



HAL
open science

Implication de la voie p53 dans les syndromes d'insuffisance médullaire

Romane Durand

► **To cite this version:**

Romane Durand. Implication de la voie p53 dans les syndromes d'insuffisance médullaire. Biologie cellulaire. Université Paris sciences et lettres, 2020. Français. NNT : 2020UPSLT002 . tel-03174869

HAL Id: tel-03174869

<https://theses.hal.science/tel-03174869>

Submitted on 19 Mar 2021

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.



THÈSE DE DOCTORAT
DE L'UNIVERSITÉ PSL

Préparée à l'Institut Curie

**Implication de la voie p53 dans les syndromes
d'insuffisance médullaire**

Soutenue par

Romane DURAND

Le 02 septembre 2020

Ecole doctorale n°515

Complexité du vivant

Spécialité

Biologie cellulaire

Composition du jury :

Nathalie DOSTATNI
Professeur, Institut Curie

Présidente

Filippo ROSSELLI
Directeur de recherche, Institut Gustave Roussy

Rapporteur

Emmanuelle HUILLARD
Chargée de recherche, Institut du Cerveau

Rapporteuse

Franck TOLEDO
Professeur, Institut Curie

Directeur de thèse

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin au bon déroulement de ma thèse et qui m'ont aidée lors de la rédaction de ce manuscrit.

J'adresse tout d'abord mes très sincères remerciements aux membres de mon jury de thèse pour l'intérêt qu'ils ont porté à mon travail. Je voudrais remercier Filippo Rosselli et Emmanuelle Huillard qui ont spontanément accepté d'être rapporteurs de ce manuscrit et m'ont fait l'honneur d'évaluer mon travail. J'aimerais également remercier Nathalie Dostatni qui m'a apporté de nombreux conseils au cours de mon Master et a accepté avec enthousiasme de présider ce jury.

Toute ma reconnaissance va ensuite, à mon directeur de thèse, Franck Toledo, qui m'a accordé toute sa confiance en m'accueillant dans son laboratoire, en me permettant d'intégrer son équipe et en m'offrant l'opportunité de poursuivre mes recherches dans le cadre d'une thèse. Merci de m'avoir permis de travailler sur des projets si passionnants et prometteurs, qui ont mené à la publication d'un article dans une excellente revue scientifique. Merci également pour tous tes conseils dans la rédaction de ce manuscrit.

Je souhaiterais remercier ensuite mon co-encadrant de thèse, Boris Bardot, pour ses conseils précieux, ses encouragements et sa grande disponibilité à mon égard. Merci d'avoir toujours pris le temps de discuter avec moi de mes projets et de mes résultats, de m'avoir apporté ton expérience personnelle et professionnelle et pour m'avoir conseillée sur mon avenir professionnel. J'ai toujours apprécié ta justesse et ta gentillesse. Ta confiance m'a donné la force d'affronter cette épreuve difficile qu'est la thèse.

J'aimerais à présent remercier les membres de l'équipe avec qui j'ai été amené à travailler et qui ont été un véritable soutien dans la réalisation de cette thèse.

Éléonore, je n'aurais pu réaliser cette thèse sans toi. Tu as été initialement mon encadrante en Master. Grâce à ta pédagogie exemplaire, tu m'as appris à être rigoureuse dans les expériences et mon raisonnement scientifique. Merci pour ta patience, tes conseils et ta gentillesse. J'ai été chanceuse de travailler avec une si bonne co-équipière. Je ne te remercierai jamais assez pour tous les moments que nous avons passés ensemble pendant ces deux ans, pour ton soutien permanent et tes encouragements. Tu as fait une très belle thèse ; tu es forte et brillante et je sais qu'une carrière exceptionnelle t'attend dans le monde de la recherche.

Vincent, ta bonne humeur, tes conseils avisés et le partage de ton expérience de laboratoire avec moi m'ont été très profitables. Merci pour tous les clonages et les génotypages réalisés pour nos projets, pour toutes nos discussions scientifiques, ton esprit d'analyse et toutes tes suggestions qui m'ont permis de mener à bien mes projets.

Anne, ta curiosité et ton esprit critique m'ont toujours amenée à me poser les bonnes questions sur mes projets. Tu as pris le temps de discuter avec moi de mes résultats, de l'avancement de ma thèse et de mon projet professionnel. Merci aussi pour toutes nos discussions non scientifiques qui m'ont rappelé qu'il y a une vie en dehors de la thèse.

Eliana, tu es un véritable rayon de soleil dans ce laboratoire. J'ai énormément apprécié ta bonne humeur, tes petites attentions et tes encouragements. J'ai beaucoup aimé travailler et passer du temps à tes côtés. Tu es une jeune femme courageuse, attentive et brillante qui mérite de se faire confiance. Je n'ai aucun doute sur le fait que tu feras une très belle thèse.

Pierre, j'ai su que nous serions co-équipiers et amis le jour où tu es arrivé au laboratoire. Merci de m'avoir toujours soutenue dans les moments difficiles et d'avoir toujours trouver les mots justes pour me faire sourire et m'aider à relativiser. Ta présence m'a manquée à chaque fois que tu n'étais pas au laboratoire. Je te souhaite beaucoup de courage pour la suite de ta thèse.

Sara, j'aurais tant souhaité travailler plus longtemps à tes côtés. Merci pour tout ce que tu m'as apporté. Tu es une jeune femme brillante, courageuse et déterminée et j'ai adoré débiter dans ce laboratoire à tes côtés. Tu as su partager ton expérience avec moi et tu as toujours été à l'écoute et de bon conseil.

Rachida, je suis très heureuse d'avoir pu travailler à tes côtés. Merci pour ton humour et ton honnêteté. Tu as été, pour moi, un véritable rayon de soleil dans cette équipe. Tu as été un soutien sans faille au cours de ma thèse. Un grand merci pour ta gentillesse et tous tes encouragements.

Vitalina, nous avons seulement passé quelques mois ensemble mais j'ai été ravie d'être ta co-équipière. Nous ne travaillions pas sur les mêmes projets et, pourtant, je pouvais compter sur toi à tout instant. Un grand merci pour tous les bons moments passés ensemble.

J'aimerais à présent remercier toutes les personnes de l'UMR3244 qui ont joué un rôle important lors de mes années de thèse. Merci à Arturo Londoño-Vallejo pour m'avoir accueillie dans son unité, et Antonin Morillon pour avoir toujours été à l'écoute et avoir suivi le bon déroulement de mon travail. Merci à Irena pour nous avoir transmis son expertise sur les télomères et pour tous ses conseils. Merci à tous ceux qui m'ont aidée et conseillée lors de mes

expériences, qui m'ont prêté leurs protocoles et leurs produits, qui m'ont formée pour certains appareils. Je pense notamment à Mike, Mylène, Irina, Fatemeh, Emilia, Win-Yan et Anne de l'équipe Londono, Alexandra, Arnaud, Dipti et Céline de l'équipe Borde, Marina, Nicolas, Anna, Maxime, Dominika et Julien de l'équipe Morillon. Merci à tous ceux avec qui j'ai passé de très bons moments, me permettant de m'évader quelques instants. Merci à Marie-France pour sa gentillesse infinie et toutes les discussions que nous avons eues ensemble. Merci à Olivia, Karina et Lélia pour tous leurs sourires et leurs attentions.

J'aimerais aussi remercier chaleureusement les membres de mon comité de thèse, Jérôme Authier, Vincent Mouly et Stephan Vagner, pour leur suivi et leurs nombreux conseils me permettant de me poser les bonnes questions sur mes projets.

Je souhaiterais aussi remercier une personne qui s'est avérée essentielle dans la poursuite de ma thèse, Emmanuelle Mouchel-Vielh, la directrice de l'École doctorale. Vous m'avez constamment encouragée, soutenue et conseillée dans mes moments de doute. Votre présence à mes côtés a toujours été un immense réconfort et m'a donné la force de continuer.

Enfin, je remercie tous les membres de l'équipe animalerie et notamment Paul, Aurélia, Maxime, Isabelle, Mickaël et Casper, mais également Gabriel et Renaud de la plateforme d'histopathologie et Zocia et Sophie de la plateforme de cytométrie.

Enfin, cette thèse n'aurait pas été possible sans le soutien inconditionnel de ma famille et de mes proches. Merci à mes parents, Corinne et Patrick, de m'avoir toujours conseillée et supportée au cours de ces trois dernières années (et dans ma vie). Merci à ma petite sœur, Athénaïs, d'avoir cru en moi quand je n'y croyais pas moi-même ! Merci à ma sœur aînée, Laura, pour son soutien et tous ses bons conseils. Merci à vous tous de m'avoir motivée lorsque je ne croyais plus pouvoir avancer et de m'avoir soutenue lorsque j'étais accablée par le stress et le doute. Merci à mon ami Sébastien pour son soutien psychologique inconditionnel. Merci à mes amis du Discord (et à ma guilde !), loin des yeux mais toujours à mes côtés, vous avez été un soutien exceptionnel lors de la rédaction de mon manuscrit. Merci de m'avoir toujours renvoyé travailler la journée lorsque mon cerveau refusait de fonctionner et de m'avoir changé les idées lorsque le besoin de s'évader s'en faisait sentir. C'est grâce à votre soutien, votre générosité, vos conseils et votre confiance permanente que je suis arrivée au bout de ce défi.

Merci.

RÉSUMÉ

TP53 est le gène le plus fréquemment muté dans les cancers humains. Il code pour le facteur de transcription p53, bien connu aujourd'hui pour son rôle dans la suppression tumorale. Néanmoins, au cours de ces dernières années, p53 est apparue comme une protéine avec une grande variété de fonctions. En effet, elle est impliquée dans de nombreux processus physiologiques tels que le développement, le vieillissement ou la fertilité.

Grâce à un modèle murin qui exprime une protéine p53 tronquée de son domaine C-terminal, mon équipe a découvert qu'une suractivation de p53 peut conduire à une répression de nombreux gènes du métabolisme télomérique. Ceci entraîne un raccourcissement des télomères et le développement de phénotypes caractéristiques de la Dyskératose Congénitale (DC), un syndrome d'insuffisance médullaire héréditaire. Des expériences réalisées *in vitro* suggéraient que ce rôle de p53 dans le métabolisme des télomères soit conservé chez l'humain et qu'une altération de la voie p53 pourrait être à l'origine des formes idiopathiques de la DC. Toutefois, cette dernière hypothèse restait à démontrer car aucune mutation de p53 ou de ses principaux régulateurs n'avait encore jamais été associée à la DC.

Au cours de ma thèse, j'ai caractérisé les effets d'une mutation de *MDM4*, codant pour un des principaux régulateurs négatifs de p53, identifiée chez une famille présentant des phénotypes proches de la DC. A l'aide de modèles murins, j'ai contribué à démontrer que cette mutation conduit à une suractivation de p53, une insuffisance médullaire et un raccourcissement des télomères. L'ensemble de ces résultats a fourni des preuves convaincantes qu'une mutation d'un régulateur spécifique de p53 peut provoquer des phénotypes de DC chez l'Homme.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	1
RÉSUMÉ.....	4
TABLE DES MATIÈRES.....	5
LISTE DES FIGURES.....	8
LISTE DES ABBRÉVIATIONS.....	9
INTRODUCTION.....	10
PARTIE I : DÉRÉGULATIONS DE LA VOIE P53 DANS LES CANCERS.....	11
1) Cancer et processus de tumorigenèse	11
1)1) Généralités sur le cancer	11
1)2) Processus de tumorigenèse.....	11
1)3) Oncogènes et suppresseurs de tumeur	13
2) Généralités sur la protéine p53	14
2)1) Découverte de la protéine p53	14
2)2) Famille <i>TP53</i>	15
2)3) Régulation de p53.....	17
3) p53, un facteur de transcription.....	18
3)1) Structure modulaire	18
3)1)1) Région N-terminale	18
3)1)2) Région centrale	19
3)1)3) Région C-terminale	19
3)2) Transactivation des gènes cibles	21
4) p53, un suppresseur de tumeur majeur	22
4)1) p53 : le gardien du génome	22
4)2) Altération de p53 dans les cancers	24
4)2)1) Mutations germinales de p53	25
4)2)2) Mutations « hotspots » de p53	25
4)3) Polymorphismes de p53	27
5) MDM2 et MDM4, les principaux régulateurs négatifs de p53.....	28
5)1) Généralités sur MDM2 et MDM4	28
5)1)1) Historique de MDM2 et MDM4.....	28
5)1)2) Structure de MDM2 et MDM4	29
5)1)3) Régulation de p53 par MDM2 et MDM4.....	31
5)1)3)1) Deux modèles de régulation	31
5)1)3)2) Maintien d'un niveau basal de p53 en condition normale	33
5)1)3)3) Levée de l'inhibition de p53 après un stress génotoxique	35
5)2) MDM2 et MDM4 dans les cancers	37
5)2)1) Dérégulations de MDM2 et MDM4.....	37
5)2)2) Expression d'isoformes alternatives dans les cancers	38
5)2)3) Fonctions oncogéniques indépendantes de p53	40
5)2)4) Polymorphismes de MDM2 et MDM4	41

PARTIE II : AUTRES FONCTIONS PHYSIOLOGIQUES ET PATHOLOGIQUES DE LA VOIE P53	43
1) p53 et développement	43
2) p53 et vieillissement	46
3) p53 et fertilité	50
4) p53 et syndromes d’insuffisance médullaire	53
4)1) Généralités sur les syndromes d’insuffisance médullaire.....	53
4)2) Les principaux syndromes d’insuffisance médullaire	55
4)2)1) La Dyskératose congénitale.....	55
4)2)1)1) La Dyskératose Congénitale, un syndrome télomérique.....	55
4)2)1)2) Les causes génétiques de la Dyskératose Congénitale	56
4)2)2) L’Anémie de Fanconi.....	58
4)2)3) L’Anémie de Blackfan-Diamond	61
4)2)4) Le syndrome de Shwachman-Diamond.....	63
4)3) Implication de p53 dans les syndromes d’insuffisance médullaire.....	64
4)3)1) La souris $p53^{A31/A31}$, un modèle de Dyskératose Congénitale	65
4)3)2) Le modèle $p53^{A31/A31}$ et anémie de Fanconi	68
4)3)3) Que sait-on du rôle de p53 dans les syndromes d’insuffisance médullaire chez l’Homme ?	69

RÉSULTATS71

“Germline mutation of MDM4, a major p53 regulator, in a familial syndrome of defective telomere maintenance”, Science Advances, 202075

DISCUSSION108

PARTIE I : SURACTIVATION DE P53 DANS LES SYNDROMES D’INSUFFISANCE MEDULLAIRE.....109

1) Activation de p53 et développement de phénotypes de Dyskératose Congénitale	109
1)1) Rôle controversé de p53 dans le métabolisme télomérique	109
1)2) Mutations de <i>PARN</i> chez des patients souffrant de Dyskératose Congénitale	111
1)3) Mutation de <i>MDM4</i> chez une famille souffrant d’un syndrome télomérique	113
2) Implication de la voie p53 dans d’autres syndromes d’insuffisance médullaire	115
2)1) Mutations germinales de <i>TP53</i> chez des patients présentant des signes d’une anémie de Blackfan-Diamond.....	115
2)2) Implication de la voie p53 dans l’Anémie de Fanconi	117

PARTIE II : IMPLICATION DE LA VOIE P53 DANS DES SYNDROMES DEVELOPPEMENTAUX	120
<u>1) Modèles murins de suractivation de p53 : effets sur le développement et le vieillissement.....</u>	120
1)1) Conséquences des mutations activatrices p53 ^{A31} et Mdm4 ^{T454M} chez la souris	120
1)2) Autres modèles murins de suractivation de p53	122
<u>2) Rôle d'une suractivation de p53 dans des syndromes développementaux humains..</u>	124
2)1) Mutations de <i>TP53</i> , <i>MDM2</i> et <i>MDM4</i> chez des patients présentant des anomalies du développement et des signes de vieillissement prématuré.....	124
2)2) Suractivation de p53 : événement secondaire ou cause principale de syndromes développementaux humains ?	125
2)3) Implication potentielle d'une suractivation de p53 dans des syndromes développementaux humains.....	127
2)3)1) Anomalies crâniofaciales du syndrome de Treacher-Collins.	127
2)3)2) Anomalies cardiovasculaires dans le syndrome de délétion 22q11.2..	128
2)3)3) Anomalies du tube neural dans le syndrome de Waardenburg de type 1.....	129
2)3)4) Le syndrome CHARGE.....	130
<u>3) Résumé et perspectives.....</u>	131
CONCLUSIONS	133
BIBLIOGRAPHIE.....	136

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Caractéristiques des cellules cancéreuses.

Figure 2 : Structure de la protéine p53.

Figure 3 : p53, le gardien du génome.

Figure 4 : Structure de deux protéines homologues, MDM2 et MDM4 (MDMX).

Figure 5 : Régulation de p53 par MDM2 et MDM4 (MDMX) via une boucle de rétrocontrôle négative.

Figure 6 : Les caractéristiques du vieillissement.

Figure 7 : Relation entre p53, raccourcissement télomérique et vieillissement.

Figure 8 : Structure des télomères

Figure 9 : Causes génétiques de l'anémie de Fanconi, des mutations germinales dans des gènes de la réparation de l'ADN.

Figure 10 : Causes génétiques de la DBA et cancers associés.

Figure 11 : Causes génétiques du SDS : des mutations dans des protéines impliquées dans la maturation de l'unité 60S, notamment SDBS, DNAJC21 et EFL1.

Figure 12 : Analyse phénotypique des souris $p53^{\Delta31/\Delta31}$.

Figure 13 : Raccourcissement des télomères chez les souris $p53^{\Delta31/\Delta31}$.

Figure 14 : *Dkc1*, *Rtll*, *Tinf2*, et *Terf1* sont réprimés par $p53^{\Delta31}$.

Figure 15 : Rôle controversé de p53 dans le métabolisme télomérique.

Figure 16 : Mutations germinales de *TP53* chez des patients montrant des signes de DBA.

Figure 17 : Modèles murins de suractivation de p53.

Tableau 1 : Rôle de la famille p53 dans le développement.

Tableau 2 : Des SNPs de la voie et de la famille p53 ont été associés à une diminution de la fertilité chez l'humain.

Tableau 3 : Caractéristiques cliniques des principaux syndromes d'insuffisance médullaire.

Tableau 4 : La perte de p53 peut rétablir le phénotype de plusieurs modèles murins de syndromes développementaux humains.

LISTE DES ABBRÉVIATIONS

ADN : acide désoxyribonucléique
ARN : acide ribonucléique
ARNm : ARN messenger
CTD (C-terminal domain) : domaine C-terminal
DBA (Diamond-Blackfan anemia) : anémie de Blackfan-Diamond
DBD (DNA binding domain) : domaine de liaison à l'ADN
DC (Dyskeratosis Congenita) : Dyskératose Congénitale
E7,5 : 7,5 jours de développement embryonnaire
EMT (epithelio-mesenchymal transition) : transition épithélio-mésenchymateuse
FA (Fanconi anemia) : anémie de Fanconi
FISH (fluorescent in situ hybridization) : hybridation in situ en fluorescence
FL (full-length) : protéine entière
HHS (Hoyeraal-Hreidarsson syndrome) : syndrome de Hoyeraal-Hreidarsson
IBMFS (inherited bone marrow failure syndromes) : syndromes d'insuffisance médullaire héréditaires
iPSCs (induced pluripotent stem cells) : cellules souches pluripotentes induites
KO (knock-out) : inactivation d'un gène
MDM2 : murine double minute 2
MDM4 : murine double minute 4
MEFs (mouse embryonic fibroblasts) : fibroblastes embryonnaires murins
NES (nuclear export signal) : signal d'export nucléaire
NLS (nuclear localization signal) : signal de localisation nucléaire
NoLS (nucleolar localization sequence) : signal de localisation nucléolaire cryptique
OD (oligomerization domain) : domaine d'oligomérisation
PRR (proline-rich region) : domaine riche en prolines
SAC (spindle assembly checkpoint) : point de contrôle de l'assemblage du fuseau
SDS (Shwachman-Diamond syndrome) : syndrome de Shwachman-Diamond
SNP (single nucleotide polymorphism) : polymorphisme nucléotidique
TAD (transactivation domain) : domaine de transactivation
TP53 : tumor protein 53
Trp53 : transformation-related protein 53
UTR (untranslated region) : région non traduite
UV : ultraviolet
WT (wild-type) : sauvage

INTRODUCTION

PARTIE I : DÉRÉGULATIONS DE LA VOIE P53 DANS LES CANCERS

1) Cancer et processus de tumorigénèse

1)1) Généralités sur le cancer

Le cancer est une maladie provoquée par la transformation de cellules qui deviennent anormales et prolifèrent de façon excessive. Ces cellules échappent aux mécanismes de régulation qui assurent habituellement le développement harmonieux de notre organisme. En se multipliant de façon anarchique, elles donnent naissance à des tumeurs qui se développent en envahissant puis en détruisant les tissus et les organes qui les entourent. Elles peuvent parfois se détacher et migrer par les vaisseaux sanguins et lymphatiques pour envahir les tissus voisins et former d'autres tumeurs appelées métastases. C'est en détruisant son environnement que le cancer peut devenir un réel danger pour la survie de l'organisme.

Le cancer constitue aujourd'hui un enjeu mondial de santé publique puisqu'il s'agit de la deuxième cause de mortalité dans le monde, après les maladies cardiovasculaires, avec une estimation, pour l'année 2015 de 17,5 millions de personnes atteintes de cancer et de 8,7 millions de décès liés à cette maladie. Le nombre de personnes touchées est en progression constante, comme l'indique l'augmentation du nombre de cas de 33 % entre 2005 et 2015 (Fitzmaurice et al., 2017). Selon plusieurs études, cette tendance pourrait se maintenir et le cancer pourrait devenir dans quelques dizaines d'années la principale cause de mortalité dans le monde, notamment en raison du vieillissement de la population, de la croissance démographique et de l'adoption de mode de vie aggravant les risques de cancers (tabac, alcool, alimentation, surpoids...). Dans la plupart des pays développés, le cancer est déjà la première cause de mortalité. C'est le cas notamment en France où, selon l'Institut National du Cancer, le nombre total de nouveaux cas a été estimé, en 2018, à 382 000. Chez les hommes, 204 600 nouveaux cas (54 %) ont été détectés avec une majorité de cancers de la prostate, du poumon et colorectaux. Chez les femmes, c'est 177 400 nouveaux cas (46 %) qui ont été estimés avec une prévalence de cancers du sein, colorectaux et du poumon.

1)2) Processus de tumorigénèse

Un cancer est une maladie complexe qui se met en place sur plusieurs années et qui résulte de l'accumulation d'altérations génétiques et épigénétiques qui apparaissent au sein d'une cellule et des cellules qui en découlent. En effet, nos cellules subissent quotidiennement de nombreuses agressions qui endommagent leur matériel génétique. Ces agressions peuvent

avoir une origine environnementale (exposition à des carcinogènes, rayonnements, virus...) ou provenir de facteurs génétiques (mutations germinales et somatiques, réarrangements chromosomiques...) ou épigénétiques. En règle générale, des points de contrôle efficaces existent dans la cellule et des mécanismes de réparation interviennent pour rétablir ces anomalies. En cas de dommages trop importants, d'autres mécanismes peuvent déclencher la mort de la cellule ou l'empêcher de se diviser pour éviter de propager les anomalies. Si une cellule anormale passe au travers des mailles du filet, elle peut aussi, dans certains cas, être repérée et éliminée par le système immunitaire.

Cependant, il est parfois possible qu'une cellule déjoue ces systèmes de surveillance et parvienne à se multiplier pour créer une descendance qui possède les mêmes altérations. Tout comme le mécanisme darwinien de l'évolution, qui suggère que les espèces les plus adaptées survivent dans leur environnement, les anomalies génétiques et épigénétiques conférant un avantage sélectif de prolifération et de survie cellulaire vont être maintenues. Ces altérations vont pouvoir s'accumuler au fur et, à mesure du temps et progressivement, vont conduire à une reprogrammation de la cellule qui va complètement perdre le contrôle des divisions cellulaires. Les cellules qui accumulent ces altérations vont alors se multiplier plus vite que les autres et se développer au détriment des cellules voisines, pour former une tumeur.

Bien que chaque tumeur soit unique, on considère aujourd'hui que les cellules tumorales partagent un ensemble de caractéristiques communes (« hallmarks » en anglais) (Figure 1). Ainsi l'autosuffisance en signaux de croissance, l'insensibilité aux signaux inhibiteurs de la croissance, la capacité à éviter l'apoptose, la capacité à se répliquer indéfiniment, l'induction de l'angiogenèse et la capacité à former des métastases permettent aux cellules cancéreuses de survivre, proliférer et de se disséminer. La dérégulation du métabolisme énergétique cellulaire et la capacité à éviter une destruction par le système immunitaire ont été reconnues, plus récemment, comme deux autres caractéristiques importantes. Enfin l'inflammation et l'instabilité du génome qui favorise l'apparition de nouvelles mutations sont deux autres critères importants favorisant le développement tumoral (Hanahan et Weinberg, 2011). Cette vision intégrée des cancers a changé notre façon de percevoir leurs traitements et les stratégies anti-tumorales mises en place aujourd'hui tentent de cibler simultanément plusieurs de ces caractéristiques de façon à limiter au maximum la progression tumorale et la dissémination métastatique (Bailón-Moscoso et al., 2014).

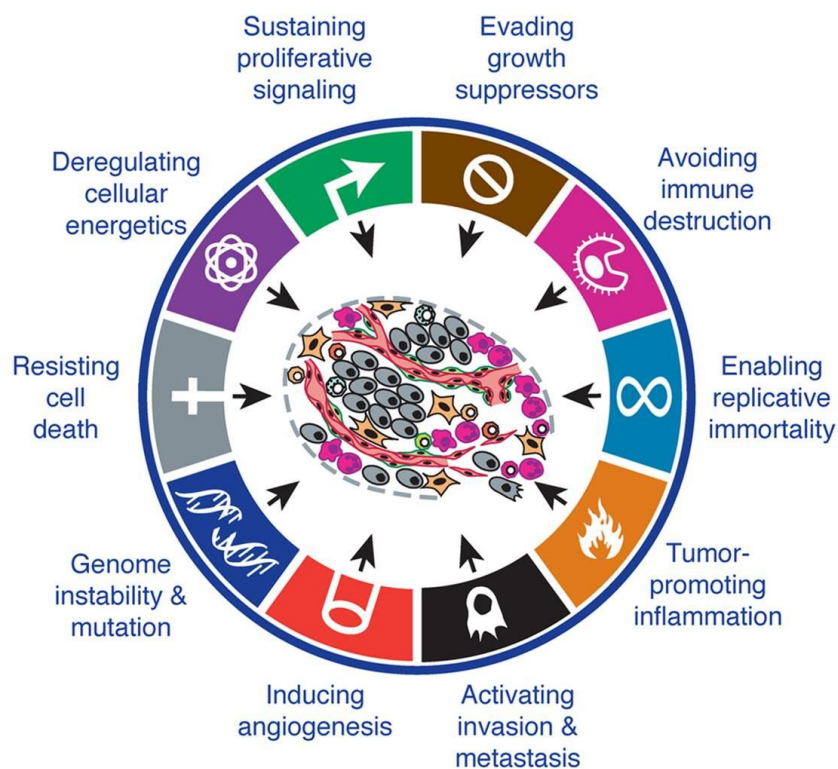


Figure 1 : Caractéristiques des cellules cancéreuses. Les cellules cancéreuses peuvent survivre, proliférer et se disséminer grâce à leur autosuffisance en signaux de croissance, leur insensibilité aux signaux inhibiteurs de la croissance, leur capacité à éviter une destruction par le système immunitaire, à se répliquer indéfiniment, à favoriser l’inflammation, à former des métastases et à induire l’angiogenèse, mais aussi grâce à leur instabilité génomique, leur capacité à éviter l’apoptose et à déréguler le métabolisme énergétique. D’après (Hanahan et Weinberg, 2011).

1)3) Oncogènes et suppresseurs de tumeur

Les altérations qui surviennent au sein d’une cellule ne sont pas toujours synonymes de cancer car elles ne fournissent pas nécessairement un avantage sélectif de prolifération et de survie cellulaire. Dans le cas du cancer, c’est souvent la mutation de gènes critiques, comprenant des oncogènes, des gènes suppresseurs de tumeur et des gènes impliqués dans la réparation de l’ADN qui va conduire à une instabilité génétique et à une perte progressive du contrôle des divisions. Les oncogènes sont des gènes dont l’expression favorise la survenue d’un cancer. Ils résultent de l’activation de gènes normaux, appelés proto-oncogènes, impliqués dans le contrôle des divisions cellulaires. Suite à leur activation en raison d’une mutation, amplification génique ou autre, ils vont stimuler la division et entraîner une prolifération désordonnée des cellules. L’oncogène MYC par exemple, parmi les plus connus, est capable, chez la souris lorsqu’il est surexprimé, d’induire une forte incidence de lymphomes B (Harris et al., 1988). La modification d’un seul allèle est suffisante pour activer un oncogène.

A l'inverse, certains gènes sont capables de réguler négativement la prolifération cellulaire : ce sont les gènes suppresseurs de tumeurs. Contrairement aux oncogènes dont l'activité est fortement augmentée dans les cellules cancéreuses, les gènes suppresseurs de tumeur vont subir une perte de leur fonction. Pour cela, il est nécessaire que les deux copies du gène soient inactivées (mutations ponctuelles, modifications épigénétiques...). Pour qu'un gène soit formellement considéré comme un suppresseur de tumeur, au moins un critère supplémentaire est requis : des mutations germinales de ce gène doivent conférer une susceptibilité au cancer chez l'Homme, ou sa perte de fonction dans un modèle animal doit conduire au développement de tumeurs *in vivo*. Le gène *TP53* codant pour la protéine p53, qui est muté dans plus de la moitié des cancers, remplit tous ces critères (Vogelstein et Kinzler, 2004, 2015).

2) Généralités sur la protéine p53

2)1) Découverte de la protéine p53

Depuis sa découverte en 1979, près de 100 000 publications ont été recensées sur la protéine p53. D'après les résultats de recherches PubMed, alors qu'une centaine d'articles étaient publiés à son sujet en 1990, il y a trente ans, c'est désormais entre 4 000 et 6 000 articles qui sont publiés chaque année sur cette protéine, soit environ 14 par jour. L'histoire de cette protéine a débuté en 1979, année durant laquelle elle a été découverte de façon surprenante par quatre équipes de recherche différentes (Lane et Crawford, 1979 ; Linzer et Levine, 1979 ; De Leo et al., 1979 ; Kress et al., 1979). A cette époque, de nombreuses équipes s'intéressaient à l'origine virale des cancers. Elles souhaitaient comprendre comment des virus comme le SV40 ou le Papillomavirus pouvaient entraîner le développement de tumeurs chez l'Homme ou mener à la transformation de cellules en culture. C'est en recherchant les mécanismes biologiques sous-jacents qu'ils ont alors identifié une protéine de 53 kDa, d'origine cellulaire, capable d'interagir avec l'antigène T du virus SV40. Suite au constat que cette protéine était surexprimée dans de nombreuses cellules tumorales et qu'elle était aussi capable de former des complexes avec des protéines exprimées par d'autres virus tumoraux (adénovirus, papillomavirus...), la protéine p53 a été initialement identifiée comme un oncogène. Elle était donc suspectée d'accompagner, via sa surexpression, le virus dans le processus de transformation tumorale. Cependant, dans les dix années ayant suivi sa découverte, d'autres équipes de recherche ont constaté que p53 était induite en réponse aux dommages à l'ADN (Maltzman and Czyzyk, 1984) et qu'elle était altérée chez des patients souffrant de leucémies et dans plusieurs lignées de cellules tumorales, ce qui prendra son importance bien plus tard.

C'est ensuite, entre 1988 et 1994, que l'on a remis en question l'identification de p53 en tant qu'oncogène. En effet, Levine et Oren ont démontré que l'ADNc de p53 WT pouvait inhiber la transformation tumorale de cellules de rat en culture. Par ailleurs, le laboratoire de Vogelstein et d'autres ont révélé qu'on retrouvait de nombreuses mutations ponctuelles de p53 dans des carcinomes colorectaux et d'autres cancers. Dans la plupart des cas, un allèle de p53 était perdu tandis que l'autre était muté, ce qui correspondait totalement à la définition d'un suppresseur de tumeur (Lane et Levine, 2010). Il a également été constaté que l'on retrouvait de nombreuses mutations de p53 chez les personnes souffrant du syndrome de Li-Fraumeni de prédisposition au cancer (Malkin et al., 1990). Finalement, c'est la création de souris p53 KO qui a démontré cette hypothèse puisque ces souris présentent une forte hausse de l'incidence de cancer et développent principalement des lymphomes et des sarcomes (Donehower et al., 1992 ; Armstrong et al., 1995 ; Donehower, 2009 ; Lozano, 2010). Dans les années qui ont suivi, les études portant sur l'activation de p53, en réponse aux dommages à l'ADN et son effet sur le cycle cellulaire et l'apoptose notamment, lui ont valu le titre de « *gardien du génome* ». La complexité sur cette protéine s'est fortement accentuée lorsque l'on a découvert qu'elle faisait partie d'une famille de protéines, incluant p63 et p73, présentant de fortes ressemblances structurelles. Depuis 1995, les équipes de recherches essayent encore de comprendre toute la complexité de cette protéine, de ses fonctions à sa régulation, en vue de développer de nouvelles thérapies anti-tumorales.

2)2) Famille TP53

La notion d'une famille *TP53* a été proposée il y a plus de vingt ans, après la découverte de deux gènes homologues à *TP53* : *TP63* et *TP73* (Aylon et al., 2011). Les trois gènes présentent de fortes homologies de séquence et de structure ce qui suggère qu'ils dérivent d'un même gène. Au cours de l'évolution, le gène ancestral, dont *TP63* est le plus proche, aurait subi deux duplications successives : la première donnant naissance à *TP53*, la seconde aboutissant à l'apparition de *TP73* (Belyi et al., 2010). Ces deux événements ont eu lieu tard dans l'évolution puisque seuls les vertébrés possèdent les trois gènes (Caron de Fromentel et al., 2012).

Les trois membres de cette famille ont une structure modulaire similaire qui inclut un domaine de transactivation (TAD), un domaine de liaison à l'ADN (DBD) et un domaine d'oligomérisation (OD). Ainsi, les protéines p63 et p73 sont capables de former des oligomères, de lier l'ADN et de transactiver des gènes cibles de p53. Elles sont capables d'induire les mêmes réponses que p53 aux dommages à l'ADN tels que l'arrêt du cycle

cellulaire, la sénescence et l'apoptose et également de coopérer avec p53 dans un réseau d'interactions complexes (Dotsch et al., 2010). Chacun de ces trois gènes est exprimé sous forme de multiples isoformes protéiques générées par la présence de promoteurs alternatifs, de multiples sites d'initiation de la traduction et de sites d'épissage alternatif (Kaghad et al., 1997 ; Yang et al., 1998 ; Inoue et Fry, 2014). En effet, *TP73* est capable d'exprimer au moins deux types d'isoformes : TAp73 qui possède un domaine de transactivation complet et Δ Np73 dont le domaine de transactivation est tronqué. Il peut également exprimer les isoformes $\Delta 2$, Δ 'N, $\Delta 2/3$ à la suite d'un épissage alternatif en 5' et les isoformes α , β , γ , ζ , δ , ϵ et η par un épissage alternatif en 3' (Candi et al., 2014). *TP63*, quant à lui, peut générer des isoformes TAp63 et Δ Np63 à partir de deux promoteurs distincts et les isoformes α , β , γ , δ et ϵ par épissage alternatif en 3'. En général, les isoformes TA exercent des fonctions similaires à celles de p53 pour la suppression tumorale en raison de leur capacité à transactiver des gènes cibles de p53. Les isoformes Δ N, quant à elles, sont capables de se lier à l'ADN mais ne peuvent pas transactiver les gènes cibles de p53, ce qui peut leur conférer un rôle dominant négatif, inhibiteur de l'activité transcriptionnelle de p53 (Inoue et Fry, 2014 ; Meek, 2015). Les protéines p73 et p63 ont également des fonctions biologiques spécifiques et distinctes de p53. p73, par exemple, exerce un rôle majeur au cours du développement des systèmes nerveux et olfactif (Poznia et al., 2000), tandis que p63 joue un rôle majeur dans le développement des cellules épithéliales (Candi et al., 2008).

Le gène *TP53* lui-même code pour au moins 12 isoformes différentes (Khoury et Bourdon, 2010). Ces isoformes ont en commun le domaine de liaison à l'ADN mais elles présentent des domaines N-terminaux et C-terminaux différents. Elles sont exprimées différemment dans les tissus normaux et sont souvent dérégulées dans les cancers humains, suggérant des fonctions biologiques variées (Vieler et Sanyal, 2018). Par exemple, la surexpression de l'isoforme $\Delta 40p53\alpha$ dans des cellules issues d'un carcinome hépatocellulaire déficientes pour p53 inhibe la prolifération cellulaire (Ota et al., 2017) suggérant un effet suppresseur de tumeur. A l'inverse, l'isoforme $\Delta 133p53\beta$, dont l'expression chez des patientes atteintes de cancer du sein est associée à une mortalité plus élevée, favorise l'invasion cellulaire (Gadea et al., 2016). Le gène *Trp53* murin code lui pour au moins 6 isoformes différentes. La séquence des gènes *TP53* humain et *Trp53* murin 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 leurs homologues p63 et p73). Ainsi, les souris de laboratoire semblent être un modèle pertinent pour étudier la complexité de la voie p53.

2)3) Régulation de p53

Dans les cellules non stressées, la protéine p53 est maintenue à un faible niveau et son temps de demi-vie est de quelques minutes seulement. En réponse à divers stress, p53 est stabilisée et activée et régule alors l'expression de nombreux gènes de façon à éviter la prolifération de cellules dont le génome est altéré. Du fait de ses effets cytotoxiques et cytostatiques, la protéine p53 doit être finement régulée. Les protéines MDM2 et MDM4, souvent surexprimées dans les cancers, sont les principaux régulateurs négatifs de p53 (Toledo et Wahl, 2006). MDM2 est une E3 ubiquitine ligase qui régule plutôt la stabilité de p53 en induisant son ubiquitination et sa dégradation par le protéasome. MDM4 qui présente de fortes homologues avec MDM2 va plutôt inhiber l'activité transcriptionnelle de p53. La régulation de p53 par MDM2 et MDM4 est détaillée dans le chapitre 5) de cette première partie. Si ces deux protéines jouent un rôle majeur dans la régulation de p53, elles ne sont pas les seules. En effet, plusieurs centaines de protéines interviendraient dans sa régulation, rajoutant ainsi un niveau de complexité supplémentaire sur nos connaissances de ce suppresseur de tumeur majeur. La protéase HAUSP, par exemple, est capable de dé-ubiquitiner p53 et d'assurer ainsi sa stabilisation (Kon et al., 2010 ; Sarkari et al., 2010). De nombreuses E3 ubiquitines ligases comme MDM2 interviennent également dans la régulation de p53 (Sane et Rezvani, 2017). Les protéines COP1, PIRH2 et TRIM28, par exemple, sont capables de favoriser l'ubiquitination de p53 et de contribuer ainsi à sa dégradation (Wang et al., 2011a), tandis que les protéines TRIM13 et TRIM19 ciblent MDM2, conduisant à sa dégradation et à une stabilisation de p53 (Joo et al., 2011). En plus de l'ubiquitination, p53 est aussi soumise à d'autres modifications post-traductionnelles qui peuvent moduler l'activité et la stabilité de la protéine telles que la phosphorylation, l'acétylation ou la méthylation à travers les différents domaines de la protéine. L'acétylation du domaine C-terminal de p53 par CBP/p300, par exemple, semble nécessaire pour la stabilisation de p53 et son activation (Akihiro et al., 2001) ; et la phosphorylation du domaine N-terminal de p53 semble être impliquée dans l'activation de p53 suite à des signaux de stress (Bode et Dong, 2004).

Bien que la régulation post-traductionnelle de p53 ait été fortement étudiée, on sait également que p53 peut être régulée au niveau post-transcriptionnel. PARN, par exemple, est une poly-A-ribonucléase qui pourrait réguler les niveaux ARNm de p53 via des micro-ARN (Zhang et al., 2015). RPL26, une protéine ribosomale, serait capable de se lier à la région 5' UTR de l'ARNm de p53 et augmenterait ainsi sa traduction (Chen et Kastan, 2010). De façon surprenante, il a été proposé que MDM2 pourrait aussi directement agir sur l'ARNm de p53 et favoriser sa

traduction (Karakostis et al., 2016). Il a également été montré *in vitro* que des G-quadruplex dans la région 3' UTR du pré-ARNm de p53 favoriseraient l'expression de p53 en réponse aux dommages à l'ADN (Decorsière et al., 2011 ; Newman et al., 2017). De plus, des G-quadruplex dans l'intron 3 du pré-ARNm de p53 pourraient avoir un impact sur l'expression d'isoformes spécifiques de p53 (Marcel et al., 2011 ; Perriaud et al., 2014). Finalement, la régulation de p53 est très complexe et fait intervenir de très nombreux mécanismes et protéines qui doivent encore être étudiés pour comprendre pleinement le fonctionnement de p53.

3) p53, un facteur de transcription

3)1) Structure modulaire

La protéine p53 est un facteur de transcription, codé par le gène humain *TP53*, situé sur le bras court du chromosome 17 (17p13.1). La protéine canonique est constituée de 393 acides aminés et a un poids moléculaire de 53 kDa, à l'origine de son nom. Comme la plupart des facteurs de transcription, p53 présente une structure modulaire constituée de différents domaines fonctionnels (Figure 2). On distingue ainsi deux domaines de transactivation (TAD1/2 : Transactivation Domain 1/2), un domaine riche en proline (PRR : Proline Rich Region), un domaine de liaison à l'ADN (DBD : DNA Binding Domain), un domaine d'oligomérisation (OD : Oligomerisation Domain) et enfin un domaine C-terminal régulateur (Joerger et Fersht, 2010 ; Sullivan et al., 2018). Chez la souris, le gène *Trp53* est localisé sur le chromosome 11. Il code pour une protéine de 390 acides aminés ayant une séquence et structure très similaire à celle de la protéine humaine (85 % d'identité).

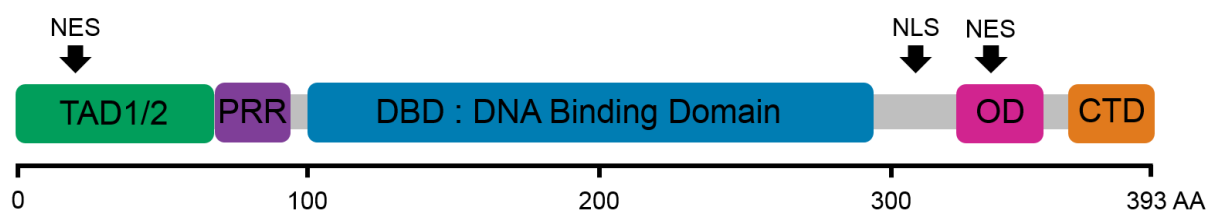


Figure 2 : Structure de la protéine p53. p53 présente en N-terminal deux domaines de transactivation (TAD1/2) et un domaine riche en prolines (PRR). La région centrale correspond au domaine de liaison à l'ADN (DBD). En C-terminal, p53 contient un domaine d'oligomérisation (OD) et un domaine C-terminal (CTD). La protéine présente plusieurs signaux d'export nucléaire (NES) et un signal d'import (NLS).

3)1)1) Région N-terminale

La région N-terminale de p53 comprend deux domaines de transactivation entre les résidus 1 et 61, responsables de l'activité transcriptionnelle de p53 (Sullivan et al., 2018). Ils

interagissent avec les composants de la machinerie transcriptionnelle ainsi qu'avec les principaux régulateurs négatifs de p53 : MDM2 et MDM4 (Joerger et Fersht, 2008). Ce domaine est souvent soumis à des modifications post-traductionnelles, notamment des phosphorylations des sérines et thréonines qui semblent être une étape essentielle dans l'activation de la transcription. C'est selon ce mécanisme notamment que les kinases ATM/ATR activent p53 après des dommages à l'ADN. De plus, dans la même région, entre les résidus 11 à 27, se trouve un signal d'export nucléaire (NES). La phosphorylation des sérines 15 et 20 en réponse aux dommages à l'ADN permet d'inhiber le NES et de séquestrer la protéine p53 dans le noyau où elle exerce sa fonction. Enfin, la région N-terminale présente un domaine riche en prolines entre les résidus 64 et 92 et contient 15 prolines et 5 motifs PXXP où P est une proline et X tout autre acide aminé. Ce domaine aurait plutôt un rôle structural et régulerait la conformation et la stabilité de p53 (Toledo et al., 2006, 2007).

3)1)2) Région centrale

La région centrale de la protéine correspond au DBD situé entre les résidus 102 et 292. Comme son nom l'indique, ce domaine va se lier à des séquences d'ADN double brin bien précises, appelées des éléments de réponses, situées en général dans les régions promotrices des gènes cibles de p53 (El-Deiry et al., 1992). La protéine se lie à ses gènes cibles sous sa forme homotétramérique. Ainsi, deux DBD se lient à un demi-site de l'élément de réponse. Sept résidus sont en contact direct avec l'ADN : K120, S241, R248, R273, A276, C277 et R280 et subissent des modifications post-traductionnelles qui peuvent moduler la liaison de p53 sur l'ADN (Kitayner et al., 2006). Chez la souris comme chez l'Homme, par exemple, l'acétylation des lysines du DBD (K117, K161, K162) semble nécessaire pour que p53 puisse induire l'arrêt du cycle cellulaire, l'apoptose ou encore la sénescence (Li et al., 2012). Dans les cancers humains, *TP53* est le plus souvent muté dans le DBD. Les mutations les plus fréquentes, appelées points chauds ou mutations « *hotspots* » ont lieu au niveau des résidus R175, Y220, G245, R248, R249, R273 et R282 (Muller et Vousden, 2013). Elles perturbent la liaison de p53 avec l'ADN et peuvent affecter des résidus se liant directement à l'ADN (mutation de contact) ou affectant la conformation de la protéine (mutation structurale).

3)1)3) Région C-terminale

La région C-terminale présente des signaux d'import et d'export nucléaire (NLS/NES) entre les résidus 305 et 322, et 326 et 356 qui assurent la mobilisation rapide de p53 entre le noyau et le cytoplasme (Stommel et al., 1999). Ces signaux sont soumis à de nombreuses

modifications post-traductionnelles et la tétramérisation de p53 masque le NES, ce qui favorise l'accumulation de p53 dans le noyau. Dans cette région, on trouve également le domaine d'oligomérisation entre les résidus 326 et 359 qui permet à p53 de se tétramériser. Certaines mutations de résidus de ce domaine, comme l'arginine 337, sont retrouvées dans les familles Li-Fraumeni, ce qui prouve son importance pour l'activité anti-tumorale de p53 (Joerger et Fersht, 2008). Enfin, le domaine C-terminal de p53 comprend les 30 derniers acides aminés de la protéine (résidus 360 à 393). Ce domaine interagit avec diverses protéines régulant la stabilité, l'activité transcriptionnelle et la localisation cellulaire de p53 (HAUSP, MDM2...) (Nakamura et al., 2000 ; Li et al., 2002). On lui attribue plutôt un rôle de régulateur et on sait qu'il est soumis à de très nombreuses modifications post-traductionnelles ayant des effets contradictoires. Le domaine C-terminal contient notamment 6 lysines chez l'Homme, 7 chez la souris, subissant de nombreuses modifications (ubiquitination, neddylation, méthylation, acétylation, sumoylation) supposées jouer un rôle dans la régulation de la réponse p53. Par exemple, la neddylation des lysines semble inhiber la transactivation alors que la sumoylation peut affecter positivement ou négativement les fonctions de p53 (Bode et Dong, 2004). L'ubiquitination de ces lysines peut contribuer à la dégradation de la protéine par le protéasome alors que leur acétylation stimule l'activité transcriptionnelle de p53. Ces modifications ont été amplement étudiées *in vitro* mais des résultats contradictoires ont été obtenus, et la création de modèles murins a été nécessaire pour mieux comprendre leur impact. Un premier modèle murin p53-7KR a d'abord semblé remettre en cause l'importance d'une acétylation ou d'une ubiquitination de ces lysines pour la stabilité et l'activité de p53. Ces souris expriment en effet une protéine p53 dont les lysines C-terminales ont été remplacées par des arginines qui ne peuvent pas subir ces modifications. L'analyse de ce modèle a montré que la protéine p53-7KR présente une activité transcriptionnelle à peine supérieure à celle de la protéine p53 sauvage (Krummel et al., 2005). Mais la délétion par notre équipe du domaine C-terminal de p53 et, plus précisément, des 31 derniers acides aminés, a établi que ce domaine joue globalement un rôle de régulateur négatif puisque la protéine délétée, p53^{Δ31}, est hyperactive (Simeonova et al., 2013). Cela a été confirmé par une autre équipe ayant réalisé une délétion plus courte du domaine C-terminal de p53 (Hamard et al., 2013). Enfin, l'analyse du modèle murin p53-KQ, exprimant une protéine p53 dont les lysines C-terminales ont été remplacées par des glutamines mimant des lysines acétylées, a montré qu'une acétylation des lysines est nécessaire pour empêcher l'interaction de p53 avec l'oncoprotéine SET qui inhibe l'activité transcriptionnelle de p53 (Wang et al., 2016 ; Kon et al., 2019).

3)2) Transactivation des gènes cibles

Comme nous l'avons vu précédemment, la protéine p53 a une structure protéique modulaire typique des facteurs de transcription. Comme l'ensemble de ces facteurs, p53 va pouvoir activer ou réprimer la transcription de gènes cibles, de façon directe ou indirecte. On estime que p53 est capable de réguler directement des centaines de gènes en se liant sous sa forme tétramérique au promoteur de ses gènes ou dans le premier intron des gènes cibles. Elle régulerait de manière indirecte des milliers d'autres gènes et de nombreuses cibles de p53 restent encore à découvrir (Beckerman et Prives, 2010). La liaison directe de p53 à ses gènes est permise grâce au domaine central de liaison à l'ADN ; elle se fait sous forme tétramérique grâce au domaine d'oligomérisation. Suite à cette liaison, les deux domaines de transactivation facilitent la transcription des gènes cibles de p53, notamment en recrutant des protéines remodelant la chromatine telles que PRMT1 et CARM1, et des histone-acétyltransférases (HATs) comme CPB/p300, afin de rendre la chromatine accessible aux composants de la machinerie transcriptionnelle (TFIID/TAFs, ARN polymérase II) (Laptenko et Prives, 2006 ; Beckerman et Prives, 2010). Ces domaines recrutent également des complexes coactivateurs comme STAGA 92 et Mediator (Gamper et Roeder, 2008 ; Meyer et al., 2010). Enfin, le domaine riche en prolines (PRR) et le domaine C-terminal (CTD) jouent des rôles régulateurs à travers des modifications post-traductionnelles et conformationnelles.

La capacité de p53 à distinguer les différents promoteurs cibles selon les stimuli est très complexe. De manière générale, 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 de gènes cibles de p53 impliqués dans la réponse apoptotique lient p53 avec une plus faible affinité mais de façon plus stable (Carvajal et Manfredi, 2013). De plus, il semblerait que les éléments de réponse perdent en potentiel transactivateur en s'éloignant du site d'initiation de la transcription et les éléments de réponse ayant une conformation flexible lient plus facilement p53. Si la reconnaissance des gènes cibles semble complexe et ajoute un niveau de régulation, la réponse transcriptionnelle elle-même est finement régulée et va dépendre de nombreux éléments comme des modifications post-traductionnelles du CTD (acétylations), le contexte épigénétique, la présence de transférases (HMTs et HATs), le recrutement de la machinerie transcriptionnelle (TFIID, TBP, TFIIA et TFIIH), des éléments en cis (MYC) etc. (Beckerman et Prives, 2010).

Si elle active la transcription de gènes cibles, p53 est également capable de réprimer des gènes, comme la *Survivine*, impliquée dans l'apoptose et la sénescence (Fischer et al., 2014), selon plusieurs mécanismes. Elle pourrait par exemple se lier aux promoteurs de ses gènes et recruter des répresseurs de la transcription. Cependant, ce mode de régulation direct est toujours discuté et remis en cause. p53 pourrait également réprimer des gènes par compétition en se liant aux éléments de réponse à la place d'activateurs de la transcription (Beckerman et Prives, 2010). Enfin, p53 est capable également de réprimer la transcription de façon indirecte. D'après des méta-analyses, le mode de répression qui semble majoritaire est la répression indirecte via la voie p53-p21-DREAM(E2F4)-CDE/CHR. En effet, p53 transactive p21, ce qui va déclencher une voie de signalisation conduisant au recrutement du complexe répresseur DREAM aux niveaux de sites CDE/CHR (Benson et al., 2014 ; Fischer et al., 2014). 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 (Fischer et al., 2016).

4) p53, un suppresseur de tumeur majeur

4)1) p53 : le gardien du génome

La voie p53 qui implique la protéine p53, ses gènes cibles et ses régulateurs est une des voies les plus complexes et les plus étudiées. L'importance cruciale de p53 dans la suppression tumorale est largement établie et démontrée par plusieurs observations. Tout d'abord, on sait que le gène *TP53* est muté dans environ 50 % des cancers sporadiques (Vogelstein et al., 2000). Dans la plupart des autres cancers, on retrouve des surexpressions de MDM2 ou MDM4, les principaux régulateurs négatifs de p53 (Toledo et Wahl, 2006). De plus, les mutations germinales de *TP53* provoquent le syndrome de Li-Fraumeni de prédisposition au cancer (Malkin et al., 1990). Enfin, les souris inactivées pour p53 développent des tumeurs avec une incidence de 100 % (Donehower et al., 1992).

Ce rôle majeur de p53 dans la suppression tumorale provient du fait que p53 est un détecteur d'une multitude de stress cellulaires tels que le stress oxydatif, la carence en nutriment, l'hypoxie, les dommages à l'ADN, l'activation d'oncogènes, les dysfonctionnements ribosomiques ou encore l'érosion des télomères (Brady et Attardi, 2010). Lors d'une érosion trop importante des télomères, ou de dommages à l'ADN, par exemple, les kinases ATM/ATR sont capables d'activer p53 via la phosphorylation de son domaine transactivateur. La protéine peut alors induire différentes réponses comme l'arrêt du cycle cellulaire afin de laisser le temps à la cellule de réparer ses propres dommages (Speidel, 2015). De façon générale, la protéine

p53 est stabilisée et activée par une levée de son inhibition par ses principaux régulateurs négatifs MDM2 et MDM4. Elle peut alors réguler l'expression de nombreux gènes pour limiter la prolifération de cellules altérées (Figure 3).

La découverte que p53 est capable d'induire l'arrêt du cycle cellulaire, la sénescence et l'apoptose en réponse à divers stress lui a valu son surnom de « gardien du génome » (Lane, 1992). Après des dommages à l'ADN, p53 peut en effet induire l'arrêt du cycle en induisant la transcription de p21 qui code pour un inhibiteur de kinases dépendantes des cyclines (CDK) et qui assure un point de contrôle du cycle cellulaire pour la transition G1/S. Chez les souris déficientes pour p21, ce checkpoint est compromis mais les souris développent peu de tumeurs spontanées, suggérant que p53 peut agir sur d'autres gènes impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire (Deng et al., 1995 ; Martin-Caballero et al., 2001). Via p21, p53 peut également induire la sénescence des cellules en réponse à une activation d'oncogènes ou à un dysfonctionnement télomérique. La transactivation de p21 va en effet conduire à l'expression d'un inhibiteur des CDK, p16INK4A, et à l'activation consécutive de pRB qui va lui-même déclencher un programme transcriptionnel activant la sénescence (Kruiswijk et al., 2015). Lorsque les dommages sont trop importants, p53 peut également induire l'apoptose en activant la transcription de plusieurs gènes pro-apoptotiques de la famille des protéines BCL2 dont BAX, NOXA et PUMA (Brady et Attardi, 2010).

Ces réponses de p53 sont les plus connues car ce sont les premières à avoir été découvertes mais p53 peut induire de nombreux autres processus pour assurer la suppression tumorale (Figure 3). p53 peut, par exemple, agir directement sur la réparation de l'ADN en stimulant différents mécanismes de réparation (réparation par excision de nucléotide ou NER, réparation par excision de base ou BER, recombinaison non-homologue ou NHEJ...) via la transactivation de gènes impliqués dans ces programmes comme GADD45A, DDB2, XPC et FANCC (Biegging, 2014). Le suppresseur de tumeur peut aussi activer l'autophagie, un frein à la formation de tumeurs, en induisant un grand nombre de gènes cibles comme DRAM1, ULK1 et la cathepsine, ou en inhibant la voie mTOR et la voie PI3K-AKT (Kruiswijk, 2015). Il peut défavoriser la glycolyse qui est le mode de production d'énergie privilégié des cellules cancéreuses (effet Warburg). Il peut en effet déréguler les premières étapes de la glycolyse, en inhibant les transporteurs du glucose GLUT1 et GLUT4, ainsi que les étapes ultérieures de la glycolyse par l'induction de TIGAR (Kruiswijk, 2015). p53 peut aussi limiter la motilité et l'invasion des cellules primaires en culture et des cellules cancéreuses, inhibant ainsi la dissémination métastatique, par exemple en réprimant le gène LASP1 codant pour une protéine

d'adhésion focale (Wang et al., 2009). Le gardien du génome est aussi capable de bloquer la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT), importante pour la formation de métastases, en modulant l'expression des familles de facteurs de transcription SNAIL, TWIST et ZEB (Walerych et al., 2015). Enfin, il peut inhiber l'angiogenèse permettant aux tumeurs d'être alimentées, en transactivant par exemple des inhibiteurs de l'angiogenèse comme TSP1 (Bieging, 2014). Ainsi, p53 peut induire une myriade de réponses pour assurer ses fonctions anti-tumorales.

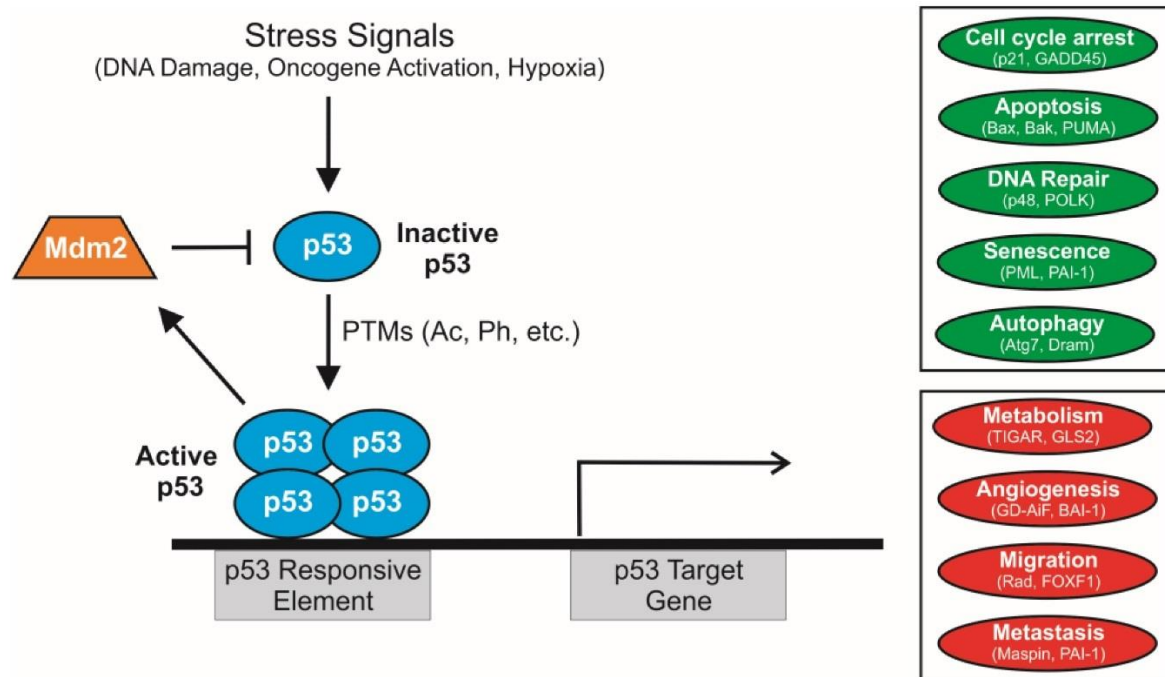


Figure 3 : p53, le gardien du génome. De nombreux stress cellulaires mènent à l'activation de p53. En conditions normales, les niveaux de p53 sont maintenus à un faible niveau par ses régulateurs négatifs comme MDM2. En cas de stress, p53 est stabilisée et activée via des modifications post-traductionnelles et sa tétramérisation. Elle se lie aux éléments de réponse de ses gènes cibles. Elle affecte alors de nombreux processus cellulaires permettant la suppression tumorale, notamment en induisant (en vert) l'expression de gènes impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire, l'apoptose, la réparation de l'ADN, la sénescence et l'autophagie, ou en inhibant (en rouge) le métabolisme, l'angiogenèse, la migration cellulaire et la formation de métastases. D'après (Reed et Quelle, 2014).

4)2) Altération de p53 dans les cancers

Les mutations somatiques de *TP53* sont les mutations les plus fréquentes dans les cancers humains (96 % de mutations de *TP53* dans les carcinomes ovariens séreux, 75 % dans les carcinomes du pancréas...) et les mutations germinales de *TP53* mènent au syndrome de Li-Fraumeni de prédisposition au cancer (Kim et al., 2015). Alors que la plupart des suppresseurs de tumeur sont inactivés à la suite d'un décalage du cadre de lecture ou d'une mutation non-

sens, le gène *TP53* est le plus souvent inactivé en raison de mutations faux-sens (Olivier et al., 2010). Ce type de mutation représente en effet 75 % des mutations somatiques de *TP53* et 77 % des mutations germinales (Huszno et Grzybowska, 2018). Par ailleurs, près de 30 % des mutations faux-sens de *TP53* ont lieu au niveau des codons essentiels pour la liaison avec l'ADN (Hainaut et Hollstein, 2000), perturbant ainsi ses capacités de transactivation.

4)2)1) Mutations germinales de p53

Des mutations germinales de *TP53* sont à l'origine du syndrome de Li-Fraumeni de prédisposition au cancer (Malkin, 1993). Ce syndrome héréditaire rare se transmet de manière autosomique dominante et prédispose au développement précoce d'ostéosarcomes, de sarcomes des tissus mous, de cancers du sein, de tumeurs cérébrales et de leucémies. Chez les familles souffrant de ce syndrome, on peut retrouver également d'autres types de cancers, comme des lymphomes, des mélanomes, des cancers du poumon et des cancers gastro-intestinaux (Nichols et al., 2001, Gonzalez et al., 2009). Les femmes présentant une mutation germinale de *TP53* sont exposées à des risques plus élevés de cancers et à des âges plus précoces que les hommes (Kamihara et al., 2014). On considère qu'une famille souffre de ce syndrome si le proband est atteint d'un sarcome avant l'âge de 45 ans, si un parent au premier degré présente un cancer avant l'âge de 45 ans et si un parent au premier ou second degré présente un cancer avant l'âge de 45 ans ou un sarcome à n'importe quel âge (Li et al., 1988). Les familles qui ne présentent qu'une partie de ces critères sont définies comme « *Li-Fraumeni Like* » (Kamihara et al., 2014).

A ce jour, plus de 250 mutations germinales de *TP53* ont été décrites dans ces familles (Huszno et Grzybowska et al., 2018) et il s'agit pour la plupart de mutations faux-sens situées dans le domaine de liaison à l'ADN (Olivier et al., 2003). Elles ont été signalées dans environ 80 % des familles atteintes du syndrome de Li-Fraumeni classique et dans 20 à 40 % des familles Li-Fraumeni-like. Dans la plupart des cas, les patients sont mutés sur un allèle et perdent au cours de leur vie le deuxième allèle dans le tissu tumoral.

4)2)2) Mutations « hotspots » de p53

Le gène *TP53* présente des mutations homozygotes dans environ 50 % des cancers humains. Environ 75 % d'entre elles sont des mutations faux-sens qui couvrent 190 codons différents localisés dans le domaine de liaison à l'ADN du gène et de la protéine (Baugh et al., 2018). Les neuf mutations les plus fréquentes sont les suivantes : R175H, Y220C, G245S, R248Q,

R248W, R249S, R273H, R273C et R282W. Elles affectent sept résidus du domaine de liaison à l'ADN. Classiquement, on distingue deux catégories de mutations « hotspots » de p53 : les mutations de contact et les mutations de structure. Les mutations de contact, telles que R273H, R273C et R282W, concernent des acides aminés impliqués dans le contact direct avec l'ADN et qui compromettent l'activité transcriptionnelle de p53. Les mutations de structure, telles que R175H, Y220C, G245S, modifient, quant à elles, la conformation tridimensionnelle de la protéine affectant ainsi sa fonction. L'existence de ces mutations hotspots peut résulter de plusieurs facteurs non exclusifs. Tout d'abord, ces mutations hotspots pourraient mener à une protéine dont la structure est altérée. De plus, des mutagènes environnementaux pourraient produire des altérations spécifiques au niveau du gène *TP53*. Par ailleurs, ces mutations pourraient survenir à des sites précis en raison de la présence de sites « hypermutables », les îlots CpG entraînant couramment des substitutions C > T. Enfin, ces mutations pourraient fournir un gain de fonction oncogénique à la protéine mutée et conférer ainsi un avantage de survie aux cellules cancéreuses (Baugh et al., 2018).

Des modèles murins ont été créés pour étudier spécifiquement l'effet de ces mutations hotspots *in vivo*. L'analyse de ces modèles murins a révélé une hétérogénéité de l'impact des mutations sur le développement tumoral chez la souris. Certaines se comportent comme des KO de p53 tandis que d'autres acquièrent de nouvelles propriétés oncogéniques. Par exemple, la mutation de structure R172H et la mutation de contact R270H (équivalentes aux mutations R175H et R273H humaines) acquièrent un gain de fonction oncogénique. Les souris portant ces mutations à l'état homozygote présentent un plus large spectre tumoral et davantage de métastases que les souris p53^{-/-}. A l'inverse, les souris portant les mutations R246S (R249S chez l'Homme) et G245S (mutant humanisé) se comportent comme des souris p53^{-/-} (Hanel et al., 2013). Cependant, les souris p53^{+/^{R246S}} montrent des phénotypes de tumorigenèse plus sévères que les souris p53^{+/-}, ce qui suggère que la protéine mutée R246S a un effet dominant-négatif sur la protéine sauvage. Cet effet peut provenir de la capacité de la protéine mutée de p53 à interagir avec la protéine sauvage pour former des hétérotétramères non fonctionnels (Muller et Vousden, 2014). Les propriétés des protéines mutées 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.

4)3) Polymorphismes de p53

Si des mutations de *TP53* sont régulièrement retrouvées dans les tumeurs, des polymorphismes de *TP53* faisant varier l'expression, la stabilité ou l'activité de la protéine pourraient eux aussi jouer un rôle dans les cancers. Le variant p53PIN3 (rs17878362), par exemple, correspond à une insertion ou une duplication de 16 nucléotides (ACCTGGAGGGCTGGGG) dans l'intron 3 de *TP53*. L'allèle portant une copie de cette séquence est nommé A1 tandis que l'allèle portant deux copies est noté A2. Il a été constaté que l'allèle A2 est associé à un risque accru de cancers colorectaux et à une diminution des niveaux des ARNm de p53 d'après l'analyse de plusieurs lignées lymphoblastoïdes (Germignani et al., 2004). D'après une méta-analyse, les individus A2A2 ont globalement un risque accru de cancers comparés aux individus A1A1, mais ces résultats sont en réalité variables en fonction des populations étudiées et du type de cancer (Sagne et al., 2013). Parmi tous les polymorphismes de *TP53* pouvant jouer un rôle dans les tumeurs, les SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) de *TP53* ont été particulièrement étudiés. Les SNPs constituent la forme la plus abondante de variations génétiques dans le génome humain et représentent plus de 90 % de toutes les différences entre individus. C'est un type de polymorphisme de l'ADN dans lequel deux chromosomes diffèrent sur un segment donné par une seule paire de bases. On considère qu'une modification sur un seul nucléotide est un SNP lorsqu'on la retrouve dans plus de 1 % de la population générale. Ces modifications, nombreuses sur *TP53*, sont localisées principalement dans les introns, en dehors des sites d'épissage ou dans des régions exoniques non codantes. D'après la banque de données « IARC TP53 », plus de 85 SNPs de *TP53* ont été identifiés dans la population humaine et plus de 400 variants ont été validés. Les conséquences cliniques de la majorité de ces SNPs sont encore mal connues mais certains pourraient jouer un rôle dans les cancers.

Le SNP de *TP53* le plus souvent mentionné est le SNP P72R (rs1042522) : une variation G/C à la deuxième position du codon 72 dans l'exon 4 peut conduire à une protéine portant soit une arginine (R72), soit une proline à la position 72 (P72) (Olivier et al., 2010 ; Ortiz et Lozano, 2018 ; Huzno et Grzybowska, 2018). Le variant R72 est plus fréquent chez les patients caucasiens, tandis que le variant P72 est plus fréquent chez les patients chinois et afro-américains (Beckman et al., 1994, Langerod et al., 2002). D'après des études *in vitro* sur des cellules cancéreuses humaines et des fibroblastes de rat, le variant P72 serait plus efficace après des dommages à l'ADN pour induire l'arrêt du cycle cellulaire, la sénescence et la réparation de l'ADN (Pim et Banks, 2004 ; Siddique et Sabapathy, 2006 ; Frank et al., 2011). Le variant R72 serait, quant à lui, plus efficace pour induire l'apoptose (Dumont et al., 2003). Des analyses

in vivo à partir de souris Hupki ont montré que ces variants induisent en réalité l'apoptose et la sénescence de façon tissu-spécifique (Azzam et al., 2011 ; Kung et al., 2016). L'exposition aux rayonnements induit par exemple une apoptose accrue dans l'intestin grêle des souris R72 par rapport aux souris P72. A l'inverse, cette apoptose est plus importante dans le thymus des animaux P72 (Azzam et al., 2011).

Des études épidémiologiques humaines ont révélé un effet modeste mais significatif de ce polymorphisme dans plusieurs types de cancers, notamment ceux des poumons, de la prostate et du sein (Alawadi et al., 2011 ; Bonafé et al., 2003, Papadakis et al., 2002 ; Rogler et al., 2011). Cependant, une méta-analyse plus récente ne conclut pas à un effet notable pour toutes les situations (Khan et al., 2015). Comme pour les souris Hupki, le polymorphisme P72R aurait en réalité des effets variables en fonction des cellules et des tissus chez l'Homme et ne serait pas associé à un risque accru pour tous les types de cancer et pour toutes les populations (Denisov et al., 2012 ; Khan et al., 2015). D'après la banque de données « IARC TP53 », bien d'autres polymorphismes de *TP53* pourraient jouer un rôle dans les cancers, comme les variants rs78378222 et rs35850753 qui ont été associés à un risque accru de neuroblastomes dans plusieurs populations (Diskin, 2014). Finalement, les SNP de *TP53* mériteraient d'être étudiés davantage afin de mieux comprendre leurs effets sur les fonctions anti-tumorales de p53 et pourraient être utilisés comme des outils pronostics et thérapeutiques intéressants.

5) MDM2 et MDM4, les principaux régulateurs négatifs de p53

5)1) Généralités sur MDM2 et MDM4

5)1)1) Historique de MDM2 et MDM4

Le gène *Mdm2* (Murine double minute 2) a été découvert par le laboratoire de Donna George en 1987 dans une lignée de cellules murines, spontanément transformées (3T3DM), qui contenait une amplification de ce gène dans des fragments d'ADN « double-minutes » (fragments supplémentaires d'ADN, externes aux chromosomes, permettant aux cellules tumorales de mieux s'adapter à leur environnement) (Cahilly-Snyder et al., 1987). Ce gène a été rapidement identifié comme un oncogène car il a été montré que sa surexpression dans des cellules NIH3T3 ou des cellules de rats conduit à leur transformation en cellules tumorales (Fakharzadeh et al., 1991). Le premier indice sur les fonctions de *Mdm2* est apparu lorsqu'on a découvert que cette protéine est capable de se lier au suppresseur de tumeur p53 et d'inhiber ses capacités de transactivation (Momand et al., 1992 ; Oliner et al., 1992). Par la suite, *MDM2*

a été identifié comme un gène cible de p53, ce qui a permis de mettre en évidence une boucle de rétrocontrôle négative (Montes de Oca Luna et al., 1995 ; Barak et al., 1993). Le rôle essentiel de Mdm2 dans la régulation de p53 a été mis en évidence grâce à l'analyse de modèles murins. En effet, le KO de Mdm2 chez la souris entraîne une létalité embryonnaire, qui est sauvée sur un fonds génétique p53 KO (Montes de Oca Luna et al., 1995 ; Jones et al., 1995). En plus d'inhiber la capacité transactivatrice de p53, il a été montré que MDM2 peut conduire à la dégradation de la protéine grâce à ses fonctions d'E3 ubiquitine ligase (Haupt et al., 1997, Kubbutat et al., 1997, Honda et al., 1997). Par la suite, il a été constaté qu'en réponse à de nombreux stress, comme des dommages à l'ADN ou l'hypoxie, l'interaction entre MDM2 et p53 est rompue ce qui contribue à l'activation de p53 et lui permet de réaliser ses fonctions anti-tumorales (Lavin et Gueven, 2006).

MDM4 a été découvert, presque 10 ans après son homologue MDM2, à partir du criblage d'une banque d'expression d'ADNc visant à identifier des nouveaux partenaires de la protéine p53 (Shvarts et al., 1996). Rapidement, il a été établi que MDM4 interagit également avec MDM2 (Sharp et al., 1999, Tanimura et al., 1999). La stabilité de MDM4 est régulée par MDM2 (Pereg et al. 2005), et il a également été proposé que MDM4 pourrait jouer un rôle dans la stabilité de MDM2, mais cela est moins clairement établi (Stad et al., 2001 ; Gu et al., 2002 ; Toledo et Wahl, 2006 ; Linares et al., 2007). Mdm4 s'est avéré être aussi important que Mdm2 dans le développement embryonnaire car les souris KO pour *Mdm4* présentent également une létalité embryonnaire qui est sauvée sur un fonds p53 KO (Parant et al., 2001 ; Migliorini et al., 2002). De façon intéressante, MDM2 et MDM4 présentent une forte homologie de séquence, avec une organisation similaire de leurs domaines protéiques.

5)1)2) Structure de MDM2 et MDM4

La protéine MDM2 humaine est une E3 ubiquitine ligase codée par le gène *MDM2* situé sur le bras long du chromosome 12 (12q13-14). Il s'agit d'une protéine de 491 acides aminés comprenant plusieurs domaines fonctionnels (Figure 4).

La région N-terminale de MDM2 contient le domaine d'interaction avec p53, entre les résidus 18 et 101, qui joue un rôle clé pour inhiber l'activité transcriptionnelle de p53. Dans la région centrale se trouvent un signal de localisation nucléaire (NLS) à la position 178 et un signal d'export nucléaire (NES) à la position 192. Le domaine acide central, entre les résidus 237 et 288, joue un rôle crucial dans la dégradation de p53 (Kawai et al., 2003 ; Meulmeester et al., 2003). Il est suivi par un domaine en doigts de zinc (289 – 331), censé faciliter les interactions

avec diverses protéines, y compris les protéines ribosomales et nucléolaires, ainsi que le suppresseur de tumeur p14ARF. La région C-terminale de MDM2 comprend un domaine RING (Really Interesting New Gene) entre les acides aminés 436 et 482, un signal de localisation nucléolaire cryptique (NoLS) entre les résidus 466 et 473 et un domaine C-terminal entre les résidus 485 et 491 qui joue un rôle dans les interactions entre domaines RING (Poyurovsky et al., 2007 ; Clegg et al., 2008). Le domaine RING de MDM2 est responsable de l'activité E3 ubiquitine ligase de la protéine et cette fonction est notamment importante pour maintenir un niveau bas de p53 pendant l'embryogenèse puisque des mutations ponctuelles dans ce domaine entraînent une létalité embryonnaire comparable à celle observée lors d'une délétion entière du gène (Clegg et al., 2008).

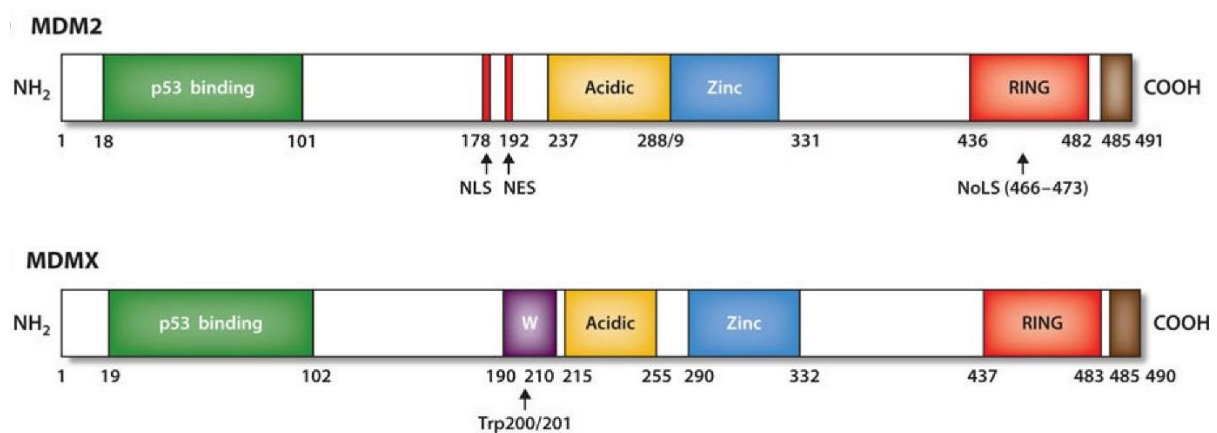


Figure 4 : Structure de deux protéines homologues, MDM2 et MDM4 (MDMX). MDM2 et MDM4 présentent une organisation similaire de leurs domaines fonctionnels. Ces protéines partagent un domaine de liaison à p53 (« p53 binding ») dans la région N-terminale, un domaine acide (« Acidic ») et un motif en doigts de zinc (« Zinc ») dans la région centrale et un domaine RING (« RING ») dans la région C-terminale. Le domaine RING de MDM2 a une activité d'E3 ubiquitine ligase non partagée par MDM4. MDM2 présente plusieurs signaux de localisation cellulaire (NLS, NES et NoLS) tandis que MDM4 présente un motif WWW (« W ») qui inhibe l'interaction avec p53. Figure issue de (Karni-Schmidt et al., 2016).

En réalité, bien qu'il existe un domaine d'interaction avec p53 dans la région N-terminale de MDM2, il a été montré que p53 et MDM2 interagissent au niveau de 3 régions. Tout d'abord, le domaine de transactivation de p53 est capable d'interagir avec le domaine N-terminal de MDM2. Cette interaction joue un rôle essentiel pour inhiber la liaison de p53 à la machinerie transcriptionnelle (Lin et al., 1994). D'autres études ont montré que le domaine acide central de MDM2 est capable d'interagir avec le domaine de liaison à l'ADN de p53. Cette interaction est nécessaire pour l'ubiquitination de p53 menant à sa dégradation. Par ailleurs, elle entraînerait un changement conformationnel de p53 l'empêchant de se lier à l'ADN (Cross et al., 2011). Enfin, un troisième point de contact existe entre le domaine N-terminal de MDM2

et le domaine C-terminal de p53 car la délétion de cette région ou des modifications post-traductionnelles peuvent altérer l'interaction avec MDM2 (Poyurovsky et al., 2010).

La protéine MDM4 est une protéine homologue de MDM2, de 490 acides aminés codée par le gène *MDM4/MDMX/HDMX* situé sur le chromosome 1. Tout comme MDM2, elle présente, dans la région N-terminale, un domaine d'interaction avec p53, entre les résidus 19 et 102 importants pour inhiber l'activité transcriptionnelle de p53. MDM4 ne présente pas de signaux de localisation (NLS, NoLs ou NES) comme MDM2 et, par conséquent, elle est localisée préférentiellement dans le cytoplasme. Cependant, en s'associant avec différents partenaires comme MDM2, elle peut être transportée dans le noyau. Dans la région centrale, MDM4 présente un domaine acide entre les résidus 215 et 255 et un domaine en doigts de zinc entre les résidus 290 et 332. Dans cette région se trouve également un motif « WWW » entre les résidus 190 et 210 (Bista et al., 2013). La délétion de ce domaine entraîne une interaction 32 fois plus importante de MDM4 avec p53. Ce motif est capable de se lier au domaine N-terminal de MDM4 et d'empêcher ainsi son interaction avec p53. Les différents domaines fonctionnels de MDM2 et MDM4 sont très bien conservés entre l'Homme et la souris (Tan et al., 2017) plaçant ainsi la souris comme un modèle pertinent pour étudier la complexité de la voie p53.

5)1)3) Régulation de p53 par MDM2 et MDM4

5)1)3)1) Deux modèles de régulation

Les protéines MDM2 et MDM4 ont été très étudiées pour leur capacité à interagir avec p53 et réguler son activité. Deux modèles ont été proposés pour ces interactions (Shadfan et al., 2012) (Figure 5). Selon un premier modèle, MDM2 et MDM4 auraient des fonctions distinctes et réguleraient de manière complémentaire l'activité de p53 : MDM2 agirait essentiellement sur la stabilité de p53 en induisant sa dégradation par le protéasome tandis que MDM4 régulerait plutôt l'activité transcriptionnelle de la protéine. Selon le second modèle, MDM2 et MDM4 interagiraient ensemble pour former un complexe qui serait plus efficace pour réguler négativement p53. D'après des études *in vitro* et l'analyse de nombreux modèles murins, MDM2 et MDM4 pourraient, en effet, avoir des fonctions qui leur sont propres mais également agir de concert pour réguler finement l'activité de p53.

Plusieurs observations encouragent l'existence du premier modèle de régulation. Tout d'abord, les souris *Mdm4* KO et *Mdm2* KO présentent une létalité embryonnaire qui est sauvée sur un fonds *p53* KO. Les souris *Mdm2* KO meurent cependant au stade de la préimplantation, autour

de 5,5 jours de développement embryonnaire, en raison d'une apoptose massive et les souris *Mdm4* KO décèdent un peu plus tard, entre 7,5 et 9,5 jours de développement embryonnaire en raison d'un arrêt du cycle cellulaire accéléré et d'une apoptose accrue. Puisqu'une létalité embryonnaire est observée lors de la perte de Mdm2 ou de Mdm4, cela suggère que les deux protéines ne sont pas redondantes : l'une ne peut pas compenser l'absence de l'autre ; elles doivent donc avoir des fonctions distinctes (Marine et al., 2006). De plus, les souris *Mdm2* KO peuvent être sauvées via l'inactivation du facteur pro-apoptotique Bax tandis que les souris *Mdm4* KO sont partiellement sauvées via l'inactivation de p21, ce qui suggère que la létalité embryonnaire implique des processus p53-dépendants différents et que Mdm2 et Mdm4 se complètent pour empêcher une apoptose et un arrêt du cycle cellulaire exacerbés au cours du développement (Chavez-Reyes et al., 2003 ; Steinman et al., 2004a). Ainsi, bien qu'elles partagent une structure très similaire, les deux protéines peuvent avoir des fonctions bien distinctes. Nous avons vu précédemment que MDM2 présente une activité E3 ubiquitine ligase qui n'est pas partagée par MDM4. On sait également que MDM2 peut perturber la liaison de p53 sur l'ADN grâce à son domaine acide (Cross et al., 2011) alors que celui de MDM4 ne perturbe que légèrement cette interaction. De plus, MDM4 peut provoquer des changements conformationnels de p53 empêchant sa dégradation par le protéasome après des dommages à l'ADN, ce qui contribuerait à sa stabilisation et son activation (Di Conza, et al., 2012), une fonction qui n'est pas partagée par MDM2. Par ailleurs, MDM4 présente un motif WWW, absent de MDM2, qui entrerait en compétition avec p53 pour la liaison au domaine N-terminal de MDM4, suggérant un mécanisme de régulation supplémentaire pour MDM4. L'existence de fonctions distinctes de MDM2 et MDM4 est également démontrée dans de nombreux cancers humains ne présentant pas de mutations de p53. En effet, les tumeurs surexprimant *MDM2* sont distinctes de celles surexprimant *MDM4*. *MDM4*, par exemple, est surexprimé dans certains cancers du côlon contrairement à *MDM2*. De la même façon, *MDM4* est amplifié dans les rétinoblastomes contrairement à *MDM2*, suggérant ainsi des rôles différents de ces protéines dans la réponse au stress et la tumorigenèse (Toledo et Wahl, 2006 ; Perry, 2010 ; Laurie et al., 2006).

Selon le second modèle, les protéines MDM2 et MDM4 sont capables d'interagir pour former des hétérodimères via leurs domaines RING/doigts de zinc (Sharp et al., 1999, Tanimura et al., 1999). Ceux-ci se formeraient plus facilement que des homodimères de MDM2 (Wang et al., 2007). Il a été proposé qu'ils soient nécessaires pour poly-ubiquitiner p53 afin de mener à sa dégradation tandis que MDM2 ne pourrait que mono-ubiquitiner la protéine (Wang et al.,

2011b). Dans les tissus adultes, il a été montré que l'interaction de MDM2 et MDM4 via leur domaine RING est nécessaire pour une ubiquitination et une dégradation efficace de p53 (Kawai et al., 2007 ; Linke et al., 2008). Au cours du développement embryonnaire, la formation de cet hétérodimère joue un rôle crucial, comme le démontre l'analyse de souris exprimant une protéine Mdm4 délétée de son domaine RING. Il a été en effet montré que la protéine Mdm4^{ΔRING} est incapable d'interagir avec Mdm2 d'une part, et d'autre part, que les souris Mdm4^{ΔRING/ΔRING} présentent une létalité embryonnaire, similaire à un KO de *Mdm4* (Pant et al., 2011). De la même façon, la mutation Mdm4^{C462A} qui perturbe l'interaction de Mdm4 avec Mdm2 entraîne une létalité embryonnaire chez la souris (Huang et al., 2011). Comme pour les souris Mdm4^{-/-}, le phénotype des souris Mdm4^{ΔRING/ΔRING} et Mdm4^{C462A/C462A} est sauvé sur un fonds p53 KO suggérant que la formation d'un hétérodimère est nécessaire pour maintenir de faibles niveaux de p53. Toutefois, l'observation de la dégradation efficace d'une p53 hypomorphe dans des fibroblastes embryonnaires *Mdm4* KO (Toledo et al., 2006) suggère que d'autres mécanismes peuvent intervenir pour réguler p53 et compenser l'absence d'hétérodimères Mdm2/Mdm4.

5)1)3)2) Maintien d'un niveau basal de p53 en condition normale

La protéine MDM2 joue un rôle essentiel pour maintenir les niveaux de p53 à un niveau basal, que ce soit dans les cellules non stressées ou après un stress génotoxique (Iwakuma et Lonzano, 2003 ; Jain et Barton, 2010 ; Meek et Anderson, 2009). La protéine p53 est dégradée par le protéasome après avoir subi une ubiquitination par cette protéine au niveau de plusieurs lysines du domaine C-terminal (notamment K370, K372, K373, K381, K382 et K386) et du DBD (Chan et al., 2006). MDM2 contribue également à la dégradation de p53 en permettant une interaction directe entre p53 et le protéasome (Kulikov et al., 2010). Enfin, MDM2 régule également les fonctions de p53 en modulant son transport du noyau vers le cytoplasme via sa mono-ubiquitination et sa sumoylation (Barak et al., 1994).

Le gène *MDM2* contient deux promoteurs : P1 et P2. Le promoteur P1 est actif de façon constitutive, tandis que le promoteur P2 contient deux sites de liaison de p53 et est activé en réponse à de nombreux stress cellulaires (Barak et al., 1994 ; Wu et al., 1993). C'est via ce promoteur que p53 assure la transcription du gène *MDM2* assurant ainsi une boucle de rétrocontrôle négative (Figure 5). Cette régulation est essentielle pour garder un faible niveau de p53 dans les cellules non stressées, mais également pour rétablir ce faible niveau après un stress. Un équilibre est donc nécessaire entre ces deux protéines et il a été observé que celui-ci

doit être maintenu aussi bien à l'échelle d'une population de cellules (Lahav et al., 2004) qu'au niveau d'une cellule unique (Hu et al., 2007a). Des études *in vivo* ont montré que cette boucle de rétrocontrôle est particulièrement importante dans les cellules hématopoïétiques pour réguler l'activité de p53, principalement en réponse à des dommages à l'ADN (Pant et al., 2013). Un élément de réponse de p53 a, de la même façon, été identifié dans le promoteur de *MDM4*, formant une autre potentielle boucle de rétrocontrôle (Wei et al., 2006). Ce promoteur mène à la production d'une protéine MDM4 avec 18 résidus supplémentaires dans la région N-terminale qui interviendrait dans l'ubiquitination de p53 par MDM2 et permettrait ainsi de réduire le niveau de p53 après un stress (Phillips, et al., 2010). Ces boucles de rétrocontrôle sont essentielles pour éviter que p53 soit activée de façon excessive et induise l'arrêt du cycle cellulaire, la sénescence ou encore l'apoptose de cellules normales.

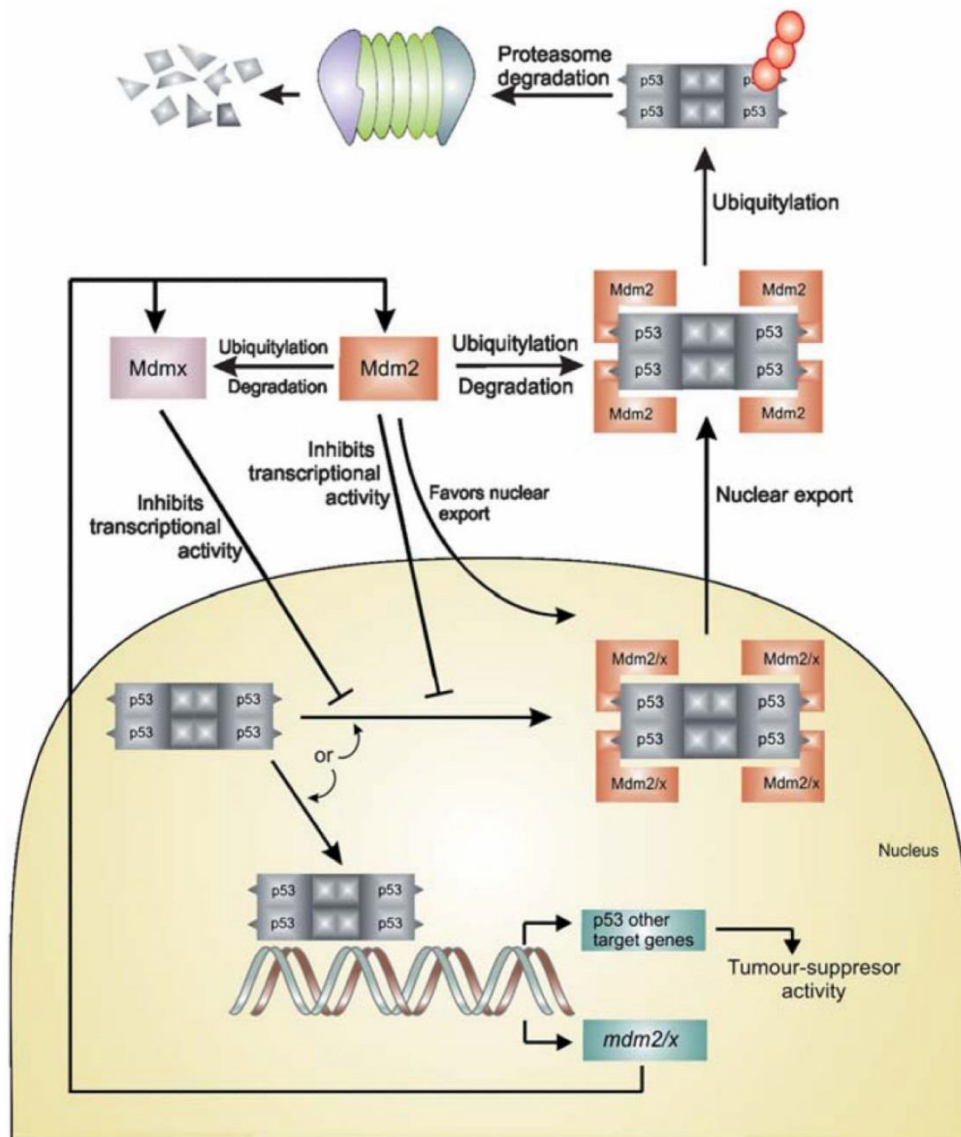


Figure 5 : Régulation de p53 par MDM2 et MDM4 (MDMX) via une boucle de rétrocontrôle négative. D'après (Khoury et al., 2011).

De nombreux modèles murins de KO conditionnels ont été générés pour mieux comprendre comment les protéines Mdm2 et Mdm4 interviennent pour maintenir un niveau bas de p53 dans les tissus (Moyer et al., 2017). Il a été constaté que la perte de *Mdm2* dans un tissu est généralement plus délétère que la perte de *Mdm4*, suggérant un rôle prépondérant de Mdm2 dans la régulation de p53. Chez les souris adultes, l'inactivation de *Mdm2* dans les cellules musculaires lisses entraîne par exemple une morbidité en moins de 10 jours, associée à une hausse des niveaux de p53 et de certains de ses gènes cibles comme p21. A l'inverse, l'inactivation de *Mdm4* dans les cellules musculaires lisses ne semble pas avoir d'effet particulier (Boesten et al., 2006). Dans le système nerveux, en revanche, la délétion de *Mdm2* ou de *Mdm4* autour de 10,5 jours de développement embryonnaire (E10,5) provoque une létalité embryonnaire qui est sauvée sur un fonds p53 KO (Grier et al., 2006 ; Xiong et al., 2006). La délétion concomitante de *Mdm2* et de *Mdm4* entraîne des phénotypes plus sévères que la délétion de *Mdm2* seule, ainsi qu'une activité p53 plus forte, suggérant que Mdm2 et Mdm4 coopèrent dans ce système pour contrôler p53 (Xiong, 2013). Dans le cœur en développement, la délétion de *Mdm2* à E7,5 entraîne une létalité embryonnaire autour de E13,5 en raison d'une activation de p53 et d'une apoptose accrue. La délétion de *Mdm4* à E7,5, en revanche, n'entraîne pas de létalité embryonnaire suggérant que Mdm2, et non Mdm4, est nécessaire pour le développement normal du cœur. Cependant, chez les souris adultes, la délétion de *Mdm4* dans les cardiomyocytes induit des problèmes cardiaques, causés par une apoptose accrue et des défauts de prolifération cellulaire. Les souris meurent en moins d'un an et ces phénotypes sont rétablis sur un fonds p53 KO (Xiong et al., 2007). Ainsi, si Mdm2 seule est suffisante pour maintenir de bas niveaux de p53 au cours du développement du cœur, la présence de Mdm4 est requise pour réguler ses niveaux dans le cœur des souris adultes. Finalement, tous ces résultats suggèrent que les protéines Mdm2 et Mdm4 interviennent différemment dans les tissus normaux pour contrôler p53 et le mode de régulation peut varier au cours du développement.

5)1)3)3) Levée de l'inhibition de p53 après un stress génotoxique

Lors d'un stress tels que des dommages à l'ADN, l'activation d'oncogènes ou un stress ribosomique, la protéine p53 va être stabilisée et activée par une levée de son inhibition par ses principaux régulateurs négatifs, MDM2 et MDM4. Elle peut alors réguler l'expression de nombreux gènes pour assurer ses fonctions anti-tumorales. La levée de l'inhibition de p53 nécessite une inhibition de MDM2 et MDM4 elles-mêmes et ce processus peut impliquer de très nombreux mécanismes en fonction du stress et du contexte cellulaire.

Après des dommages à l'ADN, par exemple, des protéines sont recrutées au niveau du site de dommage et une voie de signalisation impliquant des kinases est déclenchée. Parmi elles, la kinase ATM va phosphoryler MDM2 au niveau de la sérine 395 située dans le domaine RING (Maya et al., 2001). Cette modification va altérer l'activité E3 ubiquitine ligase de MDM2 et arrêter la dégradation de p53 et son export (Mayo et Donner, 2001). Il est intéressant de noter que cette phosphorylation pourrait également permettre l'interaction de MDM2 avec l'ARNm de p53 ce qui pourrait favoriser sa traduction (Candeias et al., 2008 ; Gajjar et al., 2012). La kinase ATM peut également entraîner la phosphorylation de la tyrosine 394 de MDM2 par la kinase c-Abl, ce qui est nécessaire pour la réponse apoptotique de p53 (Goldberg et al., 2002). De plus, la kinase DNA-PK serait capable de phosphoryler MDM2 au niveau de la sérine 17 ce qui diminuerait l'affinité de MDM2 pour p53 (Mayo et al., 1997). ATM peut aussi phosphoryler MDM4, au niveau de la sérine 403 ce qui va conduire MDM2 à cibler MDM4 pour une dégradation par le protéasome (Pereg et al., 2005). Enfin, ATM pourrait mener à la phosphorylation indirecte de MDM4 au niveau des sérines 367 et 342 ce qui conduirait au transport et à la séquestration de la protéine dans le noyau (Chen et al., 2005).

Lors de l'activation d'un oncogène, ARF qui est un important régulateur de MDM2, va s'accumuler dans la cellule et l'empêcher d'induire la dégradation de p53. Plusieurs mécanismes ont été proposés pour cela. Tout d'abord, ARF pourrait séquestrer MDM2 dans le nucléole et l'empêcher ainsi d'interagir avec p53 pour l'inhiber (Weber et al., 1999, Tao et Levine, 1999). Il a aussi été montré que ARF pourrait inhiber directement l'activité E3 ubiquitine ligase de MDM2 (Geyer et al., 2000, Honda et Yasuda, 1999). Enfin, il pourrait mener à une sumoylation de MDM2 ce qui perturberait ses fonctions (Xirodimas et al., 2002). Comme pour les dommages à l'ADN, MDM2 ne va plus cibler p53 et son affinité va être modifiée de telle sorte qu'elle cible MDM4 pour son ubiquitination, ce qui va mener à sa dégradation (Pan et Chen, 2003).

Enfin, un stress ribosomal est également connu pour entraîner une réponse p53 et de nombreuses études ont lié cette activation à la capacité de MDM2 à interagir avec des protéines ribosomales telles que RPL5, RPL12, RPL23 et RPS7 (Dai et Lu, 2004, Jin et al., 2004, Lohrum et al., 2003 ; Zhang et al., 2003 ; Zhu et al., 2009). Ces études, et d'autres, ont démontré qu'en cas de stress ribosomique, les protéines ribosomales peuvent se lier à MDM2 et l'inhiber, permettant ainsi l'activation de p53. Cette interaction pourrait aussi conduire à la dégradation de MDM4 (Gilkes et al., 2006).

5)2) MDM2 et MDM4 dans les cancers

5)2)1) Dérégulations de MDM2 et MDM4

Nous avons vu précédemment que *TP53* est inactivé dans plus de la moitié des cancers. Les principaux régulateurs négatifs de p53, MDM2 et MDM4, sont, à l'inverse, souvent amplifiés, surexprimés, ou les deux (Wade et al., 2013). Si l'amplification des gènes peut entraîner une augmentation de l'expression des protéines MDM2 ou MDM4, il est intéressant de noter que de nombreuses tumeurs présentent des niveaux élevés de ces deux protéines, sans augmentation de leur nombre de copies. C'est souvent le cas dans les mélanomes, les sarcomes d'Ewing et les carcinomes du colon (Gembarska et al., 2012, Pishas et al., 2011 ; Gilkes et al., 2008 ; Laurie et al., 2006). Cette surexpression peut provenir d'une stabilisation de MDM2 et MDM4 qui résulterait, elle-même, de l'activation de voies de signalisation spécifiques des cancers, ou d'une altération des voies régulant habituellement les niveaux de ces deux protéines. On sait notamment que la voie de signalisation impliquant RAS induit l'activation des facteurs de transcription ETS qui régulent eux-mêmes l'expression de MDM2 et MDM4. De façon intéressante, les carcinomes du colon et mélanomes présentent régulièrement des mutations activatrices de RAS pouvant ainsi contribuer à des niveaux anormalement élevés de MDM2 et MDM4 (Wade et al., 2013).

En 1998, une étude menée sur près de 4 000 échantillons de tumeurs a révélé que *MDM2* est amplifié dans 7 % d'entre elles et 19 types de tumeurs, avec une fréquence plus importante dans les tumeurs de tissus mous (20 %), dans les ostéosarcomes (16 %) et les carcinomes œsophagiens (13 %) (Momand et al., 1998). De nombreuses études récentes ont montré que *MDM2* est surexprimé dans de très nombreux cancers tels que des adénocarcinomes colorectaux, des lymphomes de Burkitt, des carcinomes pulmonaires, des cancers du sein et des sarcomes (Shaikh, Morano et Lee et al., 2016). Il a aussi été établi des corrélations entre les niveaux de MDM2 et MDM4, le grade de la tumeur et le pronostic vital des patients. Chez les patients atteints de mésothéliomes par exemple (cancers rare de la plèvre, du péritoine ou du péricarde), des niveaux élevés de MDM2 sont associés à une survie réduite (Mairinger et al., 2014). L'analyse de modèles murins supporte un rôle majeur de MDM2 dans la tumorigenèse. En effet, il a été montré que les souris transgéniques surexprimant *Mdm2* présentent une tumorigenèse spontanée accrue, avec un spectre de tumeurs similaires à celui des souris p53 KO, et une majorité de lymphomes (Jones et al., 1998). Cependant, cette étude et d'autres (Senturk et Manfredi, 2012) ont établi que les souris surexprimant *Mdm2*, KO pour

p53, présentent aussi une tumorigenèse accélérée, suggérant que le rôle de *Mdm2* en tant qu'oncogène peut aussi impliquer des voies indépendantes de p53 (Arena et al., 2018).

Comme *MDM2*, *MDM4* est fréquemment surexprimé dans les cancers (Toledo et Wahl 2006). En effet, de nombreuses tumeurs dans lesquelles *MDM2* est surexprimé présentent aussi une surexpression de *MDM4* tels que des sarcomes des tissus mous, des hépatoblastomes et des carcinomes à cellules urothéliales (Bartel et al., 2005, Veerakumarasivam et al., 2008 ; Arai et al., 2010). Par ailleurs, dans les rétinoblastomes présentant peu de mutations de *TP53*, une amplification de *MDM4* est très souvent à l'origine d'une inactivation du suppresseur de tumeur (Laurie et al., 2006). Une dérégulation de *MDM4* a également été observée dans les leucémies lymphocytaires aiguës (80 %) et les carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou (50 %) (Han et al., 2007, Valentin-Vega et al., 2007). De plus, une surexpression de *MDM4* a été rapportée dans environ 65 % des mélanomes humains de stade I – IV ayant maintenu une protéine p53 sauvage (Gembarska et al., 2012). Comme pour *Mdm2*, plusieurs équipes ont généré des modèles murins surexprimant *Mdm4*. Une équipe a rapporté en particulier la création de deux lignées de souris transgéniques surexprimant *Mdm4* et présentant une tumorigenèse spontanée accrue avec une prédominance de sarcomes (Xiong et al., 2010). De façon surprenante, on a attribué à *MDM4* un rôle de suppresseur de tumeur dans certains contextes. Dans les cellules déficientes pour p53, il a été montré par exemple que *MDM4* peut favoriser la suppression tumorale en empêchant le déroulement de mitoses multipolaires et donc en favorisant la stabilité des génomes (Matijasevic et al., 2008). Par ailleurs, les souris inactivées pour *Trp53* et *Mdm4* qui surexpriment *Mdm2* présentent une tumorigenèse accrue par rapport aux souris p53 KO, surexprimant *Mdm2*, suggérant de nouveau une fonction de suppresseur de tumeur de *Mdm4* (Steinman et al., 2005). Enfin, en réponse à des dommages à l'ADN, *MDM4* est transporté vers les mitochondries et favorise l'apoptose médiée par p53 dans des cellules traitées au cisplatine, un composant utilisé dans de nombreuses chimiothérapies (Mancini et al., 2009).

5)2)2) Expression d'isoformes alternatives dans les cancers

Si des mutations faux-sens de *MDM2* et *MDM4* n'ont été que rarement observées dans les tumeurs humaines, il n'est pas rare de constater des changements dans la séquence de ces protéines en raison de mécanisme d'épissages alternatifs, perturbés dans les cancers. Certaines isoformes pourraient avoir un rôle oncogénique comme le montrent les niveaux particulièrement élevés de certaines d'entre elles dans le cancer du sein invasif et le sarcome

des tissus mous (Okoro et al., 2012). L'expression aberrante de variants d'épissage de MDM2 a également été constatée dans des cancers colorectaux (Yu et al., 2012) et des carcinomes épidermoïdes oraux (Sam et al., 2012). Au moins 40 variants d'épissages de MDM2 ont été identifiés dans les cellules normales et cancéreuses mais seulement 5 d'entre eux sont traduits en protéine d'après des études *in vitro* (Okoro et al., 2013 ; Shaikh et al., 2016). En règle générale, les isoformes de MDM2 générées par épissage alternatif ont un domaine d'interaction avec p53 et un domaine acide incomplets, mais elles maintiennent le domaine RING de la région C-terminale (Bartel et al., 2004). La surexpression d'isoformes de MDM2 dépourvues du domaine d'interaction avec p53 prédispose les souris à former des tumeurs (Fridman et al., 2003). Il a par conséquent été proposé un rôle oncogénique de ces isoformes indépendant de p53. Cependant, ces résultats sont à nuancer puisque l'on sait que MDM2 et p53 n'interagissent pas uniquement via le domaine N-terminal de MDM2. Par ailleurs, une étude a suggéré que le variant MDM2-A pourrait avoir un effet sur p53 sans se lier directement à la protéine. En effet, Mdm2-A n'est pas capable de se lier à p53 et conduit à une tumorigenèse accrue *in vivo*. Cependant, la surexpression de Mdm2-A dans un modèle de souris transgénique mène à une létalité embryonnaire résultant d'une activation de p53 ; cela suggère donc que cette isoforme a bien un effet sur cette protéine. Un papier a récemment suggéré que le domaine RING de ces variants pourrait, en réalité, conserver son activité d'E3 ubiquitine ligase et conduire ainsi à l'ubiquitination de Mdm2, Mdm4 et p53, ce qui régulerait leurs niveaux protéiques. Ils joueraient ainsi un rôle majeur dans la régulation de la voie p53 (Fan et Wang, 2017).

Tout comme MDM2, de nombreux variants de MDM4 ont été identifiés tels que MDM4-S, MDM4-A, MDM4-G, MDM4-211, MDM4-Xlt1 et MDM4 -Xlt2 (Mancini et al., 2009). La plupart d'entre eux sont le résultat d'un épissage alternatif normal ou propre aux cellules cancéreuses. L'isoforme MDM4-S résulte d'un épissage alternatif existant dans les cellules sauvages qui mène à la perte de l'exon 6 et à un décalage du cadre de lecture faisant apparaître un codon stop prématuré. L'isoforme qui en résulte est une protéine plus courte que la protéine canonique, contenant le domaine de liaison à p53 et une séquence protéique courte qui lui est propre. D'après des expériences de surexpression, la protéine MDM4-S serait un inhibiteur plus fort que MDM4-FL. (Rallapalli et al., 1999, Rallapalli et al., 2003). Cela proviendrait de la capacité à MDM4-S à se localiser plus facilement dans le noyau et à avoir une meilleure affinité pour p53, notamment en raison de l'absence du motif WWW inhibiteur de l'interaction avec p53 (Rallapalli et al., 1999 ; Rallapalli et al., 2003 ; Bista et al., 2013). Ce variant a été retrouvé surexprimé dans certains carcinomes et sarcomes (Bartel et al., 2005, Bartel et al.,

2004, Prodosmo et al., 2008). La surexpression de MDM4 et MDM4-S a également été observée dans des lymphomes à cellules du manteau. Dans ces cancers, il a été suggéré que cette surexpression diminuerait les niveaux de p21 et favoriserait ainsi le maintien des divisions cellulaires (Liang et al., 2010). Mais l'effet principal de MDM4-S serait principalement de réguler négativement l'expression de MDM4-FL (Bardot et Toledo, 2017) comme le suggère l'analyse d'un modèle murin montrant que la délétion de l'exon 6 conduit à la fois à une augmentation de l'expression de MDM4-S mais aussi à une augmentation de l'activité de p53 associée à une diminution des niveaux ARNm de MDM4-FL (Bardot et al., 2015). D'autres variants de MDM4 ont été identifiés dans des cancers, notamment l'isoforme MDM4-B décrite la première fois dans le gliome humain (Wang et al., 2013) et dont les niveaux d'expression sont corrélés à la gravité du cancer.

5)2)3) Fonctions oncogéniques indépendantes de p53

Plusieurs observations suggèrent que MDM2 et MDM4 pourraient avoir des fonctions oncogéniques indépendantes de p53. En effet, nous avons vu précédemment que des souris surexprimant *MDM2*, mais KO pour p53, présentent une tumorigenèse accrue. Par ailleurs, la découverte de variants de MDM2, capables de favoriser la tumorigenèse sans pouvoir lier p53 suggère également un rôle indépendant de p53 dans les cancers (Fridman et al., 2003, Steinman et al., 2004b). On sait, par exemple, que MDM2 peut réguler de nombreuses protéines impliquées dans le cycle cellulaire, indépendamment de p53 et p21, comme Rb et FoxO3A (Manfredi, 2010). Il a été observé également que MDM2 peut induire l'expression de la protéine anti-apoptotique XIAP en favorisant sa traduction (Gu et al., 2009). Par ailleurs, lorsque MDM2 et MDM4 sont surexprimées, elles peuvent interagir avec le complexe MRN de réponse aux dommages de l'ADN, ainsi qu'avec ATM. L'interaction avec ATM ralentirait la réponse aux dommages à l'ADN, ce qui provoquerait une instabilité génomique (Carrillo et al., 2015). Par ailleurs, MDM2 peut jouer un rôle dans la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT), une étape essentielle pour la formation de métastases. Il a été montré notamment que MDM2 peut ubiquitiner l'E-cadhérine, ce qui mène à sa dégradation (Yang et al., 2006). Sachant que la perte de l'expression de l'E-cadhérine est une des caractéristiques des cellules ayant réalisées une EMT, cette découverte peut expliquer pourquoi certains cancers présentant une amplification de *MDM2* sont de mauvais pronostic (Onel et Cordon-Cardo, 2004). Ces résultats concordent avec ce qui est observé dans les échantillons de tumeurs de patientes atteintes d'un cancer du sein métastatique. En effet, dans ces tumeurs, des niveaux élevés de MDM2 ont été associés à de faibles niveaux de la protéine E-cadhérine. Cela a été confirmé

également par des données *in vitro*, montrant que la surexpression de MDM2 dans les cellules cancéreuses du sein peut perturber les contacts entre les cellules et améliorer la motilité cellulaire et le potentiel invasif (Yang et al., 2006).

5)2)4) Polymorphismes de MDM2 et MDM4

On retrouve très souvent des niveaux élevés de MDM2 et MDM4 dans les cancers, en particulier lorsque les tumeurs ont maintenu une p53 sauvage. Nous avons vu précédemment que ces niveaux pouvaient provenir d'une amplification des gènes codant ces deux protéines ou d'une surexpression. Comme pour *TP53*, de nombreux SNPs faisant varier les niveaux de MDM2 et MDM4 et leur activité pourraient jouer un rôle dans les cancers.

Par exemple, le SNP 309 correspond à une variation T/G au niveau du promoteur P2 de *MDM2*. Le variant 309G a été associé à un risque accru de cancer contrairement au variant SNP 309T. Le variant 309G provoque une liaison accrue de Sp1 au niveau de ce promoteur, conduisant à une hausse de la transcription de *MDM2* (Bond et al., 2004). Des modèles murins portant ces deux variants ont été générés et les souris exprimant le variant 309G présentent des niveaux plus élevés de Mdm2, une diminution de la réponse p53 et une tumorigenèse accélérée par rapport au souris exprimant le variant 309T (Post et al., 2010). Le variant 309G a également été associé à un risque de cancers plus précoces chez les patients souffrant du syndrome de Li Fraumeni ou présentant des cancers sporadiques tels que des sarcomes des tissus mous. Toutefois, une équipe (Ortiz et al., 2017) a montré plus récemment que le variant 309G pourrait conférer une protection contre le développement de carcinomes chez la souris. Ainsi, ce SNP de *MDM2* aurait des effets différents en fonction des tissus et du type de cancer.

Un autre polymorphisme de *MDM2*, SNP 285, pourrait impacter l'effet du SNP 309. D'après des analyses *in vitro*, le variant 285C abolirait la transcription accrue de *MDM2* observée en présence du variant 309G. Les patients portant le variant 309G présentent moins de risques de développer des cancers du sein, de l'ovaire et de l'endomètre s'ils portent le variant 285C (Xu et al., 2009). Toutefois, si de nombreuses méta-analyses ont révélé un effet de ces SNPs dans plusieurs cancers comme les carcinomes hépatocellulaires, les leucémies et les cancers colorectaux, gastriques, cervicaux, endométriaux, mammaires et autres, d'autres études ne distinguent pas toujours des effets, potentiellement en raison des tissus impactés et de l'ethnicité des patients (Barnoud et al., 2019).

Comme pour *MDM2*, des SNPs spécifiques de *MDM4* pourraient moduler son activité de régulateur négatif de p53 (Atwal et al., 2009). Le SNP 34091 (rs4245739) correspond à une variation A/C située dans la région 3' UTR de *MDM4*. Cette variation peut créer un site de liaison d'un micro ARN, miR-191, très souvent surexprimé dans les tumeurs. Le variant A ne présente pas ce site, ce qui empêche la liaison du micro ARN conduisant à des niveaux plus élevés de *MDM4* (Wynendaele et al., 2010 ; Stegeman et al., 2015 ; Basu et Murphy, 2016) et une inhibition plus forte de p53. Ce variant pourrait être ainsi associé à une tumorigenèse accrue ; une étude a en effet montré que le variant A est retrouvé très fréquemment dans les carcinomes ovariens de haut grade et non dans ceux de bas grade (Wynendaele et al., 2010). D'autres SNPs de *MDM4* ont été identifiés dans les cancers. En 2012, il été montré par exemple que le variant rs116197192G est fréquemment retrouvé chez les patients souffrant de rétinoblastomes (De Oliveira Reis et al., 2012). De plus, les SNPs rs11801299 et rs1380576 de *MDM4* ont été associés à un risque accru dans les cancers gastriques, du sein et les carcinomes épidermoïdes oraux (Hashemi et al., 2018 ; Lu et al., 2017 ; Wang et al., 2017).

PARTIE II : AUTRES FONCTIONS PHYSIOLOGIQUES ET PATHOLOGIQUES DE LA VOIE P53

Dans la première partie de ce manuscrit, nous avons discuté du rôle majeur de p53 dans la suppression tumorale, ce qui lui a valu son titre de « gardien du génome ». En effet, en réponse à une myriade de stress, p53 est activée et régule l'expression de nombreux gènes pour protéger les cellules d'une transformation tumorale. Les protéines MDM2 et MDM4 jouent un rôle clé pour réguler finement p53, que ce soit en condition normale pour éviter son activation exacerbée ou après un stress génotoxique pour lui permettre d'assurer ses fonctions de suppresseur de tumeur. Des dérégulations de la voie p53 ont des conséquences dramatiques dans les cancers. Toutefois, cette voie serait aussi impliquée dans de nombreux processus physiologiques et des pathologies autres que le cancer (Brady et Attardi, 2010). La voie p53 interviendrait par exemple dans le développement, le vieillissement et la fertilité, ce qui sera discuté respectivement dans les chapitres 1), 2) et 3) de cette partie. Dans mon laboratoire de thèse, nous nous sommes particulièrement intéressés au rôle de la voie p53 dans les syndromes d'insuffisance médullaire héréditaires, comme la Dyskératose Congénitale, ce qui sera présenté dans le chapitre 4) de cette deuxième partie.

1) p53 et développement

Bien que la plupart des fonctions de p53 soient importantes pour assurer la suppression tumorale, certaines d'entre elles comme la régulation de la prolifération cellulaire et l'apoptose, sont aussi essentielles pour assurer un développement normal. Si p53 est maintenue à un faible niveau dans les cellules normales adultes, son expression semble varier fortement au cours du développement, suggérant un rôle important du gardien du génome lors de ce processus. D'après des études d'embryons de souris par hybridation *in situ*, les niveaux d'ARNm de p53 seraient très élevés dans tous les tissus jusqu'au milieu de la gestation. Au cours de l'organogenèse, ces niveaux diminueraient jusqu'à être difficilement détectables dans les tissus en fin de différenciation (Schmid et al., 1991). De façon à mieux comprendre comment p53 est exprimée au cours de l'embryogenèse, de nombreux modèles murins exprimant un gène rapporteur sous le contrôle du promoteur de *Trp53* ont été générés (MacCallum et al., 1996, Gottlieb et al., 1997 ; Komarova et al., 1997). Leur analyse a montré que p53 est exprimée de façon très précise dans les tissus et à des temps différents. Une forte expression du gène rapporteur est en effet détectée dans tous les tissus au cours des premiers jours de développement embryonnaire. Par la suite, cette expression devient hétérogène et restreinte à

certaines tissus. Une forte expression du gène rapporteur est, par exemple, détectée dans le système nerveux des embryons en fin de développement et chez les souris à la naissance (Molchadsky et al., 2010).

L'importance d'une régulation précise de p53 au cours du développement est démontrée via l'étude de modèles murins KO pour *Mdm2* et *Mdm4*, codant pour les principaux régulateurs négatifs de p53. En effet, chez la souris, une inactivation d'un de ces gènes entraîne une létalité embryonnaire qui résulte d'un arrêt du cycle cellulaire ou d'une apoptose accrue à un stade où des proliférations cellulaires rapides sont nécessaires. Ces phénotypes sont directement liés à l'absence de régulation de p53 puisque la délétion de *Trp53* chez les souris inactivées pour *Mdm2* ou *Mdm4* permet de sauver ce phénotype (Montes de Oca Luna et al., 1995 ; Jones et al., 1995, Parant et al., 2001). Ces résultats indiquent clairement que p53 doit être finement régulée au cours du développement mais ses fonctions dans ce processus sont encore mal connues.

Le fait que les souris KO pour p53 parviennent à se développer et à survivre plusieurs mois après leur naissance, avant de développer des tumeurs bien spécifiques, pouvait laisser penser que cette protéine ne joue pas un rôle essentiel dans le développement. Cependant, une analyse plus poussée des souris p53 KO a montré qu'une fraction non négligeable de ces souris présente des anomalies de développement (Tableau 1). En effet, une proportion considérable de femelles *p53^{-/-}* présente des défauts de fermeture du tube neural conduisant à des exencéphalies (Armstrong et al., 1995, Sah et al., 1995), suggérant ainsi un rôle de p53 dans la mise en place du système nerveux. Par ailleurs, il a été constaté que sur le fonds génétique C57BL/6J, le nombre de souris *p53^{-/-}* survivant est plus faible que prévu (14,3 %) ; les animaux mourant prématurément présentent des malformations physiques notamment des altérations de la structure des poumons, des malformations de la face et du crâne, une fente palatine, une altération des tissus nerveux et musculaires et un ensemble d'anomalies des voies urinaires et des reins (Saifudeen et al., 2009 ; Rinon et al., 2011 ; Tateossian et al., 2015). D'autres anomalies sont retrouvées régulièrement chez ces souris comme des anomalies oculaires, une polydactylie des membres inférieurs ou des altérations des incisives supérieures (Armstrong et al., 1995). De plus, une proportion non négligeable de souris *p53^{+/-}* ou *p53^{-/-}* présente des retards de développement (Baatout et al., 2002). Puisque la plupart des souris p53 KO se développent malgré tout et naissent vivantes, cela suggère une pénétrance incomplète du phénotype des souris *p53^{-/-}* et laisse à penser que d'autres protéines pourraient partiellement compenser le rôle de p53 dans le développement. Des études sur des souris mutantes (knock-

in) ont également mis en évidence l'importance de p53 dans le développement. Des souris exprimant une protéine p53 ayant perdu ses capacités transactivatrices (p53^{25,26,53,54}) ainsi qu'une protéine p53 sauvage souffrent d'une létalité tardive au cours de la gestation et développent des phénotypes du syndrome CHARGE humain caractérisé par un ensemble de malformations congénitales (Van Nostrand et al., 2014). Les fonctions de p53 empiètent ainsi clairement sur le développement normal de la souris et, lorsqu'elles sont perturbées, donnent naissance à des phénotypes distincts.

L'inactivation de p53 chez d'autres espèces comme le Xénope semble avoir des conséquences plus graves au cours du développement. En effet, les embryons de Xénope présentent une altération dans la différenciation du mésoderme et des défauts importants au moment de la gastrulation (Cordenonsi et al., 2003). Cette différence avec la souris pourrait s'expliquer par le fait que, chez la souris, les protéines p63 et p73, de la famille de p53, sont exprimées au cours de l'embryogenèse et pourraient compenser partiellement l'absence de p53, ce qui n'est pas possible chez le Xénope qui n'exprime pas ces protéines (Stiewe, 2007 ; Danilova et al., 2008). Il a effectivement été montré que les protéines p63 et p73 peuvent transactiver certains gènes cibles de p53 du fait de leur ressemblance structurelle et jouer un rôle au cours du développement (Tableau 1). En effet, les souris p53 sauvages, inactivées pour *Trp63* ou *Trp73* ont des phénotypes très sévères liés à une altération de leur développement. Les souris *p63*^{-/-} naissent vivantes mais l'inactivation de *Trp63* mène à une altération conséquente de leur développement : tous les épithéliums squameux et leurs dérivés (peau, poils, dents, glandes mammaires, lacrymales et salivaires) sont absents et certains membres sont manquants ou anormaux. Ces souris meurent rapidement après leur naissance (Mills et al., 1999 ; Yang et al., 1999). Les souris *p73*^{-/-}, quant à elles, vivent plus longtemps puisqu'elles survivent deux mois après leur naissance et que 25 % d'entre elles atteignent l'âge adulte. Elles présentent toutefois des troubles du système nerveux (altération de l'hippocampe), une hydrocéphalie, une perte de reconnaissance des phéromones altérant leur reproduction, des infections chroniques et des inflammations (Yang et McKeon, 2000). Il a été proposé que, chez les mammifères, les membres de la famille p53 pourraient se compenser partiellement pour assurer le développement (Danilova et al., 2008 ; Levine et al., 2011). Il a cependant été montré que les embryons inactivés pour deux des membres de la famille p53 ne développent pas de phénotypes bien différents de ceux observés par l'inactivation d'un seul membre, suggérant des fonctions non-redondantes. De plus, il a été observé que l'inactivation simultanée de p53, p63 et p73 n'empêche pas le développement d'un embryon viable. Ces résultats indiquent ainsi que la

famille p53 n'est pas strictement nécessaire pour les premières étapes du développement (Van Nostrand et al., 2017). Finalement, si la suppression tumorale semble être la fonction principale de p53, une altération de ses fonctions peut également perturber le développement et les mécanismes moléculaires sous-jacents restent encore à préciser.

Mouse mutant	Mutation	Development	Mouse phenotypes	References
<i>p53^{-/-}</i>	Absence of both copies of <i>Trp53</i> in 129 background mice	±	Susceptibility to cancer Exencephaly Implantation defects Giant-cell degenerative syndrome due to multinucleated giant cells in testes	Armstrong et al. (1995); Donehower et al. (1992); Hu et al. (2007); Rotter et al. (1993)
<i>p53^{-/-}</i>	Absence of both copies of <i>Trp53</i> in C57BL/6 background mice	±	Susceptibility to cancer Exencephaly Implantation defects Renal hypoplasia Cleft palate Abnormal lung architecture Craniofacial defects in skeletal, neuronal and muscle tissues	Armstrong et al. (1995); Hu et al. (2007); Rinon et al. (2011); Sah et al. (1995); Saifudeen et al. (2009); Tateossian et al. (2015)
<i>p53^{(25,26,53,54)+}</i>	Single, heterozygous mutant alleles that encode a transcriptionally inactive variant of p53, in which residues 25, 26, 53 and 54 in the TA domain are mutated	++	Late-gestational embryonic lethality due to CHARGE syndrome	Van Nostrand et al. (2014)
<i>TAp63^{-/-}</i>	Homozygous null <i>Trp63</i> mutation	+++	Absent or defective limbs Absent hair follicles teeth and mammary glands Impaired skin development	Mills et al. (1999); Yang et al. (1999)
<i>p63^{-/-};ΔNp63</i>	Transgenic expression of ΔN <i>Trp63</i> under the K5 promoter in <i>Trp63^{-/-}</i> background	±	Epidermal development	Candi et al. (2006)
<i>ΔNp63^{9fp/gfp}</i>	ΔN <i>Trp63</i> knock-in mice, in which ΔN <i>Trp63</i> specific exon is replaced by GFP	+++	Post natal lethality Truncated limbs Craniofacial malformations Lack of mature epidermis	Romano et al. (2012)
<i>TAp73^{-/-}</i>	Homozygous null <i>Trp73</i> mutation	+++	Runting and high mortality Neural and inflammatory defects	Yang et al. (2000)
<i>ΔNp73^{-/-}</i>	Homozygous deletion <i>Trp73</i> mutation, in which exon 3 is missing.	+++	Neural defects	Wilhelm et al. (2010)

ΔN, N-terminal truncated; TA domain, transcription activation domain; CHARGE, coloboma of the eye, heart defects, atresia of the choanae, retardation of growth and development, and ear abnormalities and deafness.

±, ++ and +++ indicate the severity of major phenotypes observed in mutant mouse.

Tableau 1 : Rôle de la famille p53 dans le développement. D'après (Jain et Barton, 2018).

2) p53 et vieillissement

En réponse à divers signaux de stress, le suppresseur de tumeur p53 est capable d'induire la réparation, la survie ou l'élimination des cellules endommagées. Si ces processus jouent un rôle essentiel dans la progression tumorale, ils sont également très importants pour le vieillissement de l'organisme. Le vieillissement est un processus progressif qui résulte d'une détérioration des cellules liée à une accumulation de changements cellulaires au cours du temps. A l'échelle de l'organisme, il se manifeste par une diminution de la taille, de la durée de vie, l'apparition d'anomalies de la peau et des cheveux gris. Ces phénotypes proviennent de la perte de cellules saines et fonctionnelles, ce qui conduit à une dégénérescence progressive des tissus et de l'organisme. Au fur et à mesure du temps, l'accumulation de dommages génère un stress chronique, aboutissant à l'activation de la voie p53 qui assure normalement le maintien de

l'intégrité génomique et l'homéostasie cellulaire (Wu et Prives, 2017). Dans une revue, Lopez-Otin et al. (2013) ont proposé neuf caractéristiques (« *hallmarks* ») du vieillissement, à l'image de ce qui a été proposé dans les cancers (Figure 6). Ainsi, l'instabilité génomique, l'attrition des télomères, les altérations épigénétiques, la perte du contrôle de la protéostase, l'altération de la sensibilité aux nutriments, les dysfonctionnements mitochondriaux, la sénescence cellulaire, l'épuisement des cellules souches et l'altération de la communication intercellulaire seraient des processus responsables du vieillissement d'un organisme. Il a été proposé que p53 interviendrait dans ce processus puisqu'elle régulerait au moins trois de ces caractéristiques : l'instabilité génomique, les dysfonctionnements mitochondriaux et la sénescence cellulaire.

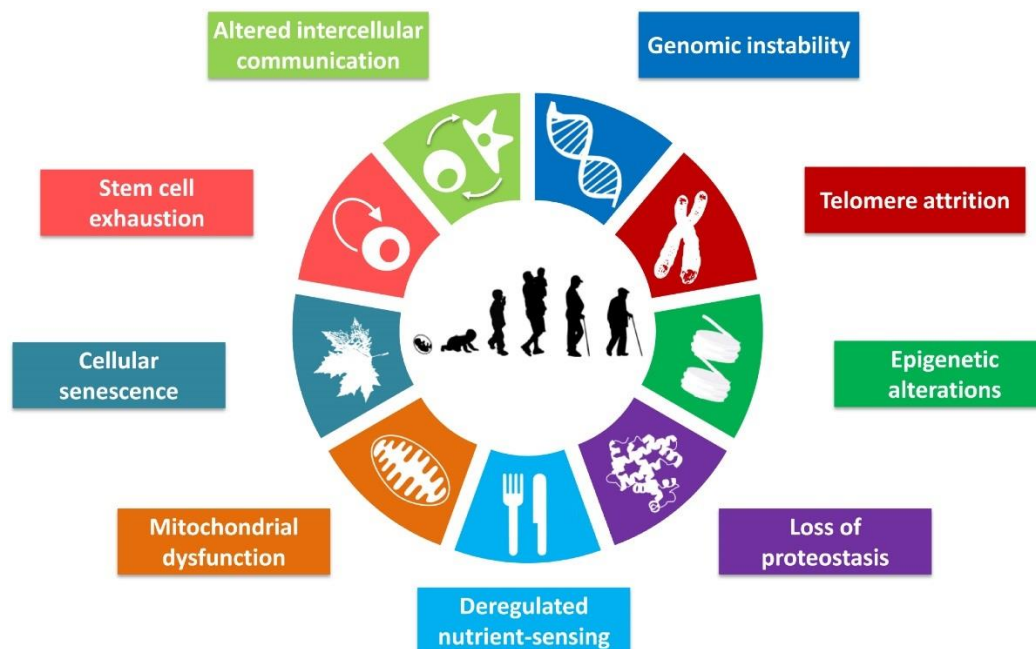


Figure 6 : Les caractéristiques du vieillissement. D'après (Lopez-Otin et al., 2013).

Plusieurs modèles murins ont permis de mettre en évidence le rôle de p53 dans le vieillissement. Tout d'abord, les souris inactivées pour *Zmpste24*, par exemple, développent des phénotypes du syndrome de Hutchinson-Gilford, appelé aussi progéria, qui est une maladie très rare de vieillissement accéléré. *Zmpste24* est une métalloprotéinase impliquée dans la maturation de la lamine A (*Lmna*), un composant essentiel de l'enveloppe nucléaire. Des mutations dans les gènes codants pour *ZMPSTE24* ou *LMNA* sont régulièrement retrouvés chez des patients souffrant de syndromes progéroïdes de vieillissement accéléré. Chez la souris, il a été montré que l'inactivation de *Zmpste24* conduit à une surexpression de nombreux gènes cibles de p53 ainsi qu'à une sénescence accrue dans les tissus, suggérant une suractivation de la protéine. De plus, ils ont constaté que le phénotype des souris *Zmpste24*^{-/-} est partiellement

sauvé sur un fonds p53 KO montrant ainsi que p53 est un facteur clé de ces phénotypes (Varela et al., 2005). De la même façon, la délétion de *Trp53* sauve le phénotype de vieillissement accéléré des souris mutées pour *Brca1* et *Bub1* présentant des défauts de réparation des cassures double brin de l'ADN et de l'assemblage du fuseau mitotique (Baker et al., 2013). L'analyse de ces modèles murins a suggéré qu'une suractivation de p53 pourrait conduire à un vieillissement accéléré. Puisque Mdm2 est un régulateur majeur de p53 et veille notamment à sa dégradation via son ubiquitination, il a été proposé que des altérations de l'interaction entre Mdm2 et p53 pourraient jouer un rôle dans ce processus.

L'analyse de deux modèles murins dans lesquels l'interaction Mdm2/p53 est rompue va justement dans ce sens. Les souris $p53^{+/m}$, par exemple, expriment une protéine p53 délétée de la région N-terminale, importante pour l'interaction avec Mdm2. Il a été montré que chez ces souris, la protéine mutante stabiliserait la protéine sauvage ce qui conduirait à sa suractivation. De plus, si les souris $p53^{+/m}$ ont une résistance accrue au développement de cancers, elles présentent une diminution de leur durée de vie et développent des signes de vieillissement accéléré comme une atrophie des muscles, une diminution de la masse corporelle et une courbure prononcée de la colonne vertébrale (Tyner et al., 2002 ; Moore et al., 2007). De la même façon, les souris $p53^{TSD/-}$ expriment une protéine p53 mimant la phosphorylation de certains résidus, incapable d'interagir avec Mdm2. Les souris $p53^{TSD/-}$ survivent 6 semaines après leur naissance et présentent des signes de vieillissement accéléré, associés à une activation constitutive de p53 et d'autres phénotypes comme une apoptose excessive des tissus, une altération de l'hématopoïèse, une atrophie testiculaire et une altération des cellules souches (Liu et al., 2010). Ainsi, une altération de la régulation négative de p53 par Mdm2 pourrait conduire à une activation de p53 qui contribuerait à des phénotypes de vieillissement accéléré. Toutefois, les mécanismes moléculaires impliqués restent à préciser.

Chez les mammifères, le vieillissement normal s'accompagne d'une érosion des télomères. En effet, de nombreux modèles murins ont montré par exemple que des télomères plus courts conduisent à une diminution de l'espérance de vie tandis que des télomères plus longs rallongent la durée de vie (Rudolph et al., 1999 ; Armanios et al., 2009 ; Tomas-Loba et al., 2008). Chez l'Homme, des méta-analyses ont établi un lien entre télomères courts et risque de mortalité, en particulier chez les plus jeunes (Boonekamp et al., 2013). De plus, des télomères courts ont été associés au développement prématuré de maladies comme la fibrose pulmonaire, la Dyskératose Congénitale ou l'anémie aplasique qui entraînent la perte des capacités régénératrices de différents tissus (Armanios et Blackburn, 2012). Les télomères, qui

constituent des structures nucléoprotéiques à l'extrémité des chromosomes, agissent en réalité comme de véritables horloges biologiques pour les cellules. A chaque division, ils se raccourcissent car leur réplication est incomplète. Lorsqu'ils atteignent une longueur critique, appelée limite de Hayflick, ils sont reconnus comme des cassures et déclenchent une réponse aux dommages à l'ADN, qui active p53 (Figure 7). Le facteur de transcription induit alors l'expression de p21 et PAI-1 pour déclencher la sénescence cellulaire ou alors réprime l'expression de PGC1a et PGC1b ce qui amène un dysfonctionnement mitochondrial qui déclenche une mort cellulaire. Pour compenser ces deux phénomènes de sénescence et de mort cellulaire, les cellules souches se mobiliseraient intensément pour rétablir le nombre de cellules, ce qui conduirait finalement à leur épuisement puis à leur incapacité à se diviser pour renouveler les tissus (Lopez-Otin et al., 2013). Dans ce modèle, une érosion importante des télomères conduirait ainsi à une activation de p53 provoquant alors des processus responsables du vieillissement des cellules, des tissus, puis de l'organisme. Toutefois, au laboratoire, nous avons montré qu'une activation de p53 n'est pas uniquement une conséquence d'une érosion des télomères mais peut également en être à l'origine. En effet, chez la souris, la délétion du domaine C-terminal de p53 conduit à une suractivation de la protéine (Simeonova et al., 2013). Il a été montré que la protéine suractivée, $p53^{\Delta31}$, régule négativement des gènes nécessaires à la maintenance des télomères. Cela conduit à leur raccourcissement dans les cellules de moelle osseuse des souris $p53^{\Delta31/\Delta31}$ et dans des fibroblastes embryonnaires murins. Mon laboratoire de thèse a ainsi démontré qu'une activation de p53 peut provoquer un raccourcissement des télomères chez la souris, qui est une caractéristique importante du vieillissement.

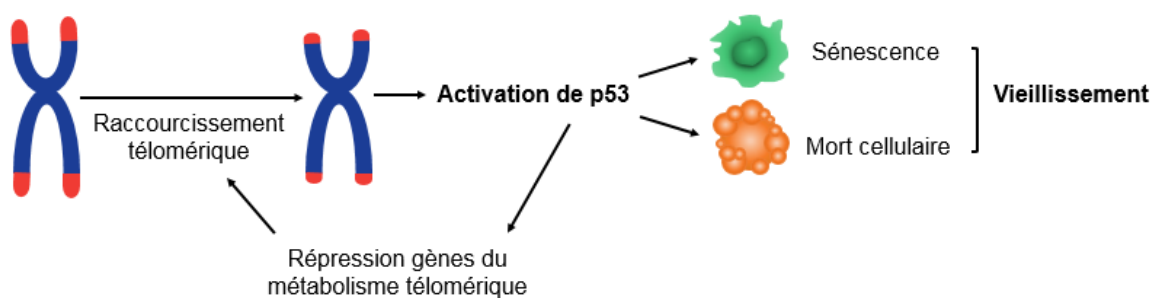


Figure 7 : Relation entre p53, raccourcissement télomérique et vieillissement. A chaque division, les télomères se raccourcissent. Lorsqu'ils atteignent une longueur critique, ils sont reconnus comme des dommages à l'ADN qui activent p53. La protéine régule alors l'expression de gènes impliqués dans la sénescence et la mort cellulaire, deux phénomènes conduisant au vieillissement des cellules. Dans notre équipe, nous avons montré qu'une suractivation de p53 chez la souris conduit également à la répression de gènes du métabolisme télomérique, ce qui mène à un raccourcissement des télomères, contribuant ainsi au vieillissement.

3) p53 et fertilité

La protéine p53 est essentielle pour maintenir l'intégrité des génomes et éviter la formation de tumeurs (Levine et al., 2006). Cette protéine, ainsi que p63 et p73 faisant partie de la même famille, sont très conservées au cours de l'évolution notamment des invertébrés aux mammifères (Belyi et al., 2010). Leurs homologues ont été très étudiés dans plusieurs organismes modèles comme l'anémone de mer (*Nematostella vectensis*), le ver rond (*Caenorhabditis elegans*), la mouche du vinaigre (*Drosophila melanogaster*), la grenouille à griffes (*Xenopus laevis*) et le poisson-zèbre (*Danio rerio*) (Hu, 2009). Leur existence chez des organismes ayant une durée de vie plus courte et ne développant pas de cancers suggère que la suppression tumorale n'est pas la fonction initiale de ces protéines. D'après l'étude de ces organismes, les protéines p53, p63 et p73 ancestrales joueraient en réalité un rôle essentiel pour maintenir l'intégrité génomique des cellules germinales et assurer un développement et une reproduction fidèles. En effet, chez des invertébrés comme l'anémone de mer, il a été montré que la protéine homologue de p53, nvp63, est très exprimée dans les cellules germinales des polypes adultes et non dans les cellules somatiques, et elle entraîne l'apoptose des gamètes après une irradiation aux UV (Pankow et Bamberger, 2007). Elle joue ainsi un rôle majeur pour maintenir l'intégrité du génome et éviter que des mutations soient transmises à la génération future. De la même façon, chez *D. melanogaster* et *C. elegans*, la protéine homologue de p53 est principalement exprimée dans les cellules germinales. Chez *C. elegans*, l'homologue CEP-1 surveille les dommages à l'ADN dans ces cellules et empêche la génération d'une descendance défectueuse en induisant l'apoptose des cellules germinales après une irradiation aux rayons γ (Ollman et al., 2000 ; Derry et al., 2001). Chez *D. melanogaster*, l'homologue Dmp53 régule le développement de la lignée germinale et son intégrité. Il induit notamment l'apoptose des cellules germinales primordiales via l'activation transcriptionnelle de deux activateurs de la mort cellulaire, reaper et sickle, après des dommages à l'ADN (Brodsky et al., 2000 ; Sogame et al., 2003). Les mutants inactivés pour Dmp53 montrent une instabilité génomique, notamment après une irradiation aux rayons γ , ainsi que des anomalies dans le développement des ovaires et une diminution de la fertilité (Lee et al., 2003).

Chez les vertébrés, les protéines de la famille p53 semblent avoir conservé leurs fonctions de protection de la lignée germinale. Chez *X. laevis*, par exemple, p53 intervient dans la transcription de nombreux gènes pendant l'ovogenèse et les niveaux de la protéine restent très élevés au cours du développement (Hoever et al., 1997). Chez la souris et le rat, les niveaux de p53 sont très élevés au cours de la spermatogenèse. Les souris KO pour *Trp53* ou ayant des

niveaux réduits de p53 présentent une dégénérescence des cellules germinales au cours de la prophase méiotique, avec une fréquence élevée de cellules géantes multinucléées dans les tubules séminifères testiculaires (Rotter et al., 1993). De plus, p53 induit l'apoptose des spermatogonies, les précurseurs des spermatozoïdes, après des dommages à l'ADN (Hasegawa et al., 1998).

En plus de ces fonctions ancestrales, p53 semble avoir acquis, au cours de l'évolution, des fonctions supplémentaires dans la fertilité et la reproduction. Chez la souris, l'inactivation de *Trp53* conduit à une forte diminution de la fertilité, principalement chez les femelles. En effet, les femelles C57BL/6J *p53*^{-/-}, par exemple, présentent un taux de naissance diminué et une taille de portée très réduite lorsqu'elles sont croisées avec des mâles *p53*^{+/+}, *p53*^{+/-} ou *p53*^{-/-} (Hu et al., 2007b). Des résultats similaires ont été observés chez des souris 129SV avec un phénotype moins prononcé, suggérant qu'il existe des facteurs propres à chaque lignée modulant cette fonction de p53. p53 régule en particulier la reproduction maternelle, notamment l'étape de l'implantation des embryons, via la transcription du facteur LIF (Leukemia Inhibitory Factor) (Hu et al., 2007b, 2008). Le gène *Lif* est en effet un gène cible de p53 et code pour un facteur exprimé dans l'utérus au moment de l'implantation. Il est fortement exprimé dans les glandes endométriales puis sécrété dans la lumière utérine. Il se lie alors à des récepteurs à la surface des cellules épithéliales ce qui permet de préparer l'utérus à accueillir le blastocyste. La production de ce facteur est critique car les souris inactivées pour *Lif* ne parviennent pas à passer l'étape de l'implantation des embryons et ce phénotype peut être rétabli après une injection du *Lif* au 4^{ème} jour de gestation (Chen et al., 2000). De la même façon, cette étape de l'implantation est perturbée chez les souris p53 KO en raison des niveaux très bas de ce facteur. Tout comme les souris inactivées pour *Lif*, l'injection de ce facteur au 4^{ème} jour de gestation permet de nettement améliorer le taux d'implantation des souris p53 KO (Hu et al., 2007b). Les femelles inactivées pour *Trp63* et *Trp73* voient, elles aussi, leur fertilité fortement diminuer. Il a été montré notamment que l'isoforme TAp63 joue un rôle essentiel pour protéger la lignée germinale et assurer la qualité des ovocytes. Lors de dommages à l'ADN, TAp63 est en effet phosphorylée et induit une apoptose des oocytes. En revanche, les oocytes ayant subi une irradiation aux rayons γ sont maintenus chez les souris n'exprimant pas cette isoforme ou inactivées pour *Trp63* (Suh et al., 2006 ; Livera et al., 2008). p73 jouerait également un rôle spécifique dans la reproduction et la fertilité. L'isoforme TAp73, en particulier, serait capable de réguler le SAC (Spindle Assembly Checkpoint), un mécanisme de surveillance qui empêche l'anaphase tant que tous les chromosomes ne sont pas

correctement attachés et alignés sur le fuseau au cours de la mitose et de la méiose (Tomasini et al., 2008). Chez la souris, la perte de cette isoforme mène à une instabilité génomique dans la lignée germinale et à des anomalies au cours des divisions cellulaires conduisant à une augmentation des aneuploïdies dans les oocytes (Tomasini et al., 2009).

Chez l'Homme, comme chez la souris, ces fonctions de p53 ont été bien conservées. Il a notamment été montré que p53 régule également le facteur LIF chez l'Homme. Le gène *LIF* humain présente en effet un élément de réponse de p53 dans son premier intron. Et p53 régule l'expression du LIF dans des cellules humaines non stressées et après stress (Hu et al., 2007b). Chez l'Homme, le facteur LIF joue également un rôle clé au moment de l'implantation. Les femmes dont les niveaux de LIF dans l'endomètre sont plus élevés au cours de la phase sécrétoire moyenne ont, par exemple, plus de chance de tomber enceintes que des femmes qui ont des niveaux de LIF plus faibles. Des niveaux diminués de LIF dans l'utérus sont souvent retrouvés chez des patientes souffrant de problèmes de fertilité (Mikolajczyk et al., 2007, Tsai et al., 2000). De plus, un niveau élevé de LIF dans l'endomètre serait associé à un meilleur taux d'implantation après une fécondation *in vitro* (Serafini et al., 2009). Ainsi, puisque p53 joue un rôle dans la fertilité chez l'humain, il a été proposé que des SNPs faisant varier son activité pourraient jouer un rôle dans ce processus.

Des SNPs, faisant varier l'activité de p53, de ses régulateurs ou de p63 et p73, ont été effectivement associés à une diminution de la fertilité chez la femme (Tableau 2) (Hu et al., 2011). Le SNP P72R ([Introduction, Partie I, Chapitre 4](#)3)) a été particulièrement étudié dans ce contexte. Il a été montré que la transactivation du gène *LIF* par p53 est deux fois plus faible dans les cellules humaines présentant le variant P72 comparé à celles qui présentent le variant R72 (Kang et al., 2009). Chez la souris, le variant P72 conduit également à une production plus faible du facteur LIF dans l'utérus, en particulier au moment de l'implantation, par rapport aux souris portant le variant R72 (Feng et al., 2011). Enfin, chez l'humain, une étude (Kay et al., 2006) a montré que le variant P72 est particulièrement retrouvé chez les femmes présentant des problèmes de fertilité et souhaitant réaliser une fécondation *in vitro* (Kang et al., 2009). Par ailleurs, la présence du variant P72 constitue un facteur de risque menant généralement à un échec de l'implantation des embryons après une fécondation *in vitro*. D'autres SNPs affectant des protéines de la voie p53 pourraient jouer un rôle dans la fertilité, notamment le SNP 309 de *MDM2* (rs2279744) et le SNP 7 de *MDM4* (rs1563828) (Tableau 2). Ainsi, outre son importance dans la suppression tumorale, la voie p53 joue un rôle clé dans la fertilité et la reproduction. Une meilleure connaissance de ces fonctions pourrait donc permettre le

développement de nouvelles stratégies pour préserver la fertilité et la traiter. De plus, l'analyse de SNPs de la voie p53 pourrait aider à identifier des patients souhaitant réaliser une fécondation *in vitro* et leur permettre de bénéficier d'une thérapie augmentant les niveaux de LIF ce qui augmenterait les chances de réussite de cette procédure.

	Gene (SNP)	Genotype	Control, %	IVF patients			
				<35 years		≥35 years	
				%	<i>P</i> ^a	%	<i>P</i> ^a
The p53 pathway	p53 (rs1042522)	G	77.3	64.8	1.8E-06 ^b	70.3	0.03 ^b
		C	22.7	35.2		29.7	
	MDM2 (rs2279744)	T	62.7	55.7	0.03 ^b	58	0.35
		G	37.3	44.3		42	
	MDM4 (rs1563828)	C	68.4	61.7	0.05 ^b	59	0.02 ^b
		T	31.6	38.3		41	
	HAUSP (rs1529916)	G	68.5	56	0.004 ^b	65.1	0.46
LIF (rs929271)	A	31.5	44		34.9		
	T	71.4	63.3	0.008 ^b	68.9	0.43	
	G	28.6	36.7		31.1		
p63	p63 (rs17506395)	T	70.9	78.3	0.02 ^b	79.2	0.01 ^b
		G	29.1	21.7		20.8	
p73	p73 (rs4648551)	G	56.9	58.4	0.70	66.5	0.004 ^b
		A	43.1	41.6		33.5	
	p73 (rs6695978)	G	95.8	94.7	0.31	92.1	0.03 ^b
		A	4.2	5.3		7.9	

Note: IVF patients were recruited at Weill Cornell Medical College. DNA from 200 healthy Caucasian individuals was obtained from the Coriell Cell Repositories, and women recruited as controls for the Women's Insights and Shared Experiences (WISE) study were used as controls.

^a χ^2 test.

^bSignificant difference between IVF patients and controls.

Tableau 2 : Des SNPs de la voie et de la famille p53 ont été associés à une diminution de la fertilité chez l'humain. D'après (Hu et al., 2011).

4) p53 et syndromes d'insuffisance médullaire

4)1) Généralités sur les syndromes d'insuffisance médullaire

Les syndromes d'insuffisance médullaire héréditaires (Inherited Bone Marrow Failure Syndromes ou IBMFS) représentent un groupe de maladies génétiques rares et hétérogènes caractérisées par un défaut de production de cellules hématopoïétiques. Ces syndromes s'accompagnent généralement de malformations physiques et d'une prédisposition au développement tumoral, notamment des leucémies. Ces syndromes sont détectés chez les

patients lorsque leur moelle osseuse est sévèrement atteinte. Ils peuvent avoir développé des défauts hématopoïétiques sévères, un syndrome myélodysplasique (ensemble de maladies caractérisées par la production insuffisante de cellules sanguines matures saines par la moelle osseuse) ou une leucémie myéloïde aiguë. Lorsque le défaut hématopoïétique concerne une seule lignée de cellules hématopoïétiques (érythrocytes, leucocytes ou plaquettes), on parle de « cytopénie », mais il peut également impliquer l'ensemble de ces lignées dans le cas d'une « pancytopenie » (Alter, 2017).

Les syndromes d'insuffisance médullaire héréditaires les plus fréquents sont l'anémie de Fanconi (FA), la Dyskératose Congénitale (DC), l'anémie de Blackfan-Diamond (DBA) et le syndrome de Shwachman-Diamond (SDS) (Tableau 3). Ces syndromes se manifestent généralement au cours de l'enfance mais l'âge d'apparition des premiers symptômes et leur sévérité peuvent fortement varier en fonction du mode de transmission et du gène impacté (Adam, 2017). Dans le cas de l'anémie de Blackfan-Diamond, par exemple, la cytopénie se manifeste plutôt au cours de la période néonatale, tandis que pour l'anémie de Fanconi, elle survient plus tard dans l'enfance, et chez les patients atteints de Dyskératose Congénitale, elle peut survenir à tout âge, y compris à l'âge adulte (Wegman-Ostrosky et Savage, 2017).

Ces pathologies sont causées par des mutations perturbant des mécanismes cellulaires essentiels. Bien que ces syndromes présentent des ressemblances cliniques qui rendent leur diagnostic difficile, ils peuvent impliquer des processus biologiques bien distincts. L'anémie de Fanconi, par exemple, résulte d'une anomalie dans la réparation de l'ADN, tandis que la Dyskératose Congénitale provient d'un défaut dans le métabolisme des télomères et l'anémie de Blackfan-Diamond et le syndrome de Shwachman-Diamond ont pour origine une altération dans la biogenèse des ribosomes (Shimamura et Alter, 2010 ; Wegman-Ostrosky et Savage, 2017). Même si les techniques de séquençage haut débit ont permis d'identifier de plus en plus de gènes impliqués dans ces syndromes, on comprend toujours mal, à l'heure actuelle, comment une altération dans ces voies peut mener à des défauts de production de cellules hématopoïétiques. Comprendre la biologie de ces maladies a ainsi un intérêt majeur pour nous permettre d'approfondir nos connaissances sur l'hématopoïèse en général, sur des voies cellulaires essentielles et également sur les processus pouvant mener à des leucémies.

IBMFS	Non-haematological clinical features	Laboratory findings	Associated cancers	Molecular mechanism
Fanconi anaemia	Radial ray anomalies, short stature, microcephaly, café au lait spots; may have features of VACTERL-H	Pancytopenia, macrocytosis, elevated HbF, increased chromosome breakage in clastogenic assay	MDS, AML, squamous cell cancers of head, neck, and anogenital region, other solid malignancies in <i>FANCD2</i>	DNA Repair: FA/BRCA pathway
Congenital amegakaryocytic thrombocytopenia	None reported	Thrombocytopenia, reduced megakaryocytes	Case report of ALL and one of MDS	Haematopoietic stem cell and megakaryocyte regulation
Dyskeratosis congenita	Skin pigmentation, nail dysplasia, oral leucoplakia, pulmonary fibrosis, stenosis of the oesophagus, liver disease	Pancytopenia, macrocytosis, elevated HbF, very short telomeres	MDS, AML, squamous cell cancers of skin, head, neck and anogenital region	Telomere biology
Diamond Blackfan anaemia	Short stature, malformation of craniofacilskeleton, eyes, heart, visceral, organs and limbs, bifid thumb	Anaemia, elevated red blood cell adenosine deaminase, macrocytosis, elevated HbF	MDS, AML, ALL, osteosarcoma, colon, possibly others	Ribosome biogenesis and processing
GATA2 deficiency			MDS, AML	
Severe congenital neutropenia	Severe infections	Neutropenia	MDS, AML	Myeloid lineage growth arrest
Shwachman Diamond syndrome	Exocrine pancreatic insufficiency, neurodevelopment and skeletal abnormalities	Neutropenia, low serum isoamylase, low serum trypsinogen	MDS, AML, ALL	Ribosome biogenesis and processing
Thrombocytopenia absent radii syndrome	Bilateral radial hypoplasia or aplasia with preservation of thumbs, other bony defects, congenital heart disease	Thrombocytopenia	Case reports of AML and ALL	mRNA maturation and processing

VACTERL-H, Vertebral anomalies, anal atresia, cardiac anomalies, tracheo-oesophageal fistula, esophageal or duodenal atresia, renal structural anomalies, limb anomalies, hydrocephalus; MDS, Myelodysplastic syndrome; AML, acute myeloid leukaemia; ALL, acute lymphocytic leukaemia; HbF, Fetal Haemoglobin; FA, Fanconi anaemia; BRCA, breast cancer.

Tableau 3 : Caractéristiques cliniques des principaux syndromes d'insuffisance médullaire. Figure issue de (Wegman-Ostrosky et Savage, 2017).

4)2) Les principaux syndromes d'insuffisance médullaire

4)2)1) La Dyskératose congénitale

4)2)1)1) La Dyskératose Congénitale, un syndrome télomérique

La Dyskératose Congénitale, également connue sous le nom de syndrome de Zinsser-Engman-Cole est un syndrome télomérique qui a été décrit en 1906. Causé par des mutations germinales entraînant un défaut dans la biologie des télomères, il touche environ une personne sur un million en Europe. Il se caractérise classiquement par une hyperpigmentation cutanée, une dystrophie des ongles et une leucoplasie buccale, c'est-à-dire une affection des muqueuses de la bouche (Wegman-Ostrosky et Savage, 2017). Cette triade classique n'est cependant pas observée chez l'ensemble des patients souffrant de DC. On peut retrouver chez eux une grande variabilité de phénotypes et les manifestations de la maladie vont fortement dépendre de l'âge

d'apparition des premiers symptômes, du gène impacté et du mode de transmission. Les patients souffrant de DC présentent très régulièrement une insuffisance médullaire et une fibrose pulmonaire. Ils peuvent également développer de nombreux autres phénotypes, non hématologiques, très variés, comme un rétrécissement des canaux lacrymaux, de l'œsophage ou de l'urètre, des troubles gastro-intestinaux, des dents anormales ou encore une perte prématurée de cheveux. Dans les cas les plus graves, le défaut en cellules sanguines peut conduire à une nécrose des os des hanches et des épaules, des hémorragies rétiniennes, de l'hyperlipidémie et une fibrose hépatique. Enfin, on estime que les patients souffrant de DC ont quatre à onze fois plus de risques de développer des cancers, notamment des leucémies myéloïdes aiguës, ou encore des carcinomes des cellules squameuses de la tête et du cou ou de la région anogénitale (Alter, 2017 ; Wegman-Ostrosky et Savage, 2017).

Il existe des formes sévères de DC comme le syndrome de Hoyeraal-Hreidarsson (HHS). Les patients souffrant de ce syndrome développent précocément des signes de DC, associés à une hypoplasie cérébelleuse, une immunodéficience et des retards de développement (Knight et al., 1999 ; Glousker et al., 2015). Le syndrome Revesz est également une forme de DC qui se caractérise, en plus des phénotypes de DC, par une rétinopathie exsudative bilatérale et des calcifications cérébrales. Quels que soient les phénotypes dont souffrent les patients de DC, l'insuffisance médullaire est la principale cause de mortalité, notamment chez les jeunes adultes. C'est pourquoi la transplantation de cellules souches hématopoïétiques constitue leur principal traitement.

La particularité des patients atteints de DC est qu'ils présentent des télomères très courts, en dessous du premier percentile comparé à la population générale (Savage et Alter, 2009). C'est d'ailleurs ce qui permet de les distinguer des autres patients souffrant de syndromes d'insuffisance médullaire lorsque les ressemblances cliniques des individus rendent le diagnostic difficile. Ainsi, aujourd'hui, afin de valider le diagnostic de DC, on effectue une prise de sang chez le patient et on mesure par flow-FISH (fluorescent in-situ hybridization) la longueur des télomères dans ses leucocytes (Alter et al., 2007, 2012).

4)2)1)2) Les causes génétiques de la Dyskératose Congénitale

La Dyskératose Congénitale a pour origine des mutations germinales dans des gènes codant pour des composants clés du métabolisme télomérique. Les télomères sont des structures nucléoprotéiques à l'extrémité des chromosomes qui jouent un rôle clé dans le maintien de l'intégrité du génome (O'Sullivan et Karlseder, 2010). Ils sont composés de répétitions de

séquences hexamériques TTAGGG, forment des structures bien précises (T-loop) et sont associés à de très nombreuses protéines (Figure 8). Parmi elles, on retrouve des protéines protectrices appelées les protéines shelterines : TRF1, TRF2 (telomere repeat factor 1 and 2), TIN2 (TRF-interacting nuclear protein 2), POT1 (protection of telomeres 1), RAP1 (repressor/activator protein 1) et TPP1 (TIN2-interacting protein 1), codées respectivement par les gènes *TERF1*, *TERF2*, *TINF2*, *POT1*, *TERF2IP*, et *ACD*, (Palm et de Lange, 2008). En s'associant aux télomères, ces protéines protègent l'extrémité des chromosomes de la dégradation et de la fusion chromosomique. D'autres protéines s'associent aux télomères comme l'hélicase RTEL1 (regulation of telomere elongation helicase 1), impliquée dans la stabilité des télomères (Porreca et al., 2018) et qui joue un rôle essentiel pour dérouler la T-loop lors de leur réplication. Enfin, on retrouve également des protéines de coiffage des télomères, les protéines CTC1, STN1 et TEN1 qui forment le complexe CST (Rice et Skordalakes, 2016) qui serait impliqué dans la synthèse du brin retardé. Toutes ces protéines protègent et assurent le maintien de l'intégrité des extrémités chromosomiques.

Malgré ces protections, les télomères se raccourcissent de 50 à 100 paires de bases à chaque division car les ADN polymérases habituelles sont incapables de répliquer totalement la fin des chromosomes. Lorsque les télomères atteignent leur limite critique dite de « Hayflick », ils sont reconnus comme des dommages à l'ADN, ce qui active la voie p53 et conduit à un arrêt de la prolifération cellulaire, appelée sénescence répliquative, ainsi qu'à une réponse apoptotique (Harley et al., 1990). Ce processus d'arrêt répliquatif impliquant p53 protège les cellules d'une instabilité chromosomique et de proliférations cellulaires incontrôlées.

Dans les cellules qui se divisent beaucoup, comme les cellules germinales ou les cellules souches hématopoïétiques, la télomérase TERT (telomerase reverse transcriptase), une transcriptase inverse, est capable de rajouter des répétitions TTAGGG au cours de chaque division cellulaire afin de compenser le raccourcissement des télomères. Elle agit sous forme d'un complexe moléculaire composé de nombreux autres facteurs comme DKC1 (dyskerin pseudouridine synthase 1), les cofacteurs NOP10, NHP2, TCAB1 et GAR1 et surtout la matrice ARN TERC, à partir de laquelle elle rallonge les télomères. D'autres protéines interagissent avec des composants de la télomérase, notamment NAF1 qui joue un rôle dans sa stabilité, TCAB1, codé par *WRAP53* qui assure le transport de la télomérase et PARN qui est impliquée dans la maturation de TERT (Boyras et al., 2016 ; Moon et al., 2015). Dans la plupart des cellules somatiques comme les fibroblastes, les cellules n'expriment pas ou peu la molécule TERT et, par conséquent, ont une capacité proliférative limitée. En revanche, la majorité des

cellules tumorales réexpriment TERT (dans plus de 90 % des cancers humains), leur conférant un potentiel de division infini propre au phénomène d'immortalisation. Ainsi, la dérégulation du métabolisme télomérique peut conduire soit à une immortalité répliquative qui est une des caractéristiques du cancer, dans le cas d'un maintien perpétuel, soit à des syndromes télomériques comme la Dyskératose Congénitale, dans le cas d'un défaut de maintenance.

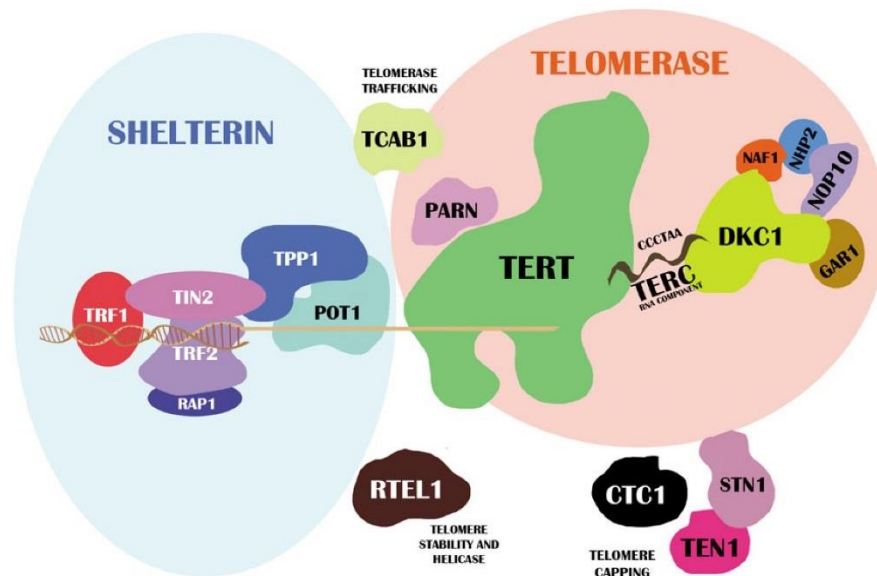


Figure 8 : Structure des télomères. Les télomères sont des structures nucléoprotéiques constituées de séquences répétées de l'ADN, associées à de nombreuses protéines : des composants de la télomérase (TERT, TERC, DKC1, NOP10, NHP2 et GAR1), des composants du complexe shelterin (TRF1, TRF2, TIN2, TPP1, RAP1 et POT1), des composants du complexe CST (CTC1, STN1 et TEN1) et enfin d'autres protéines associées (TCAB1, RTEL1, PARN et NAF1). Figure issue de (Wegman-Ostrosky et Savage, 2017).

Aujourd'hui, parmi tous les gènes impliqués dans le métabolisme télomérique, 14 sont connus pour être fréquemment mutés dans la Dyskératose Congénitale. Comme on pouvait l'imaginer, on retrouve fréquemment des mutations de gènes codant pour des composants de la télomérase (*DKC1*, *TERC*, *TERT*, *NOP10*, et *NHP2*), des composants du complexe shelterin (*ACD*, *TINF2*, et *POT1*), du complexe CST (*CTC* et *STN1*) et enfin d'autres protéines associées (*RTEL1*, *NAF1*, *WRAP53* et *PARN*). Toutefois, la cause génétique de la Dyskératose Congénitale est inconnue pour 30 % des patients et de nombreux gènes impliqués dans cette pathologie restent encore à découvrir.

4)2)2) L'Anémie de Fanconi

L'anémie de Fanconi (FA) est une maladie génétique rare causée par des mutations germinales dans des gènes de réparation de l'ADN. Elle affecte environ 1 individu sur 300 000 naissances vivantes (Dong et al., 2015). Les patients atteints de cette pathologie développent, pendant

l'enfance, différents degrés de pancytopenie. Ils présentent généralement une petite taille et des anomalies de la peau comme des macules « café au lait » ou des taches hypopigmentées ou hyperpigmentées (Mehta et Tolar, 2002 ; Smith et Wagner, 2012). Près d'un tiers des patients développent des malformations physiques affectant les membres supérieurs comme un pouce absent, hypoplasique, bifide, dupliqué, ou encore une clinodactylie (déviation latérale des doigts) ou une polydactylie (un ou plusieurs doigts supplémentaires). Ils peuvent également présenter d'autres anomalies congénitales comme une microcéphalie, une dysmorphie faciale avec un visage triangulaire, des anomalies rénales et cardiaques et un syndrome de VACTERL-H (anomalies vertébrales, atrésie anale, fistule trachéo-oesophagienne, malformations rénales et anomalies des membres) (Alter et Rosenberg, 2013). D'autres symptômes peuvent apparaître et s'intensifier avec l'âge comme de l'ostéoporose, des troubles de la vision (cataracte), une diminution de la fertilité, du diabète, des anomalies du foie ou des reins, une perte de l'audition et une immunodéficience (Fanconi Anemia : Guidelines for Diagnosis and Management, 2014 ; Alter, 2017). Près d'un tiers des patients n'ont toutefois aucune malformation congénitale et l'anémie de Fanconi n'est détectée qu'en raison d'une insuffisance médullaire, d'une leucémie ou d'un carcinome de la tête et du cou (Wegman-Ostrosky et Savage, 2017).

Le diagnostic de l'anémie de Fanconi repose sur le test de cassures chromosomiques induites par le diépoxybutane (DEB) ou la mitomycine C (Esmer et al., 2003 ; Auerbach, 2009 ; Molina et al., 2015). Dans ce test, les cellules sanguines prélevées au cours d'une prise de sang sont traitées par un de ces deux agents, puis étalées sur des lames de verres. Chez les personnes atteintes, les chromosomes présentent un nombre important de cassures en raison de l'incapacité des cellules à réparer normalement l'ADN via la voie de Fanconi, contrairement aux individus sains.

La voie de réparation de Fanconi permet notamment de résoudre les pontages interbrins à l'ADN qui représentent un des dommages les plus toxiques pour la cellule. Les agents pontants qui les génèrent lient de manière covalente les deux brins de l'ADN, créant, de ce fait, une obstruction physique aux processus cellulaires qui nécessitent le déroulement des deux brins d'ADN comme la réplication et la transcription. Au cours des divisions, ces dommages produisent d'importantes cassures chromosomiques. Lorsqu'un pont interbrin est formé, une multitude de protéines FANC fonctionnent de concert pour corriger l'anomalie et éviter ces cassures (Figure 9). Les protéines FANC : FANCA, FANCB, FANCC, FANCE, FANCF, FANCG, FANCL, FANCM et UBE2T/FANCT s'associent pour constituer un

premier complexe, nécessaire à l'ubiquitination de FANCI et FANCD2, événement culminant de l'activation de la voie de Fanconi. Le complexe moléculaire formé par FANCI et FANCD2 coordonne plusieurs événements de la voie de Fanconi à la suite de son ubiquitination et peut notamment recruter un complexe de réparation impliquant les protéines BRCA1/FANCS, PALB2/FANCN, BRIP1/FANCI/BACH1, BRCA2/FANCD1, RAD51C/FANCO, ERCC4/FANCO et SLX4/FANCP. D'autres protéines interviennent dans cette réparation, notamment MAD2L2 et XRCC2.

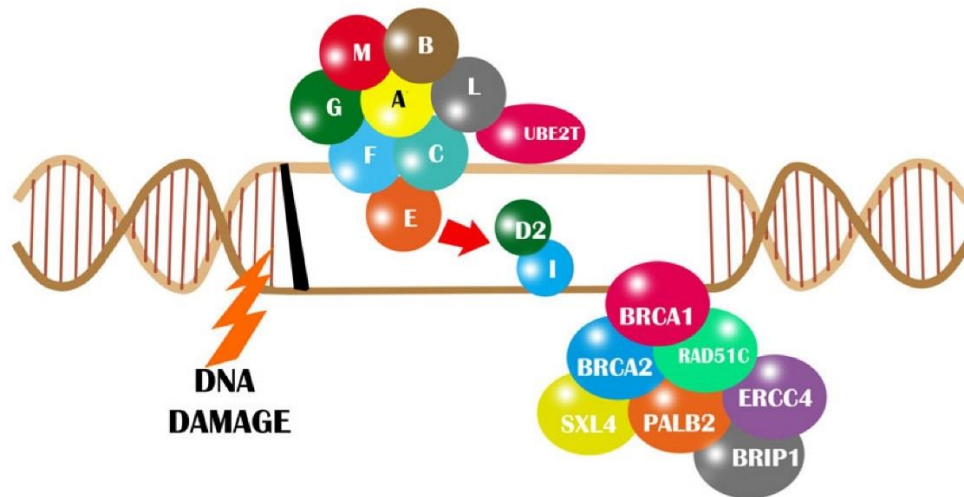


Figure 9 : Causes génétiques de l'anémie de Fanconi, des mutations germinales dans des gènes de la réparation de l'ADN. Figure issue de (Wegman-Ostrosky et Savage, 2017).

Chez les patients atteints de FA, au moins 20 gènes de la voie de Fanconi sont connus pour être mutés. Dans la majorité des cas, la maladie est transmise de façon autosomale récessive et résulte de mutations dans les gènes de réparation de l'ADN suivants : *FANCA*, *FANCC*, *BRCA2/ FANCD1*, *FANCD2*, *FANCE*, *FANCF*, *FANCG*, *FANCI*, *BRIP1/FANCI/BACH1*, *FANCL*, *FANCM*, *PALB2/FANCN*, *RAD51C/FANCO*, *SLX4/FANCP*, *RCC4/FANCO/XPF*, *RAD51/FANCR*, *BRCA1/FANCS*, *UBE2T/FANCT*, *XRCC2/ FANCU*) (Mehta et Tolar, 2002; Domchek et al., 2013 ; Kashiyama et al., 2013 ; Ameziane et al., 2015 ; Hira et al., 2015 ; Wang et al., 2015). Le gène *FANCB*, lié à l'X a également été retrouvé chez des patients (Meetei et al., 2004). Enfin, des mutations des gènes *MAD2L2/REV7* ont récemment été identifiées chez des patients souffrant de cette pathologie (Bluteau et al., 2016).

Comme pour la plupart des syndromes d'insuffisance médullaire, on ne sait pas tout à fait comment une altération dans une voie de réparation de l'ADN peut conduire à de l'insuffisance médullaire. Cependant, on sait que les dommages à l'ADN activent p53 ([Introduction, Partie I, Chapitre 4](#)) qui peut entraîner l'arrêt du cycle des cellules altérées ou leur apoptose. Des études ont montré que les cellules déficientes pour un des composants de la voie Fanconi,

humaines ou murines (notamment *FANCD2* et *FANCG*), accumulant des 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 (Ceccaldi et al., 2012). 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*^{-/-} et *Fancc*^{-/-}, suggérant une coopération entre les deux voies pour la suppression tumorale (Garaycochea et Patel, 2014).

4)2)3) L'Anémie de Blackfan-Diamond

L'anémie de Blackfan-Diamond (DBA) est une maladie génétique rare décrite en 1938 par Kenneth Blackfan et Louis Diamond. Il s'agit d'une érythroblastopénie congénitale : la moelle osseuse est incapable de produire des globules rouges en quantité suffisante. Les autres lignées hématopoïétiques sont le plus souvent normales et une pancytopénie est rare. Cette maladie qui concerne 7 naissances sur 1 million résulte de mutations dans des gènes essentiels du métabolisme ribosomique, nécessaires à l'assemblage des ribosomes et à leur fonction. Le déficit en globules rouges s'accompagne de malformations physiques notamment une petite taille, des malformations du pouce (triphalangé, bifide...), une fusion des cervicales (anomalie de Klippel-Feil), une malformation de la ceinture scapulaire (anomalie de Sprengel) et des anomalies cardiaques et de l'appareil urogénital (Wegman-Ostrosky et Savage, 2017). Cependant, les manifestations de la maladie sont très variables et certains patients ne présentent aucune de ces anomalies congénitales (Steinberg-Shemer et al., 2016). La DBA est associée à un risque élevé de syndromes myélodysplasiques, de leucémies myéloïdes aiguës, de cancers du côlon, d'ostéosarcomes et de cancers génitaux féminins (Figure 10) (Shimamura et Alter, 2010).

La DBA est diagnostiquée la première année de vie dans plus de 90 % des cas en raison du défaut de globules rouges, avec une médiane à 2 mois de vie. Elle peut être détectée à la naissance dans 16 % des cas ou même *in utero* car cette pathologie entraîne des grossesses difficiles (Da Costa, 2013 ; Da Costa et al., 2018). La moelle osseuse des patients atteints de DBA est généralement normocellulaire (volume normal de moelle) ou légèrement hypocellulaire et présente une érythroblastopénie (défaut de précurseurs des globules rouges) caractéristique, avec des lignées lymphoïdes, granulocytaires et mégacaryocytaires normales (Shimamura et Alter, 2010). Cette composition peut être révélée après une ponction de moelle osseuse. Le diagnostic peut être confirmé grâce au dosage de l'adénosine désaminase

érythrocytaire, une des enzymes du globule rouge, qui est anormalement élevée chez les patients atteints de DBA (Glader et al., 1983 ; Fargo et al., 2013). La recherche des mutations de gènes du métabolisme ribosomique permet de confirmer le diagnostic chez 70 % des patients.

La DBA provient dans la majorité des cas de la mutation de gènes codant pour des protéines ribosomiques, essentielles pour l'assemblage et les fonctions des ribosomes. Les ribosomes sont constitués d'un assemblage de protéines et d'ARN organisés en deux sous-unités : une petite sous-unité, nommée 40S et une grande sous-unité, 60S. La petite sous-unité comprend l'ARNr 18 S et 33 protéines ribosomales tandis que la grande sous-unité contient les ARNr 5S, 28S, 5.8S et 46 protéines. L'assemblage des ribosomes commence dans le noyau où les ARNr sont transcrits et se poursuit dans le cytoplasme. Au total, on estime que plus que 80 protéines ribosomales et 200 facteurs accessoires interviennent dans la biogenèse des ribosomes.

Le premier lien entre ribosomes et anémie de Blackfan-Diamond a été découvert en 1999 avec l'identification d'une mutation de *RPS19* chez un patient atteint de cette pathologie. *RPS19*, qui code pour la protéine ribosomique (RP), S19 faisant partie de la sous-unité 40S, constitue actuellement la principale cause de DBA puisque ce gène est muté chez 25 % des patients (Figure 10). En 2010, le séquençage de gènes a permis d'identifier d'autres gènes impliqués dans cette pathologie : *RPS17*, *RPS24*, *RPS10*, *RPS7* et *RPS26* codant pour des protéines de la petite sous-unité et *RPL35A*, *RPL5* et *RPL11* codant pour des protéines de la grande sous-unité (Lipton et Ellis, 2009). L'utilisation de puces d'hybridation génomique comparative a permis d'identifier des délétions de nouveaux gènes impliqués dans la DBA, *RPL26* et *RPL15* (Farrar et al., 2011 ; Landowski et al., 2013). Le séquençage de l'exome a conduit à la découverte de mutation dans le gène *GATA1* sur le chromosome X, qui code pour un facteur de transcription hématopoïétique, chez une minorité de patients (Sankaran et al., 2012), ainsi que de la protéine ribosomale *RPS29* chez deux familles (Mirabello et al., 2014). Enfin, plus récemment encore, de nouvelles mutations ont été identifiées dans les gènes *RPS28*, *RPL31*, *RPL27* et également dans un nouveau gène situé sur le chromosome X, *TSR2*, qui code pour une protéine interagissant avec *RPS26* (Gripp et al., 2014 ; Danilova et Gazda, 2015). Aujourd'hui, on considère que ces mutations entraînent une altération dans la biogenèse ou l'assemblage des ribosomes, via une altération de la maturation des ARNr ou des sous-unités pré-40S ou pré-60S (Farrar et al., 2008 ; Danilova et al., 2014 ; De Oliveira et al., 2010 ; In et al., 2016). Cependant, on ne sait toujours pas comment ces altérations mènent à une anémie profonde chez les patients souffrant de DBA. Il a été proposé, par exemple, que, puisque les globules rouges

matures n'ont pas de noyau, les cellules érythroïdes immatures auraient besoin de produire des ribosomes en très grande quantité pour l'ensemble du cycle de vie du globule rouge, les mutations réduiraient cette production, ce qui perturberait la viabilité de ces cellules (Sieff et al., 2010 ; Danilova et Gazda, 2015).

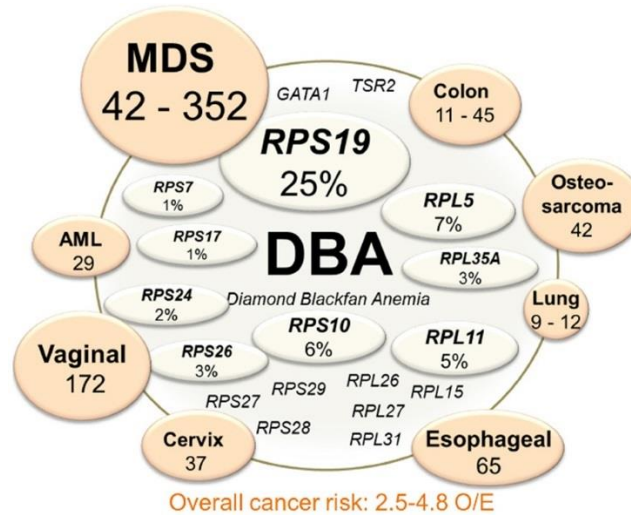


Figure 10 : Causes génétiques de la DBA et cancers associés. Les cercles internes indiquent les gènes mutés dans la DBA et la fraction de patients portant une mutation de ce gène. Les cercles externes indiquent les cancers associés à la DBA et le nombre de cas reportés. Figure issue de (Sulima et al., 2019).

4)2)4) Le syndrome de Shwachman-Diamond

Le syndrome de Shwachman-Diamond (SDS) est une maladie génétique, initialement décrite en 1961 par Nezelof, un pédiatre français, puis par Shwachman et Diamond en 1964. Elle affecte environ 1 individu sur 200 000 naissances vivantes et se manifeste généralement au cours de la petite enfance ou tôt pendant l'enfance. Les patients souffrant de ce syndrome présentent une insuffisance pancréatique externe, c'est-à-dire que le pancréas ne parvient pas à sécréter en quantité suffisante les hormones qu'il fabrique, ce qui mène à une malabsorption des aliments (Myers et al., 2013 ; Shimamura et Alter, 2010). Les patients souffrant de SDS développent également une neutropénie chronique, généralement légère, qui entraîne un risque élevé d'infections bactériennes et fongiques. Ils présentent parfois des malformations physiques, notamment une petite taille, une dysplasie métaphysaire (anomalie du développement osseux portant surtout sur les os longs), des anomalies thoraciques et un retard de développement (Myers et al., 2013 ; Shimamura et Alter, 2010). Si les fonctions pancréatiques peuvent s'améliorer avec l'âge, l'insuffisance médullaire responsable de la neutropénie peut s'aggraver vers une anémie aplasique, un syndrome myélodysplasique ou une leucémie myéloïde aiguë (Shimamura et Alter, 2010 ; Lindsley et al., 2017).

Dans 92-95 % des cas, le SDS est causé par des mutations du gène *SBDS* (7q11.22) (transmission autosomique récessive), codant pour une protéine ribosomique impliquée dans la biogenèse des ribosomes et d'autres processus cellulaires (Boocock et al., 2003 ; Woloszynek et al., 2004). Cette protéine intervient dans la maturation de la sous-unité 60S en favorisant la libération du facteur d'initiation de la traduction EIF6 des sous-unités pré-60S (Weis et al., 2015). Chez les patients souffrant de SDS, les cellules sont incapables de libérer efficacement EIF6 qui bloque alors la maturation de l'unité 60S (Finch et al., 2011) (Figure 11). Plus récemment, d'autres gènes impliqués dans la maturation de cette sous-unité ont été retrouvés chez des patients souffrant du SDS, notamment *EFL1*, *SRP54* et *DNAJC21* (Carapito et al., 2017 ; Dhanraj et al., 2017 ; Stepensky et al., 2017 ; Tan et al., 2019).

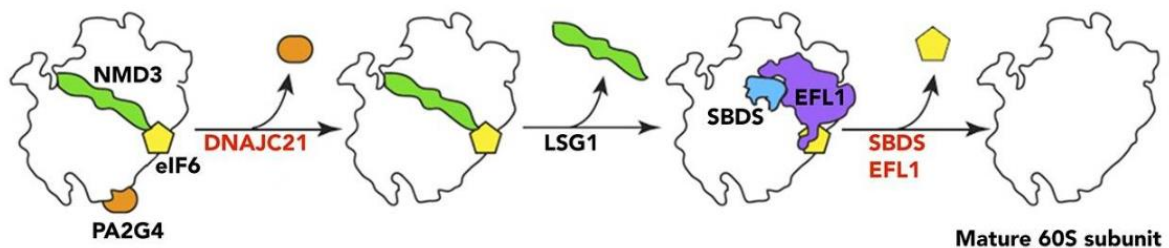


Figure 11 : Causes génétiques du SDS : des mutations dans des protéines impliquées dans la maturation de l'unité 60S, notamment *SBDS*, *DNAJC21* et *EFL1*. Figure issue de (Tan et al., 2019).

4)3) Implication de p53 dans les syndromes d'insuffisance médullaire

La protéine p53 est au carrefour de très nombreux processus cellulaires car elle est capable de reconnaître une multitude de stress et d'induire, en réponse, l'expression de nombreux gènes pour éviter la prolifération de cellules dont le génome est altéré. Quel que soit le syndrome d'insuffisance médullaire concerné, les processus cellulaires altérés peuvent conduire à une activation de p53. Dans le cas de la Dyskératose Congénitale, par exemple, une érosion trop importante des télomères peut mener à une activation de la machinerie de reconnaissance des cassures double brin de l'ADN et activer p53 (Karlseder et al., 1999 ; Deng et al., 2008 ; Artandi et DePinho, 2010 ; Fok et al., 2017). Les anomalies de réparation de l'ADN observée dans l'anémie de Fanconi peuvent également activer la protéine selon le même mécanisme (Kastan et al., 1991 ; Ceccaldi et al., 2012 ; Williams et Schumacher, 2016). Et il est bien connu aujourd'hui qu'une altération dans la biologie des ribosomes comme dans l'anémie de Blackfan-Diamond ou le syndrome de Shwachman-Diamond peut conduire à une activation de p53 (Jones et al., 2008 ; McGowan et al., 2008 ; Zhang et Lu, 2009 ; Barlow et al., 2010).

Mon laboratoire de thèse, via l'étude du modèle murin $p53^{A31/A31}$, a mis en évidence des rôles insoupçonnés du « gardien du génome » dans ces syndromes. Avec une première publication (Simeonova et al., 2013), le laboratoire a en effet démontré que les souris $p53^{A31/A31}$ modélisent la Dyskératose Congénitale et que p53 peut agir comme un régulateur négatif du métabolisme télomérique. Par la suite, ils ont constaté que p53 est aussi capable de réguler négativement la voie de Fanconi de réparation de l'ADN qui est perturbée dans l'anémie de Fanconi (Jaber, Toufektchan et al., 2016). Ces études menées chez la souris nous ont incités à approfondir le rôle de p53 dans les syndromes d'insuffisance médullaire chez l'Homme.

4)3)1) La souris $p53^{A31/A31}$, un modèle de Dyskératose Congénitale

Mon laboratoire d'accueil a montré qu'une suractivation de p53 peut mener au développement d'un tableau clinique complet de Dyskératose Congénitale chez la souris (Simeonova et al., 2013). Initialement, mon équipe d'accueil souhaitait étudier le rôle du domaine C-terminal de p53 car celui-ci était sujet à controverse. Pour élucider sa fonction, ils ont généré le modèle murin $p53^{A31/A31}$ qui exprime une protéine p53 tronquée de ses 31 derniers acides aminés et dépourvue de la totalité du domaine C-terminal. Ils ont constaté que cette mutation entraîne une suractivation de la protéine p53, aussi bien dans un modèle cellulaire *ex vivo* qu'*in vivo*. En effet, ils ont tout d'abord observé une augmentation de la transactivation de gènes cibles classiques de p53 (*p21*, *Mdm2*, *Puma...*) dans des fibroblastes embryonnaires murins (MEFs) $p53^{A31/A31}$ par rapport aux MEFs WT. Ils ont remarqué que ces fibroblastes mutés sénescent plus rapidement que les fibroblastes sauvages. De plus, les thymocytes de souris $p53^{A31/A31}$ présentent une apoptose accrue par rapport à ceux des souris WT, ce qui va toujours dans le sens d'une suractivation de p53. Cette dernière résulte d'une meilleure stabilisation de la protéine, que ce soit dans des MEFs non stressés ou après stress, ou dans différents tissus. Ainsi, bien que son rôle soit resté longtemps controversé, le domaine C-terminal de p53 joue globalement un rôle de régulateur négatif de la protéine.

Par ailleurs, le laboratoire a rapidement constaté que les souris homozygotes pour la mutation, $p53^{A31/A31}$, meurent prématurément puisque la majorité des souris décèdent en 3-4 semaines seulement (Figure 12). Ces souris sont de petite taille et présentent une hyperpigmentation cutanée, une hypoplasie cérébelleuse, une atrophie testiculaire, une hypertrophie cardiaque et enfin, une anémie aplasique résultant d'une insuffisance médullaire. Il est intéressant de noter que ces phénotypes avaient déjà été observés dans d'autres modèles murins présentant une suractivation de p53 (Liu et al., 2010, 2007 ; McGowan et al., 2008 ; Mendrysa et al., 2003 ;

Terzian et al., 2007). Bien que l'insuffisance médullaire soit la cause la plus probable de leur mort prématurée, les souris $p53^{A31/A31}$ ont également développé de la fibrose pulmonaire. Ce phénotype était particulièrement surprenant puisque, chez l'Homme, l'association d'une anémie aplasique et d'une fibrose pulmonaire est caractéristique des syndromes télomériques comme la Dyskératose Congénitale.

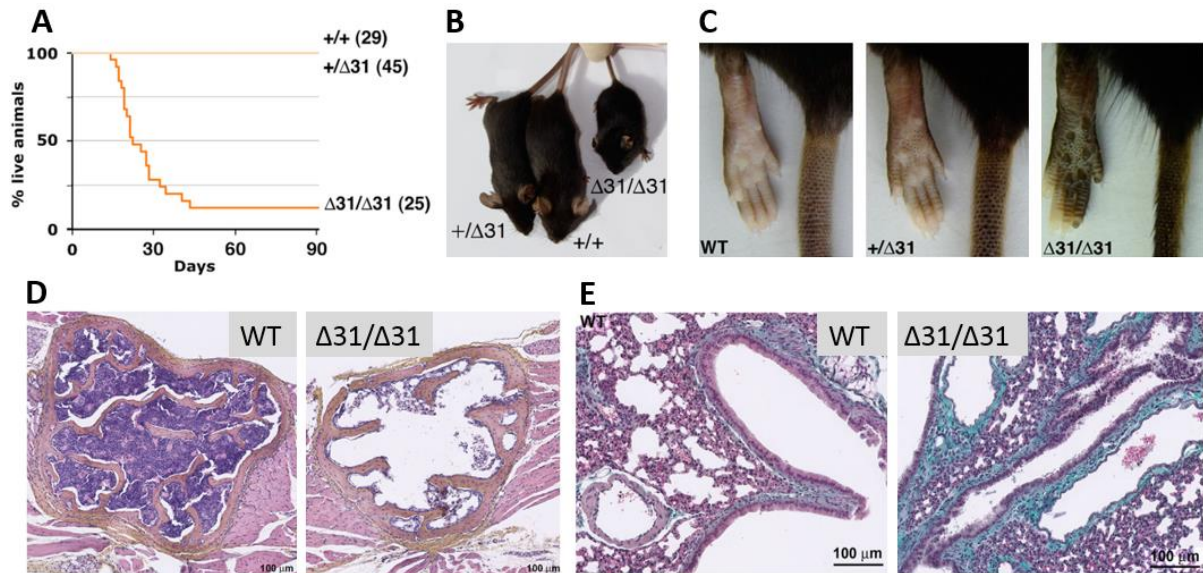


Figure 12 : Analyse phénotypique des souris $p53^{\Delta31/\Delta31}$. (A) Courbe de survie des souris WT, $p53^{+/\Delta31}$ (+/ $\Delta31$) et $p53^{\Delta31/\Delta31}$ ($\Delta31/\Delta31$) après 90 jours. L'effectif des populations de souris est entre parenthèses. (B) Exemples de souris WT, $p53^{+/\Delta31}$ et $p53^{\Delta31/\Delta31}$ de la même portée, 28 jours après la naissance (P28). (C) Exemples de pattes arrières de souris WT, $p53^{+/\Delta31}$ et $p53^{\Delta31/\Delta31}$. La souris $p53^{\Delta31/\Delta31}$ présente une hyperpigmentation cutanée. (D) Coloration hématoxyline-éosine de sections de sternum de souris WT et $p53^{\Delta31/\Delta31}$ de la même portée à P23, montrant de l'aplasie médullaire chez le mutant. (E) Coloration Trichrome de Masson de sections de poumons de souris WT et $p53^{\Delta31/\Delta31}$ de la même portée montrant de la fibrose pulmonaire chez le mutant. D'après (Simeonova et al., 2013).

Puisque ces syndromes sont liés à une altération de la longueur et/ou de la structure des télomères (Parry et al., 2011), mon équipe a comparé la longueur des télomères dans différents types cellulaires issus de souris $p53^{A31/A31}$ avec ceux issus de souris sauvages. Ils ont ainsi observé un raccourcissement anormal des télomères, aussi bien dans des cellules de moelle osseuse que dans des fibroblastes $p53^{A31/A31}$, confirmant ainsi que les souris développent des phénotypes de DC (Figure 13). Ces résultats ont été confortés par ceux d'une autre équipe qui a montré que des souris exprimant la protéine $p53^{\Delta24}$, avec une délétion plus courte du domaine C-terminal de p53, présentent également une activation de p53 et meurent rapidement d'aplasie médullaire, même si, dans cette deuxième étude, le phénotype télomérique n'a pas été analysé (Hamard et al., 2013).

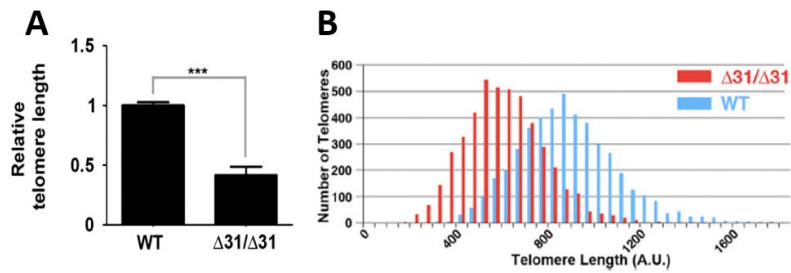


Figure 13 : Raccourcissement des télomères chez les souris $p53^{\Delta 31/\Delta 31}$. Résultats de la quantification de la longueur des télomères de cellules de moelle osseuse WT ou $p53^{\Delta 31/\Delta 31}$ par flow-FISH (A) ou de fibroblastes embryonnaires murins WT ou $p53^{\Delta 31/\Delta 31}$ par q-FISH (B). D'après (Simeonova et al., 2013).

Une analyse plus poussée du modèle $p53^{\Delta 31}$ a été menée afin d'expliquer le phénotype télomérique des souris mutantes homozygotes. Parmi plusieurs gènes connus pour être impliqués dans les syndromes télomériques, il a été observé que la suractivation de p53 conduit à la répression de 11 gènes du métabolisme télomérique parmi lesquels trois sont connus pour être mutés chez certains patients atteints de DC (*Dkc1*, *Tinf2* et *Rtel1*) et un dont un SNP est supposé impliqué dans des cas d'anémie aplasique (*Terf1*) (Figure 14). Ainsi, grâce à ce modèle murin, mon laboratoire de thèse a montré que p53 joue un rôle majeur dans la régulation du métabolisme des télomères chez la souris et peut conduire à leur raccourcissement.

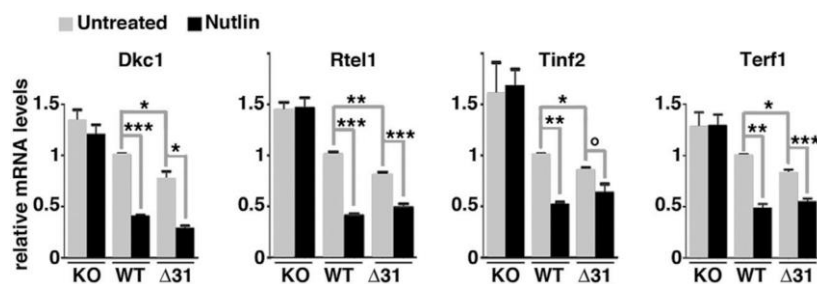


Figure 14 : *Dkc1*, *Rtel1*, *Tinf2*, et *Terf1* sont réprimés par $p53^{\Delta 31}$. Résultats de la quantification par RT-qPCR des niveaux des ARNm de *Dkc1*, *Rtel1*, *Tinf2*, et *Terf1* dans des MEFs WT ou traités à la Nutlin. D'après (Simeonova et al., 2013).

Cependant, ces résultats semblaient en contradiction avec une étude ultérieure, qui a proposé que p53 pourrait protéger les télomères de la dégradation en réponse à un stress génotoxique (Tutton et al., 2016 ; Lieberman, 2016). En effet, cette équipe a identifié des sites de liaison de p53 dans les régions subtélomériques humaines et murines. Lors de dommages à l'ADN, p53 pourrait se lier à ces sites ce qui permettrait la transcription du long ARN non codant TERRA (telomere-repeat encoding RNA), impliqué dans le maintien de l'intégrité des télomères. De plus, cette liaison induirait des modifications de la structure de la chromatine (acétylation des histones télomériques) pour faciliter la réparation des dommages. Enfin, la liaison de p53 serait associée à une diminution des marques γ -H2AX qui témoignent de dommages à l'ADN et à

une augmentation de l'interaction des protéines protectrices TRF1 et TRF2 avec l'ADN des régions télomériques et subtélomériques. La délétion de p53 altérerait la transcription de TERRA et induirait un dysfonctionnement télomérique, suggérant qu'une activation de p53 est nécessaire pour protéger les télomères lors de dommages à l'ADN. Ainsi, d'après les résultats de mon laboratoire de thèse, si la perte de p53 affecte les télomères probablement via une perte de la transcription de TERRA, une suractivation de la protéine a aussi des conséquences délétères via la répression de gènes impliqués dans le maintien des télomères (Toledo, 2018).

4)3)2) Le modèle $p53^{A31/A31}$ et anémie de Fanconi

En élargissant l'étude à d'autres gènes impliqués dans le métabolisme des télomères ou dont les mutations sont associées à leur dysfonctionnement, mon laboratoire de thèse a identifié le gène *Fancd2* comme étant un gène réprimé par $p53^{\Delta31}$. Ce gène a particulièrement retenu l'attention de mon laboratoire car, chez l'Homme, l'inactivation d'un seul des gènes FANC est suffisante pour induire l'anémie de Fanconi, qui présente de nombreux traits phénotypiques semblables à la DC. D'autres liens avec la voie de Fanconi ont été établis puisque mes collègues ont remarqué, par exemple, que *Rtel1*, l'un des gènes mutés dans la DC et précédemment identifié comme réprimé par $p53^{\Delta31}$, code pour une hélicase apparentée à *Fancj*. De plus, *Blm* et *Fen1*, deux autres gènes trouvés comme réprimés par p53 codent pour une hélicase et une endonucléase interagissant avec des protéines Fanc.

Ces observations ont conduit mon laboratoire de thèse à évaluer plus précisément l'impact de p53 sur l'expression des gènes *Fanc*. C'est ainsi qu'ils ont découvert que la suractivation de p53 mène à la répression de 11 gènes *Fanc* supplémentaires. Ils ont par ailleurs constaté que les cellules $p53^{A31/A31}$ sont hypersensibles à la Mitomycine C, un agent induisant des ponts interbrins, ce qui est typique des cellules de patients atteints de l'anémie de Fanconi (Longerich et al., 2014). Ainsi, l'ensemble des résultats obtenus par l'étude du modèle murin $p53^{A31/A31}$ a permis d'associer p53 à la régulation du métabolisme des télomères, mais également à celle de la voie Fanconi de réparation de l'ADN. Ce mécanisme commun pourrait expliquer la confusion clinique possible entre ces deux syndromes (Jaber, Toufektchan et al., 2016). En effet, des défauts télomériques ont été observés chez certains patients atteints de FA présentant une mutation de *FANCD2* (Joksic et al., 2012). A l'inverse, des cellules de patients souffrant du syndrome de Hoyeraal-Hreidarsson, un variant sévère de la DC, et mutées pour *RTEL1*, peuvent présenter une hypersensibilité à la Mitomycine C (Ballew et al., 2013). De plus, il a

récemment été montré que des mutations de *BRCA1* (*FANCS*) ou *BRCA2* (*FANCD1*) peuvent altérer la structure et la fonction des télomères (Uziel et al., 2016).

Ainsi, s'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, les résultats de mon laboratoire de thèse 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 d'amplification positive. Ce modèle est compatible avec une étude qui avait indiqué que l'insuffisance de la moelle osseuse dans l'anémie de Fanconi est déclenchée par une réponse exacerbée de p53 aux dommages de l'ADN dépendante de p21 (Ceccaldi et al., 2012). Grâce à des cellules de patients, et divers modèles murins (*Fancg*^{-/-} et *Fancd2*^{-/-}) et de xéno greffes, les chercheurs ont montré que l'accumulation des dommages à l'ADN induit une réponse p53/p21, dans les cellules progénitrices hématopoïétiques, qui conduirait à un arrêt des cellules en phase G0/G1. Le KO de p53 ou de p21 dans ces différents modèles permet de rétablir ce phénotype. Cet arrêt du cycle cellulaire, qui a probablement comme fonction de limiter l'accumulation de dommages, pourrait survenir très tôt comme le montre l'analyse de foies fœtaux. Il perturberait ainsi la mise en place du pool de cellules progénitrices hématopoïétiques et serait à l'origine de l'insuffisance médullaire chez les patients atteints de FA. L'ensemble de ces résultats laisse à penser que p53, bien qu'il soit considéré comme le gardien du génome, pourrait également contribuer, via une activation exacerbée, aux développements de syndromes d'insuffisance médullaire chez des patients.

4)3)3) Que sait-on du rôle de p53 dans les syndromes d'insuffisance médullaire chez l'Homme ?

Mon équipe d'accueil a constaté, d'une part, que la protéine délétée p53^{Δ31} est hyperactive et, d'autre part, que les souris *p53*^{Δ31/Δ31} récapitulent les phénotypes cliniques et moléculaires de la DC. Ces phénotypes sont provoqués par la suractivation de p53 qui mène à la répression de gènes du métabolisme télomérique dont certains sont connus pour être impliqués dans le développement de la pathologie (Simeonova et al., 2013 ; Jaber, Toufektchan et al., 2016). Ils ont également démontré que les cellules *p53*^{Δ31/Δ31} phénocopient les cellules de patients atteints de FA et que la protéine p53 régule négativement des gènes impliqués dans la voie de Fanconi de réparation de l'ADN (Jaber, Toufektchan et al., 2016). Dans des cellules humaines en culture, mon équipe a établi que la plupart de ces gènes sont également régulés par p53, notamment *DKC1*, *RTEL1* et *FANCD2*. Ces résultats ont incité mon laboratoire de thèse à se

demander si une suractivation de p53 peut être à l'origine d'un syndrome d'insuffisance médullaire chez l'Homme.

Une étude menée par une autre équipe (Tummala et al., 2015) semblait conforter cette hypothèse. Cette équipe a mis en évidence une mutation du gène *PARN* dans une famille atteinte de DC. Ce gène code pour une polyA-ribonucléase supposée dégrader de nombreux ARNm et notamment ceux de p53. Les cellules de patients mutées pour *PARN* présentaient une suractivation de p53 associée à une faible expression de plusieurs gènes impliqués dans le métabolisme des télomères (*TRF1*, *DKC1* et *RTEL1*) dont certains sont régulés par p53 (Tummala et al., 2015). Il a été proposé qu'une mutation de *PARN*, altérant sa capacité à dégrader son ARNm, pourrait mener à une stabilisation accrue de p53. Cela contribuerait à son activation et conduirait ainsi à une altération du métabolisme télomérique comme dans le modèle p53^{Δ31}. Cependant, *PARN* régule aussi la stabilité de TERC (Moon et al., 2015), l'ARN de la télomérase, et il est possible que la suractivation de p53 dans les cellules de ces patients soit, au moins en partie, consécutive à l'instabilité de TERC. Par ailleurs, le rôle de *PARN* lui-même en tant que polyA-ribonucléase a été remis en question récemment, et il a été proposé que cette protéine soit plutôt un modulateur d'ARNs non codant nucléaires (Son et al., 2018). Ainsi, l'analyse de familles souffrant de DC mutées pour *PARN* n'a pas permis de déterminer si une suractivation de p53 peut être à l'origine de syndromes d'insuffisance médullaire chez l'Homme et nous a encouragés à poursuivre notre analyse.

Afin de déterminer si une suractivation de p53 peut contribuer au développement de syndromes d'insuffisance médullaire chez des patients, mon équipe d'accueil a initié des collaborations avec des équipes de cliniciens pour tenter d'identifier des mutations de *TP53* ou de ses principaux régulateurs, *MDM2* et *MDM4*, chez des familles souffrant de ces syndromes. Une collaboration avec l'équipe de Sharon Savage (National Cancer Institute) a notamment conduit à identifier une mutation de *MDM4* chez une famille présentant des phénotypes proches de la Dyskératose Congénitale, un syndrome d'insuffisance médullaire causé par des altérations du métabolisme télomérique. Des mutations de *MDM4* ou d'autres gènes de la voie p53 n'avaient encore jamais été découvertes chez des patients souffrant de ce syndrome. Par ailleurs, *MDM4* n'a jamais été directement associée au métabolisme télomérique. Au cours de ma thèse, j'ai participé à l'étude d'un modèle murin portant cette mutation de *MDM4*, généré par notre laboratoire, de façon à déterminer son effet sur l'activité de p53 et son implication dans le développement du syndrome d'insuffisance médullaire de cette famille.

RESULTATS

La Dyskératose Congénitale (DC) est un syndrome d'insuffisance médullaire causé par une altération des télomères. Mon laboratoire d'accueil a découvert, grâce au modèle murin $p53^{A31/A31}$, qu'une suractivation de p53 chez la souris conduit à une répression de gènes du métabolisme télomérique et au développement de phénotypes de DC. Cependant, la pertinence de ces résultats chez l'Homme restait à démontrer. Mon projet consistait donc à déterminer si des mutations de p53 ou de ses régulateurs pouvaient contribuer à des syndromes d'insuffisance médullaire chez des patients. Pour répondre à cette question, mon équipe d'accueil a collaboré avec le laboratoire de Sharon Savage (National Cancer Institute) qui a réalisé des séquençages chez des familles souffrant de DC mais qui ne présentent pas de mutations dans les gènes habituellement mutés chez les patients souffrant de ce syndrome.

Ce séquençage a permis d'identifier une mutation de *MDM4* chez une famille présentant des phénotypes proches de la DC. Plusieurs membres de cette famille, porteurs de la mutation, présentent une insuffisance médullaire et des télomères courts. Certains d'entre eux ont développé une leucémie myéloïde aiguë ou des carcinomes de la langue, des complications courantes chez les patients souffrant de DC. Pour ces raisons, nous nous sommes demandé quelle pouvait être la contribution de la mutation de *MDM4* dans le développement de ces phénotypes.

Cette mutation de *MDM4* est une mutation faux-sens qui conduit à la substitution d'une thréonine en méthionine, à la position 454, dans le domaine RING de la protéine. Elle est située au niveau d'un domaine P-loop qui confère à la protéine la capacité de lier l'ATP et également au niveau d'une structure secondaire, importante pour l'interaction avec MDM2. Nous avons constaté que le domaine RING de *MDM4* muté conserve sa capacité à lier l'ATP de façon spécifique. Toutefois, ce domaine muté interagit moins bien avec le domaine RING de MDM2 d'après un test double hybride. Par ailleurs, des expériences de transfection de vecteurs exprimant les protéines sauvages (WT) ou mutées ($MDM4^{T454M}$) ont été réalisées pour évaluer l'impact de la mutation sur les protéines entières. Ces expériences indiquent que la protéine $MDM4^{T454M}$ est moins bien exprimée que la protéine WT. Cela pourrait conduire à une inhibition de p53 moins efficace et contribuer ainsi à une suractivation de p53.

Puisque le domaine RING de *MDM4* est très conservé entre l'Homme et la souris, nous avons décidé de reproduire cette mutation sur un modèle murin pour évaluer ses conséquences physiologiques. Le ciblage dans des cellules ES nous a permis de générer des individus hétérozygotes pour la mutation $Mdm4^{+/T454M}$ que nous avons croisé entre eux pour générer des fibroblastes embryonnaires murins (MEFs) $Mdm4^{T454M/T454M}$. L'analyse de ces fibroblastes a

montré que la mutation n'affecte pas les niveaux des ARNm de Mdm4-FL et Mdm4-S, les deux isoformes principales de Mdm4. Toutefois, le niveau d'expression de la protéine Mdm4-FL dans les MEFs *Mdm4*^{T454M/T454M} est plus faible que celui observé dans les MEFs WT, ce qui concorde avec nos résultats précédents. Par la suite, nous avons observé une surexpression de p21 et Mdm2, deux gènes cibles de p53, dans les MEFs *Mdm4*^{T454M/T454M} par rapport aux MEFs WT et *Mdm4*^{+T454M}. Ces résultats suggèrent une suractivation de p53. En accord avec cette hypothèse, un test 3T3 indique que les MEFs *Mdm4*^{T454M/T454M} prolifèrent moins bien au fur et à mesure des passages que les MEFs WT ou *Mdm4*^{+T454M}. Ainsi, ces résultats indiquent que la mutation de *Mdm4* peut conduire à une suractivation de p53 comme dans le modèle *p53*^{Δ31/Δ31}.

Nous avons évalué ensuite les conséquences de cette suractivation sur le métabolisme des télomères. Une expérience de qFISH a montré que les MEFs *Mdm4*^{T454M/T454M} ont des télomères en moyenne plus courts que les MEFs WT et qu'ils présentent en plus une population de chromosomes avec des télomères très courts. Comme dans les MEFs *p53*^{Δ31/Δ31}, nous avons constaté que la suractivation de p53 conduit à une diminution subtile mais significative de l'expression de nombreux gènes du métabolisme télomérique. Ces résultats nous ont encouragés à poursuivre notre analyse pour évaluer l'impact de la mutation de *Mdm4* *in vivo*.

Dans un premier temps, nous avons généré des souris homozygotes pour la mutation, *Mdm4*^{T454M/T454M}. Cependant, ces mutants décèdent dans l'heure qui suit leur naissance, probablement de problèmes respiratoires. En effet, les nouveau-nés *Mdm4*^{T454M/T454M} apparaissent hypoxiques et sont de petite taille par rapport aux autres petits de la même portée. Ils présentent également une hypoplasie pulmonaire et leurs poumons ne flottent pas dans un liquide contrairement à ceux des WT, indiquant une absence d'air. Puisque cet organe semblait particulièrement affecté, nous avons mesuré la longueur des télomères dans les cellules de poumons par flow-FISH. Nous avons ainsi montré que les mutants présentent un raccourcissement de leurs télomères dans ces cellules. Pour déterminer si la létalité périnatale observée est causée par une suractivation de p53, nous avons tenté de générer des individus *Mdm4*^{T454M/T454M} sur un fonds *p53* KO. Nous avons constaté que la perte d'un seul allèle de *p53* est suffisante pour sauver partiellement leur phénotype puisque les souris *Mdm4*^{T454M/T454M} *p53*^{+/-} survivent au moins 2 mois après leur naissance. Ces souris sont de petite taille et présentent une hyperpigmentation cutanée. Des coupes de sternum ont révélé qu'elles souffrent d'aplasie médullaire, confirmée par des numérations montrant un défaut en cellules sanguines. Ainsi, bien que le phénotype pulmonaire ait été rétabli, les souris *Mdm4*^{T454M/T454M} *p53*^{+/-} décèdent prématurément d'insuffisance médullaire. Ces résultats étaient prometteurs car ils suggéraient que la mutation de *MDM4* peut conduire à de l'insuffisance médullaire chez

l'Homme. Par ailleurs, le fait que les souris $Mdm4^{T454M/T454M} p53^{-/-}$ ne présentent pas d'autres phénotypes qu'un développement prématuré de thymome ou de sarcome, à l'instar de ce qui est observé chez les souris $Mdm4^{+/+} p53^{-/-}$, indique que l'effet de cette mutation est dépendant de p53. Toutefois, cette mutation est retrouvée uniquement à l'état hétérozygote dans la famille. Pour la modéliser plus fidèlement, nous avons étudié des souris hétérozygotes $Mdm4^{+/T454M}$.

Nous avons constaté que la plupart des souris $Mdm4^{+/T454M}$ survivent comme des souris sauvages. Elles ne développent pas de phénotypes de DC. Toutefois, certaines d'entre elles présentent une hyperpigmentation cutanée, un signe d'une suractivation de p53. Nous avons décidé de les croiser avec des souris $p53^{+/Δ31}$ qui présentent, elles aussi, une légère activation de p53 sans toutefois développer des phénotypes de DC. Nous avons alors observé que les souris $Mdm4^{+/T454M} p53^{+/Δ31}$ meurent en moins de 3 mois. Par ailleurs, elles sont de petite taille et présentent une hyperpigmentation cutanée, une hypertrophie cardiaque et une hypoplasie thymique et testiculaire, cette dernière étant retrouvée chez les patients atteints du syndrome de Hoyeraal-Hreidarsson, un variant sévère de la DC. Ces souris présentent également une aplasie médullaire qui a été confirmée par des analyses sanguines indiquant une pancytopénie. Enfin, l'analyse des cellules de moelle osseuse par flow-FISH a, de nouveau, montré un raccourcissement des télomères chez les souris $Mdm4^{+/T454M} p53^{+/Δ31}$ par rapport aux WT et aux simples hétérozygotes.

Finalement, la caractérisation phénotypique de ces modèles murins a montré, sur différents fonds génétiques, que la mutation $Mdm4^{T454M}$ entraîne une suractivation de p53 et conduit à des phénotypes d'insuffisance médullaire et à des raccourcissements télomériques. La grande variabilité des phénotypes observés suggèrent que des variations subtiles dans l'activité de p53 peuvent impacter fortement les effets de la mutation $Mdm4^{T454M}$. En effet, les souris $Mdm4^{T454M/T454M} p53^{+/+}$ meurent à la naissance de problèmes respiratoires, tandis que les souris $Mdm4^{T454M/T454M} p53^{+/-}$ souffrent d'insuffisance médullaire. Les souris $Mdm4^{+/T454M} p53^{+/+}$ présentent uniquement de l'hyperpigmentation cutanée mais les souris $Mdm4^{+/T454M} p53^{+/Δ31}$ développent des phénotypes de DC. Ces résultats nous ont laissé penser que des SNPs faisant varier l'activité de p53 pourraient expliquer la variabilité des phénotypes chez les membres de la famille. En accord avec cette hypothèse, nous avons identifié trois SNPs de *MDM4* et deux SNPs de *TP53* qui pourraient impacter l'activité de p53 et conduire à des phénotypes plus ou moins prononcés dans la famille étudiée. Finalement, l'ensemble de ces résultats indique que la mutation de *MDM4* contribue au développement des phénotypes de DC de la famille.

GENETICS

Germline mutation of *MDM4*, a major p53 regulator, in a familial syndrome of defective telomere maintenance

Eléonore Toufektchan^{1,2,3,4*}, Vincent Lejour^{1,2,3,4*}, Romane Durand^{1,2,3,4*}, Neelam Giri⁵, Irena Draskovic^{2,3,4,6}, Boris Bardot^{1,2,3,4}, Pierre Laplante^{1,2,3,4}, Sara Jaber^{1,2,3,4}, Blanche P. Alter⁵, José-Arturo Londono-Vallejo^{2,3,4,6}, Sharon A. Savage⁵, Franck Toledo^{1,2,3,4†}

Copyright © 2020 The Authors, some rights reserved; exclusive licensee American Association for the Advancement of Science. No claim to original U.S. Government Works. Distributed under a Creative Commons Attribution License 4.0 (CC BY).

Dyskeratosis congenita is a cancer-prone inherited bone marrow failure syndrome caused by telomere dysfunction. A mouse model recently suggested that p53 regulates telomere metabolism, but the clinical relevance of this finding remained uncertain. Here, a germline missense mutation of *MDM4*, a negative regulator of p53, was found in a family with features suggestive of dyskeratosis congenita, e.g., bone marrow hypocellularity, short telomeres, tongue squamous cell carcinoma, and acute myeloid leukemia. Using a mouse model, we show that this mutation (p.T454M) leads to increased p53 activity, decreased telomere length, and bone marrow failure. Variations in p53 activity markedly altered the phenotype of *Mdm4* mutant mice, suggesting an explanation for the variable expressivity of disease symptoms in the family. Our data indicate that a germline activation of the p53 pathway may cause telomere dysfunction and point to polymorphisms affecting this pathway as potential genetic modifiers of telomere biology and bone marrow function.

INTRODUCTION

TP53 is the gene most frequently mutated in human tumors (1), and germ line-inactivating p53 mutations cause the Li-Fraumeni syndrome of cancer predisposition (2). In addition, accelerated tumorigenesis has been associated with polymorphisms increasing the expression of MDM2 or MDM4, the essential p53 inhibitors (3, 4). Alterations of the p53/MDM2/MDM4 regulatory node are, thus, mainly known to promote cancer. Unexpectedly, however, we recently found that mice expressing p53^{Δ31}, a hyperactive mutant p53 lacking its C terminus, recapitulated the complete phenotype of patients with dyskeratosis congenita (DC) (5).

DC is a telomere biology disorder characterized by the mucocutaneous triad of abnormal skin pigmentation, nail dystrophy, and oral leukoplakia; patients are also at very high risk of bone marrow failure, pulmonary fibrosis, and cancer, especially head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) and acute myeloid leukemia (AML) (6). Patients with DC are known to exhibit disease diversity in terms of age of onset, symptoms, and severity due to the mode of inheritance and causative gene (7, 8). DC is caused by germline mutations in genes encoding key components of telomere biology: the telomerase holoenzyme (*DKC1*, *TERC*, *TERT*, *NOP10*, and *NHP2*), the shelterin telomere protection complex (*ACD*, *TINF2*, and *POT1*), telomere capping proteins (*CTC1* and *STN1*), and other proteins interacting with these cellular processes (*RTEL1*, *NAF1*, *WRAP53*, and *PARN*) (6). Twenty to 30% of affected individuals remain unexplained at the molecular level.

Our finding that p53^{Δ31/Δ31} mice were remarkable models of DC was initially unexpected for two reasons. First, an increased p53 activity was not expected to cause telomere dysfunction, given the

well-accepted notion that p53 acts as “the guardian of the genome”. However, p53 is now known to down-regulate the expression of many genes involved in genome maintenance (5, 9, 10), and this might actually contribute to its toolkit to prevent tumor formation (11). Second, telomere biology diseases are usually difficult to model in mice because of differences in telomere length and telomerase expression between mice and humans. Mice that lack telomerase exhibited short telomeres only after three or four generations (G3/G4) of intracrosses (12, 13). However, mice with a telomerase haploinsufficiency and a deficient shelterin complex exhibited telomere dysfunction and DC features in a single generation (G1) (14). Because DC features were observed in G1 p53^{Δ31/Δ31} mice, we supposed that p53 might exert pleiotropic effects on telomere maintenance. Consistent with this, we found that murine p53 down-regulates several genes implicated in telomere biology (5, 9). Because some of these genes were also down-regulated by p53 in human cells (5, 9), our data suggested that an activating p53 mutation might cause features of DC in humans. However, this conclusion remained speculative in the absence of any clinical evidence.

Here, we report the identification of a germline missense mutation in *MDM4*, encoding an essential and specific negative regulator of p53, in a family presenting some DC-like phenotypic traits. We used a mouse model to demonstrate that this mutation leads to p53 activation, short telomeres, and bone marrow failure. Together, our results provide compelling evidence that a germline mutation affecting a specific p53 regulator may cause DC-like features in both humans and mice.

RESULTS

A *MDM4* mutation in a family with DC-like features

Family NCI-226 first enrolled in the National Cancer Institute (NCI) inherited bone marrow failure syndrome (IBMFS) cohort in 2008 (Fig. 1A and table S1). At the time, the proband (226-1) was 17 years of age and had a history of neutropenia, bone marrow hypocellularity,

¹Genetics of Tumor Suppression, Institut Curie, Paris, France. ²CNRS UMR 3244, Paris, France. ³Sorbonne Université, Paris, France. ⁴PSL Research University, Paris, France. ⁵Clinical Genetics Branch, Division of Cancer Epidemiology and Genetics, National Cancer Institute, Rockville, MD, USA. ⁶Telomeres and Cancer, Institut Curie, Paris, France. *These authors contributed equally to this work. †Corresponding author. Email: franck.toledo@curie.fr

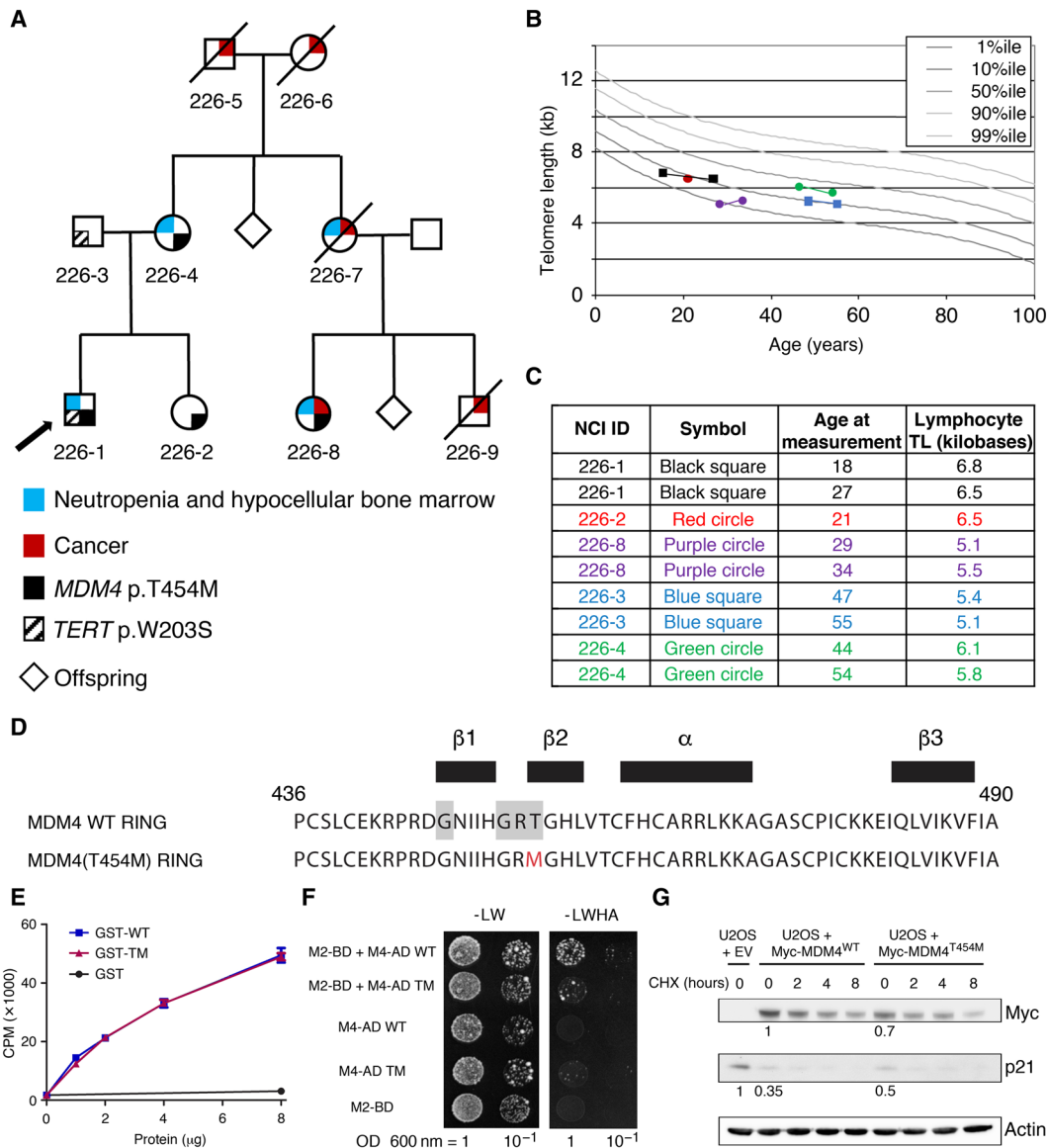


Fig. 1. A germline *MDM4* p.T454M mutation identified in a family with bone marrow hypocellularity and short telomeres. (A) Pedigree of family NCI-226. Arrow indicates proband. Cancer histories include oral squamous cell carcinoma for 226-8 at age 27 years and for 226-9 at age 42 years, and melanoma at 51 years and AML at 52 years for 226-7 (see table S1 for further details). 226-5 had lung cancer at age 69 years. 226-6 had non-Hodgkin lymphoma at age 91 years. In addition, four siblings of 226-6 had cancer: one with breast, two with lung, and one with ovary or uterus (not specified). Sequencing of 226-5, 226-6, 226-7, and 226-9 was not possible because of lack of available DNA. (B and C) Lymphocyte telomere lengths (TL) of study participants. Total lymphocyte telomere lengths are shown and were measured by flow cytometry with in situ hybridization. (B) Graphical depiction of telomere length in relation to age. Four individuals had telomeres measured twice. Legend is in (C). Percentiles (%ile) are based on 400 healthy individuals (50). (C) Age at measurement(s) and telomere length in kilobases. (D) Sequence of the *MDM4* RING domain (residues 436 to 490) with secondary structure residues indicated (black boxes). The P-loop motif is highlighted in gray, and the mutated residue in red. (E) The mutant RING domain retains ATP-binding capacity. Wild-type (WT) and mutant (TM) glutathione *S*-transferase (GST)–RING proteins, or GST alone, were incubated with 10 nM ATP and 5 μ Ci ATP- γ - 32 P for 10 min at room temperature, filtered through nitrocellulose, and counted by liquid scintillation CPM, counts per minute. Results from two independent experiments. (F) The mutant *MDM4* RING domain has an altered capacity to dimerize with the *MDM2* RING. Two-hybrid assays were carried out as described (47). -LW, minus leucine and tryptophan; -LWHA, minus leucine, tryptophan, histidine and adenine; OD, optical density. Growth on the -LWHA medium indicates protein interaction, readily observed between *MDM2* (M2-BD) and WT *MDM4* (M4-AD WT) but faintly visible between *MDM2* and *MDM4*^{T454M} (M4-AD TM). (G) Impact of the mutation in transfected human cells. U2OS cells were transfected with an empty vector (EV) or an expression plasmid encoding a Myc-tagged *MDM4* (WT or T454M) protein and then treated or not with cycloheximide (CHX) to inhibit protein synthesis, and protein extracts were immunoblotted with antibodies against Myc, p21, or actin. Bands were normalized to actin, and a value of 1 was assigned to cells transfected with the WT *MDM4* expression plasmid (for Myc) or with the empty vector (for p21).

vague gastrointestinal symptoms, and chronic pain. His mother (226-4) also had intermittent neutropenia and a hypocellular bone marrow. Notably, his maternal aunt (226-7) had a history of melanoma and died at age 52 because of AML. The maternal aunt's

daughter (proband's cousin, 226-8) had HNSCC at age 27 years, intermittent neutropenia, and bone marrow hypocellularity, while her son (proband's cousin, 226-9) was diagnosed with metastatic HNSCC at 42 years of age. The proband's father (226-3) was healthy

with the exception of hemochromatosis. An IBMFS was suspected on the basis of the family history of cancer and neutropenia. Chromosome breakage for Fanconi anemia was normal, while lymphocyte telomeres were between the 1st and 10th percentiles in the proband and maternal cousin (226-8) (Fig. 1, B and C). The proband was tested for mutations in known DC-causing genes, and a *TERT* variant (p.W203S) was identified. Unexpectedly, however, the variant was found to be inherited from his father. *TERT* p.W203S is not present in gnomAD, but it is predicted to be tolerated by MetaSVM (15).

Since the *TERT* variant did not track with disease inheritance, whole-exome sequencing (WES) was performed to search for a causal gene. The whole-exome data were filtered by maternal autosomal inheritance and revealed three genes with heterozygous missense mutations potentially deleterious according to bioinformatics predictions: *MDM4*, *KRT76*, and *REM1* (table S2). Given the limited knowledge of the function of *KRT76* and *REM1*, and our prior knowledge of a DC-like phenotype in *p53^{Δ31/Δ31}* mice, we chose to focus on the mutation affecting *MDM4* because it encodes a major negative regulator of p53. Although the T454M mutation does not affect the p53 interaction domain of MDM4, it might affect p53 regulation because it affects the MDM4 RING domain: Residue 454 is both part of a P-loop motif thought to confer adenosine triphosphate (ATP)-binding capacity (16) and part of a β strand important for MDM2-MDM4 heterodimerization (Fig. 1D) (17). The mutant RING domain had fully retained its capacity to bind ATP specifically (Fig. 1E and fig. S1A) but exhibited an altered capacity to interact with the MDM2 RING domain in a yeast two-hybrid assay (Fig. 1F). We next used transfection experiments to evaluate the consequences of this mutation on the full-length protein in human cells. We transfected U2OS cells—known to have a functional but attenuated p53 pathway due to MDM2 overexpression (18)—with either an empty vector or an expression plasmid encoding a Myc-tagged MDM4^{WT} or MDM4^{T454M} protein. Compared with cells transfected with the empty vector, cells transfected with a MDM4^{WT} or a MDM4^{T454M} expression plasmid exhibited decreased p21 levels, indicating MDM4-mediated p53 inhibition in both cases (Fig. 1G). However, the decrease in p21 levels was less pronounced in cells expressing MDM4^{T454M} than in cells expressing MDM4^{WT} (Fig. 1G) despite similar transfection efficiencies (fig. S1B). The lower expression levels of the MDM4^{T454M} protein likely contributed to its decreased capacity to inhibit p53 (Fig. 1G). In this experimental setting, the treatment with cycloheximide did not reveal any significant difference in stability between the mutant and wild-type (WT) MDM4 proteins (Fig. 1G and quantification in fig. S1C), raising the possibility that the observed lower MDM4^{T454M} protein levels might result from differences in mRNA translation efficiency. Together, these preliminary results argued for an impact of the mutation on MDM4 function, leading to p53 activation.

Targeting of an *Mdm4*^{T454M} mutation in the mouse

The MDM4 RING domain is remarkably conserved throughout evolution, e.g., with 91% identity between the RING domains of human MDM4 and mouse *Mdm4* (19). Thus, we decided to create a mouse model to precisely evaluate the physiological impact of the human mutation. We used homologous recombination in embryonic stem (ES) cells to target the p.T454M mutation at the *Mdm4* locus (Fig. 2A). Targeted recombinants were identified by long-range polymerase chain reaction (PCR) (Fig. 2B), confirmed by DNA sequencing (Fig. 2C), and the structure of the recombinant allele was

further analyzed by Southern blots with probes located 5' and 3' of the targeted mutation (Fig. 2D). Recombinant ES clones were then microinjected into blastocysts to generate chimeric mice, and chimeras were mated with PGK-Cre mice to excise the Neo gene. PCR was used to verify transmission through the germ line of the *Mdm4*^{T454M} (noted below *Mdm4*TM) mutation and to genotype the mouse colony and mouse embryonic fibroblasts (MEFs) (Fig. 2E). We first isolated RNAs from *Mdm4*^{TM/TM} MEFs and sequenced the entire *Mdm4* coding sequence: The *Mdm4*TM sequence was identical to the WT *Mdm4* sequence except for the introduced missense mutation (not shown). Furthermore, like its human counterpart, the *Mdm4* gene encodes two major transcripts: *Mdm4*-FL, encoding the full-length oncoprotein that inhibits p53, and *Mdm4*-S, encoding a shorter, extremely unstable protein (20, 21). We observed, in unstressed cells as well as in cells treated with Nutlin [a molecule that activates p53 by preventing Mdm2-p53 interactions (22) without altering Mdm4-p53 interactions (23, 24)], that the *Mdm4*TM mutation affected neither *Mdm4*-FL nor *Mdm4*-S mRNA levels (Fig. 2F). In Western blots, however, *Mdm4*-FL was the only detectable isoform, and it was expressed at lower levels in the mutant MEFs (Fig. 2G).

Mdm4^{TM/TM} fibroblasts exhibit increased p53 activity and short telomeres

Mdm4^{TM/TM} MEFs contained higher mRNA levels for the p53 targets *p21* (*Cdkn1a*) and *Mdm2*, indicating increased p53 activity (Fig. 3A). Consistent with this, *Mdm4*^{TM/TM} MEFs exhibited increased p21 and *Mdm2* protein levels (Fig. 3B and fig. S2). Moreover, *Mdm4*^{TM/TM} MEFs prematurely ceased to proliferate when submitted to a 3T3 protocol (Fig. 3C), which also suggests an increased p53 activity. The mean telomere length was decreased by 11% in *Mdm4*^{TM/TM} MEFs, and a subset of very short telomeres was observed in these cells, hence demonstrating a direct link between the *Mdm4*TM mutation, p53 activation, and altered telomere biology (Fig. 3D). In *p53^{Δ31/Δ31}* MEFs, subtle but significant decreases in expression were previously observed for several genes involved in telomere biology, and in particular, small variations in *Rtel1* gene expression were found to have marked effects on the survival of *p53^{Δ31/Δ31}* mice (5, 9). Similarly, *Mdm4*^{TM/TM} MEFs exhibited subtle but significant decreases in expression for *Rtel1* and several other genes contributing to telomere biology (Fig. 3E). We previously showed that p53 activation correlates with an increased binding of the E2F4 repressor at the *Rtel1* promoter (9). Hence, the decreased *Rtel1* mRNA levels in *Mdm4*^{TM/TM} MEFs most likely resulted from increased p53 signaling. Consistent with this, a further increase in p53 activity, induced by Nutlin, led to further decreases in *Rtel1* mRNA and protein levels, in both WT and *Mdm4*^{TM/TM} cells (fig. S3A). Recently, in apparent contradiction with our finding that p53 activation can cause telomere shortening (5), p53 was proposed to prevent telomere DNA degradation by inducing subtelomeric transcripts, including telomere repeat-containing RNA (TERRA) (25, 26), which suggested a complex, possibly context-dependent impact of p53 on telomeres (27). This led us to compare TERRA transcripts in WT and *Mdm4*^{TM/TM} cells. Consistent with an earlier report (26), p53 activation led to increased TERRA at the mouse Xq subtelomeric region in WT cells (fig. S3B). However, *Mdm4*^{TM/TM} cells failed to induce TERRA in response to stress (fig. S3B). Together, our data suggest that the telomere shortening observed in *Mdm4*^{TM/TM} cells results from a p53-dependent decrease in expression of several telomere-related genes and, notably, *Rtel1*, a gene mutated in several families with

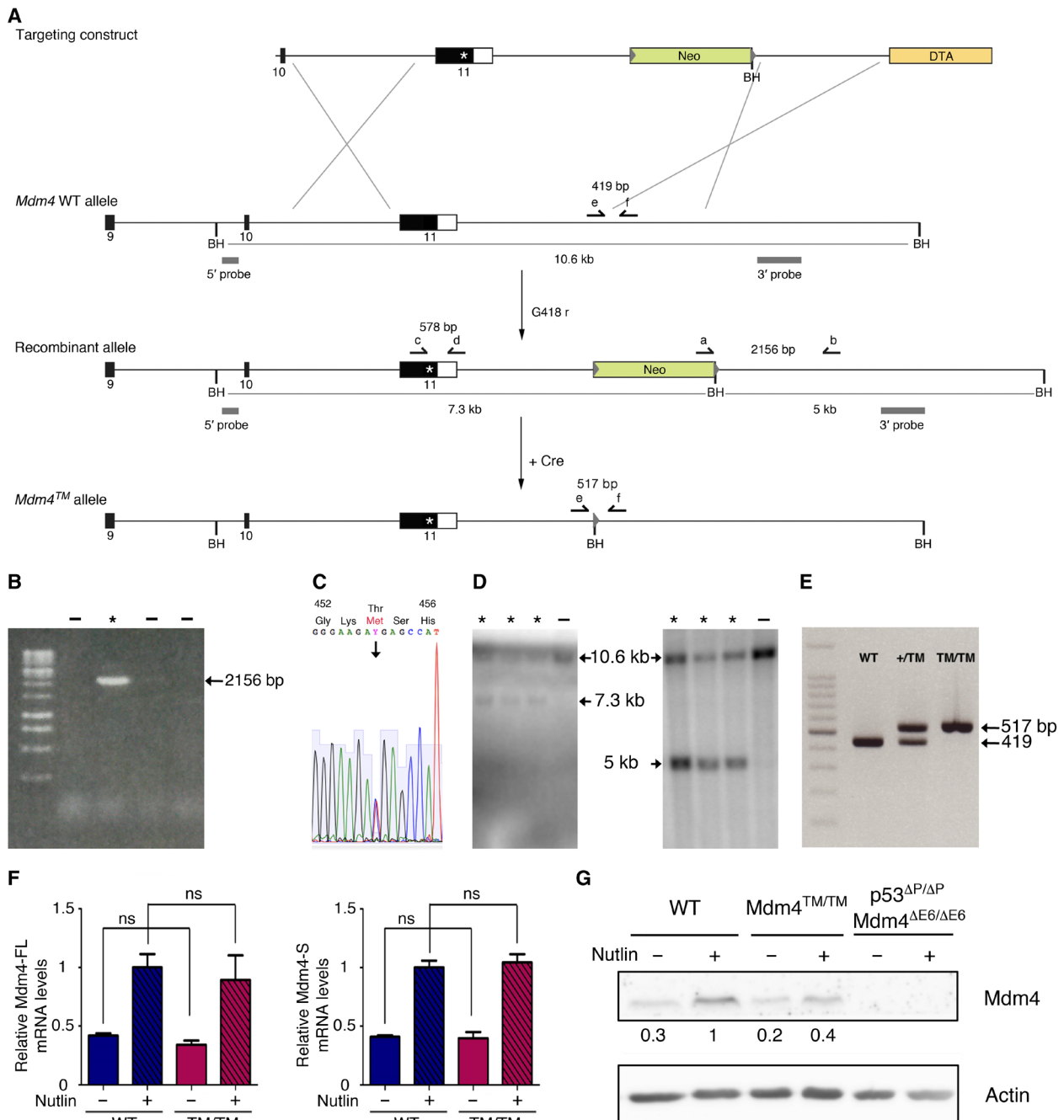


Fig. 2. Generation of a mouse model with a targeted *Mdm4*^{T454M} mutation. (A) Targeting strategy. Homologous recombination in ES cells was used to target the T454M mutation at the *Mdm4* locus. For the *Mdm4* WT allele, exons 9 to 11 are shown [black boxes, coding sequences; white box, 3' untranslated region (3'UTR)] and Bam HI (BH) restriction sites. Above, the targeting construct contains the following: (i) a 2.9-kb-long 5' homology region encompassing exon 10, intron 10, and exon 11 sequences upstream the mutation; (ii) the mutation (asterisk) within exon 11; (iii) a 2.6-kb-long fragment encompassing the 3' end of the gene and sequences immediately downstream; (iv) a *neomycin* selection gene (Neo) flanked by loxP sequences (gray arrowheads) and an additional BH site; (v) a 2.1-kb-long 3' homology region containing sequences downstream *Mdm4*; and (vi) the *Diphtheria toxin A* gene (DTA) for targeting enrichment. (B to D) Screening of G418-resistant ES clones as described in (A), with asterisks (*) indicating positive recombinants: (B) PCR with primers a and b; (C) sequencing after PCR with primers c and d; the sequence for codons 452 to 456 demonstrates heterozygosity at codon 454; (D) Southern blot of Bam HI-digested DNA with the 5' (left) or 3' (right) probe. (E) Examples of fibroblast genotyping by PCR with primers e and f. (F) The *Mdm4*^{T454M} mutation does not alter *Mdm4* mRNA levels. *Mdm4*-FL (left) and *Mdm4*-S (right) mRNAs were extracted from WT and *Mdm4*^{TM/TM} MEFs before or after treatment for 24 hours with 10 μ M Nutlin, quantified using real-time PCR, and normalized to control mRNAs, and then the value in Nutlin-treated WT MEFs was assigned a value of 1. Results from five independent experiments and >4 MEFs per genotype. ns, not significant in a Student's *t* test. (G) Decreased *Mdm4* protein levels in *Mdm4*^{TM/TM} MEFs. Protein extracts, prepared from MEFs treated as in (F), were immunoblotted with antibodies against *Mdm4* or actin. Bands were normalized to actin, and then the values in Nutlin-treated WT cells were assigned a value of 1. *p53*^{AP/AP} *Mdm4* ^{Δ E6/ Δ E6} MEFs do not express a full-length *Mdm4* protein (20): They were loaded to unambiguously identify the *Mdm4*-(FL) band in the other lanes.

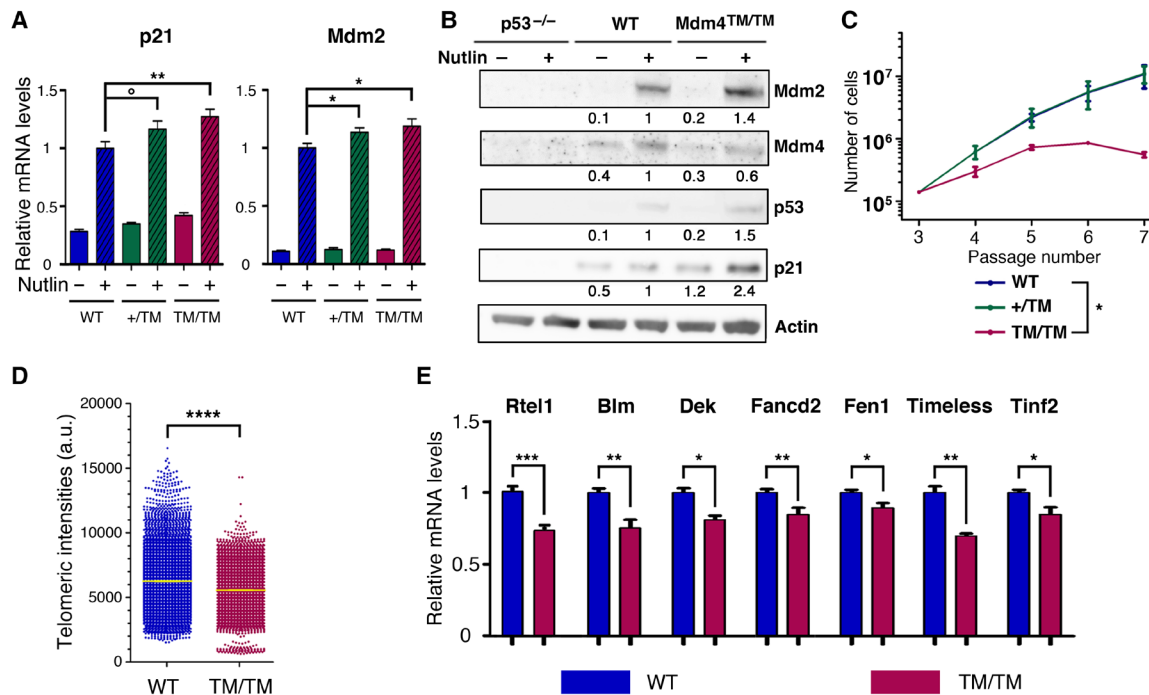


Fig. 3. *Mdm4*^{TM/TM} fibroblasts exhibit increased p53 activity and short telomeres. (A) Quantification of p21 and Mdm2 mRNAs extracted from WT, *Mdm4*^{+TM}, and *Mdm4*^{TM/TM} MEFs, treated or not for 24 hours with 10 μ M Nutlin. mRNA levels were quantified using real-time PCR and normalized to control mRNAs, and then the value in Nutlin-treated WT MEFs was assigned a value of 1. Results from 10 independent experiments. (B) Protein extracts, prepared from *p53*^{-/-}, WT, and *Mdm4*^{TM/TM} MEFs treated as in (A), were immunoblotted with antibodies against Mdm2, Mdm4, p53, p21, or actin. Bands were normalized to actin, and then the values in Nutlin-treated WT MEFs were assigned a value of 1. (C) Proliferation of MEFs in a 3T3 protocol. Each point is the average value of three independent MEFs. (D) Decreased telomere length in *Mdm4*^{TM/TM} MEFs, as measured by quantitative FISH with a telomeric probe. Results from two MEFs per genotype, and 68 to 75 metaphases per MEF [means + 95% confidence interval (CI) are shown in yellow]. a.u., arbitrary units. (E) Telomere-related genes down-regulated in *Mdm4*^{TM/TM} MEFs. mRNAs were extracted from unstressed WT and *Mdm4*^{TM/TM} MEFs, quantified using real-time PCR, and normalized to control mRNAs, and the value in WT MEFs was assigned a value of 1. Results from >3 independent experiments and two MEFs per genotype. In relevant panels: * $P = 0.08$, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, and **** $P < 0.0001$ by Student's *t* (A, C at passage 7, and E) or Mann-Whitney (D) statistical tests.

DC (6). In addition, although evidence that altered TERRA levels can cause DC is currently lacking, we cannot exclude that an altered regulation of TERRA expression might contribute to telomere defects in *Mdm4*^{TM/TM} cells.

The perinatal death of *Mdm4*^{TM/TM} mice is rescued by p53 loss

Mdm4^{TM/TM} mice were born in Mendelian proportions from *Mdm4*^{+TM} intercrosses (Fig. 4A) but were smaller than their littermates and died within 0 to 30 min after birth, with signs of severe respiratory distress (Fig. 4, B and C). Consistent with this, *Mdm4*^{TM/TM} pups at postnatal day 0 (P0) appeared hypoxic (Fig. 4C), and their lungs were very small and dysfunctional (Fig. 4D). Thus, *Mdm4*^{TM/TM} pups most likely died from neonatal respiratory failure. Tissues from *Mdm4*^{TM/TM} pups exhibited increased p21 mRNA levels, suggesting an increase in p53 activity in these animals (fig. S4). We next used flow-FISH (fluorescence in situ hybridization) with a telomere-specific probe to evaluate the impact of the mutation on telomere length in vivo. Lung cells from *Mdm4*^{TM/TM} pups (and control G3 *Terc*^{-/-} mice) exhibited a 25% decrease in mean telomere length compared with cells from WT or *Mdm4*^{+TM} littermates, indicating altered telomere biology in G1 homozygous mutants (Fig. 4E). Notably, p53 loss or haploinsufficiency rescued the perinatal lethality of *Mdm4*^{TM/TM} pups, illustrating that the premature death of *Mdm4*^{TM/TM} mice likely resulted from increased p53 activity (Fig. 4F). However, *p53*^{-/-}

and *Mdm4*^{TM/TM} *p53*^{-/-} mice exhibited similar survival curves, with a fraction of the mice (respectively 4 of 12 and 1 of 6) succumbing to thymic lymphoma in less than 180 days. In contrast, after 180 days, all the *p53*^{+/-} mice remained alive, whereas most *Mdm4*^{TM/TM} *p53*^{+/-} mice had died. *Mdm4*^{TM/TM} *p53*^{+/-} mice were smaller than their littermates (Fig. 4G) and exhibited hyperpigmentation of the footpads (Fig. 4H), and 120-day-old *Mdm4*^{TM/TM} *p53*^{+/-} mice exhibited abnormal hemograms (Fig. 4I). Furthermore, the *Mdm4*^{TM/TM} *p53*^{+/-} mice that died 60 to 160 days after birth exhibited bone marrow hypocellularity (Fig. 4J), indicating bone marrow failure as the likely cause for their premature death.

Mdm4^{+TM} mice are hypersensitive to increases in p53 activity

Although *Mdm4*^{TM/TM} MEFs and mice were useful to demonstrate that the *Mdm4*^{T454M} mutation leads to p53 activation and short telomeres, a detailed analysis of *Mdm4*^{+TM} mice appeared more relevant to model the NCI-226 family, in which all affected relatives were heterozygous carriers of the *MDM4*^{T454M} mutation. Unlike *Mdm4*^{TM/TM} mice, most *Mdm4*^{+TM} animals remained alive 6 months after birth and had no apparent phenotype, similarly to WT mice (Fig. 5A). This was consistent with our analyses in fibroblasts because *Mdm4*^{+TM} MEFs behaved like WT cells in a 3T3 proliferation assay (Fig. 3C). However, p53 target genes appeared to be transactivated slightly more efficiently in *Mdm4*^{+TM} than in WT cells (Fig. 3A),

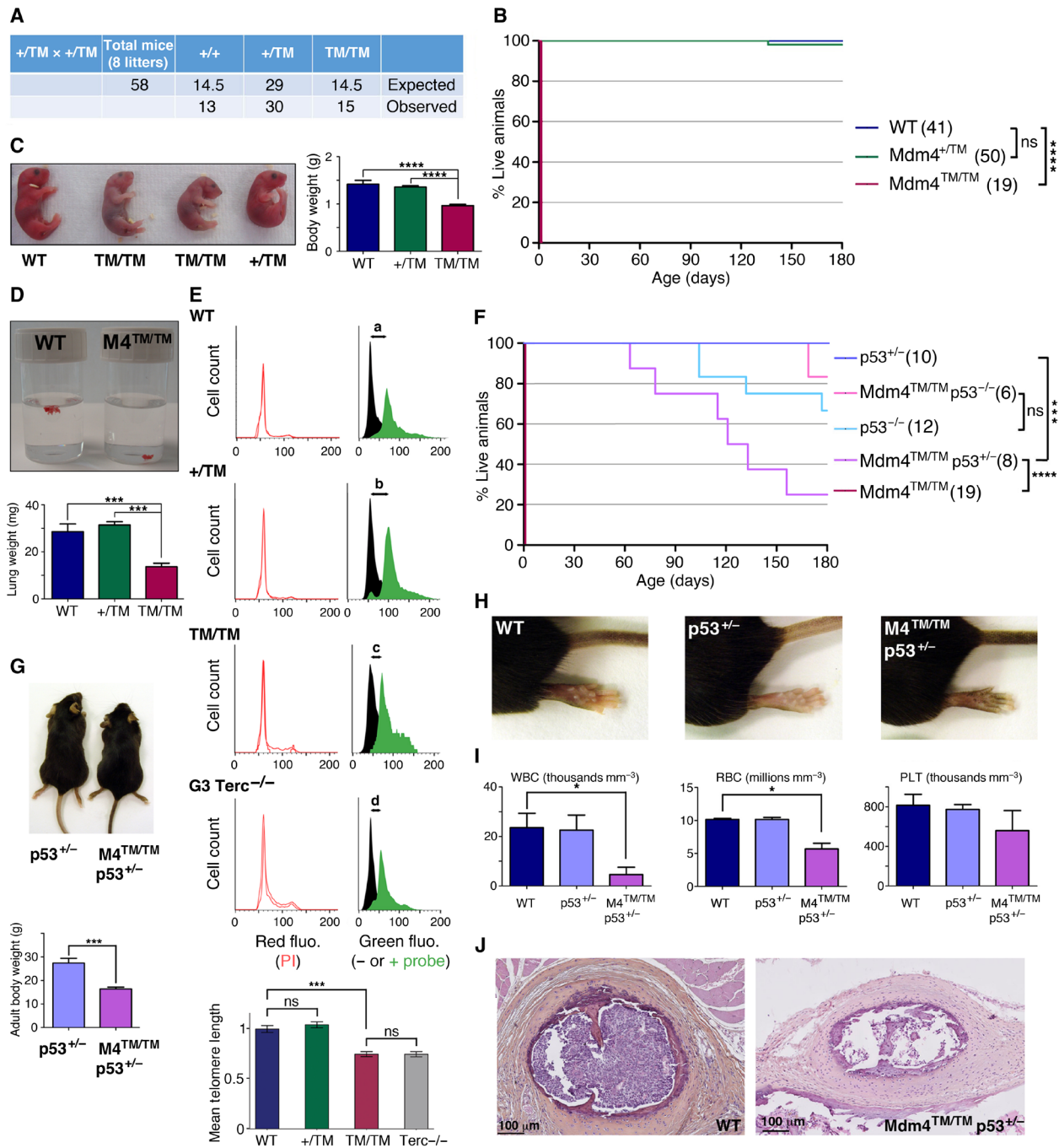


Fig. 4. *Mdm4*^{TM/TM} mice die perinatally but can be rescued by p53 loss or haploinsufficiency. (A) Mendelian distribution of the offspring from 8 *Mdm4*^{+TM} intercrosses. (B) *Mdm4*^{TM/TM} mice die at birth. Cohort sizes are in parentheses. (C) *Mdm4*^{TM/TM} neonates are smaller than their littermates and appear hypoxic. (D) Lungs from *Mdm4*^{TM/TM} P0 pups are hypoplastic and sink in phosphate-buffered saline owing to a lack of air inflation. (E) Flow-FISH analysis of P0 lung cells with a telomere-specific peptide nucleic acid (PNA) probe. Top: Representative results from a WT, a *Mdm4*^{+TM}, a *Mdm4*^{TM/TM}, and a G3 *Terc*^{-/-} mouse are shown. Right: Green fluorescence (flu.) 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 *Mdm4*^{TM/TM} and *Terc*^{-/-} cells (c or d < a or b), indicating reduced telomere length. Left: Propidium iodide (PI) fluorescence histograms are superposed for cells with or without the probe. Below: Statistical analysis of green fluorescence shifts (see Materials and Methods). Means + 95% CI are shown; data are from two to three mice and >3800 cells per genotype. (F) Impact of decreased p53 activity on *Mdm4*^{TM/TM} animals. Cohort sizes are in parentheses. (G) Examples of littermates with indicated genotypes. (H) Hind legs of mice with indicated genotypes. (I) *Mdm4*^{TM/TM}*p53*^{+/-} mice exhibit abnormal hemograms. Counts for white blood cells (WBC), red blood cells (RBC), and platelets (PLT) for age-matched (120 days old) animals are shown. (J) Hematoxylin and eosin staining of sternum sections from WT and *Mdm4*^{TM/TM}*p53*^{+/-} mice. In relevant panels: ns, not significant; *P < 0.05, ***P < 0.001, and ****P < 0.0001 by Mantel-Cox (B and F), Student's *t* (C, D, G, and I), or Mann-Whitney (E) statistical tests. Photo credits: E.T. and R.D., Institut Curie (C, G, and H); R.D., Institut Curie (D).

intense skin hyperpigmentation (Fig. 5C), were much smaller than their littermates (Fig. 5D), and exhibited heart hypertrophy (Fig. 5E) and thymic hypoplasia (Fig. 5F) and the males had testicular hypoplasia (Fig. 5G). Bone marrow failure was the likely cause for the premature death of *Mdm4*^{+/*TM*} *p53*^{+/*Δ31*} mice, as indicated by abnormal hemograms of 18-day-old (P18) compound heterozygotes (Fig. 5H) and bone marrow hypocellularity in the sternum sections of moribund *Mdm4*^{+/*TM*} *p53*^{+/*Δ31*} animals (Fig. 5I). We next used flow-FISH to analyze telomere length in the bone marrow cells of P18 WT, *Mdm4*^{+/*TM*}, *p53*^{+/*Δ31*}, and *Mdm4*^{+/*TM*} *p53*^{+/*Δ31*} mice. We found no significant difference between telomere lengths in cells from five WT and three *Mdm4*^{+/*TM*} mice with normal skin pigmentation, whereas cells from two *Mdm4*^{+/*TM*} mice with increased skin pigmentation (or from *p53*^{+/*Δ31*} mice) exhibited marginal (5 to 7%) decreases in mean telomere length. Notably, in G1 *Mdm4*^{+/*TM*} *p53*^{+/*Δ31*} cells, the average telomere length was decreased by 34% (Fig. 5J). Together, these results demonstrate that *Mdm4*^{+/*TM*} mice are hypersensitive to subtle increases in p53 activity. Consistent with this, *Mdm4*^{+/*TM*} *p53*^{+/*Δ31*} MEFs also exhibited increased p53 signaling and accelerated proliferation arrest in a 3T3 protocol (fig. S5). In sum, the comparison between *Mdm4*^{TM/*TM*} and *Mdm4*^{TM/*TM*} *p53*^{+/-} mice, or between *Mdm4*^{+/*TM*} and *Mdm4*^{+/*TM*} *p53*^{+/*Δ31*} animals, indicated that subtle variations in p53 signaling had marked effects on the phenotypic consequences of the *Mdm4*^{T454M} mutation (table S3).

Polymorphisms that may affect p53 signaling differ among DC-like family members

The carriers of the *MDM4*^{T454M} mutation exhibited considerable heterogeneity in their phenotypes (Fig. 1 and table S1). The data from our mouse model suggested that variations in p53 activity might account for the variable expressivity and penetrance of clinical features among the NCI-226 *MDM4*^{+/*T454M*} relatives. Hence, we analyzed nine known common polymorphisms reported to affect p53 activity and tumorigenesis (four at the *TP53* locus, two at the *MDM2* locus, and three at the *MDM4* locus) (3,4,28–32). Among the four *MDM4*^{+/*T454M*} relatives, the proband (NCI-226-1) is more difficult to interpret because the potential contribution of the *TERT* p.W203S variant to his phenotype cannot be ruled out (even though it appears unlikely according to in silico predictions). The *MDM4* allele encoding the mutant protein (p.T454M) appears associated with the C allele of single-nucleotide polymorphism (SNP) rs4245739, the G allele of SNP rs11801299, and the G allele of SNP rs1380576 (Fig. 6A). These three *MDM4* variant alleles are associated with increased p53 activity (4,32) and might, thus, synergize with the *MDM4*^{T454M} mutation in this family.

The proband's affected cousin (226-8) exhibited a very early onset of disease, with lymphocyte telomere length within or below the first percentile of age-matched control participants and tongue squamous cell carcinoma at age 27 (Fig. 1 and table S1). The WT *MDM4* allele of 226-8 carried the rs4245739 C, the rs11801299 G, and the rs1380576 G variants associated with increased p53 activity. This suggests a potential disease-modifying effect of these *MDM4* SNPs. In contrast, the proband's mother (226-4) was much less severely affected, with telomere length between the 10th and 50th percentiles (Fig. 1). Although we cannot rule out that disease anticipation might contribute to her milder phenotype, note that her WT *MDM4* allele carried variants that might correlate with decreased p53 activity and could antagonize the *MDM4*^{T454M} mutation (rs4245739 A, rs11801299 A, and rs1380576 C; Fig. 6A). Family members 226-4 and 226-8

shared the same genotypes for all the other tested variants, except for *TP53* rs1042522, a SNP first reported to affect apoptotic or cell cycle arrest responses (28), but with a clinical effect that now appears controversial (33). The proband's sister (226-2), with a B cell deficiency and telomere lengths around the 10th percentile, also appeared less affected than 226-8. All the tested variants at the *MDM2* and *MDM4* loci were identical between 226-2 and 226-8. However, unlike 226-8, 226-2 exhibited a *TP53* allele with an A1A1 haplotype for variants rs17878362 and rs17880560 that might decrease p53 activity (30) and antagonize the effects of the *MDM4*^{T454M} mutation (Fig. 6A).

We had primary fibroblasts available for two of these family members, 226-4 and 226-8, allowing us to directly assess the functional effect of the *MDM4*^{T454M} variant in these cells. These fibroblasts were grown in parallel with primary fibroblasts from patients with DC carrying either a *TINF2*^{K280E} mutation or a *TERT*^{P704S} mutation, and mRNA levels for p21 and RTEL1 were quantified. In agreement with the notion that a *MDM4*^{T454M} heterozygous mutation activates p53 signaling in NCI-226 family members, fibroblasts from both 226-4 and 226-8 exhibited increased p21 mRNA levels compared with *TINF2* or *TERT* mutant cells (Fig. 6B). However, cells from 226-4 only exhibited a 2-fold increase in p21 levels, whereas a 12-fold increase was observed for cells from 226-8, consistent with the notion that SNPs affecting the p53 pathway might counteract (for 226-4) or strengthen (for 226-8) the effect of the *MDM4*^{T454M} mutation. Furthermore, we previously showed that RTEL1 mRNA levels are down-regulated upon p53 activation in human cells (5). RTEL1 mRNA levels appeared normal in cells from 226-4 but were markedly decreased in cells from 226-8, raising the possibility that a threshold in p53 activation might be required to affect RTEL1 expression (Fig. 6B).

DISCUSSION

Although *MDM4* is primarily known for its clinical relevance in cancer biology, our study shows that a germline missense *MDM4* mutation may cause features suggestive of DC. In humans, the *MDM4* (p.T454M) mutation was identified in this family with neutropenia, bone marrow hypocellularity, early-onset tongue SCC, AML, and telomeres between the 1st and 10th percentiles in the younger generation. In mice, the same *Mdm4* mutation notably correlated with increased p53 activity, short telomeres, and bone marrow failure. In both human transfected cells and MEFs, the mutant protein was expressed at lower levels than its WT counterpart, likely contributing to increased p53 activity. Together, these results demonstrate the importance of the *MDM4*/p53 regulatory axis on telomere biology and DC-like features in both species. Notably, *p53*^{Δ31/Δ31} mice were previously found to phenocopy DC (5), but whether this finding was relevant to human disease had remained controversial. When a mutation in *PARN* was found to cause DC (34), it first appeared consistent with the *p53*^{Δ31} mouse model because *PARN*, the polyadenylate-specific ribonuclease, had been proposed to regulate p53 mRNA stability (35). However, whether *PARN* regulates the stability of mRNAs is now contested (36). Rather, *PARN* would regulate the levels of over 200 microRNAs, of which only a few might repress p53 mRNA translation (37). Furthermore, *PARN* regulates *TERC*, the telomerase RNA component (38), and *TERC* overexpression increased telomere length in *PARN*-deficient cells (39). Thus, whether a germline mutation that specifically activates p53 can cause DC-like features

A

	<i>TP53</i> rs1800371 (P47S)	<i>TP53</i> rs1042522 (P72R)	<i>TP53</i> haplotype rs17878362 (PIN3)* and rs17880560**	<i>MDM2</i> rs117039649 (SNP285)	<i>MDM2</i> rs2279744 (SNP309)	<i>MDM4</i> rs4245739 (SNP34091)	<i>MDM4</i> rs11801299	<i>MDM4</i> rs1380576
	G>A,T MAF = 0.01563 & 3×10^{-5}	G>C MAF = 0.6631	*A1>A2 MAF unknown **A1>A2 MAF = 0.3015	G>C MAF = 0.02209	T>G MAF = 0.3057	C>A,G MAF = 0.7733 and 6×10^{-6}	G>A MAF = 0.1773	G>C MAF = 0.5971
Proband (226-1)	G/G	G/G	A1A1/A1A2	G/G	T/T	C/A	G/G	G/C
Sister (226-2)	G/G	G/G	A1A1/A1A2	G/G	T/T	C/C	G/G	G/G
Mother (226-4)	G/G	C/G	A2A2/A1A2	G/G	T/T	C/A	G/A	G/C
Cousin (226-8)	G/G	C/C	A2A2/A1A2	G/G	T/T	C/C	G/G	G/G

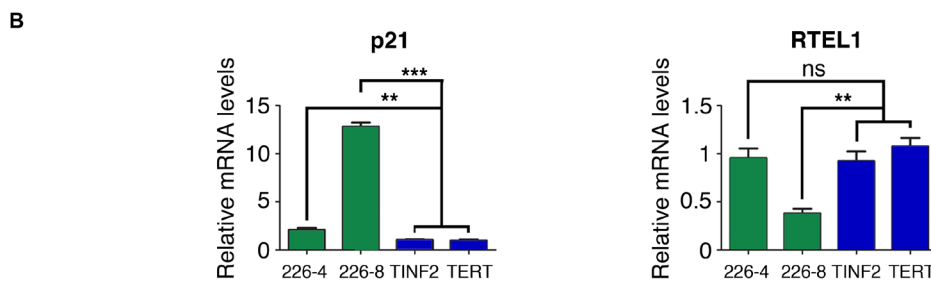


Fig. 6. *TP53* or *MDM4* polymorphisms might alter the impact of the *MDM4*^{T454M} mutation among NCI-226 family members. (A) Genotyping of polymorphisms that may affect the p53 pathway. The SNPs rs1800371 and rs1042522 modify the p53 protein sequence (28,29), whereas rs17878362 and rs17880560 are singlets (A1) or doublets (A2) of G-rich sequences in noncoding regions of *TP53* that affect p53 expression (30). SNPs rs117039649 and rs2279744, in the *MDM2* promoter, affect *MDM2* mRNA levels (3,31). Three SNPs are at the *MDM4* locus: rs4245739 in the 3'UTR region affects *MDM4* protein levels (4), whereas rs11801299 and rs1380576 were associated with an increased risk of developing retinoblastoma (32), a cancer type with frequent *MDM4* alterations (51). Polymorphisms that differ among family members are in bold, with the allele (or haplotype) associated with increased p53 activity in green (because it may synergize with the effects of the *MDM4*^{T454M} mutation). Alleles (or haplotypes) for which there is evidence of decreased p53 activity, or for which the effect is uncertain, are highlighted in red or blue, respectively. Please note that the clinical effects of the *TP53* rs1042522 SNP have recently been contested (33), so that all alleles for this SNP were labeled in blue. MAF, minor allele frequency reported for all gnomAD populations combined. <https://gnomad.broadinstitute.org> (52). (B) Comparative analysis of primary fibroblasts from family members 226-4 and 226-8. p21 and RTEL1 mRNAs, extracted from cells from relatives NCI 226-4 and NCI 226-8 or two unrelated patients with DC carrying a *TINF2* or a *TERT* mutation, were quantified using real-time PCR, normalized to control mRNAs, and then expressed relative to the mean values in *TINF2* and *TERT* mutant cells. ns, not significant, $^{**}P < 0.01$ and $^{***}P < 0.001$ in a Student's *t* test.

remained to be demonstrated in humans, and our report provides compelling evidence for this, because unlike PARN, *MDM4* is a very specific regulator of p53.

A germline antiterminating *MDM2* mutation was recently identified in a patient with a Werner-like syndrome of premature aging. Although multiple mechanisms might contribute to the clinical features in that report, a premature cellular senescence resulting from p53 hyperactivation was proposed to play a major role in his segmental progeroid phenotype (40). In that regard, our finding that increased p53 activity correlates with short telomeres appears relevant because telomere attrition is a primary hallmark of aging, well known to trigger cellular senescence (41). Furthermore, germline *TP53* frameshift mutations were recently reported in two patients diagnosed with pure red blood cell aplasia and hypogammaglobulinemia, resembling but not entirely consistent with Diamond Blackfan anemia (DBA) (42). In addition to the pure red cell aplasia diagnostic of DBA, those patients were found to exhibit relatively short telomeres (although not as short as telomeres from patients with DC), which may also seem consistent with our results. Our finding of an *MDM4* missense mutation in a DC-like family, together with recent reports linking an antiterminating *MDM2* mutation to a Werner-

like phenotype and *TP53* frameshift mutations to DBA-like features, indicates that the clinical impact of germline mutations affecting the p53/*MDM2*/*MDM4* regulatory network is just emerging. An inherited hyperactivation of the p53 pathway—via a germline *TP53*, *MDM2*, or *MDM4* mutation—may thus cause either DBA, Werner-like, or DC-like features, but additional work will be required to determine whether mutations in any of these three genes can cause any of these three syndromes. Likewise, several mouse models have implicated p53 deregulation in features of other developmental syndromes including the CHARGE, Treacher-Collins, Waardenburg, or DiGeorge syndrome (43), and it will be important to know whether germline mutations in *TP53*, *MDM2*, or *MDM4* may cause these additional syndromes in humans.

Heterozygous *Mdm4*^{+TM} mice appeared normal but were hypersensitive to variations in p53 activity, and, perhaps most notably, *Mdm4*^{+TM} *p53*^{+Δ31} compound heterozygous mice rapidly died from bone marrow failure. Thus, the p53^{Δ31} mutation acted as a strong genetic modifier of the *Mdm4*TM mutation. It is tempting to speculate that similarly, among the NCI-226 family members heterozygous for the *MDM4*^{T454M} allele, differences in the severity of phenotypic traits (e.g., lymphocyte telomere length and bone marrow cellularity)

may result, in part, from modifiers affecting the p53 pathway and synergize or antagonize with the effects of the *MDM4*^{T454M} mutation. To search for potentially relevant modifiers, we looked at nine polymorphisms at the *TP53*, *MDM2*, and *MDM4* loci that were previously reported to affect p53 activity. Notably, we found that the family member most severely affected (226-8, the proband's cousin) carried a *TP53* haplotype, as well as SNPs on the WT *MDM4* allele, that might synergize with the effects of the *MDM4*^{T454M} mutation. Conversely, a *TP53* haplotype for the proband's sister (226-2), or SNPs at the WT *MDM4* locus for the proband's mother (226-4), might antagonize the impact of *MDM4*^{T454M} allele. Consistent with this, primary fibroblasts from 226-4 and 226-8 exhibited increased p53 activity, but p53 activation was much stronger in cells from 226-8. Our data, thus, appear consistent with the existence of genetic modifiers at the *TP53* and *MDM4* loci that may affect DC-like phenotypic traits among family members carrying the *MDM4* (p.T454M) mutation. However, this remains speculative given the small number of individuals that could be analyzed. Furthermore, nonexonic variants affecting other genes might also contribute to DC-like traits (44). Last, the *TP53* and *MDM4* polymorphisms considered here were previously evaluated for their potential impact on tumorigenic processes, rather than DC-like traits such as telomere length or bone marrow hypocellularity. Our data suggest that polymorphisms at the *TP53* and *MDM4* (and possibly *MDM2*) loci should be evaluated for their potential impact on bone marrow function and telomere biology.

MATERIALS AND METHODS

Patient and family

The individuals in this study are participants in an Institutional Review Board–approved longitudinal cohort study at the NCI entitled “Etiologic Investigation of Cancer Susceptibility in Inherited Bone Marrow Failure Syndromes” (www.marowfailure.cancer.gov, ClinicalTrials.gov NCT00027274) (7). Patients and their family members enrolled in 2008 and completed detailed family history and medical history questionnaires. Detailed medical record review and thorough clinical evaluations of the proband, his sister, parents, and maternal cousin were conducted at the National Institutes of Health (NIH) Clinical Center. Telomere length was measured by flow cytometry with in situ hybridization (flow-FISH) (45) in leukocytes of all patients and family members reported. DNA was extracted from whole blood using standard methods. DNA was not available from 226-7 or 226-9 (Fig. 1). Given the time frame of participant enrollment, Sanger sequencing of *DKC1*, *TINF2*, *TERT*, *TERC*, and *WRAP53* was performed first, followed by exome sequencing.

Whole-exome sequencing

WES of blood-derived DNA for family NCI-226 was performed at the NCI's Cancer Genomics Research Laboratory as previously described (46). Exome enrichment was performed with NimbleGen's SeqCap EZ Human Exome Library v3.0 + UTR (Roche NimbleGen Inc., Madison, WI, USA), targeting 96 Mb of exonic sequence and the flanking untranslated regions (UTRs) on an Illumina HiSeq. Annotation of each exome variant locus was performed using a custom software pipeline. WES variants of interest were identified if they met the following criteria: heterozygous in the proband, his mother, and maternal cousin; nonsynonymous; had a minor allele frequency <0.1% in the Exome Aggregation Consortium databases;

and occurred <5 times in our in house database of 4091 individuals. Variants of interest were validated to rule out false-positive findings using an Ion 316 chip on the Ion PGM Sequencer (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA).

ATP-binding assays

Primers flanking the *MDM4* RING domain were used to amplify RING sequences, and PCR products were cloned (or cloned and mutagenized) in the pGST-parallel2 plasmid. Glutathione S-transferase (GST) fusion proteins were expressed in BL21 (DE3) cells. After induction for 16 hours at 20°C with 0.2 mM IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside), soluble proteins were extracted by sonication in lysis buffer [50 mM tris (pH 7.0), 300 mM LiSO₄, 1 mM dithiothreitol (DTT), 0.5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 0.2% NP-40, complete Protease inhibitors (Roche) 1×]. The soluble protein fraction was incubated with Glutathione Sepharose beads (Pharmacia) at 4°C for 2 hours, and the bound proteins were washed with 50 mM tris (pH 7.0), 300 mM LiSO₄, and 1 mM DTT and then eluted with an elution buffer [50 mM tris-HCl (pH 7.5), 300 mM NaCl, 1 mM DTT, and 15 mM glutathione]. WT and mutant GST-RING proteins (0, 1, 2, 4, or 8 μg) or GST alone (0 or 8 μg) was incubated with 10 nM ATP and 5 μCi ATP-γ³²P for 10 min at room temperature, filtered through nitrocellulose, and counted by liquid scintillation. Alternatively, 7 μg of either WT or mutant GST-RING proteins was incubated with 5 μCi ATP-γ³²P for 10 min at room temperature and increasing amounts (0, 0.02, 2, 20, and 200 μM) of ATP or guanosine triphosphate (GTP), filtered through nitrocellulose, and counted by liquid scintillation.

Yeast two-hybrid assays

The yeast two-hybrid assays were performed as described (47). Briefly, *MDM4* and *MDM2* RING open reading frames were cloned in plasmids derived from the two-hybrid vectors pGADT7 (Gal4-activating domain) and pGBKT7 (Gal4-binding domain) creating N-terminal fusions and transformed in yeast haploid strains Y187 and AH109 (Clontech). Interactions were scored, after mating and diploid selection on dropout medium without leucine and tryptophan, as growth on dropout medium without leucine, tryptophan, histidine, and adenine.

Transfection assays

U2OS cells (10⁶) were transfected by using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) with pCDNA3.1 (6 μg), or 5 × 10⁶ cells were transfected with 30 μg of pCDNA3.1-MycTag-*MDM4*^{WT} or pCDNA3.1-MycTag-*MDM4*TM. Twenty-four hours after transfection, cells were treated with cycloheximide (50 μg/ml; Sigma-Aldrich, C4859), then scratched in phosphate-buffered saline (PBS) after 2, 4, or 8 hours, pelleted, and snap frozen in liquid nitrogen before protein or RNA extraction with standard protocols.

Mdm4^{T454M} targeting construct

The targeting vector was generated by recombineering from the RP23-365M5 BAC (bacterial artificial chromosome) clone (CHORI BACPAC Resources) containing mouse *Mdm4* and downstream sequences of C57Bl6/J origin. A loxP-flanked neomycin cassette (Neo) and a diphtheria toxin α gene (DTA) were inserted downstream of the *Mdm4* gene, respectively, for positive and negative selections, and a single-nucleotide mutation encoding the missense mutation T454M (TM) was targeted in the exon 11 of *Mdm4*. The targeting construct was fully sequenced before use.

Targeting in ES cells and mouse genotyping

CK-35 ES cells were electroporated with the targeting construct linearized with Not I. Recombinant clones were identified by long-range PCR, confirmed by Southern blot, PCR, and DNA sequencing (primer sequences in table S4). Two independent recombinant clones were injected into blastocysts to generate chimeras, and germline transmission was verified by genotyping their offspring. Reverse transcription PCR (RT-PCR) of RNAs from Mdm4^{TM/TM} MEFs showed that the mutant complementary DNA (cDNA) differed from an Mdm4 WT sequence only by the engineered missense mutation. The genotyping of *p53*^{+/-}, *p53*^{+/ Δ 31}, and G3 *Terc*^{-/-} mice was performed as previously described (5, 12). All experiments were performed according to Institutional Animal Care and Use Committee regulations.

Cells and cell culture reagents

MEFs isolated from 13.5-day embryos were cultured in a 5% CO₂ and 3% O₂ incubator, in Dulbecco's modified Eagle's medium GlutaMAX (Gibco), with 15% fetal bovine serum (Biowest), 100 μ M 2-mercaptoethanol (Millipore), 0.01 mM Non-Essential Amino Acids, and penicillin/streptavidin (Gibco) for five or fewer passages, except for 3T3 experiments, performed in a 5% CO₂ incubator for seven passages. Cells were treated for 24 hours with 10 μ M Nutlin 3a (Sigma-Aldrich) (22) or 15 μ M cisplatin (Sigma-Aldrich). Primary human fibroblasts at low passage (p.2 for *TINF2*^{K280E}, p.3 for NCI-226-4 and NCI-226-8, and p.4 for *TERT*^{P704S}) were thawed and cultured in fibroblast basal medium (Lonza) with 20% fetal calf serum, l-glutamin, 10 mM Hepes, penicillin/streptavidin, and gentamicin before quantitative PCR (qPCR) analysis.

Quantitative RT-PCR

Total RNA, extracted using NucleoSpin RNA II (Macherey-Nagel), was reverse transcribed using SuperScript IV (Invitrogen), with, for TERRA quantification, a (CCCTAA)₄ oligo as described (48). Real-time qPCRs were performed with primer sequences as described (5, 9, 48) on a QuantStudio using Power SYBR Green (Applied Biosystems).

Western blots

Protein detection by immunoblotting was performed using antibodies against Mdm2 (4B2), Mdm4 (M0445; Sigma-Aldrich), p53 (AF1355, R&D Systems), actin (A2066; Sigma-Aldrich), p21 (F5; Santa Cruz Biotechnology), Myc-Tag (SAB2702192; Sigma-Aldrich), and Rtel1 (from J.-A.L.-V.). Chemiluminescence revelation was achieved with SuperSignal West Dura (Perbio). Bands of interest were quantified by using ImageJ and normalized with actin.

Telomeric quantitative FISH

Cells were treated with colcemide (0.5 μ g/ml) for 1.5 hours, submitted to hypotonic shock, fixed in an (3:1) ethanol/acetic acid solution, and dropped onto glass slides. Quantitative FISH was then carried out as described (5) with a TelC-Cy3 peptide nucleic acid (PNA) probe (Panagene). Images were acquired using a Zeiss Axioplan 2, and telomeric signals were quantified with iVision (Chromaphor).

Telomeric flow-FISH

Flow-FISH with mouse cells was performed as described (45). For each animal, either the lungs were collected or the bone marrow from two tibias and two femurs was collected and red blood cells were lysed; then, 2 \times 10⁶ cells were fixed in 500 μ l of PNA hybridization

buffer [70% deionized formamide, 20 mM tris (pH 7.4), and 0.1% Blocking reagent; Roche] and stored at -20°C. Either nothing (control) or 5 μ l of probe stock solution was added to cells [probe stock solution: 10 μ M TelC-FAM PNA probe (Panagene), 70% formamide, and 20 mM tris (pH 7.4)], and samples were denatured for 10 min at 80°C before hybridization for 2 hours at room temperature. After three washes, cells were resuspended in PBS 1 \times , 0.1% bovine serum albumin, ribonuclease A (1000 U/ml), and propidium iodide (12.5 μ g/ml) and analyzed with an LSR II fluorescence-activated cell sorter. WT and G3 *Terc*^{-/-} mice were included in all flow-FISH experiments, respectively, as controls of normal and short telomeres. For fluorescence shift analyses, the green histograms (corresponding to cells with the telomeric probe) were sliced into 18 windows of equal width and numbered 0 to 17 according to their distance from the median value in cells without the probe, and the number of cells in each window was quantified with ImageJ. The data from two to five mice per genotype were typically used to calculate mean telomere lengths, expressed relative to the mean in WT cells.

Anatomopathology and hemograms

Organs were fixed in formol 4% for 24 hours and then ethanol 70% and embedded in paraffin wax. Serial sections were stained with hematoxylin and eosin using standard procedures (49). For hemograms, 100 μ l of blood from each animal was recovered retro-orbitally in a 10- μ l citrate-concentrated solution (S5770; Sigma-Aldrich) and analyzed using an MS9 machine (Melet Schloesing Laboratoires).

Human polymorphisms affecting the p53 pathway

DNA extracted from Epstein-Barr virus-transformed lymphocytes of NCI-226 family members was amplified with primers flanking nucleotide polymorphisms of interest (primer sequences in table S5), and then PCR products were analyzed by Sanger DNA sequencing.

Statistical analyses

Analyses with Student's *t*, Mann-Whitney, or Mantel-Cox statistical tests were performed by using GraphPad Prism, and values of *P* < 0.05 were considered significant.

SUPPLEMENTARY MATERIALS

Supplementary material for this article is available at <http://advances.sciencemag.org/cgi/content/full/6/15/eaay3511/DC1>

[View/request a protocol for this paper from Bio-protocol.](#)

REFERENCES AND NOTES

1. J. M. Nigro, S. J. Baker, A. C. Preisinger, J. M. Jessup, R. Hosteller, K. Cleary, S. H. Signer, N. Davidson, S. Baylin, P. Devilee, T. Glover, F. S. Collins, A. Weslon, R. Modali, C. C. Harris, B. Vogelstein, Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types. *Nature* **342**, 705–708 (1989).
2. D. Malkin, F. P. Li, L. C. Strong, J. F. Fraumeni, C. E. Nelson, D. H. Kim, J. Kassel, M. A. Gryka, F. Z. Bischoff, M. A. Tainsky, Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. *Science* **250**, 1233–1238 (1990).
3. G. L. Bond, W. Hu, E. E. Bond, H. Robins, S. G. Lutzker, N. C. Arva, J. Bargonetti, F. Bartel, H. Taubert, P. Wuerl, K. Onel, L. Yip, S.-J. Hwang, L. C. Strong, G. Lozano, A. J. Levine, A single nucleotide polymorphism in the MDM2 promoter attenuates the p53 tumor suppressor pathway and accelerates tumor formation in humans. *Cell* **119**, 591–602 (2004).
4. J. Wynendaele, A. Böhne, E. Leucci, S. J. Nielsen, I. Lambertz, S. Hammer, N. Sbrzesny, D. Kubitzka, A. Wolf, E. Gradhand, K. Balschun, I. Braicu, J. Sehouli, S. Darb-Esfahani, C. Denkert, C. Thomssen, S. Hauptmann, A. Lund, J.-C. Marine, F. Bartel, An illegitimate microRNA target site within the 3' UTR of MDM4 affects ovarian cancer progression and chemosensitivity. *Cancer Res.* **70**, 9641–9649 (2010).
5. I. Simeonova, S. Jaber, I. Draskovic, B. Bardot, M. Fang, R. Bouarich-Bourim, V. Lejour, L. Charbonnier, C. Soudais, J.-C. Bourdon, M. Huerre, A. Londono-Vallejo, F. Toledo,

- Mutant mice lacking the p53 C-terminal domain model telomere syndromes. *Cell Rep.* **3**, 2046–2058 (2013).
6. S. A. Savage, Beginning at the ends: Telomeres and human disease. *F1000Res.* **7**, 524 (2018).
 7. B. P. Alter, N. Giri, S. A. Savage, P. S. Rosenberg, Cancer in the National Cancer Institute inherited bone marrow failure syndrome cohort after fifteen years of follow-up. *Haematologica* **103**, 30–39 (2018).
 8. S. C. Ward, S. A. Savage, N. Giri, B. P. Alter, P. S. Rosenberg, D. C. Pichard, E. W. Cowen, Beyond the triad: Inheritance, mucocutaneous phenotype, and mortality in a cohort of patients with dyskeratosis congenita. *J. Am. Acad. Dermatol.* **78**, 804–806 (2018).
 9. S. Jaber, E. Toufekhtchan, V. Lejour, F. Bartot, F. Toledo, p53 downregulates the Fanconi anaemia DNA repair pathway. *Nat. Commun.* **7**, 11091 (2016).
 10. D. Filipescu, M. Naughtin, K. Podspanina, V. Lejour, L. Wilson, Z. A. Gurard-Levin, G. A. Orsi, I. Simeonova, E. Toufekhtchan, L. D. Attardi, F. Toledo, G. Almouzni, Essential role for centromeric factors following p53 loss and oncogenic transformation. *Genes Dev.* **31**, 463–480 (2017).
 11. E. Toufekhtchan, F. Toledo, The guardian of the genome revisited: p53 downregulates genes required for telomere maintenance, DNA repair, and centromere structure. *Cancers* **10**, E135 (2018).
 12. M. A. Blasco, H. W. Lee, M. P. Hande, E. Samper, P. M. Lansdorp, R. A. DePinho, C. W. Greider, Telomere shortening and tumor formation by mouse cells lacking telomerase RNA. *Cell* **91**, 25–34 (1997).
 13. E. Aix, Ó. Gutiérrez-Gutiérrez, C. Sánchez-Ferrer, T. Aguado, I. Flores, Postnatal telomere dysfunction induces cardiomyocyte cell-cycle arrest through p21 activation. *J. Cell Biol.* **213**, 571–583 (2016).
 14. D. Hockemeyer, W. Palm, R. C. Wang, S. S. Couto, T. de Lange, Engineered telomere degradation models dyskeratosis congenita. *Genes Dev.* **22**, 1773–1785 (2008).
 15. S. Kim, J.-H. Jhong, J. Lee, J.-Y. Koo, Meta-analytic support vector machine for integrating multiple omics data. *BioData Min.* **10**, 2 (2017).
 16. C. Priest, C. Prives, M. V. Poyurovsky, Deconstructing nucleotide binding activity of the Mdm2 RING domain. *Nucleic Acids Res.* **38**, 7587–7598 (2010).
 17. K. Linke, P. D. Mace, C. A. Smith, D. L. Vaux, J. Silke, C. L. Day, Structure of the MDM2/MDMX RING domain heterodimer reveals dimerization is required for their ubiquitylation in trans. *Cell Death Differ.* **15**, 841–848 (2008).
 18. J. E. Landers, S. L. Cassel, D. L. George, Translational enhancement of mdm2 oncogene expression in human tumor cells containing a stabilized wild-type p53 protein. *Cancer Res.* **57**, 3562–3568 (1997).
 19. B. X. Tan, H. P. Liew, J. S. Chua, F. J. Ghadessy, Y. S. Tan, D. P. Lane, C. R. Coffill, Anatomy of Mdm2 and Mdm4 in evolution. *J. Mol. Cell Biol.* **9**, 3–15 (2017).
 20. B. Bartot, B. Bouarich-Bourimi, J. Leemput, V. Lejour, A. Hamon, L. Plancke, A. G. Jochemsen, I. Simeonova, M. Fang, F. Toledo, 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).
 21. M. Dewaele, T. Tabaglio, K. Willekens, M. Bezzi, S. X. Teo, D. H. P. Low, C. M. Koh, F. Rambow, M. Fiers, A. Rogiers, E. Radaelli, M. Al-Haddawi, S. Y. Tan, E. Hermans, F. Amant, H. Yan, M. Lakshmanan, R. C. Koumar, S. T. Lim, F. A. Derheimer, R. M. Campbell, Z. Bonday, V. Tergaonkar, M. Shackleton, C. Blattner, J.-C. Marine, E. Guccione, Antisense oligonucleotide-mediated MDM4 exon 6 skipping impairs tumor growth. *J. Clin. Invest.* **126**, 68–84 (2016).
 22. L. T. Vassilev, B. T. Vu, B. Graves, D. Carvajal, F. Podlaski, Z. Filipovic, N. Kong, U. Kammlott, C. Lukacs, C. Klein, N. Fotouhi, E. A. Liu, In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2. *Science* **303**, 844–848 (2004).
 23. B. Hu, D. M. Gilkes, B. Farooqi, S. M. Sebti, J. Chen, MDMX overexpression prevents p53 activation by the MDM2 inhibitor Nutlin. *J. Biol. Chem.* **281**, 33030–33035 (2006).
 24. M. Wade, E. T. Wong, M. Tang, J. M. Stommel, G. M. Wahl, Hdmx modulates the outcome of p53 activation in human tumor cells. *J. Biol. Chem.* **281**, 33036–33044 (2006).
 25. S. Tutton, G. A. Azzam, N. Stong, O. Vladimirova, A. Wiedmer, J. A. Monteith, K. Beishline, Z. Wang, Z. Deng, H. Riethman, S. B. McMahon, M. Murphy, P. M. Lieberman, Subtelomeric p53 binding prevents accumulation of DNA damage at human telomeres. *EMBO J.* **35**, 193–207 (2016).
 26. S. Tutton, Z. Deng, N. Gulve, O. Vladimirova, K. Beishline, A. Wiedmer, M. Murphy, P. M. Lieberman, Elevated telomere dysfunction in cells containing the African-centric Pro47Ser cancer-risk variant of TP53. *Oncotarget* **10**, 3581–3591 (2019).
 27. F. Toledo, p53: A two-faced regulator of telomere metabolism? (comment on DOI 10.1002/bies.201600078). *Bioessays* **38**, 938 (2016).
 28. M. C. Marin, C. A. Jost, L. A. Brooks, M. S. Irwin, J. O’Nions, J. A. Tidy, N. James, J. M. McGregor, C. A. Harwood, I. G. Yulug, K. H. Vousden, M. J. Allday, B. Gusterson, S. Ikawa, P. W. Hinds, T. Crook, W. G. Kaelin, A common polymorphism acts as an intragenic modifier of mutant p53 behaviour. *Nat. Genet.* **25**, 47–54 (2000).
 29. X. Li, P. Dumont, A. Della Pietra, C. Shetler, M. E. Murphy, The codon 47 polymorphism in p53 is functionally significant. *J. Biol. Chem.* **280**, 24245–24251 (2005).
 30. C. Sagne, V. Marcel, M. Bota, G. Martel-Planche, A. Nobrega, E. I. Palmero, L. Perriaud, M. Boniol, S. Vagner, D. G. Cox, C. S. Chan, J.-L. Mergny, M. Olivier, P. Ashton-Prolla, J. Hall, P. Hainaut, M. I. Achatz, Age at cancer onset in germline TP53 mutation carriers: Association with polymorphisms in predicted G-quadruplex structures. *Carcinogenesis* **35**, 807–815 (2014).
 31. S. Knappskog, M. Bjørnslett, L. M. Myklebust, P. E. A. Huijts, M. P. Vreeswijk, H. Edvardsen, Y. Guo, X. Zhang, M. Yang, S. K. Ylisaukko-Oja, P. Alhopuro, J. Arola, R. A. E. M. Tollenaar, C. J. van Asperen, C. Seynaeve, V. Staalesen, R. Chrisanther, E. Løkkevik, H. B. Salvesen, D. G. Evans, W. G. Newman, D. Lin, L. A. Aaltonen, A.-L. Børresen-Dale, G. S. Tell, C. Stoltenberg, P. Romundstad, K. Hveem, J. R. Lillehaug, L. Vatten, P. Devilee, A. Dørum, P. E. Lønning, The MDM2 promoter SNP285C/309G haplotype diminishes Sp1 transcription factor binding and reduces risk for breast and ovarian cancer in Caucasians. *Cancer Cell.* **19**, 273–282 (2011).
 32. F. Yu, Z. Jiang, A. Song, Association of rs11801299 and rs1380576 polymorphisms at MDM4 with risk, clinicopathological features and prognosis in patients with retinoblastoma. *Cancer Epidemiol.* **58**, 153–159 (2019).
 33. J. B. Kodak, S. Vedel-Krogh, C. J. Kobylecki, B. G. Nordestgaard, S. E. Bojesen, TP53 Arg72Pro, mortality after cancer, and all-cause mortality in 105,200 individuals. *Sci. Rep.* **7**, 336 (2017).
 34. H. Tummala, A. Walne, L. Collopy, S. Cardoso, J. de la Fuente, S. Lawson, J. Powell, N. Cooper, A. Foster, S. Mohammed, V. Plagnol, T. Vulliamy, I. Dokal, Poly(A)-specific ribonuclease deficiency impacts telomere biology and causes dyskeratosis congenita. *J. Clin. Invest.* **125**, 2151–2160 (2015).
 35. E. Devany, X. Zhang, J. Y. Park, B. Tian, F. E. Kleiman, Positive and negative feedback loops in the p53 and mRNA 3’ processing pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **110**, 3351–3356 (2013).
 36. A. Son, J.-E. Park, V. N. Kim, PARN and TOE1 Constitute a 3’ end maturation module for nuclear non-coding RNAs. *Cell Rep.* **23**, 888–898 (2018).
 37. S. Shukla, G. A. Bjerke, D. Muhrad, R. Yi, R. Raker, The RNase PARN controls the levels of specific miRNAs that contribute to p53 regulation. *Mol. Cell* **73**, 1204–1216.e4 (2019).
 38. D. H. Moon, M. Segal, B. Boyraz, E. Guinan, I. Hofmann, P. Cahan, A. K. Tai, S. Agarwal, Poly(A)-specific ribonuclease (PARN) mediates 3’-end maturation of the telomerase RNA component. *Nat. Genet.* **47**, 1482–1488 (2015).
 39. B. Boyraz, D. H. Moon, M. Segal, M. Z. Muosieyiri, A. Aykanat, A. K. Tai, P. Cahan, S. Agarwal, Posttranscriptional manipulation of TERC reverses molecular hallmarks of telomere disease. *J. Clin. Invest.* **126**, 3377–3382 (2016).
 40. D. Lessel, D. Wu, C. Trujillo, T. Ramezani, I. Lessel, M. K. Alwasiyah, B. Saha, F. M. Hisama, K. Rading, I. Goebel, P. Schütz, G. Speit, J. Högel, H. Thiele, G. Nürnberg, P. Nürnberg, M. Hammerschmidt, Y. Zhu, D. R. Tong, C. Katz, G. M. Martin, J. Oshima, C. Prives, C. Kubisch, Dysfunction of the MDM2/p53 axis is linked to premature aging. *J. Clin. Invest.* **127**, 3598–3608 (2017).
 41. C. López-Otin, M. A. Blasco, L. Partridge, M. Serrano, G. Kroemer, The hallmarks of aging. *Cell* **153**, 1194–1217 (2013).
 42. T. Toki, K. Yoshida, R. Wang, S. Nakamura, T. Maekawa, K. Goi, M. C. Katoh, S. Mizuno, F. Sugiyama, R. Kanezaki, T. Uechi, Y. Nakajima, Y. Sato, Y. Okuno, A. Sato-Otsubo, Y. Shiozawa, K. Kataoka, Y. Shiraiishi, M. Sanada, K. Chiba, H. Tanaka, K. Terui, T. Sato, T. Kamio, H. Sakaguchi, S. Ohga, M. Kuramitsu, I. Hamaguchi, A. Ohara, H. Kanno, S. Miyano, S. Kojima, A. Ishiguro, K. Sugita, N. Kenmochi, S. Takahashi, K. Eto, S. Ogawa, E. Ito, De Novo mutations activating germline TP53 in an inherited bone-marrow-failure syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* **103**, 440–447 (2018).
 43. J. L. Van Nostrand, L. D. Attardi, Guilty as CHARGED: p53’s expanding role in disease. *Cell Cycle* **13**, 3798–3807 (2014).
 44. E. G. Arias-Salgado, E. Galvez, L. Planas-Cerezales, L. Pintado-Berninches, E. Vallespin, P. Martínez, J. Carrillo, L. Iarriccio, A. Ruiz-Llobet, A. Catalá, I. Badell-Serra, L. I. Gonzalez-Granado, A. Martín-Nalda, M. Martínez-Gallo, A. Galera-Miñarro, C. Rodríguez-Vigil, M. Bastos-Oreiro, G. P. de Nancrales, V. Leiro-Fernández, M.-L. Uria, C. Diaz-Heredia, C. Valenzuela, S. Martín, B. López-Muñoz, P. Lapunzina, J. Sevilla, M. Molina-Molina, R. Perona, L. Sastre, Genetic analyses of aplastic anemia and idiopathic pulmonary fibrosis patients with short telomeres, possible implication of DNA-repair genes. *Orphanet J. Rare Dis.* **14**, 82 (2019).
 45. G. M. Baerlocher, I. Vulto, G. de Jong, P. M. Lansdorp, Flow cytometry and FISH to measure the average length of telomeres (flow FISH). *Nat. Protoc.* **1**, 2365–2376 (2006).
 46. B. J. Balow, M. Yeager, K. Jacobs, N. Giri, J. Boland, L. Burdett, B. P. Alter, S. A. Savage, Germline mutations of regulator of telomere elongation helicase 1, RTEL1, in Dyskeratosis congenita. *Hum. Genet.* **132**, 473–480 (2013).
 47. C. Adam, R. Guérois, A. Citarella, L. Verardi, F. Adolphe, C. Béneut, V. Sommermeyer, C. Ramus, J. Govin, Y. Couté, V. Borde, The PHD finger protein Spp1 has distinct functions in the Set1 and the meiotic DSB formation complexes. *PLoS Genet.* **14**, e1007223 (2018).
 48. I. López de Silanes, O. Graña, M. L. De Bonis, O. Dominguez, D. G. Pisano, M. A. Blasco, Identification of TERRA locus unveils a telomere protection role through association to nearly all chromosomes. *Nat. Commun.* **5**, 4723 (2014).
 49. E. Prophet, B. Mills, J. Arrington, L. Sobin, *Laboratory Methods in Histotechnology* (AFIP, 1992).

50. B. P. Alter, G. M. Baerlocher, S. A. Savage, S. J. Chanock, B. B. Weksler, J. P. Willner, J. A. Peters, N. Giri, P. M. Lansdorp, Very short telomere length by flow fluorescence in situ hybridization identifies patients with dyskeratosis congenita. *Blood* **110**, 1439–1447 (2007).
51. N. A. Laurie, S. L. Donovan, C.-S. Shih, J. Zhang, N. Mills, C. Fuller, A. Teunisse, S. Lam, Y. Ramos, A. Mohan, D. Johnson, M. Wilson, C. Rodriguez-Galindo, M. Quarto, S. Francoz, S. M. Mendrysa, R. K. Guy, J.-C. Marine, A. G. Jochemsen, M. A. Dyer, Inactivation of the p53 pathway in retinoblastoma. *Nature* **444**, 61–66 (2006).
52. M. Lek, K. J. Karczewski, E. V. Minikel, K. E. Samocha, E. Banks, T. Fennell, A. H. O'Donnell-Luria, J. S. Ware, A. J. Hill, B. B. Cummings, T. Tukiainen, D. P. Birnbaum, J. A. Kosmicki, L. E. Duncan, K. Estrada, F. Zhao, J. Zou, E. Pierce-Hoffman, J. Berghout, D. N. Cooper, N. DeFlaux, M. DePristo, R. Do, J. Flannick, M. Fromer, L. Gauthier, J. Goldstein, N. Gupta, D. Howrigan, A. Kiezun, M. I. Kurki, A. L. Moonshine, P. Natarajan, L. Orozco, G. M. Peloso, R. Poplin, M. A. Rivas, V. Ruano-Rubio, S. A. Rose, D. M. Ruderfer, K. Shakir, P. D. Stenson, C. Stevens, B. P. Thomas, G. Tiao, M. T. Tusie-Luna, B. Weisburd, H.-H. Won, D. Yu, D. M. Altshuler, D. Ardissino, M. Boehnke, J. Danesh, S. Donnelly, R. Elosua, J. C. Florez, S. B. Gabriel, G. Getz, S. J. Glatt, C. M. Hultman, S. Kathiresan, M. Laakso, S. McCarrroll, M. I. McCarthy, D. McGovern, R. McPherson, B. M. Neale, A. Palotie, S. M. Purcell, D. Saleheen, J. M. Scharf, P. Sklar, P. F. Sullivan, J. Tuomilehto, M. T. Tsuang, H. C. Watkins, J. G. Wilson, M. J. Daly, D. G. MacArthur, Exome Aggregation Consortium, Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. *Nature* **536**, 285–291 (2016).
53. F. Toledo, K. A. Krummel, C. J. Lee, C.-W. Liu, L.-W. Rodewald, M. Tang, G. M. Wahl, 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 (2006).
54. N. M. Ioannidis, J. H. Rothstein, V. Pejaver, S. Middha, S. K. McDonnell, S. Baheti, A. Musolf, Q. Li, E. Holzinger, D. Karyadi, L. A. Cannon-Albright, C. C. Teerlink, J. L. Stanford, W. B. Isaacs, J. Xu, K. A. Cooney, E. M. Lange, J. Schleutker, J. D. Carpten, I. J. Powell, O. Cussenot, G. Cancel-Tassin, G. G. Giles, R. J. MacInnis, C. Maier, C.-L. Hsieh, F. Wiklund, W. J. Catalona, W. D. Foulkes, D. Mandal, R. A. Eeles, Z. Kote-Jarai, C. D. Bustamante, D. J. Schaid, T. Hastie, E. A. Ostrander, J. E. Bailey-Wilson, P. Radivojac, S. N. Thibodeau, A. S. Whittemore, W. Sieh, REVEL: An ensemble method for predicting the pathogenicity of rare missense variants. *Am. J. Hum. Genet.* **99**, 877–885 (2016).
55. L. A. Donehower, M. Harvey, B. L. Slagle, M. J. McArthur, C. A. Montgomery, J. S. Butel, A. Bradley, Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature* **356**, 215–221 (1992).
56. J.-C. Marine, S. Francoz, M. Maetens, G. Wahl, F. Toledo, G. Lozano, Keeping p53 in check: Essential and synergistic functions of Mdm2 and Mdm4. *Cell Death Differ.* **13**, 927–934 (2006).

Acknowledgments: We are grateful to the family for valuable contributions to this study. We thank I. Grandjean, C. Caspersen, A. Fosse, and M. Garcia from the Animal Facility, C. Alberti and C. Roulle 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 thank A. Chor for help with qPCRs, A. Pyanitskaya, C. Adam, V. Borde, M. Schertzer, and M. Perderiset for plasmids and technical advices, and A. Fajac for comments on the manuscript. F.T. would like to acknowledge the talent, kindness, and loyal support of I. Simeonova and S.J., two exceptional PhD students whose pioneering work led to this study. **Funding:** The “Genetics of Tumor Suppression” laboratory received funding from the Ligue Nationale contre le Cancer (Labellisation 2014-2018 and Comité Ile-de-France), the Fondation ARC and the Gefluc. PhD students were supported by fellowships from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (to S.J., E.T., and R.D.), the Ligue Nationale contre le Cancer (to S.J.), and the Fondation pour la Recherche Médicale (to E.T.). The work of S.A.S., N.G., and B.P.A. was supported by the intramural research program of the Division of Cancer Epidemiology and Genetics, NCI, and the NIH Clinical Center. **Author contributions:** V.L. created the Mdm4^{T454M} mouse model, genotyped mouse cohorts, and performed transfections, yeast two-hybrid assays, protein purifications, and molecular cloning. E.T., R.D., and V.L. managed mouse colonies. E.T., R.D., and P.L. performed mouse anatomopathology. I.D., E.T., R.D., F.T., and J.-A.L.-V. determined mouse telomere lengths. V.L. and S.J. genotyped human polymorphisms and analyzed human fibroblasts. E.T. and R.D. genotyped MEFs and performed 3T3 assays. V.L., R.D., and E.T. performed Western blots. E.T., R.D., V.L., S.J., and P.L. performed qPCRs. B.B. and V.L. performed ATP-binding assays. B.P.A. supervised the NCI IBMFS study. N.G. and S.A.S. evaluated study participants. S.A.S. analyzed the exome sequencing data. F.T. and S.A.S. supervised the project and wrote the manuscript. **Competing interests:** The authors declare that they have no competing interests. **Data and materials availability:** All data needed to evaluate the conclusions in the paper are present in the paper and/or the Supplementary Materials. Additional data related to this paper may be requested from the authors. The human samples can be provided by S.A.S. pending scientific review and a completed material transfer agreement. Requests for human cells should be submitted to S.A.S.

Submitted 11 June 2019

Accepted 16 January 2020

Published 10 April 2020

10.1126/sciadv.aay3511

Citation: E. Toufektchan, V. Lejour, R. Durand, N. Giri, I. Draskovic, B. Bardot, P. Laplante, S. Jaber, B. P. Alter, J.-A. Londono-Vallejo, S. A. Savage, F. Toledo, Germline mutation of *MDM4*, a major p53 regulator, in a familial syndrome of defective telomere maintenance. *Sci. Adv.* **6**, eaay3511 (2020).

Germline mutation of *MDM4*, a major p53 regulator, in a familial syndrome of defective telomere maintenance

Eléonore Toufektchan, Vincent Lejour, Romane Durand, Neelam Giri, Irena Draskovic, Boris Bardot, Pierre Laplante, Sara Jaber, Blanche P. Alter, José-Arturo Londono-Vallejo, Sharon A. Savage and Franck Toledo

Sci Adv 6 (15), eaay3511.
DOI: 10.1126/sciadv.aay3511

ARTICLE TOOLS

<http://advances.sciencemag.org/content/6/15/eaay3511>

SUPPLEMENTARY MATERIALS

<http://advances.sciencemag.org/content/suppl/2020/04/06/6.15.eaay3511.DC1>

REFERENCES

This article cites 55 articles, 14 of which you can access for free
<http://advances.sciencemag.org/content/6/15/eaay3511#BIBL>

PERMISSIONS

<http://www.sciencemag.org/help/reprints-and-permissions>

Use of this article is subject to the [Terms of Service](#)

Science Advances (ISSN 2375-2548) is published by the American Association for the Advancement of Science, 1200 New York Avenue NW, Washington, DC 20005. The title *Science Advances* is a registered trademark of AAAS.

Copyright © 2020 The Authors, some rights reserved; exclusive licensee American Association for the Advancement of Science. No claim to original U.S. Government Works. Distributed under a Creative Commons Attribution License 4.0 (CC BY).

Supplementary Materials for

Germline mutation of *MDM4*, a major p53 regulator, in a familial syndrome of defective telomere maintenance

Eléonore Toufektchan, Vincent Lejour, Romane Durand, Neelam Giri, Irena Draskovic, Boris Bardot, Pierre Laplante, Sara Jaber, Blanche P. Alter, José-Arturo Londono-Vallejo, Sharon A. Savage, Franck Toledo*

*Corresponding author. Email: franck.toledo@curie.fr

Published 10 April 2020, *Sci. Adv.* **6**, eaay3511 (2020)
DOI: 10.1126/sciadv.aay3511

This PDF file includes:

Figs. S1 to S5
Table S1 to S5
References

Supplementary Materials

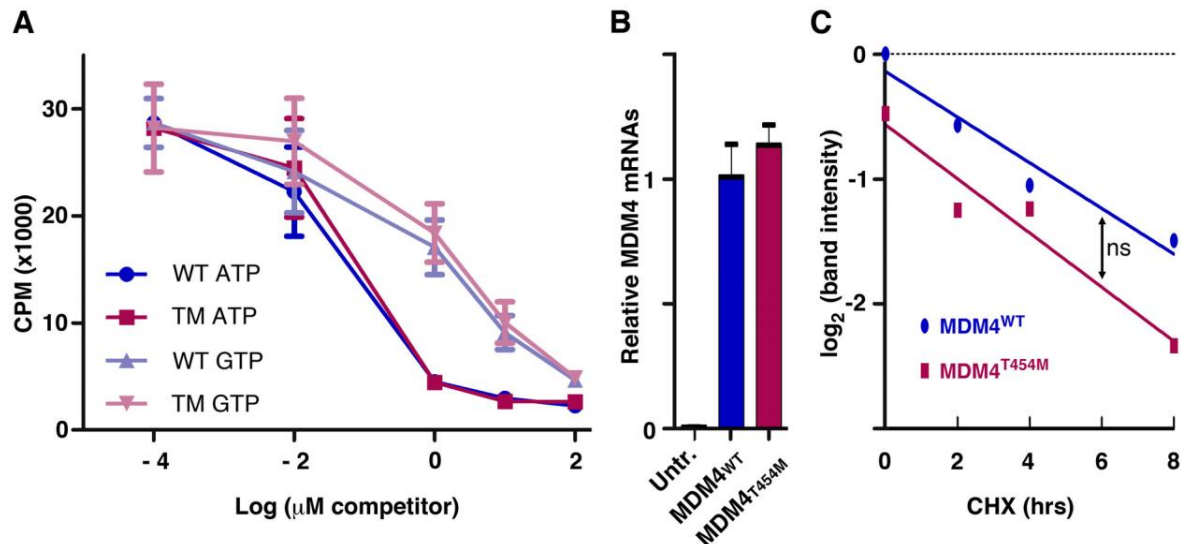


Fig. S1. Impact of the mutation on MDM4 function. (A) The WT and TM mutant RING domains bind ATP, rather than GTP. 7 μg of either WT or mutant GST-RING proteins were incubated with 5 μCi ATP- $\gamma^{32}\text{P}$ for 10 min at 30°C and increasing amounts (0, 0.02, 2, 20, 200 μM) of ATP or GTP, filtered through nitrocellulose, and counted by liquid scintillation. Results from 2 independent experiments. (B) U2OS cells were transfected with the Myc-MDM4^{WT} or Myc-MDM4^{T454M} plasmids at similar efficiencies. mRNAs were extracted from untransfected (Untr.) U2OS cells, or cells transfected with a Myc-MDM4^{WT} or Myc-MDM4^{T454M} expression plasmid, and MDM4 mRNAs were quantified using real-time PCR, normalized to control mRNAs, then the value in cells transfected with the Myc-MDM4^{WT} plasmid was assigned a value of 1. The same transfection experiments were used for RNA extractions in this Figure and protein extractions in Fig. 1G, so that the experiments are directly comparable. Importantly, because endogenous MDM4 mRNAs were in negligible amounts compared to Myc-MDM4 mRNAs expressed from transfected plasmids, the effects on p21 levels of Myc-MDM4^{WT} and Myc-MDM4^{T454M} were directly measurable in Fig. 1G. (C) In transfected cells, the Myc-MDM4^{WT} and Myc-MDM4^{T454M} proteins are expressed at different levels, but exhibit similar half-lives. For half-life determination, the Myc-MDM4 bands shown in Fig. 1G were quantified and normalized to actin bands, then to the first time-point (CHX 0) of cells transfected with the Myc-MDM4^{WT} plasmid. The comparative analysis of regression lines with Graphpad prism indicated that slopes were not significantly different (ns), indicating similar protein stability.

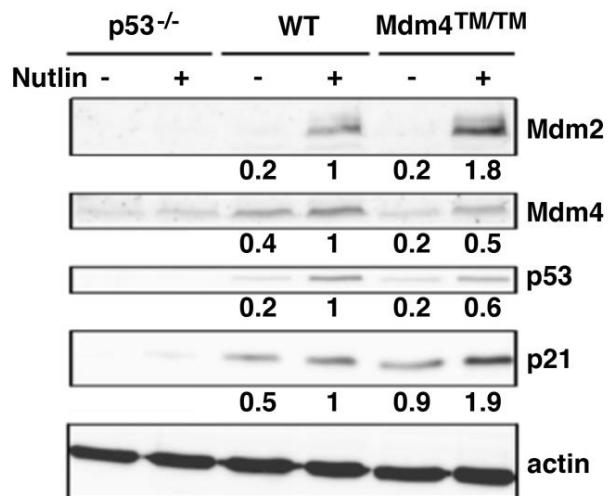


Fig. S2. Impact of the Mdm4^{T454M} mutation on p21 and Mdm2 protein levels. Protein extracts, prepared from *p53*^{-/-}, WT, and *Mdm4*^{TM/TM} MEFs before or after treatment for 24 hours with 10 μ M Nutlin, were immunoblotted with antibodies against Mdm2, Mdm4, p53, p21 or actin. Bands were normalized to actin, then the values in Nutlin-treated WT MEFs were assigned a value of 1. This figure presents an experiment independent from the one presented in Fig. 3B. In the mutant cells, increased Mdm2 and p21 were observed in all (> 3) experiments (e.g. see also Fig. 3B), indicating increased p53 activity. The decreased Mdm4 protein levels in *Mdm4*^{TM/TM} MEFs were also observed in all experiments (see also Fig. 2G and 3B). For p53 levels however, we observed either a slight increase (as in Fig. 3B), or a slight decrease (as shown here) in the mutant cells, depending on the experiment. We presume that in some experiments the increased Mdm2 proteins are not fully inhibited by Nutlin, leading to increased p53 ubiquitination and degradation in the mutant cells. This is reminiscent of what was previously observed in another mouse model, in which Mdm4 loss was found to increase p53 activity, but decrease p53 stability (53).

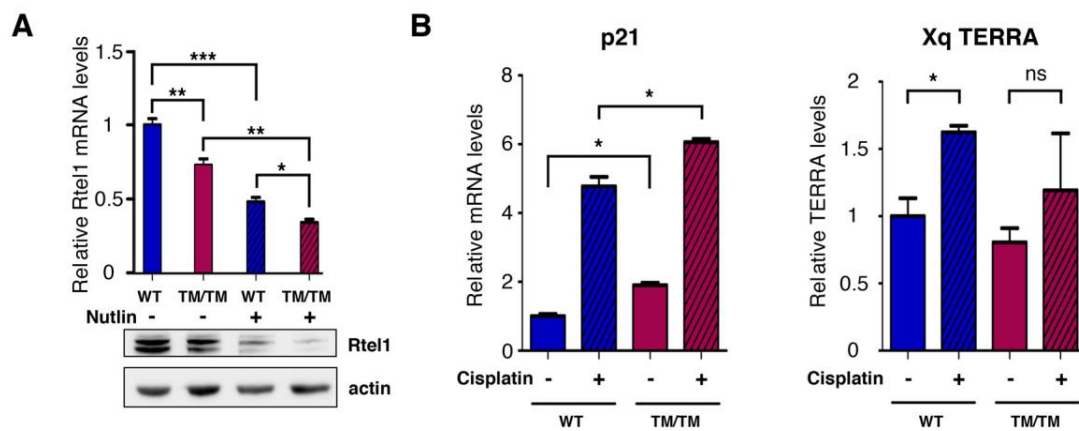


Fig. S3. Quantification of Rtel1 and TERRA in MEFs. **(A)** Quantification of Rtel1 mRNAs extracted from WT and *Mdm4*^{TM/TM} MEFs, unstressed or Nutlin-treated. Results from 3 experiments. Below, western blots showing Rtel1 and actin protein levels. **(B)** Quantification of p21 and TERRA extracted from WT and *Mdm4*^{TM/TM} MEFs, unstressed or treated with 15 μ M cisplatin. Results from 2 independent MEFs per genotype.

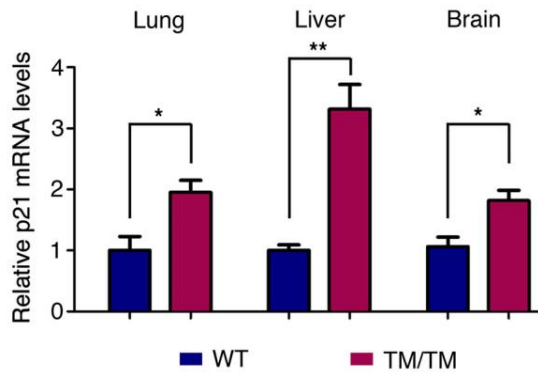


Fig. S4. Tissues from *Mdm4*^{TM/TM} pups exhibit increased p21 mRNA levels. mRNAs were extracted from the lungs, liver and brain of WT and *Mdm4*^{TM/TM} P0 pups, then p21 mRNA levels were quantified using real-time PCR, normalized to control mRNAs, and the value in WT tissues was assigned a value of 1. Results from 3 WT and 4 *Mdm4*^{TM/TM} pups. * P<0.05 and ** P<0.01 by Student's t tests.

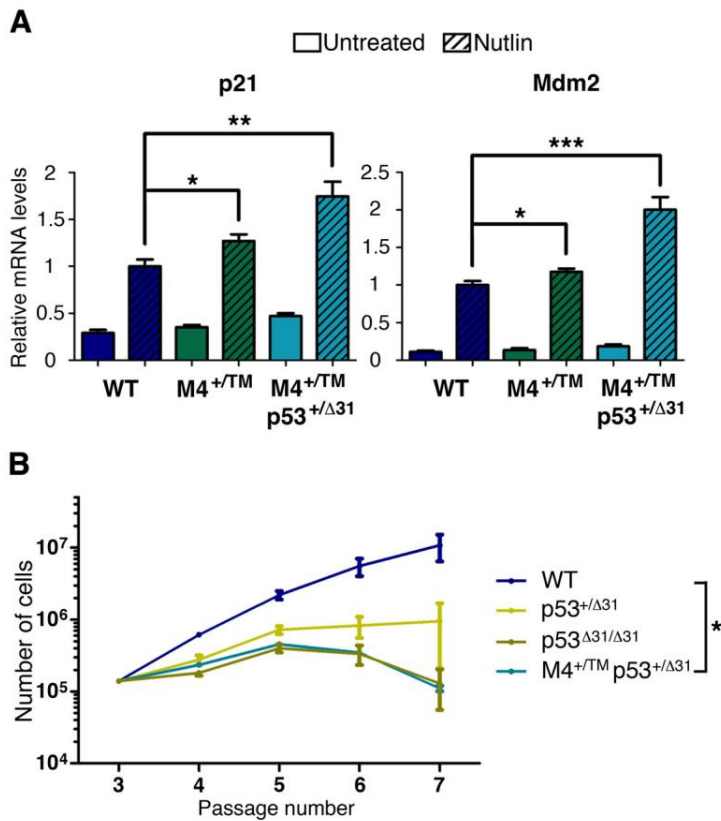


Fig. S5. *Mdm4*^{+/TM} *p53*^{+/Δ31} MEFs exhibit increased p53 activity. (A) Quantification of p21 and Mdm2 mRNAs extracted from WT, *Mdm4*^{+/TM} (M4^{+/TM}) and *Mdm4*^{+/TM} *p53*^{+/Δ31} (M4^{+/TM} p53^{+/Δ31}) MEFs, treated or not 10 μM Nutlin for 24 hours. p21 and Mdm2 mRNAs were quantified as in Fig. 3A. Results from 4 independent experiments, and at least 2 independent MEFs per genotype. * P<0.05, ** P<0.01 and *** P<0.001 by Student's t tests. (B) Proliferation in a 3T3 protocol of MEFs of the indicated genotypes. Each point is the average value of 2 independent MEFs. * P<0.05 by Student's t test at passage 7.

NCI ID	Gene, variant	Hematologic manifestations	Other clinical manifestations
226-1, proband	<i>MDM4</i> p.T454M <i>TERT</i> p.W203S	Current age 29 years. Mild intermittent neutropenia from age 14 years (ANC range 1.0-1.5 x 10 ⁹ /L) Macrocytosis: MCV 100-105 (normal 79-92.2 fL) Hb 14.4 gm/dL, platelets 144 x 10 ⁹ /L EPO 77.3 (normal 3.7-31.5 mIU/mL) HbF 8.5% (normal 0-2%) Bone marrow hypocellular (30%), no dysplasia. Cytogenetics 46,XY[20]	No dysmorphism; no DC phenotype; normal weight and height. Chronic fatigue and muscle pains since age 14, currently being treated with gabapentin. Normal PFT, MRI brain, LFT
226-2, sister	<i>MDM4</i> p.T454M	Current age 31 years. WBC range 3.6 – 4.1 x 10 ⁹ /L, ANC 2.5 x 10 ⁹ /L, Hb 13.2 gm/dL, platelets 193 x 10 ⁹ /L; MCV 95.2 (normal 79.4-94.8 fL). Mild lymphopenia with ALC 0.85 x 10 ⁹ /L (normal 1.18-3.74 x 10 ⁹ /L) EPO 27.6 (normal 3.7-31.5 mIU/mL) HbF <1% (normal 0-2%)	No dysmorphism; no DC phenotype; normal weight and height. Recurrent sinus and respiratory infections needing treatment with prolonged antibiotic courses. B cell immunodeficiency with poor response to vaccines. Chronic fatigue and muscle pains being treated with gabapentin
226-3, father	<i>TERT</i> p.W203S	CBC normal at age 47 years. MCV 89 fL Hemochromatosis mutation positive (<i>HFE</i> p.C282Y/H63D)	No abnormalities
226-4, mother	<i>MDM4</i> p.T454M	Current age 55 years. Macrocytosis: MCV 100-107 (normal 79.4-94.8 fL). WBC range 2.6 – 4.0 x 10 ⁹ /L, ANC 1.7 x 10 ⁹ /L, Hb 14.2 gm/dL, platelets 209 x 10 ⁹ /L. EPO 64.4 (normal 3.7-31.5 mIU/mL) HbF 4.1% (normal 0-2%) Bone marrow hypocellular (20-30%); no dysplasia; 46,XX[20]	No dysmorphism; no DC phenotype; normal weight and height. H/O menorrhagia; thin hair; hypothyroidism; osteopenia Normal PFT; normal LFT
226-7, aunt	<i>MDM4</i> p.T454M	Died at age 52 from acute myeloid leukemia	History of melanoma
226-8, cousin	<i>MDM4</i> p.T454M	Current age 41 years. Macrocytosis: MCV 100-108 (normal 79.4-94.8 fL). ANC 1.7 x 10 ⁹ /L; Hb 14.8 gm/dL, platelets 217 x 10 ⁹ /L. EPO 22.6, (normal 3.7-31.5 mIU/mL) HbF <1% (normal 0-2%) Bone marrow: hypocellular (30-50%), no dysplasia. Cytogenetics: 46,XX[20]	No dysmorphism; no DC phenotype; normal weight and height. Tongue SCC resected at age 27 years. Fertility problems and h/o fetal losses. Received fertility meds; preeclampsia, preterm delivery
226-9, cousin	DNA not available	None known	HNSCC at 42 years, died of cancer-related complications

Table S1. Clinical data on study participants. Participants were evaluated by the study team and data reflect summary of eleven years of follow-up for each participant. DNA from the proband's maternal aunt (226-7) was not available, but she is an obligate carrier given the genotypes of her sister and daughter. Abbreviations: ANC, absolute neutrophil count; MCV, mean corpuscular volume; Hb, hemoglobin; EPO, erythropoietin; HbF, hemoglobin F; DC phenotype, dyskeratosis congenita mucocutaneous triad; WBC, white blood cells; ALC, absolute lymphocyte count; CBC, complete blood count; PFT, pulmonary function tests; LFT, liver function tests; SCC, squamous cell carcinoma; HNSCC, head and neck squamous cell carcinoma.

Chromosome	Position	ID	REF	ALT	gnomAD allele count	gnomAD MAF [^]	Ensembl GeneName	Ensembl Transcript	Amino Acid Change	REVEL Score	CADD_phred Score	MetaSVM	Proband, NCI-226-1	Sister, NCI226-2	Father, NCI-226-3	Mother, NCI-226-4	Maternal Cousin, NCI-226-8
chr1	147084719	rs144335253*	C	G	5/279938	0.00001786	BC19	ENST00000234739	p.Pro31Ala	0.166	27.1	T	0/1	0/0	0/0	0/1	0/1
chr1	204518698	.	C	T	0	0	MDM4	ENST00000367182	p.Thr454Met	0.872	28	D	0/1	0/1	0/0	0/1	0/1
chr1	205273017	.	G	C	0	0	MJAK2	ENST00000367157	p.Pro483Arg	0.088	10.6	T	0/1	0/1	0/0	0/1	0/1
chr2	109067508	rs148209837	C	A	135/282670	0.0004776	GCC2	ENST00000309863	p.Leu30Ile	0.198	21.2	T	0/1	0/1	0/0	0/1	0/1
chr2	220162145	rs151265781	C	T	16/282100	0.00005672	PTPRN	ENST00000295718	p.Arg633His	0.38	22.4	T	0/1	0/0	0/0	0/1	0/1
chr7	33945314	rs367821838	A	G	7/250366	0.00002796	BMPER	ENST00000297161	p.Asn30Ser	0.078	18.65	T	0/1	0/1	0/0	0/1	0/1
chr9	103109174	rs1235691348	C	T	2/251420	0.000007955	TEX10	ENST00000374902	p.Ser232Asn	0.066	17.53	T	0/1	0/0	0/0	0/1	0/1
chr9	115336621	rs375495090	A	G	2/282506	0.000007079	K/AA1958	ENST00000536272	p.Ile87Met	0.27	0.367	T	0/1	0/0	0/0	0/1	0/1
chr10	104125263	rs1373756831	A	G	2/282370	0.00001062	GBF1	ENST00000369983	p.Gln738Arg	0.047	21	T	0/1	0/0	0/0	0/1	0/1
chr11	66055605	.	T	C	0	0	YIF1A	ENST00000376901	p.Met64Val	0.149	22.3	T	0/1	0/1	0/0	0/1	0/1
chr12	53164963	rs199792968	C	T	14/282872	0.00004949	KRT76	ENST00000332411	p.Arg435His	0.609	25.2	D	0/1	0/0	0/0	0/1	0/1
chr13	49281319	rs201226412	G	A	2/282452	0.000007081	CYSLTR2	ENST00000282018	p.Met122Ile	0.45	27.4	T	0/1	0/1	0/0	0/1	0/1
chr13	111562966	rs143331283	G	A	7/250770	0.00002791	ANKRD10	ENST00000267339	p.Pro121Leu	0.091	23.2	T	0/1	0/1	0/0	0/1	0/1
chr14	86087877	rs747657938	A	G	3/249689	0.00001202	FLRT2	ENST00000330753	p.Lys7Glu	0.063	19.81	T	0/1	0/0	0/0	0/1	0/1
chr17	78078662	rs142481170	G	A	22/279638	0.00007867	GAA	ENST00000302262	p.Ala93Thr	0.284	15.61	T	0/1	0/1	0/0	0/1	0/1
chr20	30070192	rs200495484	C	T	20/251304	0.00007958	REM1	ENST00000201979	p.Arg176Cys	0.862	22.5	D	0/1	0/0	0/0	0/1	0/1

Table S2. Variants identified in exome sequencing of family NCI-226 as described in the Methods.

[^]Minor allele frequency (MAF) reported for all gnomAD populations combined (52).

*rs144335253 is reported as multi-allelic C>G,T. The T allele is absent in gnomAD.

REVEL score determined by Ioannidis *et al.* (54).

Phenotype	Mdm4 mutants	compound mutants	p53 mutants
Embryonic lethality	Mdm4 ^{-/-}		
Perinatal lethality	Mdm4 ^{TM/TM}		
Bone Marrow failure (65-100% of mice in < 5 months)		Mdm4 ^{+TM} p53 ^{+Δ31} Mdm4 ^{TM/TM} p53 ^{+/-}	p53 ^{Δ31/Δ31}
Rare accelerated death (2-6% of mice in < 7 months)	Mdm4 ^{+TM}		p53 ^{+Δ31}
WT	Mdm4 ^{+/+}		p53 ^{+/+}
Cancer after > 1 year			p53 ^{+/-}
Cancer in < 1 year		Mdm4 ^{TM/TM} p53 ^{-/-}	p53 ^{-/-}

Table S3. A summary of phenotypes of Mdm4 and p53 mutants. Background colors indicate p53 activity, from null (white) to very high (black). The phenotypes of *Mdm4*^{-/-}, *p53*^{-/-}, *p53*^{+/-}, *p53*^{+Δ31} and *p53*^{Δ31/Δ31} mice were described previously (5,55,56), whereas those of *Mdm4*^{+TM}, *Mdm4*^{TM/TM} and compound mutants are described in this report.

Primer Name	Purpose	Sequence 5'-3'
a	PCR screen (3') of ES cells	TAGGTCCCTCGAGGGGATC
b	PCR screen (3') of ES cells	CGTAGGCAATTCTGTAACCACAAC
c	Amplification of mutated region	ACTCAGTGGGATTTTTGGATTGG
d	Amplification of mutated region	CCCTCTGGGTTTCACAATTGG
e	ES and mouse genotyping	GTTTGCCGAGGAACCTTCCT
f	ES and mouse genotyping	GCAAGACTCTGCCCCAAAAG
SB-5'-F	PCR product is 5' Southern blot probe	CAGCCTTCTGTAAGGCAGC
SB-5'-R	PCR product is 5' Southern blot probe	TAAAAACCACAGGGCTACTAAATACC
SB-3'-F	PCR product is 3' Southern blot probe	GACTGCCTGAAGATGGAGGAA
SB-3'-R	PCR product is 3' Southern blot probe	CACTTCCCCAAATCATGCCAAA
SeqTM	Sequencing of mutation	CATAGTTCTGAAAGCCAGGAGA

Table S4. Primers for the targeting strategy and mouse genotyping. These primers are relevant to Figure 2.

Primer Name	Tested polymorphisms	Sequence 5'-3'
SNPp53F	rs1800371, rs1042522, rs17878362	TGGGACTGACTTTCTGCTCT
SNPp53R	rs1800371, rs1042522, rs17878362	CAAGAAGCCCAGACGGAAAC
p53-2F	rs17880560	ATGTCTGACTGCCCTTCAA
p53-2R	rs17880560	CTGCATGACAACAAGGGAGG
p53-2S	rs17880560	TCCCTATCCCAAGAAGCCCT
SNPm2F	rs117039649, rs2279744	GCTTTGCGGAGGTTTGTGGACT
SNPm2R	rs117039649, rs2279744	CCACAGGTCTACCCTCCAATCGCCACT
SNPm4-1F	rs4245739	GCCAAGAGACCATCTCAAGC
SNPm4-1R	rs4245739	ACTGTCTGAAGAGGGGCAGA
SNPm4-2F	rs11801299	CCTAGCTCAGCCTCCCAAAA
SNPm4-2R	rs11801299	TCCCAGCAGCCATACTCAA
SNPm4-2S	rs11801299	TTGCTTTTGCTGGCACAAT
SNPm4-3F	rs1380576	CTTCTGGCCTGGAATCTCGT
SNPm4-3R	rs1380576	TTACAGGCATGCACCATCAC

Table S5. Primers for human polymorphism genotyping. The primers were used to amplify and genotype the variants mentioned in Fig. 6A.

REFERENCES AND NOTES

1. J. M. Nigro, S. J. Baker, A. C. Preisinger, J. M. Jessup, R. Hosteller, K. Cleary, S. H. Signer, N. Davidson, S. Baylin, P. Devilee, T. Glover, F. S. Collins, A. Weslon, R. Modali, C. C. Harris, B. Vogelstein, Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types. *Nature* **342**, 705–708 (1989).
2. D. Malkin, F. P. Li, L. C. Strong, J. F. Fraumeni, C. E. Nelson, D. H. Kim, J. Kassel, M. A. Gryka, F. Z. Bischoff, M. A. Tainsky, Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. *Science* **250**, 1233–1238 (1990).
3. G. L. Bond, W. Hu, E. E. Bond, H. Robins, S. G. Lutzker, N. C. Arva, J. Bargonetti, F. Bartel, H. Taubert, P. Wuerl, K. Onel, L. Yip, S.-J. Hwang, L. C. Strong, G. Lozano, A. J. Levine, A single nucleotide polymorphism in the MDM2 promoter attenuates the p53 tumor suppressor pathway and accelerates tumor formation in humans. *Cell* **119**, 591–602 (2004).
4. J. Wynendaele, A. Böhnke, E. Leucci, S. J. Nielsen, I. Lambertz, S. Hammer, N. Sbrzesny, D. Kubitzka, A. Wolf, E. Gradhand, K. Balschun, I. Braicu, J. Sehouli, S. Darb-Esfahani, C. Denkert, C. Thomssen, S. Hauptmann, A. Lund, J.-C. Marine, F. Bartel, An illegitimate microRNA target site within the 3' UTR of MDM4 affects ovarian cancer progression and chemosensitivity. *Cancer Res.* **70**, 9641–9649 (2010).
5. I. Simeonova, S. Jaber, I. Draskovic, B. Bardot, M. Fang, R. Bouarich-Bourimi, V. Lejour, L. Charbonnier, C. Soudais, J.-C. Bourdon, M. Huerre, A. Londono-Vallejo, F. Toledo, Mutant mice lacking the p53 C-terminal domain model telomere syndromes. *Cell Rep.* **3**, 2046–2058 (2013).
6. S. A. Savage, Beginning at the ends: Telomeres and human disease. *F1000Res.* **7**, 524 (2018).
7. B. P. Alter, N. Giri, S. A. Savage, P. S. Rosenberg, Cancer in the National Cancer Institute inherited bone marrow failure syndrome cohort after fifteen years of follow-up. *Haematologica* **103**, 30–39 (2018).

8. S. C. Ward, S. A. Savage, N. Giri, B. P. Alter, P. S. Rosenberg, D. C. Pichard, E. W. Cowen, Beyond the triad: Inheritance, mucocutaneous phenotype, and mortality in a cohort of patients with dyskeratosis congenita. *J. Am. Acad. Dermatol.* **78**, 804–806 (2018).
9. S. Jaber, E. Toufektchan, V. Lejour, B. Bardot, F. Toledo, p53 downregulates the Fanconi anaemia DNA repair pathway. *Nat. Commun.* **7**, 11091 (2016).
10. D. Filipescu, M. Naughtin, K. Podsypanina, V. Lejour, L. Wilson, Z. A. Gurard-Levin, G. A. Orsi, I. Simeonova, E. Toufektchan, L. D. Attardi, F. Toledo, G. Almouzni, Essential role for centromeric factors following p53 loss and oncogenic transformation. *Genes Dev.* **31**, 463–480 (2017).
11. E. Toufektchan, F. Toledo, The guardian of the genome revisited: p53 downregulates genes required for telomere maintenance, DNA repair, and centromere structure. *Cancer* **10**, E135 (2018).
12. M. A. Blasco, H. W. Lee, M. P. Hande, E. Samper, P. M. Lansdorp, R. A. DePinho, C. W. Greider, Telomere shortening and tumor formation by mouse cells lacking telomerase RNA. *Cell* **91**, 25–34 (1997).
13. E. Aix, Ó. Gutiérrez-Gutiérrez, C. Sánchez-Ferrer, T. Aguado, I. Flores, Postnatal telomere dysfunction induces cardiomyocyte cell-cycle arrest through p21 activation. *J. Cell Biol.* **213**, 571–583 (2016).
14. D. Hockemeyer, W. Palm, R. C. Wang, S. S. Couto, T. de Lange, Engineered telomere degradation models dyskeratosis congenita. *Genes Dev.* **22**, 1773–1785 (2008).
15. S. Kim, J.-H. Jhong, J. Lee, J.-Y. Koo, Meta-analytic support vector machine for integrating multiple omics data. *BioData Min.* **10**, 2 (2017).
16. C. Priest, C. Prives, M. V. Poyurovsky, Deconstructing nucleotide binding activity of the Mdm2 RING domain. *Nucleic Acids Res.* **38**, 7587–7598 (2010).
17. K. Linke, P. D. Mace, C. A. Smith, D. L. Vaux, J. Silke, C. L. Day, Structure of the MDM2/MDMX RING domain heterodimer reveals dimerization is required for their ubiquitylation in trans. *Cell Death Differ.* **15**, 841–848 (2008).

18. J. E. Landers, S. L. Cassel, D. L. George, Translational enhancement of mdm2 oncogene expression in human tumor cells containing a stabilized wild-type p53 protein. *Cancer Res.* **57**, 3562–3568 (1997).
19. B. X. Tan, H. P. Liew, J. S. Chua, F. J. Ghadessy, Y. S. Tan, D. P. Lane, C. R. Coffill, Anatomy of Mdm2 and Mdm4 in evolution. *J. Mol. Cell Biol.* **9**, 3–15 (2017).
20. B. Bardot, R. Bouarich-Bourimi, J. Leemput, V. Lejour, A. Hamon, L. Plancke, A. G. Jochemsen, I. Simeonova, M. Fang, F. Toledo, 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).
21. M. Dewaele, T. Tabaglio, K. Willekens, M. Bezzi, S. X. Teo, D. H. P. Low, C. M. Koh, F. Rambow, M. Fiers, A. Rogiers, E. Radaelli, M. Al-Haddawi, S. Y. Tan, E. Hermans, F. Amant, H. Yan, M. Lakshmanan, R. C. Koumar, S. T. Lim, F. A. Derheimer, R. M. Campbell, Z. Bonday, V. Tergaonkar, M. Shackleton, C. Blattner, J.-C. Marine, E. Guccione, Antisense oligonucleotide-mediated MDM4 exon 6 skipping impairs tumor growth. *J. Clin. Invest.* **126**, 68–84 (2016).
22. L. T. Vassilev, B. T. Vu, B. Graves, D. Carvajal, F. Podlaski, Z. Filipovic, N. Kong, U. Kammlott, C. Lukacs, C. Klein, N. Fotouhi, E. A. Liu, In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2. *Science* **303**, 844–848 (2004).
23. B. Hu, D. M. Gilkes, B. Farooqi, S. M. Sebti, J. Chen, MDMX overexpression prevents p53 activation by the MDM2 inhibitor Nutlin. *J. Biol. Chem.* **281**, 33030–33035 (2006).
24. M. Wade, E. T. Wong, M. Tang, J. M. Stommel, G. M. Wahl, Hdmx modulates the outcome of p53 activation in human tumor cells. *J. Biol. Chem.* **281**, 33036–33044 (2006).
25. S. Tutton, G. A. Azzam, N. Stong, O. Vladimirova, A. Wiedmer, J. A. Monteith, K. Beishline, Z. Wang, Z. Deng, H. Riethman, S. B. McMahon, M. Murphy, P. M. Lieberman, Subtelomeric p53 binding prevents accumulation of DNA damage at human telomeres. *EMBO J.* **35**, 193–207 (2016).

26. S. Tutton, Z. Deng, N. Gulve, O. Vladimirova, K. Beishline, A. Wiedmer, M. Murphy, P. M. Lieberman, Elevated telomere dysfunction in cells containing the African-centric Pro47Ser cancer-risk variant of TP53. *Oncotarget* **10**, 3581–3591 (2019).
27. F. Toledo, p53: A two-faced regulator of telomere metabolism? (comment on DOI 10.1002/bies.201600078). *Bioessays* **38**, 938 (2016).
28. M. C. Marin, C. A. Jost, L. A. Brooks, M. S. Irwin, J. O’Nions, J. A. Tidy, N. James, J. M. McGregor, C. A. Harwood, I. G. Yulug, K. H. Vousden, M. J. Allday, B. Gusterson, S. Ikawa, P. W. Hinds, T. Crook, W. G. Kaelin, A common polymorphism acts as an intragenic modifier of mutant p53 behaviour. *Nat. Genet.* **25**, 47–54 (2000).
29. X. Li, P. Dumont, A. Della Pietra, C. Shetler, M. E. Murphy, The codon 47 polymorphism in p53 is functionally significant. *J. Biol. Chem.* **280**, 24245–24251 (2005).
30. C. Sagne, V. Marcel, M. Bota, G. Martel-Planche, A. Nobrega, E. I. Palmero, L. Perriaud, M. Boniol, S. Vagner, D. G. Cox, C. S. Chan, J.-L. Mergny, M. Olivier, P. Ashton-Prolla, J. Hall, P. Hainaut, M. I. Achatz, Age at cancer onset in germline TP53 mutation carriers: Association with polymorphisms in predicted G-quadruplex structures. *Carcinogenesis* **35**, 807–815 (2014).
31. S. Knappskog, M. Bjørnslett, L. M. Myklebust, P. E. A. Huijts, M. P. Vreeswijk, H. Edvardsen, Y. Guo, X. Zhang, M. Yang, S. K. Ylisaukko-Oja, P. Alhopuro, J. Arola, R. A. E. M. Tollenaar, C. J. van Asperen, C. Seynaeve, V. Staalesen, R. Chrisanthar, E. Løkkevik, H. B. Salvesen, D. G. Evans, W. G. Newman, D. Lin, L. A. Aaltonen, A.-L. Børresen-Dale, G. S. Tell, C. Stoltenberg, P. Romundstad, K. Hveem, J. R. Lillehaug, L. Vatten, P. Devilee, A. Dørum, P. E. Lønning, The MDM2 promoter SNP285C/309G haplotype diminishes Sp1 transcription factor binding and reduces risk for breast and ovarian cancer in Caucasians. *Cancer Cell.* **19**, 273–282 (2011).
32. F. Yu, Z. Jiang, A. Song, Association of rs11801299 and rs1380576 polymorphisms at MDM4 with risk, clinicopathological features and prognosis in patients with retinoblastoma. *Cancer Epidemiol.* **58**, 153–159 (2019).

33. J. B. Kodal, S. Vedel-Krogh, C. J. Kobylecki, B. G. Nordestgaard, S. E. Bojesen, TP53 Arg72Pro, mortality after cancer, and all-cause mortality in 105,200 individuals. *Sci. Rep.* **7**, 336 (2017).
34. H. Tummala, A. Walne, L. Collopy, S. Cardoso, J. de la Fuente, S. Lawson, J. Powell, N. Cooper, A. Foster, S. Mohammed, V. Plagnol, T. Vulliamy, I. Dokal, Poly(A)-specific ribonuclease deficiency impacts telomere biology and causes dyskeratosis congenita. *J. Clin. Invest.* **125**, 2151–2160 (2015).
35. E. Devany, X. Zhang, J. Y. Park, B. Tian, F. E. Kleiman, Positive and negative feedback loops in the p53 and mRNA 3' processing pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **110**, 3351–3356 (2013).
36. A. Son, J.-E. Park, V. N. Kim, PARN and TOE1 Constitute a 3' end maturation module for nuclear non-coding RNAs. *Cell Rep.* **23**, 888–898 (2018).
37. S. Shukla, G. A. Bjerke, D. Muhlrads, R. Yi, R. Parker, The RNase PARN controls the levels of specific miRNAs that contribute to p53 regulation. *Mol. Cell* **73**, 1204–1216.e4 (2019).
38. D. H. Moon, M. Segal, B. Boyraz, E. Guinan, I. Hofmann, P. Cahan, A. K. Tai, S. Agarwal, Poly(A)-specific ribonuclease (PARN) mediates 3'-end maturation of the telomerase RNA component. *Nat. Genet.* **47**, 1482–1488 (2015).
39. B. Boyraz, D. H. Moon, M. Segal, M. Z. Muosieyiri, A. Aykanat, A. K. Tai, P. Cahan, S. Agarwal, Posttranscriptional manipulation of TERC reverses molecular hallmarks of telomere disease. *J. Clin. Invest.* **126**, 3377–3382 (2016).
40. D. Lessel, D. Wu, C. Trujillo, T. Ramezani, I. Lessel, M. K. Alwasiyah, B. Saha, F. M. Hisama, K. Rading, I. Goebel, P. Schütz, G. Speit, J. Högel, H. Thiele, G. Nürnberg, P. Nürnberg, M. Hammerschmidt, Y. Zhu, D. R. Tong, C. Katz, G. M. Martin, J. Oshima, C. Prives, C. Kubisch, Dysfunction of the MDM2/p53 axis is linked to premature aging. *J. Clin. Invest.* **127**, 3598–3608 (2017).
41. C. López-Otín, M. A. Blasco, L. Partridge, M. Serrano, G. Kroemer, The hallmarks of aging. *Cell* **153**, 1194–1217 (2013).

42. T. Toki, K. Yoshida, R. Wang, S. Nakamura, T. Maekawa, K. Goi, M. C. Katoh, S. Mizuno, F. Sugiyama, R. Kanezaki, T. Uechi, Y. Nakajima, Y. Sato, Y. Okuno, A. Sato-Otsubo, Y. Shiozawa, K. Kataoka, Y. Shiraishi, M. Sanada, K. Chiba, H. Tanaka, K. Terui, T. Sato, T. Kamio, H. Sakaguchi, S. Ohga, M. Kuramitsu, I. Hamaguchi, A. Ohara, H. Kanno, S. Miyano, S. Kojima, A. Ishiguro, K. Sugita, N. Kenmochi, S. Takahashi, K. Eto, S. Ogawa, E. Ito, De Novo mutations activating germline TP53 in an inherited bone-marrow-failure syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* **103**, 440–447 (2018).
43. J. L. Van Nostrand, L. D. Attardi, Guilty as CHARGED: p53's expanding role in disease. *Cell Cycle* **13**, 3798–3807 (2014).
44. E. G. Arias-Salgado, E. Galvez, L. Planas-Cerezales, L. Pintado-Berninches, E. Vallespin, P. Martínez, J. Carrillo, L. Iarriccio, A. Ruiz-Llobet, A. Catalá, I. Badell-Serra, L. I. Gonzalez-Granado, A. Martín-Nalda, M. Martínez-Gallo, A. Galera-Miñarro, C. Rodríguez-Vigil, M. Bastos-Oreiro, G. Perez de Nanclares, V. Leiro-Fernández, M.-L. Uria, C. Diaz-Heredia, C. Valenzuela, S. Martín, B. López-Muñiz, P. Lapunzina, J. Sevilla, M. Molina-Molina, R. Perona, L. Sastre, Genetic analyses of aplastic anemia and idiopathic pulmonary fibrosis patients with short telomeres, possible implication of DNA-repair genes. *Orphanet J. Rare Dis.* **14**, 82 (2019).
45. G. M. Baerlocher, I. Vulto, G. de Jong, P. M. Lansdorp, Flow cytometry and FISH to measure the average length of telomeres (flow FISH). *Nat. Protoc.* **1**, 2365–2376 (2006).
46. B. J. Ballew, M. Yeager, K. Jacobs, N. Giri, J. Boland, L. Burdett, B. P. Alter, S. A. Savage, Germline mutations of regulator of telomere elongation helicase 1, RTEL1, in Dyskeratosis congenita. *Hum. Genet.* **132**, 473–480 (2013).
47. C. Adam, R. Guérois, A. Citarella, L. Verardi, F. Adolphe, C. Béneut, V. Sommermeyer, C. Ramus, J. Govin, Y. Couté, V. Borde, The PHD finger protein Spp1 has distinct functions in the Set1 and the meiotic DSB formation complexes. *PLOS Genet.* **14**, e1007223 (2018).
48. I. López de Silanes, O. Graña, M. L. De Bonis, O. Dominguez, D. G. Pisano, M. A. Blasco, Identification of TERRA locus unveils a telomere protection role through association to nearly all chromosomes. *Nat. Commun.* **5**, 4723 (2014).

49. E. Prophet, B. Mills, J. Arrington, L. Sobin, *Laboratory Methods in Histotechnology* (AFIP, 1992).
50. B. P. Alter, G. M. Baerlocher, S. A. Savage, S. J. Chanock, B. B. Weksler, J. P. Willner, J. A. Peters, N. Giri, P. M. Lansdorp, Very short telomere length by flow fluorescence in situ hybridization identifies patients with dyskeratosis congenita. *Blood* **110**, 1439–1447 (2007).
51. N. A. Laurie, S. L. Donovan, C.-S. Shih, J. Zhang, N. Mills, C. Fuller, A. Teunisse, S. Lam, Y. Ramos, A. Mohan, D. Johnson, M. Wilson, C. Rodriguez-Galindo, M. Quarto, S. Francoz, S. M. Mendrysa, R. K. Guy, J.-C. Marine, A. G. Jochemsen, M. A. Dyer, Inactivation of the p53 pathway in retinoblastoma. *Nature* **444**, 61–66 (2006).
52. M. Lek, K. J. Karczewski, E. V. Minikel, K. E. Samocha, E. Banks, T. Fennell, A. H. O'Donnell-Luria, J. S. Ware, A. J. Hill, B. B. Cummings, T. Tukiainen, D. P. Birnbaum, J. A. Kosmicki, L. E. Duncan, K. Estrada, F. Zhao, J. Zou, E. Pierce-Hoffman, J. Berghout, D. N. Cooper, N. DeFlaux, M. DePristo, R. Do, J. Flannick, M. Fromer, L. Gauthier, J. Goldstein, N. Gupta, D. Howrigan, A. Kiezun, M. I. Kurki, A. L. Moonshine, P. Natarajan, L. Orozco, G. M. Peloso, R. Poplin, M. A. Rivas, V. Ruano-Rubio, S. A. Rose, D. M. Ruderfer, K. Shakir, P. D. Stenson, C. Stevens, B. P. Thomas, G. Tiao, M. T. Tusie-Luna, B. Weisburd, H.-H. Won, D. Yu, D. M. Altshuler, D. Ardissino, M. Boehnke, J. Danesh, S. Donnelly, R. Elosua, J. C. Florez, S. B. Gabriel, G. Getz, S. J. Glatt, C. M. Hultman, S. Kathiresan, M. Laakso, S. McCarroll, M. I. McCarthy, D. McGovern, R. McPherson, B. M. Neale, A. Palotie, S. M. Purcell, D. Saleheen, J. M. Scharf, P. Sklar, P. F. Sullivan, J. Tuomilehto, M. T. Tsuang, H. C. Watkins, J. G. Wilson, M. J. Daly, D. G. MacArthur, Exome Aggregation Consortium, Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. *Nature* **536**, 285–291 (2016).
53. F. Toledo, K. A. Krummel, C. J. Lee, C.-W. Liu, L.-W. Rodewald, M. Tang, G. M. Wahl, 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 (2006).
54. N. M. Ioannidis, J. H. Rothstein, V. Pejaver, S. Middha, S. K. McDonnell, S. Baheti, A. Musolf, Q. Li, E. Holzinger, D. Karyadi, L. A. Cannon-Albright, C. C. Teerlink, J. L. Stanford, W. B. Isaacs, J. Xu, K. A. Cooney, E. M. Lange, J. Schleutker, J. D. Carpten, I. J. Powell, O. Cussenot, G. Cancel-Tassin, G. G. Giles, R. J. MacInnis, C. Maier, C.-L. Hsieh, F. Wiklund, W. J. Catalona, W. D.

Foulkes, D. Mandal, R. A. Eeles, Z. Kote-Jarai, C. D. Bustamante, D. J. Schaid, T. Hastie, E. A. Ostrander, J. E. Bailey-Wilson, P. Radivojac, S. N. Thibodeau, A. S. Whittemore, W. Sieh, REVEL: An ensemble method for predicting the pathogenicity of rare missense variants. *Am. J. Hum. Genet.* **99**, 877–885 (2016).

55. L. A. Donehower, M. Harvey, B. L. Slagle, M. J. McArthur, C. A. Montgomery, J. S. Butel, A. Bradley, Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature* **356**, 215–221 (1992).

56. J.-C. Marine, S. Francoz, M. Maetens, G. Wahl, F. Toledo, G. Lozano, Keeping p53 in check: Essential and synergistic functions of Mdm2 and Mdm4. *Cell Death Differ.* **13**, 927–934 (2006).

DISCUSSION

PARTIE I : SURACTIVATION DE P53 DANS LES SYNDROMES D'INSUFFISANCE MEDULLAIRE

1) Activation de p53 et développement de phénotypes de Dyskératose Congénitale

Les syndromes d'insuffisance médullaire sont des maladies génétiques rares caractérisées par une incapacité de la moelle osseuse à produire un nombre suffisant de cellules sanguines associée à des malformations physiques et une prédisposition au développement tumoral. La Dyskératose Congénitale (DC) est un syndrome d'insuffisance médullaire causé par une altération des télomères. Suite à l'étude du modèle murin $p53^{A31/A31}$, mon laboratoire de thèse a émis l'hypothèse qu'une suractivation de p53 pourrait être un facteur clé, et non seulement une conséquence, du développement de phénotypes de DC (Simeonova et al., 2013). Mes collègues ont en effet constaté que la délétion du domaine C-terminal de p53 conduisant à une suractivation de la protéine, entraîne le développement chez la souris de l'ensemble des phénotypes cliniques et moléculaires de la DC. Ils ont constaté en particulier que la protéine p53 hyperactive réprime des gènes impliqués dans le métabolisme des télomères ce qui entraîne leur raccourcissement. Bien qu'ils aient démontré que cette régulation est conservée pour la plupart de ces gènes chez l'Homme, d'autres études ont montré des résultats contradictoires remettant en cause le rôle de p53 dans le métabolisme télomérique.

1)1) Rôle controversé de p53 dans le métabolisme télomérique

La Dyskératose Congénitale (DC) est un syndrome télomérique causé par des mutations germinales entraînant un défaut dans la biologie des télomères ([Introduction, Partie II, Chapitre 4\)2\)1](#)). Le fait que les souris $p53^{A31/A31}$ récapitulent les phénotypes cliniques et moléculaires de ce syndrome était totalement inattendu pour plusieurs raisons. Tout d'abord, il n'avait jamais été montré qu'une suractivation de p53 peut conduire à une altération des télomères. Cette première observation était surprenante puisque que p53, considérée comme le gardien du génome, est, *a contrario*, activée lors d'une érosion des télomères afin d'empêcher la prolifération de cellules altérées. Toutefois, ce rôle paradoxal de p53 pourrait potentiellement contribuer à ses fonctions de suppresseur de tumeur. Lors d'une érosion trop importante des télomères, par exemple, p53 est activée et peut conduire à un arrêt du cycle cellulaire de façon à laisser du temps à la cellule pour réparer ses dommages. Si ces derniers persistent, l'activation de p53 est maintenue, ce qui pourrait conduire à une altération encore plus importante des télomères ([Introduction, Partie II, Chapitre 2](#)) et pourrait ainsi sceller le sort des cellules endommagées vers la sénescence ou l'apoptose (Toufektchan et Toledo, 2018).

De plus, les syndromes télomériques sont généralement difficiles à modéliser chez la souris en raison des différences dans la longueur des télomères et dans l'activité de la télomérase entre les souris et les humains. En effet, les souris de laboratoire ont des télomères 5 à 10 fois plus longs que ceux des humains (Calado et Dumitriu, 2013). De plus, l'activité de la télomérase dépend principalement de la transcription de TERT, la composante protéique à activité reverse transcriptase de la télomérase. Celle-ci est largement exprimée dans les tissus des souris adultes, tandis que hTERT est exprimée à des niveaux extrêmement bas dans la plupart des tissus chez les êtres humains adultes (Zhang et al., 2016). Pour ces raisons, les souris dépourvues de télomérase ne présentent des télomères courts qu'après trois ou quatre générations seulement (Blasco et al., 1997, Alx et al., 2016). Les souris présentant une combinaison de mutations affectant la télomérase et le complexe shelterine (*mTERT*^{+/-} *Pot1b*^{-/-}) présentent des dysfonctionnements télomériques, développent certains phénotypes de DC et décèdent en une seule génération (Hockemeyer et al., 2008). Cependant, cette combinaison de mutations n'a jamais été retrouvée chez des patients souffrant de DC. Puisque les souris *p53*^{A31/A31} présentent des télomères courts et développent des phénotypes de DC en une seule génération, mon laboratoire de thèse a émis l'hypothèse que p53 aurait des effets pléiotropes sur la maintenance des télomères. Mes collègues ont ainsi montré que p53 régule négativement plusieurs gènes impliqués dans ce processus et que cette régulation est conservée chez l'Homme (Simeonova et al., 2013 ; Jaber et Toufekchan et al., 2016). Ils ont ainsi démontré que p53 joue un rôle dans le métabolisme des télomères aussi bien chez l'Homme que chez la souris et ont proposé que des mutations qui activent p53 pourraient provoquer un raccourcissement des télomères et des phénotypes de DC chez des patients.

Cette hypothèse semblait toutefois en contradiction avec une autre étude suggérant, qu'à l'inverse, p53 protégerait les télomères de la dégradation en induisant la transcription du long ARN non codant TERRA en réponse à un stress génotoxique (Tutton et al., 2016) (Figure 15). En effet, le laboratoire de Lieberman a identifié des sites de liaison à p53, dérivés de rétrotransposons, dans des régions subtélomériques (Introduction, Partie II, Chapitre 4)31)). Ils ont établi que lorsque p53 est activée après des dommages à l'ADN, elle se lie à ces sites ce qui induit la transcription de TERRA. Cette liaison entraîne alors des modifications de la structure de la chromatine pour faciliter la réparation des dommages. Elle conduit à la fois à une diminution des marques γ -H2AX témoignant de cassures mais aussi à une augmentation de l'interaction de protéines protégeant les télomères. La délétion de p53 perturbe la transcription de TERRA et mène à des dysfonctionnements télomériques, suggérant ainsi

qu'une activation de p53 est nécessaire pour protéger les télomères lors de dommages à l'ADN. Ces deux études suggèrent finalement que p53 peut conduire à des dysfonctionnements télomériques quand elle est perdue mais également lorsqu'elle est suractivée. Nos résultats indiquent toutefois que, s'il y a un effet positif lié à l'expression de TERRA dans un contexte de suractivation de p53, cet effet ne peut pas compenser les effets négatifs liés à la répression de plusieurs gènes jouant un rôle clé dans le métabolisme des télomères.

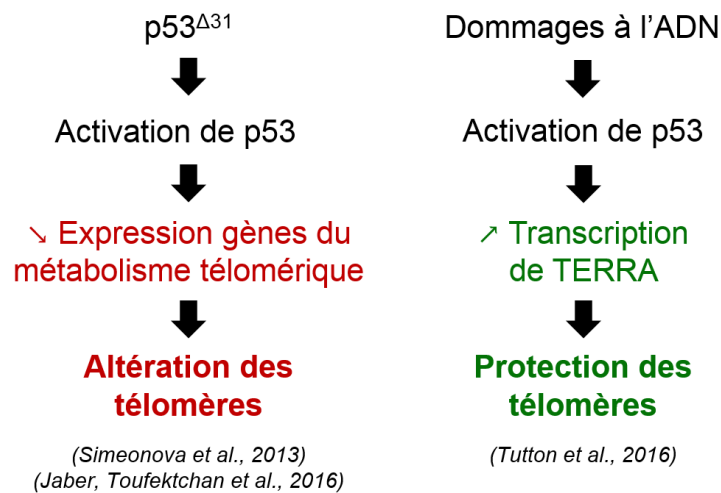


Figure 15 : Rôle controversé de p53 dans le métabolisme télomérique.

1)2) Mutations de *PARN* chez des patients souffrant de Dyskératose Congénitale

Pour mieux comprendre le rôle de p53 dans le métabolisme des télomères et les conséquences de sa suractivation dans des syndromes télomériques, il était nécessaire d'évaluer sa contribution chez des patients. Initialement, l'étude de familles DC mutées pour *PARN* semblait conforter ce que nous avons observés dans le modèle *p53^{Δ31/Δ31}*.

PARN est une polyA-ribonucléase qui serait capable de dégrader de nombreux ARNm, en particulier ceux de p53 (Virtanen et al., 2013). Elle régulerait ainsi la stabilité et l'expression de nombreux gènes (Balatsos et al., 2012). Des mutations de *PARN* ont été retrouvées chez plusieurs patients souffrant de DC ou du syndrome de Hoyeraal-Hreidarsson (HHS) (Tummala et al., 2015) (Introduction, Partie II, Chapitre 4)3)3)). Si l'on sait que ces mutations entraînent une inactivation de la protéine, on ne sait pas exactement par quel mécanisme elles peuvent conduire à des phénotypes de DC. On sait que *PARN* régule la stabilité de *TERT* et que la surexpression de *TERT* permet de rallonger les télomères dans les cellules mutées pour *PARN* (Boyraz et al., 2016). Toutefois, il a été proposé qu'une diminution des niveaux de *TERT* ne pourrait pas expliquer à, elle seule, les phénotypes sévères des patients souffrant de HHS

(Benyelles et al., 2019). Sachant que PARN pourrait aussi réguler les niveaux des ARNm de p53 et que la suractivation de p53 chez la souris entraîne des phénotypes de DC dans le modèle $p53^{\Delta31/\Delta31}$, il était intéressant d'étudier la contribution d'une suractivation de p53 chez les patients mutés pour *PARN*.

Une équipe a justement identifié une famille souffrant de DC mutée pour le gène *PARN* (Tummala et al., 2015). Ce laboratoire a montré que les cellules de patients présentent une suractivation de p53 associée à une faible expression de plusieurs gènes impliqués dans le métabolisme des télomères (*TRF1*, *DKC1* et *RTEL1*) dont certains sont normalement régulés par p53. Il a été proposé qu'une mutation de *PARN*, altérant sa capacité à dégrader l'ARNm de p53, pourrait mener à une stabilisation accrue de p53 ce qui contribuerait à son activation et conduirait ainsi à une altération du métabolisme télomérique comme dans le modèle $p53^{\Delta31}$. Toutefois, cela n'a pas été démontré dans cette étude. Afin d'évaluer la contribution d'une activation de p53 dans les phénotypes de DC chez des patients mutés pour *PARN*, nous avons débuté la caractérisation d'un modèle murin exprimant une mutation de *Parn* générée par le laboratoire de Patrick Revy de l'Institut Imagine. Cette mutation conduit à un décalage du cadre de lecture et mène à une protéine tronquée et non fonctionnelle ($Parn^{del}$). Nous avons constaté dans un premier temps que les souris $Parn^{+/del}$ survivent comme des souris sauvages et ne développent pas de phénotypes de DC. En revanche, le génotype $Parn^{del/del}$ entraîne une létalité avant 9,5 jours de développement embryonnaire. Ce résultat pouvait laisser penser à une activation trop importante de p53 comme chez les souris $Mdm2^{-/-}$ et $Mdm4^{-/-}$. Toutefois, contrairement à ses dernières, il n'est pas possible de sauver leur phénotype sur un fonds p53 KO (données non publiées), ce qui a été confirmé par l'équipe de Patrick Révy (Benyelles et al., 2019). Ainsi, il est probable que PARN agisse sur d'autres gènes impliqués dans le développement embryonnaire.

Par ailleurs, nous avons voulu évaluer l'effet de la mutation $Parn^{del}$ sur le fonds génétique $p53^{+/Δ31}$ sensibilisé au développement de phénotypes de DC. En effet, les souris $p53^{+/Δ31}$ survivent comme des souris sauvages et ne développent pas de phénotypes de DC particuliers, mais seulement une légère hyperpigmentation cutanée. Toutefois, les souris $Mdm4^{+/-} p53^{+/Δ31}$ et $Mdm4^{+TM} p53^{+/Δ31}$ meurent prématurément et développent de l'insuffisance médullaire, suggérant qu'elles sont sensibles à des variations subtiles dans l'activité de régulateur de p53. A l'image de ces souris, nous avons généré des souris $Parn^{+/del} p53^{+/Δ31}$ et nous avons constaté qu'elles survivent comme des souris sauvages et ne présentent pas de phénotypes particuliers comme les souris $p53^{+/Δ31}$. Par ailleurs, les niveaux des ARNm des gènes cibles classiques de

p53 (*p21*, *Mdm2*...) restent inchangés entre les fibroblastes embryonnaires murins *Parn*^{+/+} *p53*^{+/ Δ 31} et *Parn*^{+/ Δ el} *p53*^{+/ Δ 31} (données non publiées), suggérant que la délétion hétérozygote de *Parn* n'entraîne pas une activation accrue de p53 dans ce modèle. Cela ne semble toutefois pas surprenant étant donné que, chez l'Homme, les mutations de *PARN* affectent généralement les deux allèles.

Une équipe a récemment testé la contribution d'une suractivation de p53 chez des patients mutés pour *PARN* (Benyelles et al., 2019). Dans cette étude, les chercheurs ont identifié deux patients indépendants, souffrant de HHS et présentant des mutations bi-alléliques de *PARN* et un raccourcissement de leurs télomères. À partir de cellules humaines inactivées pour *PARN* par CRISPR et de cellules de patients, ils ont constaté que l'inactivation de *PARN* entraîne une suractivation de p53 et une diminution des niveaux de nombreux gènes du métabolisme télomérique, notamment *TRF1*, *TRF2*, *POT1*, *DKC1* et *TPP1*. L'induction de l'expression de la protéine PARN sauvage dans ces cellules rétablit les niveaux de *TRF1*, *TRF2*, *POT1* et *TPP1*, mais n'a pas d'effet sur ceux de p53. Cela suggère que l'inactivation de *PARN* est bien responsable de la dérégulation de plusieurs gènes du métabolisme télomérique. Par ailleurs, si le niveau de ces gènes est rétabli alors que p53 est suractivée, cela suggère que p53 n'est pas impliquée dans leur répression. En revanche, les niveaux de *DKC1*, ne sont pas rétablis après expression de la protéine PARN sauvage, indiquant que cette régulation pourrait dépendre de p53 comme cela a été proposé dans le modèle *p53* ^{Δ 31}. Finalement, l'analyse de patients DC mutés pour PARN n'a pas permis de déterminer la contribution d'une suractivation de p53 dans le développement de phénotypes de DC et le raccourcissement de télomères.

1)3) Mutation de *MDM4* chez une famille souffrant d'un syndrome télomérique

Au cours de ma thèse, j'ai étudié une mutation germinale faux-sens de *MDM4*, codant pour un régulateur négatif essentiel et spécifique de p53, dans une famille présentant de nombreux signes de DC. Bien que *MDM4* soit principalement connu pour son implication dans les cancers, nous avons montré qu'une mutation germinale de *MDM4* peut contribuer à des phénotypes de DC chez l'Homme comme chez la souris. Cette mutation a été identifiée chez une famille présentant de nombreux signes de ce syndrome, notamment une neutropénie, une moelle osseuse hypocellulaire, des carcinomes des cellules squameuses de la langue, une leucémie myéloïde aiguë et des télomères courts entre le premier et le dixième percentile pour la génération la plus jeune. Pour évaluer la contribution de la mutation dans le développement

de ces phénotypes, nous avons généré un modèle murin portant une mutation de *Mdm4* homologue à celle retrouvée chez l'Homme.

Nous avons montré que cette mutation entraîne une suractivation de p53 aussi bien dans les MEFs et dans les tissus de différents modèles murins que dans les cellules de certains membres de la famille. D'un point de vue moléculaire, nous avons constaté que la suractivation de p53 entraîne une diminution subtile mais significative de plusieurs gènes du métabolisme télomérique, en particulier *Rtel1*, *Blm*, *Dek*, *Fancd2*, *Fen1*, *Timeless* et *Tinf2*. De plus, nous avons constaté que cette répression est plus importante pour *Rtel1* après un traitement à la Nutlin, une molécule qui active p53 en se liant spécifiquement à Mdm2, démontrant ainsi qu'une suractivation de p53 est bien la cause de cette régulation. Dans les cellules de patients, une activation accrue de p53 est associée à une diminution des niveaux de RTEL1 et des télomères plus courts. Par ailleurs, nous avons montré que la mutation *Mdm4*^{T454M} entraîne un raccourcissement des télomères, que ce soit dans les fibroblastes ou les cellules de poumons de souris *Mdm4*^{T454M/T454M}, ou dans les cellules de moelle osseuse de souris *Mdm4*^{+ / T454M} *p53*^{+ / Δ31}. Ainsi, l'ensemble de ces résultats démontre que la mutation de *MDM4* peut conduire, via une suractivation de p53, à un raccourcissement des télomères dans la famille et contribuer ainsi au développement de phénotypes de DC.

Pour mieux comprendre l'implication de TERRA dans ces phénotypes par rapport aux résultats précédemment discutés ([Discussion, Partie I, Chapitre 1](#))), nous avons évalué son expression dans des fibroblastes *Mdm4*^{T454/T454M} en comparaison avec des fibroblastes sauvages. Nous avons constaté que l'activation de p53 conduit à une augmentation de la transcription de TERRA au niveau de la région subtélomérique Xq dans les fibroblastes sauvages, ce qui est en accord avec les résultats du laboratoire de Lieberman. Cependant, son induction après un stress est perdue dans les fibroblastes *Mdm4*^{T454/T454M}. Ainsi, une dérégulation de TERRA pourrait également contribuer aux dysfonctionnements télomériques observés dans la famille et dans notre modèle murin, même si une dérégulation de cet ARN n'a jamais été observée à ce jour chez des patients souffrant de DC. En conclusion, nos résultats ont fourni des preuves cliniques convaincantes qu'une mutation qui active p53 peut provoquer des raccourcissements des télomères et des phénotypes de DC chez l'Homme et chez la souris. Cependant, la contribution exacte des différents gènes impliqués dans le métabolisme des télomères régulés par p53 reste à déterminer.

En outre, plusieurs modèles murins affichant une activité accrue de p53 présentent des phénotypes similaires aux souris $p53^{\Delta31/\Delta31}$, $Mdm4^{+/T454M} p53^{+/Δ31}$ et $Mdm4^{T454M/T454M} p53^{+/-}$ (Discussion, Partie II, Chapitre 1)). En effet, les souris $p53^{\Delta24}$ présentent également une activation de p53 et meurent rapidement d'aplasie médullaire (Hamard et al., 2013). Les souris doubles hétérozygotes $Mdm2^{+/-} Mdm4^{+/-}$ (Terzian et al., 2007) et les souris exprimant un mutant p53 hypomorphe sur un fonds Mdm2 KO (Liu et al., 2007) présentent un retard de croissance, une hématopoïèse altérée, des défauts de développement cérébelleux et meurent rapidement après la naissance. Puisqu'il a été montré récemment qu'une suractivation de p53, à la suite d'un raccourcissement des télomères, est à l'origine de l'insuffisance médullaire chez les patients souffrant de DC (Fok et al., 2017) et, au vu de nos résultats, il serait intéressant d'évaluer le phénotype télomérique de ces différents modèles murins.

2) Implication de la voie p53 dans d'autres syndromes d'insuffisance médullaire

Nos résultats ont démontré qu'une mutation de *MDM4* qui active p53 peut contribuer aux phénotypes de DC observés chez une famille. Les causes génétiques de ce syndrome étant inconnues pour près de 30 % des patients, nos résultats suggèrent qu'il serait intéressant de rechercher des mutations de *TP53* ou de ses principaux régulateurs chez les patients présentant une forme idiopathique de cette maladie. Récemment, plusieurs observations ont suggéré qu'une suractivation de p53 pourrait contribuer à d'autres syndromes d'insuffisance médullaire comme l'anémie de Blackfan-Diamond, le syndrome de Shwachman-Diamond ou l'anémie de Fanconi.

2)1) Mutations germinales de *TP53* chez des patients présentant des signes d'une anémie de Blackfan-Diamond

Plusieurs études ont montré qu'une suractivation de p53 jouerait un rôle central dans des ribosomopathies comme l'anémie de Blackfan-Diamond (DBA) ou le syndrome de Shwachman-Diamond (SDS). La DBA correspond à une érythroblastopénie congénitale, c'est-à-dire que la moelle osseuse est incapable de produire des globules rouges en quantité suffisante (Introduction, Partie II, Chapitre 4)2)3)). Elle est notamment associée à des malformations physiques et un risque élevé de syndromes myélodysplasiques ou de leucémies myéloïdes aiguës. Elle résulte la plupart du temps de mutations dans des gènes essentiels du métabolisme ribosomique, codant pour des protéines impliquées dans l'assemblage et les fonctions des ribosomes (Wegman-Ostrosky et Savage, 2017). Il est bien connu aujourd'hui que la voie p53 est activée lors de dysfonctionnements ribosomiques. De plus, plusieurs

modèles murins ont établi qu'une suractivation de p53 est un facteur clé du développement des phénotypes de DBA. Les souris ayant des mutations germinales dans les gènes *RPS19* ou *RPS20*, par exemple, présentent une hyperpigmentation cutanée associée à une accumulation de p53 dans l'épiderme, une diminution de l'hématocrite (volume occupé par les globules rouges dans le sang total), et une augmentation du volume moyen des érythrocytes. Le croisement des souris mutées pour *RPS19* avec des souris p53 KO permet de corriger ces phénotypes (McGowan, Li et Park et al., 2008). Par ailleurs, l'inactivation partielle de *RPS14* et *RPS19* dans des cellules progénitrices hématopoïétiques humaines primaires conduit à une accumulation de p53, une augmentation de l'expression de ses gènes cibles et une augmentation de l'arrêt du cycle cellulaire et de l'apoptose. L'inhibition de MDM2 par la Nutlin dans ces cellules phénocopie une haploinsuffisance pour un gène codant pour des protéines ribosomiques. De plus, l'inhibition pharmacologique de p53 permet de rétablir les niveaux des gènes cibles de p53 et une prolifération normale des cellules, alors même que les dysfonctionnements ribosomiques sont maintenus. Ces résultats démontrent qu'une suractivation de p53 pourrait jouer un rôle majeur dans les défauts de production de globules rouges chez les patients souffrant de DBA (Dutt et al., 2011).

Une étude laisse penser qu'une suractivation de p53 pourrait effectivement contribuer au développement de phénotypes de DBA (Toki et al., 2018). Une équipe a reporté des mutations germinales de *TP53* chez deux individus présentant certains signes de ce syndrome (déficit de globules rouges, taux de γ -globulines faible, retard de développement et microcéphalie). Ces patients ne montrent pas de mutations dans les gènes connus pour entraîner habituellement la DBA. Ils présentent également un raccourcissement de leurs télomères bien que ces derniers ne soient pas aussi courts que chez des patients souffrant de DC (Figure 16). L'un des deux individus a aussi développé une pigmentation anormale de la peau et un hypogonadisme, des traits observés chez des patients souffrant de DC. Ces mutations, conduisent comme dans le modèle p53 ^{Δ 31}, à la délétion du domaine C-terminal de p53. La protéine p53 ^{Δ 32} qui en résulte est capable, selon un test Luciférase, d'induire plus efficacement la transcription de gènes cibles de p53, notamment *p21* et *MDM2*, suggérant une suractivation de la protéine. Pour évaluer l'effet de cette mutation *in vivo*, ce laboratoire a développé un modèle de poisson-zèbre exprimant la protéine délétée ; il a constaté que la mutation altère le développement des embryons et que ceux-ci présentent un défaut d'érythrocytes. Enfin, les chercheurs ont reproduit par CRISPR cette mutation dans des iPSCs (cellules souches pluripotentes induites) et ont constaté que la mutation mène de nouveau à une surexpression de gènes cibles de p53 et

perturbe la différenciation des cellules en érythrocytes. Finalement, ces résultats suggèrent que ces mutations de *TP53* pourraient conduire à une suractivation de p53 et contribueraient ainsi au développement des phénotypes de DBA et potentiellement ceux de DC chez les patients (bien que l'effet sur les télomères n'ait pas été directement analysé dans cette étude). Ces résultats indiquent qu'il serait intéressant de rechercher des mutations de *TP53* ou de ses régulateurs chez des patients souffrant de syndromes d'insuffisance médullaire comme la DBA. Il serait notamment intéressant de rechercher des mutations de MDM2, sachant que cette protéine est capable d'interagir en réponse à un stress ribosomique avec plusieurs protéines souvent mutées dans la DBA, notamment RPS7, RPL5 et RPL11.

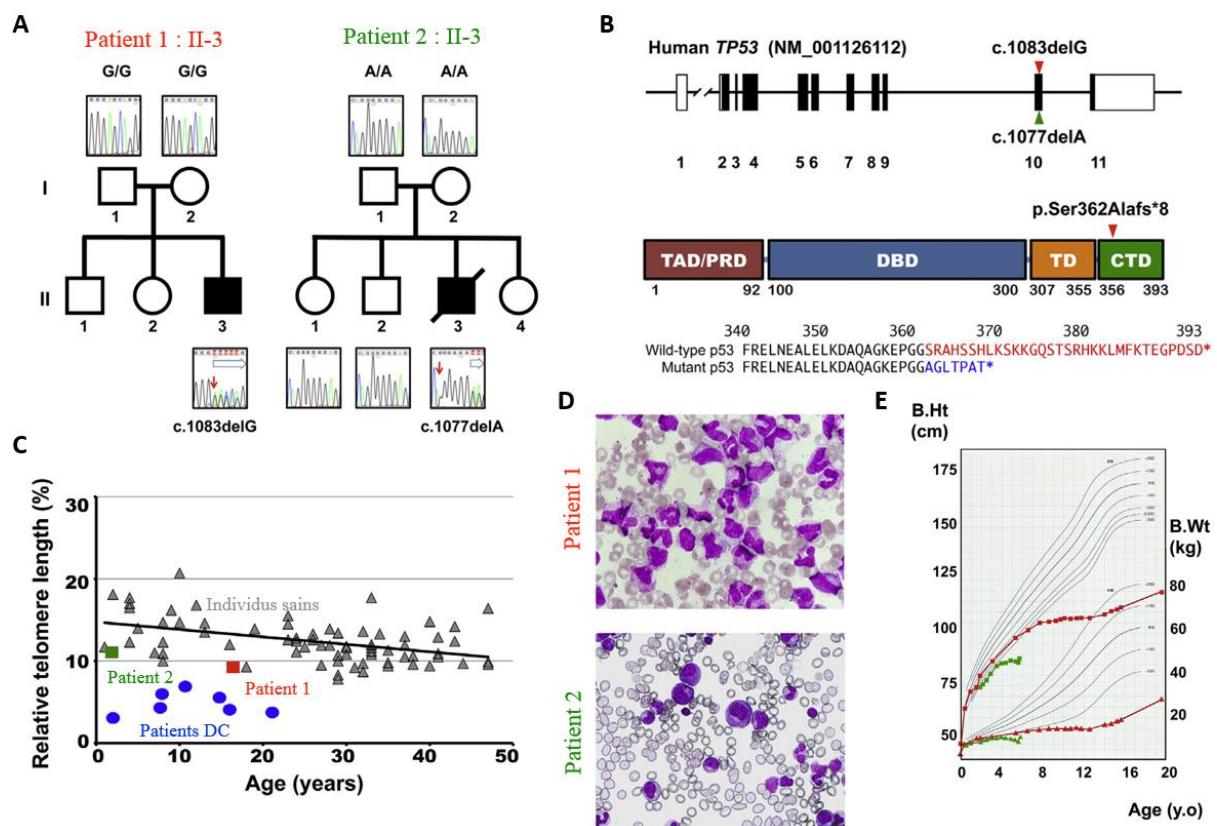


Figure 16 : Mutations germinales de *TP53* chez des patients montrant des signes de DBA.

A. Pédigrés des patients. La délétion d'un nucléotide (flèche rouge) entraîne un décalage du cadre de lecture (flèche bleue). B. Structure du locus *TP53*. Les flèches rouges et vertes indiquent la position des mutations. Elles mènent à la délétion d'une partie du domaine C-terminal de p53. La séquence en rouge de la protéine sauvage correspond à la région supprimée. La séquence en bleue de la protéine mutante correspond à la région modifiée par rapport à la protéine sauvage. C. Mesure relative de la longueur des télomères par flow-FISH dans les lymphocytes des deux patients, de patients DC et d'individus sains. D. Frottis de moelle osseuse montrant une hypoplasie érythroïde chez les deux individus. E. Courbe de croissance des deux individus. Figures extraites de (Toki et al., 2018).

2)2) Implication de la voie p53 dans l'Anémie de Fanconi

L'anémie de Fanconi est un syndrome d'insuffisance médullaire associé à un risque accru de cancer et à un ensemble de malformations congénitales (Mamrak et al., 2017) (Introduction, Partie II, Chapitre 4)2)2)). On pense que les défauts hématopoïétiques chez les patients atteints de l'anémie de Fanconi surviennent *in utero* lors de la mise en place du pool de cellules souches hématopoïétiques dans le foie fœtal (Introduction, Partie II, Chapitre 4)3)2)). Ces défauts s'aggravaient progressivement pendant l'enfance, aboutissant ainsi à une insuffisance de la moelle osseuse (Ceccaldi et al., 2012). Une mutation dans l'un des gènes codant pour des protéines FANC, impliquées dans la réparation des ponts interbrins de l'ADN, peut provoquer une anémie de Fanconi. On sait que des dommages à l'ADN sont connus pour mener à une activation de p53. En accord avec cette observation, l'activité de p53 est augmentée dans les cellules sanguines et de moelle osseuse des patients atteints d'une anémie de Fanconi et dans le foie fœtal d'embryons humains, obtenus à partir de grossesses interrompues (Ceccaldi et al., 2012). Dans un modèle murin d'anémie de Fanconi, la perte de *Trp53* peut sauver les défauts hématopoïétiques des souris *Fancd2*^{-/-} et notamment le défaut en cellules souches hématopoïétiques dans la moelle osseuse. De plus, la perte de p53 dans les cellules de moelle osseuse augmente les chances de réussite d'une greffe chez les souris *Fancg*^{-/-} (Ceccaldi et al., 2012). D'après des études *in vivo* et *in vitro*, une suractivation de p53 conduirait à des défauts hématopoïétiques en déclenchant l'apoptose ou en limitant la prolifération des cellules souches hématopoïétiques. Une augmentation de l'apoptose de ces cellules a, en effet, été observée chez les souris *Fancd2*^{-/-}. De plus, une diminution des proliférations cellulaires a été constatée dans des lignées lymphoblastoïdes générées à partir de cellules de patients atteints d'une anémie de Fanconi et traitées avec un agent provoquant des ponts interbrins (Ceccaldi et al., 2012). L'ensemble de ces résultats a indiqué qu'une suractivation de p53 pourrait être un facteur clé des défauts hématopoïétiques chez les patients souffrant d'une anémie de Fanconi.

Une suractivation de p53 pourrait aussi contribuer aux malformations congénitales observées dans ce syndrome. En effet, en plus des défauts hématopoïétiques, il a été montré que la perte de p53 peut sauver, complètement ou partiellement, les phénotypes d'autres modèles animaux de l'anémie de Fanconi présentant des défauts de développement. En effet, la perte de p53 peut corriger la létalité embryonnaire, les défauts crâniofaciaux et les anomalies de la pigmentation chez les souris inactivées pour *Xrcc2*, *Rad51*, *Brca1* ou *Palb2*. De plus, la perte de p53 corrige le retard de croissance, la microcéphalie et les défauts oculaires chez les poissons-zèbres inactivés pour *Fancd2* (Lim et Hasty, 1996 ; Xu et al., 2001 ; Liu et al., 2003 ; Adam et al.,

2007 ; Bouwman et al., 2011 ; Tonks et al., 2012 ; Kitami et al., 2018). Ainsi, les données de divers modèles animaux et d'échantillons de patients humains suggèrent qu'une augmentation de l'activité de p53 peut contribuer aux défauts hématopoïétiques et aux malformations congénitales observés chez des patients souffrant de l'anémie de Fanconi.

Dans mon laboratoire de thèse, la découverte que les cellules murines $p53^{\Delta31/\Delta31}$ phénocopient les cellules de patients atteints de l'anémie de Fanconi et que $p53^{\Delta31}$ régule négativement plusieurs gènes *Fanc*, nous a laissés penser que des mutations qui activent p53 pourrait être à l'origine du développement de ce syndrome (Jaber, Toufektchan et al., 2016). En effet, en diminuant l'expression de gènes *Fanc*, p53 conduirait à une perturbation de la voie de Fanconi de réparation de l'ADN ce qui provoquerait des dommages à l'ADN et entraîneraient une activation de p53 plus importante, formant ainsi une boucle positive d'amplification. Au vu de l'implication évidente d'une suractivation de p53 dans les défauts hématopoïétiques observés chez les patients souffrant de l'anémie de Fanconi et au vu de nos résultats montrant qu'une mutation de *MDM4* qui active p53 peut conduire à des phénotypes de DC, proche de l'anémie de Fanconi, il serait intéressant de déterminer si des mutations de *TP53* ou de ses régulateurs pourraient être responsables du développement de ce syndrome.

PARTIE II : IMPLICATION DE LA VOIE P53 DANS DES SYNDROMES DEVELOPPEMENTAUX

Si la plupart des réponses au stress de p53 sont importantes pour assurer la suppression tumorale, elles jouent également un rôle dans des processus physiologiques comme le développement et vieillissement. Nous avons vu précédemment (Introduction, Partie II, Chapitre 1) et 2)) que p53 est impliquée dans ces processus. Par ailleurs, nos résultats ont montré que des dérégulations de p53 ou de MDM4 peuvent mener au développement de syndromes d'insuffisance médullaire chez l'Homme comme chez la souris. Les patients souffrant de ces syndromes présentent des anomalies de développement conduisant à des malformations congénitales mais également des signes de vieillissement accéléré comme une perte des capacités régénératrices de la moelle osseuse. Ces observations suggèrent que des dérégulations de la voie p53 pourraient contribuer de façon plus globale à un ensemble de syndromes développementaux humains. De nombreux modèles murins ont démontré en particulier les conséquences délétères que peut avoir une suractivation de p53 sur le développement et le vieillissement.

1) Modèles murins de suractivation de p53 : effets sur le développement et le vieillissement

1)1) Conséquences des mutations activatrices p53^{Δ31} et Mdm4^{T454M} chez la souris

Dans mon laboratoire de thèse, nous avons caractérisé chez la souris les conséquences phénotypiques de deux mutations qui activent p53 : p53^{Δ31} et Mdm4^{T454M} (Simeonova et al., 2013 ; Jaber, Toufektchan et al., 2016 ; Toufektchan, Lejour, Durand et al., 2020). L'analyse de plusieurs modèles murins portant ces mutations a montré que des variations dans l'activité de p53 peuvent conduire à une grande variabilité de phénotypes chez la souris. La plupart des souris p53^{+/Δ31}, par exemple, présentent une légère suractivation de p53 et survivent comme des souris sauvages. Elles ne développent pas de phénotypes particuliers, si ce n'est une légère hyperpigmentation des pattes (Simeonova et al., 2013). En revanche, sur un fonds génétique Mdm2^{+/-} ou Mdm4^{+/-}, ces souris décèdent en quelques mois seulement et présentent de l'insuffisance médullaire et un raccourcissement de leurs télomères dans les cellules de moelle osseuse, contrairement aux souris simples hétérozygotes. Les souris p53^{Δ31/Δ31} qui ont une activité accrue de p53 décèdent en 3 à 4 semaines seulement et développent des phénotypes de Dyskératose Congénitale (DC). Elles présentent des retards de croissance (petite taille), une hyperpigmentation cutanée, une insuffisance médullaire, une fibrose pulmonaire, une

hypertrophie cardiaque, une hyperkératose de la langue, une hypoplasie cérébelleuse et testiculaire et enfin un raccourcissement de leurs télomères.

A l'état hétérozygote, la mutation $Mdm4^{T454M}$ conduit à des phénotypes similaires aux souris $p53^{+/Δ31}$: la plupart survivent comme des souris sauvages et ne développent qu'une légère hyperpigmentation cutanée. Lorsqu'on combine les deux mutations hétérozygotes en revanche, les souris $Mdm4^{+/T454M} p53^{+/Δ31}$ décèdent pour la plupart en moins d'un mois, comme les souris $p53^{Δ31/Δ31}$. Elles présentent d'ailleurs plusieurs phénotypes communs avec ces dernières, notamment une petite taille, une hyperpigmentation cutanée, une insuffisance médullaire, une hypertrophie cardiaque et une hypoplasie testiculaire. En revanche, les souris $Mdm4^{+/T454M} p53^{+/Δ31}$ ne souffrent pas d'une fibrose pulmonaire ni d'une hyperkératose de la langue, contrairement aux souris $p53^{Δ31/Δ31}$. Ce résultat concorde avec ce qui est observé chez l'Homme puisque la mutation hétérozygote de $MDM4$ ne conduit pas à des troubles pulmonaires ou une hyperkératose de la langue chez les membres de la famille. Cette différence entre les deux modèles murins pourrait être expliquée par le fait que p53 et Mdm4 ne sont pas exprimées de la même façon dans les tissus. Par ailleurs, les mutations $Mdm4^{T454M}$ et $p53^{Δ31}$ activent probablement p53 selon des processus différents, qui peuvent impliquer diverses protéines qui ne sont pas nécessairement exprimées dans tous les tissus. De plus, les souris $Mdm4^{+/T454M} p53^{+/Δ31}$ ont maintenu une protéine p53 sauvage contrairement aux souris $p53^{Δ31/Δ31}$. Le degré d'hyperactivation de p53 dans la muqueuse de la langue et les poumons pourrait ne pas être suffisant pour induire un phénotype dans ces tissus.

A l'état homozygote, la mutation $Mdm4^{T454M}$ semble conduire à une suractivation intense de p53 puisqu'elle mène à une létalité périnatale. Les nouveau-nés $Mdm4^{T454M/T454M}$ décèdent en effet dans l'heure qui suit leur naissance. Ils présentent des retards de croissance (petite taille) et souffrent de difficultés respiratoires en raison de poumons hypoplasiques. Cette létalité est sauvée sur un fonds $p53^{+/-}$ ou $p53^{-/-}$ démontrant ainsi qu'une suractivation trop importante de p53 est responsable de ce phénotype. Toutefois, si les souris $Mdm4^{T454M/T454M} p53^{+/-}$ survivent plusieurs mois après leur naissance, elles décèdent malgré tout prématurément, entre 60 et 160 jours. Elles présentent une petite taille, une hyperpigmentation cutanée et de l'insuffisance médullaire. Les mutations $p53^{Δ31}$ et $Mdm4^{T454M}$ peuvent ainsi conduire à des anomalies du développement qui affectent de nombreux tissus et notamment la moelle osseuse, les poumons, le cœur, les testicules et la peau. Par ailleurs, elles peuvent conduire à des phénotypes de vieillissement comme un raccourcissement des télomères et une perte des capacités régénératrices de la moelle osseuse.

1)2) Autres modèles murins de suractivation de p53

De nombreux modèles murins présentant une suractivation de p53 ont été générés par d'autres équipes via des mutations de *Trp53*, *Mdm2* ou *Mdm4* (Figure 17). L'analyse de ces modèles a démontré qu'une suractivation de p53 pendant le développement embryonnaire et après la naissance peut entraîner de nombreuses anomalies du développement.

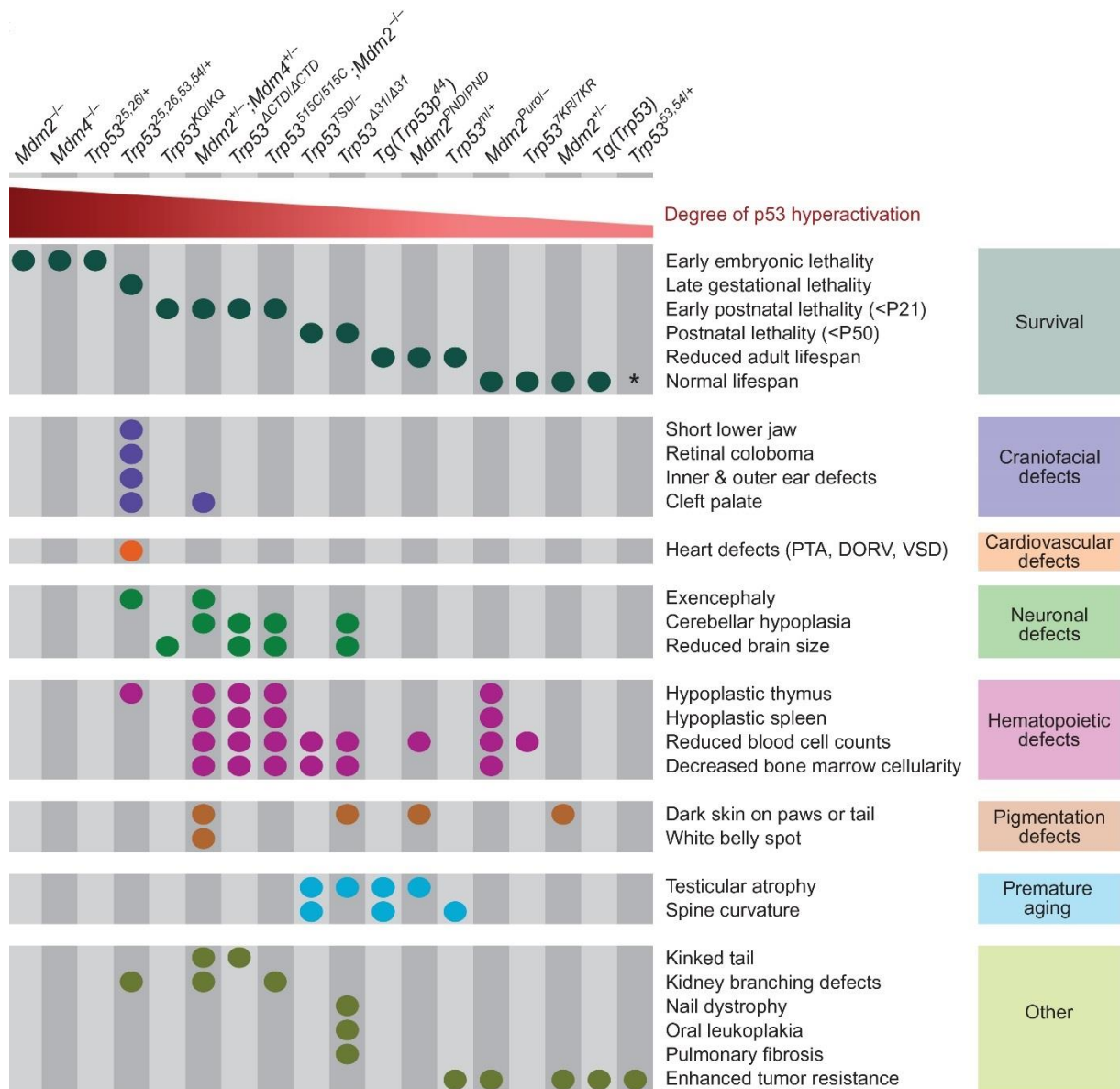


Figure 17 : Modèles murins de suractivation de p53. P21 et P50 : 21 et 50 jours après la naissance. *Les souris *Trp53*^{53,54/+} adultes apparaissent normales, mais leur survie n'a pas été comparée à celle de souris sauvages. Figure issue de (Bowen et Attardi, 2019).

Comme nous l'avons vu précédemment (Introduction, Partie II, Chapitre 1)), les souris *Mdm2* KO et *Mdm4* KO qui ont une suractivation de p53 maximale souffrent d'une létalité embryonnaire causée par une apoptose accrue ou un arrêt du cycle cellulaire accéléré. Certains mutants avec une suractivation de p53 plus faible, comme les souris *p53*^{25,26,53,54/+}, meurent

tardivement au cours du développement embryonnaire et présentent des défauts du crâne et de la face, des malformations cardiovasculaires et des défauts de fermeture du tube neural (Van Nostrand et al., 2014). Les souris avec une suractivation de p53 plus modérée, en raison d'une perte partielle de Mdm2 ou de Mdm4 par exemple, ou de l'expression de protéines mutantes, survivent pendant l'embryogenèse mais présentent pour la plupart des anomalies du développement à des stades plus tardifs (Bowen et Attardi, 2019). C'est le cas des souris *p53^{TSD/-}* dont nous avons discuté précédemment ([Introduction, Partie II, Chapitre 2](#)) qui survivent 6 semaines après leur naissance. Elles présentent des signes de vieillissement accéléré et d'autres phénotypes comme une apoptose excessive des tissus, une altération de l'hématopoïèse, une atrophie testiculaire et une altération des cellules souches (Liu et al., 2010). C'est le cas également des souris *Mdm2^{+/-} Mdm4^{+/-}* qui présentent des défauts hématopoïétiques, une hypoplasie du cervelet et une hyperpigmentation de la peau (Terzian et al., 2007, 2011).

De manière générale, la suractivation de p53 chez la souris semble conduire à des anomalies du développement qui affectent la peau, la face et le crâne, les tissus hématopoïétiques, le système nerveux et le système cardiovasculaire. Curieusement, certains modèles murins ont une activité accrue de p53 mais survivent jusqu'à l'âge adulte et n'ont pas d'anomalies de développement. Cependant, il a été montré que ces souris présentent pour la plupart des signes de vieillissement accéléré comme une courbure de la colonne vertébrale et une hypoplasie testiculaire, et ont une résistance accrue aux cancers. C'est le cas, par exemple, des souris *p53^{+/m}* évoquées précédemment ([Introduction, Partie II, Chapitre 2](#)) qui développent des signes de vieillissement accéléré comme une atrophie des muscles, une diminution de la masse corporelle et une courbure prononcée de la colonne vertébrale (Tyner et al., 2002 ; Moore et al., 2007). Il semblerait ainsi que lorsque la suractivation de p53 ne conduit pas à des anomalies du développement, provoquant une mort prématurée à l'état embryonnaire ou peu après la naissance, elle peut mener à un vieillissement accéléré de l'organisme. Ce constat ne semble cependant pas compatible avec l'étude des souris « super-p53 » qui présentent plusieurs copies du gène *Trp53* et surexpriment ainsi la protéine. Ces souris survivent jusqu'à l'âge adulte, sont très résistantes aux cancers mais ne vieillissent pas prématurément (Garcia et al., 2002). Elles expriment toutefois une protéine Mdm2 sauvage et, lorsque p53 est surexprimée, elle induit l'expression de *Mdm2*, ce qui permet de diminuer les niveaux de p53 selon une boucle de rétrocontrôle négative ([Introduction, Partie I, Chapitre 5](#)). Ainsi, dans ce modèle, la suractivation de p53 pourrait être réduite grâce au maintien des capacités régulatrices de Mdm2

qui sont, à l'inverse, diminuées dans la plupart des modèles murins décrits ci-dessus. Finalement, tous ces résultats indiquent que le degré d'hyperactivation de p53 est précisément corrélé avec la durée de vie de ces souris. De plus, la suractivation de p53 contribue principalement à des anomalies du développement à des stades précoces et à des phénotypes de vieillissement accéléré à des stades plus tardifs (Bowen et Attardi, 2019).

2) Rôle d'une suractivation de p53 dans des syndromes développementaux humains

2)1) Mutations de *TP53*, *MDM2* et *MDM4* chez des patients présentant des anomalies du développement et des signes de vieillissement prématuré

De nombreux modèles murins exprimant des mutations de *Trp53*, *Mdm2* ou *Mdm4* ont démontré qu'une activation exacerbée de p53 peut entraîner des altérations du développement et des phénotypes de vieillissement accéléré. Plusieurs études récentes suggèrent que ces résultats sont transposables chez l'Homme. Dans notre dernière étude tout d'abord, nous avons montré qu'une mutation de *MDM4* qui active p53 peut contribuer au développement de phénotypes de DC chez une famille. En effet, la suractivation de p53 conduit à une insuffisance médullaire aussi bien chez l'Homme que chez la souris. Elle conduit également à un raccourcissement des télomères, ce qui est typique des patients souffrant de DC et constitue une caractéristique importante du vieillissement ([Introduction, Partie II, Chapitre 2](#)). Comme discuté précédemment, des mutations germinales de *TP53* ont aussi été identifiées chez deux individus présentant certains signes de DBA, un autre syndrome d'insuffisance médullaire ([Discussion, Partie I, Chapitre 2](#)1)). Ces deux patients présentent un défaut de moelle osseuse, des retards de développement, une microcéphalie, une pigmentation anormale de la peau, un hypogonadisme et des anomalies des dents. De façon surprenante, ces mutations conduisent, comme dans le modèle p53^{Δ31}, à une délétion du domaine C-terminal de p53, ce qui pourrait mener à une suractivation de la protéine (Toki et al., 2018). Enfin, une mutation de *MDM2* a récemment été impliquée dans le vieillissement chez l'Homme. Une équipe a en effet identifié une mutation germinale de *MDM2* chez un patient souffrant d'un syndrome progéroïde segmentaire (syndrome Werner-like) se manifestant par un vieillissement accéléré (Lessel et al., 2017). À l'âge de 19 ans, le patient présentait une petite taille, des traits du visage pincés, des cheveux gris, des changements cutanés de type sclérodermique, une voix aiguë, un hypogonadisme, des reins hypoplasiques, une insuffisance rénale et de l'hypertension artérielle. Grâce à l'analyse des cellules du patient et d'autres systèmes artificiels, ils ont montré que la mutation de *MDM2* altère l'activité de la protéine et conduit à une augmentation

des niveaux de p53 et sa stabilisation. L'analyse des effets de cette mutation dans un modèle de poisson-zèbre a montré que la protéine MDM2 mutée est incapable d'empêcher une apoptose accrue des tissus au cours du développement, contrairement à la protéine sauvage. Les résultats de cette étude laissent donc à penser que la mutation de *MDM2* pourrait contribuer au phénotype de vieillissement accéléré du patient. Ainsi, des mutations de *TP53*, *MDM2* ou *MDM4* semblent pouvoir contribuer à une altération du développement et des phénotypes de vieillissement chez l'Homme. Dans cet ordre d'idées, il a été proposé que le SNP P72R de *TP53* puisse jouer un rôle dans ces processus. En effet, le variant R72, qui permettrait une réponse apoptotique plus efficace que le variant P72, serait associé à une espérance de vie plus courte et augmenterait les risques de présenter des anomalies dans la formation du tube neural et une faible masse à la naissance (Dumont et al., 2003 ; Bojesen et Nordestgaard, 2008 ; Thurow et al., 2011 ; Arora et al., 2012). Notons cependant que l'impact pathologique du SNP P72R de *TP53* a été récemment contesté (Khan et al., 2015). En conclusion, il sera intéressant de voir si des mutations supplémentaires de *TP53*, *MDM2* ou *MDM4* ou des polymorphismes dans ces gènes pourraient être associés à des malformations congénitales isolées ou contribuer à des altérations du développement et des phénotypes de vieillissement accéléré dans de nombreux syndromes développementaux.

2)2) Suractivation de p53 : événement secondaire ou cause principale de syndromes développementaux humains ?

Des milliers de syndromes génétiques humains ont été identifiés et se caractérisent par un ensemble d'anomalies du développement se manifestant principalement à la naissance ou au début de l'enfance (OMIM : <https://www.omim.org>). De façon intéressante, la plupart de ces syndromes sont causés par des mutations dans des gènes impliqués dans des voies cellulaires essentielles telles que la réparation de l'ADN, la biogenèse des ribosomes, la duplication des centrioles, la maturation des ARN et la maintenance des télomères (Yelick et Trainor, 2015 ; Lee et al., 2016 ; McMahon et al., 2016 ; Roake et Artandi, 2017 ; Nigg et Holland, 2018). Un nombre croissant de données provenant de modèles murins de ces syndromes et, dans certains cas, d'échantillons de patients humains, démontrent que la perturbation de ces gènes peut conduire à une suractivation de p53. Cette observation a alors soulevé l'hypothèse que de nombreux syndromes développementaux pourraient, en réalité, être la conséquence d'une hyperactivation de p53. Plusieurs modèles murins représentant ces syndromes appuient cette hypothèse car leurs phénotypes sont souvent dépendants de p53 (Tableau 4). En effet, dans certains de ces modèles et en accord avec ce que nous avons observé avec la mutation

Mdm4^{T454M}, les défauts de développement peuvent être complètement sauvés par la délétion des deux allèles de *Trp53* et partiellement sauvés via la délétion hétérozygote de ce gène. C'est le cas par exemple des souris *Tcof1*^{+/-} présentant une létalité néonatale et souffrant de malformations de la face et du crâne, et des souris *Rps19*^{Dsk3/+} présentant un défaut en globules rouges, une altération de la pigmentation de la peau et une faible masse corporelle. Cela suggère qu'une activité accrue de p53 serait le principal facteur à l'origine des défauts de développement de ces souris (Jones et al., 2008 ; McGowan et al., 2008). Dans d'autres modèles murins comme les souris *Emx1-Cre Eif4a3*^{fllox/+} et *Emx1-Cre Rbm8a*^{fllox/+} souffrant de microcéphalies, la perte complète de *Trp53* ne sauve que partiellement les défauts de développement, ce qui suggère que des voies dépendantes et indépendantes de p53 contribuent à ces anomalies (Mao et al., 2016).

Human syndrome	Elevated p53 levels in human patient tissue/cells	Mouse model		
		Genotype	Developmental defects rescued by loss of p53 ^a	References
Teacher Collins syndrome	N/D	<i>Tcof1</i> ^{+/-}	Frontonasal hypoplasia, cleft palate, microphthalmia, cranial nerve defects, neonatal lethality	Jones et al. (2008)
Diamond-Blackfan anemia	Yes (Dutt et al., 2011; Aspesi et al., 2017)	<i>Rps7</i> ^{2ma/+}	Erythrocyte maturation delay, tail kink, white belly spot, developmental delay	Watkins-Chow et al. (2013)
		<i>Rps19</i> ^{Dsk3/+}	Lower red blood cell count, skin hyperpigmentation, reduced postnatal body weight	McGowan et al. (2008)
5q- syndrome	Yes (Pellagatti et al. 2010; Dutt et al. 2011)	Deletion spanning <i>Rps14</i>	Decreased number of hematopoietic stem cells	Barlow et al. (2010)
Fanconi anemia	Yes (Ceccaldi et al., 2012)	<i>Fancd2</i> ^{-/-}	Decreased number of hematopoietic stem cells	Ceccaldi et al. (2012)
		<i>Xrcc2</i> ^{-/-}	Short tail, lethality ~E12.5	Adam et al. (2007)
		<i>Rad51</i> ^{-/-}	Lethality ~E6.5	Lim and Hasty (1996)
		<i>Brca1</i> ^{Δ11/Δ11}	Late gestational lethality	Xu et al. (2001)
		<i>Wnt1-Cre; Brca1</i> ^{fllox/fllox}	Hypoplastic craniofacial skeleton	Kitami et al. (2018)
		<i>Tyr-Cre; Brca1</i> ^{fllox/fllox}	Piebald fur pigmentation	Tonks et al. (2012)
		<i>Palb2</i> ^{-/-}	Lethality ~E8.5	Bouwman et al. (2011)
		<i>Math1-Cre; Aspm</i> ^{fllox/fllox}	Hypoplastic cerebellum	Williams et al. (2015)
		<i>Cit</i> ^{-/-}	Microcephaly, ataxia	Bianchi et al. (2017)
		<i>Cenpj</i> ^{-/-}	Lethality ~E9.5	Bazzi and Anderson (2014)
Autosomal recessive primary microcephaly	N/D	<i>Nestin-Cre; Cenpj</i> ^{fllox/fllox}	Microcephaly	Insolera et al. (2014)
		<i>Cep63</i> ^{fl/fl}	Microcephaly	Marjanović et al. (2015)
Seckel syndrome	N/D	<i>Nestin-Cre; Nbn</i> ^{fllox/fllox}	Microcephaly, cerebellar defects, ataxia, postnatal growth retardation	Frappart et al. (2005)
Nijmegen breakage syndrome	Yes (Mlody et al., 2017)	<i>Lig4</i> ^{-/-}	Late gestational lethality	Frank et al. (2000)
LIG4 syndrome	N/D	<i>Xrcc4</i> ^{-/-}	Late gestational lethality	Gao et al. (2000)
SSMED	N/D	<i>Nde1</i> ^{-/-}	Microcephaly	Houlihan and Feng (2014)
Microlissencephaly	N/D			Mao et al. (2016)
Richieri-Costa-Pereira syndrome	N/D	<i>Emx1-Cre; Eif4a3</i> ^{fllox/+}	Microcephaly	Mao et al. (2016)
Thrombocytopenia-absent radius syndrome	N/D	<i>Emx1-Cre; Rbm8a</i> ^{fllox/+}	Microcephaly	Mao et al. (2016)
Waardenburg syndrome type 1	N/D	<i>Pax3</i> ^{Sp/Sp}	Neural tube defects, heart outflow tract defects	Morgan et al. (2008), Pani (2002)
22q11.2 deletion syndrome	N/D	<i>Tbx1</i> ^{neo2/-}	Pharyngeal arch artery defects, heart outflow tract defects	Caprio and Baldini (2014)
CHARGE syndrome	Yes (Van Nostrand et al., 2014)	<i>Chd7</i> ^{-/-}	Lethality ~E10.5	Van Nostrand et al. (2014)
Dyskeratosis congenita	Yes (Pereboeva et al., 2016)	<i>Acd</i> ^{Acd/Acd}	Skin hyperpigmentation, hypoplastic adrenal glands, hindlimb hypoplasia, vertebral fusions	Else et al. (2009), Vlangos et al. (2009)
		<i>Terc</i> ^{-/-}	Hypoplastic testes	Chin et al. (1999)

^aIncludes developmental defects that are fully or partially rescued by concomitant deletion of one or both alleles of *Trp53*.

Tableau 4 : La perte de p53 peut rétablir le phénotype de plusieurs modèles murins de syndromes développementaux humains. Figure issue de (Bowen et Attardi, 2019).

Par ailleurs, il est intéressant de noter que la perte de p53 ne rétablit pas le défaut cellulaire primaire causé par les mutations dans ces modèles de souris. Par exemple, dans le modèle murin muté pour *Tcof1*, un gène impliqué dans la biogenèse des ribosomes, la perte de *Trp53* sauve complètement les défauts de développement des souris mais ne rétablit pas une biogenèse normale des ribosomes (Jones et al., 2008). Cette observation suggère que ce n'est pas les défauts dans la biogenèse des ribosomes en soi qui provoque des défauts de développement mais plutôt l'augmentation de l'activité de p53. L'ensemble de ces études suggère que l'augmentation de l'activité de p53 est entièrement ou partiellement responsable des défauts de développement dans des modèles murins de syndromes de développement. Ainsi, p53 pourrait contribuer à plusieurs syndromes développementaux humains, notamment le syndrome de Treacher-Collins, le syndrome de délétion 22q11.2, le syndrome de Waardenburg et le syndrome CHARGE, ce qui va être discuté ci-dessous.

2)3) Implication potentielle d'une suractivation de p53 dans des syndromes développementaux humains

2)3)1) Anomalies crâniofaciales du syndrome de Treacher-Collins

Le syndrome de Treacher-Collins est une anomalie congénitale du développement crâniofacial. Il se manifeste dès la naissance par des malformations plus ou moins importantes de la partie inférieure du visage, des yeux et des oreilles. Les atteintes sont bilatérales et symétriques. Le squelette crâniofacial se forme à partir des cellules de la crête neurale, une population de cellules transitoires et multipotentes issues du neuroépithélium du tube neural. Elles migrent au cours du développement pour former les tissus squelettiques et conjonctifs de la face et du crâne (Bronner et Simões-Costa, 2016). Le syndrome de Treacher-Collins est causé le plus souvent par des mutations hétérozygotes inactivatrices de *TCOF1* qui code pour une protéine nucléolaire. Il peut aussi avoir pour origine des mutations de *POLR1C* et *POLR1D* codant pour des sous-unités des ARN polymérase I et III. *TCOF1* code pour la protéine Treacle qui joue un rôle dans la biogenèse des ribosomes en favorisant la transcription des ARN ribosomiaux et leur maturation, mais également dans la réparation de l'ADN en facilitant la reconnaissance des cassures double brins (Sakai et Trainor, 2016). Chez la souris, *Tcof1* est exprimé dans le neuroépithélium pendant l'embryogenèse. La perte d'une copie de ce gène entraîne une diminution des niveaux de ribosomes matures et une augmentation des dommages à l'ADN dans ce tissu (Dixon et al., 2006 ; Jones et al., 2008 ; Sakai et al., 2016). Chez les embryons *Tcof1*^{+/-}, des expériences d'immunomarquage ont révélé une augmentation des niveaux de p53

dans le neuroépithélium, ce qui est attendu puisque des dommages à l'ADN et une altération dans la biogenèse des ribosomes sont connus pour activer p53. Cette hausse des niveaux de p53 est associée à une apoptose accrue dans le neuroépithélium, conduisant ainsi à un défaut de cellules de la crête neurale. Chez les souris adultes, cela conduit à des défauts crâniotaxiaux caractéristiques du syndrome de Treacher-Collins. De manière intéressante, la délétion de *Trp53* chez les souris *Tcof1*^{+/-} empêche une apoptose accrue des cellules du neuroépithélium, rétablit la formation de cellules de la crête neurale et empêche les anomalies de développement de la face et du crâne (Jones et al., 2008). La perte de p53 empêche aussi une apoptose du neuroépithélium et des défauts crâniotaxiaux chez le poisson-zèbre portant des mutations de *polr1c* ou *polr1d* (Dauwerse et al., 2011 ; Lau et al., 2016 ; Noack Watt et al., 2016). Ces résultats suggèrent que l'augmentation de l'activité de p53, causée par une altération dans la biogenèse des ribosomes et de réparation de l'ADN, est un moteur des défauts crâniotaxiaux du syndrome de Treacher Collins. Ils ont été confortés par une étude plus récente (Bowen et al., 2019) qui a montré que la suractivation conditionnelle de p53 dans les cellules de la crête neurale chez la souris conduit seule à des malformations crâniotaxiales typiques de ce syndrome.

2)3)2) Anomalies cardiovasculaires dans le syndrome de délétion 22q11.2

Le syndrome de délétion 22q11.2, appelé aussi syndrome de Di George, est causé par une anomalie chromosomique et entraîne des malformations congénitales. Il se caractérise le plus souvent par des malformations cardiaques, une dysmorphie faciale, un retard du développement psychomoteur avec ou sans déficience intellectuelle, des troubles du comportement, des difficultés d'élocution dues à un dysfonctionnement du voile du palais, des problèmes d'hypocalcémie et parfois une immunodéficience (McDonald-McGinn et al., 2015). Il est dû la plupart du temps à une délétion de 3 millions de paires de base (Mb) dans la région chromosomique 22q11.2. Celle-ci mène à la perte de plus de 40 gènes codant pour des protéines, notamment *TBX1*. Ce gène jouerait un rôle important dans le développement de ce syndrome car la mutation hétérozygote de *TBX1* seule conduit à la plupart des phénotypes de la maladie (Yagi et al., 2003 ; Paylor et al., 2006 ; Papangelis et Scambler, 2013). Il code pour un facteur de transcription impliqué dans le développement chez l'Homme et chez la souris. Il favorise en particulier la prolifération de cellules progénitrices cardiaques et inhibe leur différenciation cellulaire (Chen et al., 2009 ; Vincent et Buckingham, 2010). Chez la souris, la délétion hétérozygote de *Tbx1* provoque des malformations cardiaques qui résultent d'une diminution des proliférations cellulaires dans le cœur au cours du développement

embryonnaire. Il a été montré que la perte hétérozygote de p53 est suffisante pour rétablir les proliférations cellulaires et sauver les souris de ces phénotypes (Caprio et Baldini, 2014). Ainsi, une suractivation de p53 pourrait contribuer aux malformations cardiaques observées chez les patients souffrant du syndrome de délétion 22q11.2. Bien que les mécanismes sous-jacents impliquant p53 et Tbx1 ne soient pas encore clairs, il a été proposé que ces protéines aient des fonctions opposées dans la régulation des gènes impliqués dans le développement cardiaque (Caprio et Baldini, 2014). Des recherches supplémentaires seront nécessaires pour préciser la relation entre Tbx1 et p53 et pour déterminer si d'autres phénotypes associés au syndrome 22q11.2 sont aussi dépendants de p53.

2)3)3) Anomalies du tube neural dans le syndrome de Waardenburg de type 1

Le syndrome de Waardenburg de type 1 (WS1) est une maladie génétique autosomique dominante qui se caractérise par des anomalies morphologiques faciales, des troubles de la pigmentation (yeux, cheveux et peau) et une surdité. Certains patients présentent également des malformations congénitales témoignant d'un défaut de fermeture du tube neural comme une spina bifida (fermeture incomplète de la colonne vertébrale lors du développement fœtal) (Hart et Miriyala, 2017). Ce syndrome est principalement causé par des mutations du gène *PAX3* qui a aussi été associé à de graves anomalies du tube neural chez la souris et chez l'Homme. Chez la souris, une carence en *Pax3* entraîne justement une augmentation de l'apoptose dans le neuroépithélium et déclenche des malformations liées à des défauts de fermeture du tube neural comme une spina bifida ou des exencéphalies (Pani, 2002). Les embryons déficients pour *Pax3* présentent également des malformations cardiaques et une altération des muscles des membres (Morgan et al., 2008). Le gène *Pax3* est exprimé dans le tube neural, la crête neurale et le dermomyotome ; il code pour un facteur de transcription qui régule des gènes impliqués dans le développement. Récemment, *Pax3* s'est également vu attribuer un rôle de régulateur négatif de p53, indépendant de ses capacités transactivatrices (Boudjadi et al., 2018). En effet, *Pax3* est capable de se lier à p53 et de favoriser sa dégradation par Mdm2. De plus, la perte de cette protéine conduit à une augmentation des niveaux de p53 (Wang et al., 2011c). Chez la souris, l'inactivation de p53 permet de sauver les défauts du tube neural chez les embryons déficients pour *Pax3*, suggérant que cette protéine joue un rôle essentiel pour diminuer l'activité de p53 au cours de la fermeture du tube neural (Pani, 2002). La perte de p53 permet également d'empêcher les malformations cardiaques observées chez la souris, mais pas les défauts musculaires. Ainsi, une suractivation de p53 pourrait être à l'origine des anomalies de fermeture du tube neural chez des patients isolés ou souffrant du syndrome

de Waardenburg de type 1. Par ailleurs, il serait intéressant de déterminer si p53 peut jouer un rôle dans les autres phénotypes observés chez ces patients comme les anomalies dans la morphologie de la face, les troubles de la pigmentation et la surdité.

2)3)4) Le syndrome CHARGE

Le syndrome CHARGE est un syndrome d'anomalies congénitales multiples qui se manifeste par divers phénotypes, notamment un colobome oculaire (anomalie de développement du cristallin, de l'iris, de la choroïde ou de la rétine), des malformations cardiaques, une atrésie choanale (obstruction du canal nasal), un retard de développement et de la croissance, une hypoplasie de l'appareil uro-génital et des malformations de l'oreille (Davenport et al., 1986). Dans 70 à 90 % des cas, ce syndrome résulte de mutations dans le gène *CHD7*, codant pour un remodeleur de la chromatine (Jongmans et al., 2006). Un rôle pour p53 dans ce syndrome a été établi grâce à l'étude de souris mutées pour p53. En effet, il a été montré que les souris $p53^{25,26,53,54/+}$, exprimant une protéine p53 ayant perdu ses capacités transactivatrices ($p53^{25,26,53,54}$) ainsi qu'une protéine p53 sauvage, meurent prématurément à la fin de la gestation et présentent de nombreux phénotypes caractéristiques du syndrome CHARGE (Zentner et al., 2010 ; Van Nostrand et al., 2014). Ces souris présentent notamment un colobome, des malformations de l'oreille interne et externe, des anomalies du système cardiovasculaire et des malformations de la face et du crâne. Dans ce modèle, il a été montré que la protéine mutante $p53^{25,26,53,54}$ peut stabiliser et hyperactiver la protéine p53 sauvage ce qui conduit à une activation de ses gènes cibles, ainsi qu'un arrêt du cycle cellulaire et une apoptose exacerbés au cours du développement. Ces phénotypes ne sont observés qu'en présence d'un allèle p53 sauvage puisque les embryons $p53^{25,26,53,54/-}$ sont viables. Bien que les mécanismes selon lesquels une inactivation de *Chd7* déclenche une activation de p53 ne soient pas complètement connus, il a été constaté que *Chd7* peut se lier au promoteur de *Trp53* et pourrait ainsi réprimer l'expression de ce gène (Van Nostrand et al., 2014). Par ailleurs, la perte de *Chd7* dans les cellules de la crête neurale ou dans des échantillons de patients atteints du syndrome CHARGE (fibroblastes de patients et thymus fœtal) entraîne une activation de p53. De façon surprenante, il a été montré que la perte hétérozygote de p53 sauve partiellement le phénotype des embryons KO pour *Chd7*, démontrant ainsi que p53 contribue aux phénotypes causés par l'inactivation de ce gène. Ainsi, une activation inappropriée de p53 peut contribuer au développement de phénotypes du syndrome CHARGE chez la souris. La suractivation de p53 apparaît comme un facteur clé de ces phénotypes puisque, chez la souris, la suractivation conditionnelle de p53 dans l'ectoderme de la face et le télencéphale conduit directement à un colobome oculaire, une

atrésie choanale et des anomalies de l'oreille interne, des phénotypes caractéristiques de ce syndrome (Bowen et al., 2019). Des recherches supplémentaires seront nécessaires pour élucider ces mécanismes et mieux définir le rôle de p53 dans ce syndrome chez l'Homme.

3) Résumé et perspectives

L'analyse de modèles murins présentant des mutations de *Trp53*, *Mdm2* ou *Mdm4* a montré qu'une suractivation de p53 peut conduire à de nombreuses altérations du développement et des phénotypes de vieillissement accéléré. De plus, nous avons vu que, chez l'Homme, des mutations de *TP53* et de *MDM4* pourraient contribuer à des syndromes d'insuffisance médullaire et qu'une mutation de *MDM2* a été associée à un syndrome de vieillissement prématuré. Par ailleurs, la plupart des syndromes développementaux humains proviennent de mutations dans des gènes impliqués dans des voies cellulaires essentielles qui activent p53 quand elles sont altérées. Enfin, la perte de p53 permet de corriger tout ou partie des phénotypes mutants de nombreux modèles murins représentant ces syndromes. Toutes ces observations suggèrent qu'une suractivation de p53 pourrait être directement responsable des défauts de développement et des phénotypes de vieillissement accéléré de plusieurs syndromes développementaux et soulèvent de nouvelles questions.

Tout d'abord, puisqu'une suractivation de p53 conduit à des défauts de développement de certains tissus en particulier, cela suggère que seule une partie des cellules de l'embryon et du nouveau-nés sont sensibles à l'activation de p53. Cependant, on ne sait pas, d'un point de vue moléculaire, ce qui peut déterminer la sensibilité d'une cellule à une suractivation de p53. De plus, dans la plupart des études présentées, il est proposé que la suractivation de p53 conduit à un arrêt du cycle cellulaire et une apoptose exacerbée. Cependant, nous avons vu qu'en réponse à divers stress, p53 peut aussi réguler des gènes impliqués dans de nombreux processus important pour le développement comme la régulation du métabolisme, la différenciation et la migration cellulaire. Il serait intéressant de déterminer si ces processus peuvent contribuer, eux aussi, à des syndromes développementaux. Enfin, il serait intéressant de déterminer comment une suractivation de p53 peut conduire à des phénotypes bien spécifiques, aussi bien chez l'Homme que chez la souris. Dans cette optique, une étude récente (Bowen et al., 2019) a montré que la suractivation de p53 au cours du développement embryonnaire, dans des types cellulaires spécifiques, pourrait conduire à la grande variabilité des phénotypes observés dans les modèles murins de suractivation de p53. En effet, la suractivation de p53 dans les cellules de la crête neurale, par exemple, conduit à des malformations crâniofaciales, des malformations

cardiaques, des anomalies dans la pigmentation de la peau et des altérations du tube neural, des phénotypes classiques de nombreux syndromes développementaux. Par ailleurs, l'activation de p53 dans l'ectoderme facial et le télencéphale, conduit à des anomalies dans la structure de la face, des malformations des yeux, de l'oreille interne et des voies nasales et respiratoires. Ainsi, pour chaque syndrome, il conviendrait de déterminer si les différents phénotypes observés apparaissent car les mutations à l'origine du syndrome activent p53 dans un compartiment cellulaire bien précis, selon un degré différent et à un moment précis du développement embryonnaire, ou si ces différences proviennent de voies indépendantes de p53.

Il serait également intéressant de déterminer si les observations présentées ici peuvent être exploitées à des fins thérapeutiques. Bien qu'il soit possible que l'inhibition pharmacologique directe de p53 puisse empêcher les défauts de développement dans ces syndromes, cette approche peut ne pas être avisée au vu du rôle critique de p53 dans la suppression tumorale. Cette approche doit également être traitée avec prudence car certains phénotypes peuvent être accentués par l'inhibition de p53. Dans un modèle murin de l'anémie de Fanconi, par exemple, la perte de *Trp53* permet de sauver les souris contre les défauts hématopoïétiques survenant au cours des premiers stades de développement, mais elle conduit à l'épuisement du pool de cellules souches chez la souris adulte (Li et al., 2018). Ainsi, au lieu d'inhiber directement p53, il pourrait être intéressant de rétablir en amont les voies cellulaires perturbées de façon à prévenir une hyperactivation de p53 (Bowen et Attardi, 2019). Il a été montré, par exemple, qu'une alimentation riche en anti-oxydants permettrait de diminuer les malformations du crâne et de la face des souris *Tcof1*^{+/-}, modélisant le syndrome de Treacher-Collins. Les anti-oxydants permettraient de réduire le stress oxydatif pendant l'embryogenèse, ce qui pourrait limiter les dommages à l'ADN et la suractivation de p53 (Sakai et al., 2016). Approfondir le rôle de p53 dans des syndromes développementaux humains et les mécanismes moléculaires sous-jacents pourrait ainsi mener à de nouvelles stratégies pour leur prévention.

CONCLUSIONS

La protéine p53 et ses principaux régulateurs négatifs, MDM2 et MDM4, sont majoritairement connus pour leur rôle dans les cancers. Néanmoins, au cours de ces dernières années, ces protéines ont été impliquées dans de nombreux processus physiologiques comme le développement, le vieillissement et la fertilité. Grâce au modèle murin *p53^{A31/A31}*, mon équipe a découvert qu'une suractivation de p53 conduit à une répression de nombreux gènes du métabolisme télomérique. Cela conduit à un raccourcissement des télomères et le développement de phénotypes caractéristiques de la Dyskératose Congénitale (DC), un syndrome d'insuffisance médullaire héréditaire causé par une altération des télomères. Mon laboratoire de thèse a montré que de nombreux gènes du métabolisme télomérique sont également régulés par p53 dans des cellules humaines. Ils ont ainsi émis l'hypothèse qu'une suractivation de p53 pourrait être à l'origine des formes idiopathiques de la DC. Cependant, cela restait à démontrer d'une part parce qu'aucune mutation de p53 ou de ses principaux régulateurs n'avait encore jamais été associée à ce syndrome et d'autre part, parce qu'il a été montré que p53 participerait à la protection des télomères, via la transcription de TERRA. Il était ainsi nécessaire d'obtenir des données cliniques pour mieux comprendre les conséquences d'une suractivation de p53 sur le métabolisme télomérique chez l'Homme et le développement potentiel de phénotypes de DC.

Au cours de ma thèse, j'ai caractérisé les effets d'une mutation de *MDM4* identifiée chez une famille présentant des phénotypes de DC. Cette famille présentait en effet de nombreux signes de ce syndrome, notamment une moelle osseuse hypocellulaire, des carcinomes des cellules squameuses de la langue, une leucémie myéloïde aiguë et des télomères courts entre le premier et le dixième percentile pour la génération la plus jeune. Grâce à l'utilisation de plusieurs modèles murins, mon travail de thèse a contribué à démontrer que cette mutation conduit à une suractivation de p53, des télomères courts, une insuffisance médullaire et d'autres phénotypes de DC. Comme dans le modèle *p53^{A31/A31}*, cette suractivation mène à la répression de nombreux gènes du métabolisme télomérique. Par ailleurs, la mutation de *Mdm4* pourrait conduire à une dérégulation de TERRA. Finalement, ce travail a fourni des preuves cliniques convaincantes qu'une suractivation de p53 peut conduire à une altération des télomères et le développement de phénotypes de DC chez l'Homme.

Plusieurs observations suggèrent que des mutations dans la voie p53 pourraient jouer un rôle dans d'autres syndromes d'insuffisance médullaire. En effet, des mutations germinales de *TP53* ont été identifiées chez deux patients présentant des signes d'une anémie de Blackfan-Diamond. Cette mutation pourrait conduire à une suractivation de p53 et a été associée en

particulier à une aplasie des globules rouges et des malformations physiques. Ces patients présentaient aussi des télomères relativement courts, ce qui est cohérent avec nos résultats. Par ailleurs, bien que des mutations de la voie p53 n'ait pas été identifiée chez des patients souffrant d'une anémie de Fanconi, il a été montré qu'une suractivation de p53 est un facteur clé des défauts hématopoïétiques et des malformations congénitales de ces patients. Finalement, l'ensemble de ces observations démontre l'intérêt de rechercher des mutations de *TP53*, *MDM2* ou *MDM4* ou des polymorphismes dans ces gènes chez des patients souffrant de syndromes d'insuffisance médullaire héréditaires.

En outre, l'analyse d'autres modèles murins a montré qu'une suractivation de p53 peut conduire à un large spectre de phénotypes dans lequel le développement et le vieillissement sont altérés. La découverte qu'une mutation de *MDM4* peut conduire à des phénotypes de DC, qu'une mutation de *TP53* pourrait mener à des phénotypes de DBA et l'analyse de ces modèles, suggèrent que des dérégulations de la voie p53 pourraient contribuer de façon plus globale à un ensemble de syndromes développementaux humains. Une mutation germinale de *MDM2* a notamment été identifiée chez un patient souffrant d'un syndrome progéroïde segmentaire de vieillissement accéléré. Par ailleurs, chez l'Homme, les mutations à l'origine de la plupart des syndromes développementaux affectent des voies cellulaires essentielles qui sont connues pour activer p53. Dans de nombreux modèles murins de ces syndromes, la perte de p53 permet de rétablir partiellement ou totalement le phénotype des souris, alors même que le processus cellulaire perturbé à l'origine n'est pas rétabli. Ces observations démontrent ainsi l'intérêt de rechercher et d'évaluer la contribution de mutations activatrices de p53 dans des syndromes développementaux humains comme le syndrome de Treacher-Collins, le syndrome CHARGE, le syndrome de délétion 22q11.2 ou encore le syndrome de Waardenburg.

BIBLIOGRAPHIE

- Adam, J., Deans, B., and Thacker, J. (2007). A role for Xrcc2 in the early stages of mouse development. *DNA Repair (Amst.)* 6, 224–234.
- Aix, E., Gutiérrez-Gutiérrez, Ó., Sánchez-Ferrer, C., Aguado, T., and Flores, I. (2016). Postnatal telomere dysfunction induces cardiomyocyte cell-cycle arrest through p21 activation. *J. Cell Biol.* 213, 571–583.
- Alawadi, S., Ghabreau, L., Alsaleh, M., Abdulaziz, Z., Rafeek, M., Akil, N., and Alkhalaf, M. (2011). P53 gene polymorphisms and breast cancer risk in Arab women. *Med. Oncol.* 28, 709–715.
- Alter, B.P. (2007). Diagnosis, genetics, and management of inherited bone marrow failure syndromes. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 29–39.
- Alter, B.P. (2017). Inherited bone marrow failure syndromes: considerations pre- and posttransplant. *Blood* 130, 2257–2264.
- Alter, B.P., and Rosenberg, P.S. (2013). VACTERL-H Association and Fanconi Anemia. *Mol Syndromol* 4, 87–93.
- Alter, B.P., Rosenberg, P.S., Giri, N., Baerlocher, G.M., Lansdorp, P.M., and Savage, S.A. (2012). Telomere length is associated with disease severity and declines with age in dyskeratosis congenita. *Haematologica* 97, 353–359.
- Ameziane, N., May, P., Haitjema, A., van de Vrugt, H.J., van Rossum-Fikkert, S.E., Ristic, D., Williams, G.J., Balk, J., Rockx, D., Li, H., et al. (2015). A novel Fanconi anaemia subtype associated with a dominant-negative mutation in RAD51. *Nat Commun* 6, 8829.
- Arai, Y., Honda, S., Haruta, M., Kasai, F., Fujiwara, Y., Ohshima, J., Sasaki, F., Nakagawara, A., Horie, H., Yamaoka, H., et al. (2010). Genome-wide analysis of allelic imbalances reveals 4q deletions as a poor prognostic factor and MDM4 amplification at 1q32.1 in hepatoblastoma. *Genes Chromosomes Cancer* 49, 596–609.
- Arena, G., Cissé, M.Y., Pyrdziak, S., Chatre, L., Riscal, R., Fuentes, M., Arnold, J.J., Kastner, M., Gayte, L., Bertrand-Gaday, C., et al. (2018). Mitochondrial MDM2 Regulates Respiratory Complex I Activity Independently of p53. *Mol. Cell* 69, 594-609.e8.
- Armanios, M., and Blackburn, E.H. (2012). The telomere syndromes. *Nat. Rev. Genet.* 13, 693–704.
- Armanios, M., Alder, J.K., Parry, E.M., Karim, B., Strong, M.A., and Greider, C.W. (2009). Short telomeres are sufficient to cause the degenerative defects associated with aging. *Am. J. Hum. Genet.* 85, 823–832.
- Armstrong, J.F., Kaufman, M.H., Harrison, D.J., and Clarke, A.R. (1995). High-frequency developmental abnormalities in p53-deficient mice. *Curr. Biol.* 5, 931–936.
- Arora, J., Saraswathy, K.N., and Deb, R. (2012). Effect of maternal Tp53 gene G412C polymorphism on neural tube defects: A study from North India. *Indian J Hum Genet* 18, 177–182.
- Artandi, S.E., and DePinho, R.A. (2010). Telomeres and telomerase in cancer. *Carcinogenesis* 31, 9–18.
- Atwal, G.S., Kirchhoff, T., Bond, E.E., Montagna, M., Monagna, M., Menin, C., Bertorelle, R., Scaini, M.C., Bartel, F., Böhnke, A., et al. (2009). Altered tumor formation and evolutionary selection of genetic variants in the human MDM4 oncogene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 10236–10241.
- Auerbach, A.D. (2009). Fanconi anemia and its diagnosis. *Mutat. Res.* 668, 4–10.
- Aylon, Y., and Oren, M. (2011). New plays in the p53 theater. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 21, 86–92.

- Azzam, G.A., Frank, A.K., Hollstein, M., and Murphy, M.E. (2011). Tissue-specific apoptotic effects of the p53 codon 72 polymorphism in a mouse model. *Cell Cycle* 10, 1352–1355.
- Baatout, S., Jacquet, P., Michaux, A., Buset, J., Vankerkom, J., Derradji, H., Yan, J., von Suchodoletz, H., de Saint-Georges, L., Desaintes, C., et al. (2002). Developmental abnormalities induced by X-irradiation in p53 deficient mice. *In Vivo* 16, 215–221.
- Bailón-Moscoso, N., Romero-Benavides, J.C., and Ostrosky-Wegman, P. (2014). Development of anticancer drugs based on the hallmarks of tumor cells. *Tumour Biol.* 35, 3981–3995.
- Baker, D.J., Weaver, R.L., and van Deursen, J.M. (2013). p21 both attenuates and drives senescence and aging in BubR1 progeroid mice. *Cell Rep* 3, 1164–1174.
- Balatsos, N.A.A., Anastasakis, D., and Stathopoulos, C. (2009). Inhibition of human poly(A)-specific ribonuclease (PARN) by purine nucleotides: kinetic analysis. *J Enzyme Inhib Med Chem* 24, 516–523.
- Ballew, B.J., Joseph, V., De, S., Sarek, G., Vannier, J.-B., Stracker, T., Schrader, K.A., Small, T.N., O'Reilly, R., Manschreck, C., et al. (2013). 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.
- Barak, Y., Juven, T., Haffner, R., and Oren, M. (1993). mdm2 expression is induced by wild type p53 activity. *EMBO J.* 12, 461–468.
- Barak, Y., Gottlieb, E., Juven-Gershon, T., and Oren, M. (1994). Regulation of mdm2 expression by p53: alternative promoters produce transcripts with nonidentical translation potential. *Genes Dev.* 8, 1739–1749.
- Bardot, B., and Toledo, F. (2017). Targeting MDM4 Splicing in Cancers. *Genes (Basel)* 8.
- Bardot, B., Bouarich-Bourimi, R., Leemput, J., Lejour, V., Hamon, A., Plancke, L., Jochemsen, A.G., Simeonova, I., Fang, M., and Toledo, F. (2015). 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.
- Barlow, J.L., Drynan, L.F., Hewett, D.R., Holmes, L.R., Lorenzo-Abalde, S., Lane, A.L., Jolin, H.E., Pannell, R., Middleton, A.J., Wong, S.H., et al. (2010). A p53-dependent mechanism underlies macrocytic anemia in a mouse model of human 5q- syndrome. *Nat Med* 16, 59–66.
- Barnoud, T., Parris, J.L.D., and Murphy, M.E. (2019). Common genetic variants in the TP53 pathway and their impact on cancer. *J Mol Cell Biol* 11, 578–585.
- Bartel, F., Harris, L.C., Würfl, P., and Taubert, H. (2004). MDM2 and its splice variant messenger RNAs: expression in tumors and down-regulation using antisense oligonucleotides. *Mol. Cancer Res.* 2, 29–35.
- Bartel, F., Schulz, J., Böhnke, A., Blümke, K., Kappler, M., Bache, M., Schmidt, H., Würfl, P., Taubert, H., and Hauptmann, S. (2005). Significance of HDMX-S (or MDM4) mRNA splice variant overexpression and HDMX gene amplification on primary soft tissue sarcoma prognosis. *Int. J. Cancer* 117, 469–475.
- Basu, S., and Murphy, M.E. (2016). Genetic Modifiers of the p53 Pathway. *Cold Spring Harb Perspect Med* 6, a026302.
- Baugh, E.H., Ke, H., Levine, A.J., Bonneau, R.A., and Chan, C.S. (2018). Why are there hotspot mutations in the TP53 gene in human cancers? *Cell Death Differ.* 25, 154–160.

- Beckerman, R., and Prives, C. (2010). Transcriptional regulation by p53. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2, a000935.
- Beckman, G., Birgander, R., Sjölander, A., Saha, N., Holmberg, P.A., Kivelä, A., and Beckman, L. (1994). Is p53 polymorphism maintained by natural selection? *Hum. Hered.* 44, 266–270.
- Belyi, V.A., Ak, P., Markert, E., Wang, H., Hu, W., Puzio-Kuter, A., and Levine, A.J. (2010). The origins and evolution of the p53 family of genes. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2, a001198.
- Benson, E.K., Mungamuri, S.K., Attie, O., Kracikova, M., Sachidanandam, R., Manfredi, J.J., and Aaronson, S.A. (2014). p53-dependent gene repression through p21 is mediated by recruitment of E2F4 repression complexes. *Oncogene* 33, 3959–3969.
- Benyelles, M., Episkopou, H., O'Donohue, M.-F., Kermasson, L., Frange, P., Poulain, F., Burcu Belen, F., Polat, M., Bole-Feysot, C., Langa-Vives, F., et al. (2019). Impaired telomere integrity and rRNA biogenesis in PARN-deficient patients and knock-out models. *EMBO Mol Med* 11, e10201.
- Bieging, K.T., Mello, S.S., and Attardi, L.D. (2014). Unravelling mechanisms of p53-mediated tumour suppression. *Nat. Rev. Cancer* 14, 359–370.
- Bista, M., Petrovich, M., and Fersht, A.R. (2013). MDMX contains an autoinhibitory sequence element. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110, 17814–17819.
- 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.
- Bluteau, D., Masliah-Planchon, J., Clairmont, C., Rousseau, A., Ceccaldi, R., Dubois d'Enghien, C., Bluteau, O., Cuccuini, W., Gachet, S., Peffault de Latour, R., et al. (2016). Biallelic inactivation of REV7 is associated with Fanconi anemia. *J. Clin. Invest.* 126, 3580–3584.
- Bode, A.M., and Dong, Z. (2004). Post-translational modification of p53 in tumorigenesis. *Nat. Rev. Cancer* 4, 793–805.
- Boesten, L.S.M., Zadelaar, S.M., De Clercq, S., Francoz, S., van Nieuwkoop, A., Biessen, E. a. L., Hofmann, F., Feil, S., Feil, R., Jochemsen, A.G., et al. (2006). Mdm2, but not Mdm4, protects terminally differentiated smooth muscle cells from p53-mediated caspase-3-independent cell death. *Cell Death Differ.* 13, 2089–2098.
- Bojesen, S.E., and Nordestgaard, B.G. (2008). The common germline Arg72Pro polymorphism of p53 and increased longevity in humans. *Cell Cycle* 7, 158–163.
- Bonafé, M., Ceccarelli, C., Farabegoli, F., Santini, D., Taffurelli, M., Barbi, C., Marzi, E., Trapassi, C., Storci, G., Olivieri, F., et al. (2003). Retention of the p53 codon 72 arginine allele is associated with a reduction of disease-free and overall survival in arginine/proline heterozygous breast cancer patients. *Clin. Cancer Res.* 9, 4860–4864.
- Bond, G.L., Hu, W., Bond, E.E., Robins, H., Lutzker, S.G., Arva, N.C., Bargonetti, J., Bartel, F., Taubert, H., Wuerl, P., et al. (2004). A single nucleotide polymorphism in the MDM2 promoter attenuates the p53 tumor suppressor pathway and accelerates tumor formation in humans. *Cell* 119, 591–602.
- Boocock, G.R.B., Morrison, J.A., Popovic, M., Richards, N., Ellis, L., Durie, P.R., and Rommens, J.M. (2003). Mutations in SBDS are associated with Shwachman-Diamond syndrome. *Nat. Genet.* 33, 97–101.
- Boonekamp, J.J., Simons, M.J.P., Hemerik, L., and Verhulst, S. (2013). Telomere length behaves as biomarker of somatic redundancy rather than biological age. *Aging Cell* 12, 330–332.

- Boudjadi, S., Chatterjee, B., Sun, W., Vemu, P., and Barr, F.G. (2018). The expression and function of PAX3 in development and disease. *Gene* 666, 145–157.
- Bouwman, P., Drost, R., Klijn, C., Pieterse, M., van der Gulden, H., Song, J.-Y., Szuhai, K., and Jonkers, J. (2011). Loss of p53 partially rescues embryonic development of Palb2 knockout mice but does not foster haploinsufficiency of Palb2 in tumour suppression. *J. Pathol.* 224, 10–21.
- Bowen, M.E., and Attardi, L.D. (2019). The role of p53 in developmental syndromes. *J Mol Cell Biol* 11, 200–211.
- Bowen, M.E., McClendon, J., Long, H.K., Sorayya, A., Van Nostrand, J.L., Wysocka, J., and Attardi, L.D. (2019). The Spatiotemporal Pattern and Intensity of p53 Activation Dictates Phenotypic Diversity in p53-Driven Developmental Syndromes. *Dev. Cell* 50, 212-228.e6.
- Boyras, B., Moon, D.H., Segal, M., Muosieyiri, M.Z., Aykanat, A., Tai, A.K., Cahan, P., and Agarwal, S. (2016). Posttranscriptional manipulation of TERC reverses molecular hallmarks of telomere disease. *J. Clin. Invest.* 126, 3377–3382.
- Brady, C.A., and Attardi, L.D. (2010). p53 at a glance. *J. Cell. Sci.* 123, 2527–2532.
- Brodsky, M.H., Nordstrom, W., Tsang, G., Kwan, E., Rubin, G.M., and Abrams, J.M. (2000). Drosophila p53 binds a damage response element at the reaper locus. *Cell* 101, 103–113.
- Cahilly-Snyder, L., Yang-Feng, T., Francke, U., and George, D.L. (1987). Molecular analysis and chromosomal mapping of amplified genes isolated from a transformed mouse 3T3 cell line. *Somat. Cell Mol. Genet.* 13, 235–244.
- Calado, R.T., and Dumitriu, B. (2013). Telomere dynamics in mice and humans. *Semin. Hematol.* 50, 165–174.
- Candeias, M.M., Malbert-Colas, L., Powell, D.J., Daskalogianni, C., Maslon, M.M., Naski, N., Bourougaa, K., Calvo, F., and Fåhræus, R. (2008). P53 mRNA controls p53 activity by managing Mdm2 functions. *Nat. Cell Biol.* 10, 1098–1105.
- Candi, E., Cipollone, R., Rivetti di Val Cervo, P., Gonfloni, S., Melino, G., and Knight, R. (2008). p63 in epithelial development. *Cell. Mol. Life Sci.* 65, 3126–3133.
- Candi, E., Agostini, M., Melino, G., and Bernassola, F. (2014). How the TP53 family proteins TP63 and TP73 contribute to tumorigenesis: regulators and effectors. *Hum. Mutat.* 35, 702–714.
- Caprio, C., and Baldini, A. (2014). p53 Suppression partially rescues the mutant phenotype in mouse models of DiGeorge syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111, 13385–13390.
- Carapito, R., Konantz, M., Paillard, C., Miao, Z., Pichot, A., Leduc, M.S., Yang, Y., Bergstrom, K.L., Mahoney, D.H., Shardy, D.L., et al. (2017). Mutations in signal recognition particle SRP54 cause syndromic neutropenia with Shwachman-Diamond-like features. *J. Clin. Invest.* 127, 4090–4103.
- Caron de Fromentel, C., Aberdam, E., and Aberdam, D. (2012). [The two faces of p63, Janus of the p53 gene family]. *Med Sci (Paris)* 28, 381–387.
- Carrillo, A.M., Bouska, A., Arrate, M.P., and Eischen, C.M. (2015). Mdmx promotes genomic instability independent of p53 and Mdm2. *Oncogene* 34, 846–856.
- Carvajal, L.A., and Manfredi, J.J. (2013). Another fork in the road--life or death decisions by the tumour suppressor p53. *EMBO Rep.* 14, 414–421.
- Ceccaldi, R., Parmar, K., Mouly, E., Delord, M., Kim, J.M., Regairaz, M., Pla, M., Vasquez, N., Zhang, Q.-S., Pondarre, C., et al. (2012). 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.

Chan, W.M., Mak, M.C., Fung, T.K., Lau, A., Siu, W.Y., and Poon, R.Y.C. (2006). Ubiquitination of p53 at multiple sites in the DNA-binding domain. *Mol. Cancer Res.* 4, 15–25.

Chavez-Reyes, A., Parant, J.M., Amelse, L.L., de Oca Luna, R.M., Korsmeyer, S.J., and Lozano, G. (2003). Switching mechanisms of cell death in mdm2- and mdm4-null mice by deletion of p53 downstream targets. *Cancer Res.* 63, 8664–8669.

Chen, J., and Kastan, M.B. (2010). 5'-3'-UTR interactions regulate p53 mRNA translation and provide a target for modulating p53 induction after DNA damage. *Genes Dev.* 24, 2146–2156.

Chen, J.R., Cheng, J.G., Shatzer, T., Sewell, L., Hernandez, L., and Stewart, C.L. (2000). Leukemia inhibitory factor can substitute for nidatory estrogen and is essential to inducing a receptive uterus for implantation but is not essential for subsequent embryogenesis. *Endocrinology* 141, 4365–4372.

Chen, L., Gilkes, D.M., Pan, Y., Lane, W.S., and Chen, J. (2005). ATM and Chk2-dependent phosphorylation of MDMX contribute to p53 activation after DNA damage. *EMBO J.* 24, 3411–3422.

Chen, L., Fulcoli, F.G., Tang, S., and Baldini, A. (2009). Tbx1 regulates proliferation and differentiation of multipotent heart progenitors. *Circ Res* 105, 842–851.

Clegg, H.V., Itahana, K., and Zhang, Y. (2008). Unlocking the Mdm2-p53 loop: ubiquitin is the key. *Cell Cycle* 7, 287–292.

Cordenonsi, M., Dupont, S., Maretto, S., Insinga, A., Imbriano, C., and Piccolo, S. (2003). Links between tumor suppressors: p53 is required for TGF-beta gene responses by cooperating with Smads. *Cell* 113, 301–314.

Cross, B., Chen, L., Cheng, Q., Li, B., Yuan, Z.-M., and Chen, J. (2011). Inhibition of p53 DNA binding function by the MDM2 protein acidic domain. *J. Biol. Chem.* 286, 16018–16029.

Da Costa, L. (2013). Defects in DBA: more than meets the eye. *Blood* 122, 856–857.

Da Costa, L., Narla, A., and Mohandas, N. (2018). An update on the pathogenesis and diagnosis of Diamond-Blackfan anemia. *F1000Res* 7.

Dai, M.-S., and Lu, H. (2004). Inhibition of MDM2-mediated p53 ubiquitination and degradation by ribosomal protein L5. *J. Biol. Chem.* 279, 44475–44482.

Danilova, N., and Gazda, H.T. (2015). Ribosomopathies: how a common root can cause a tree of pathologies. *Dis Model Mech* 8, 1013–1026.

Danilova, N., Sakamoto, K.M., and Lin, S. (2008). p53 family in development. *Mech. Dev.* 125, 919–931.

Danilova, N., Bibikova, E., Covey, T.M., Nathanson, D., Dimitrova, E., Konto, Y., Lindgren, A., Glader, B., Radu, C.G., Sakamoto, K.M., et al. (2014). The role of the DNA damage response in zebrafish and cellular models of Diamond Blackfan anemia. *Dis Model Mech* 7, 895–905.

Dauwerse, J.G., Dixon, J., Seland, S., Ruivenkamp, C.A.L., van Haeringen, A., Hoefsloot, L.H., Peters, D.J.M., Boers, A.C., Damer-Haas, C., Maiwald, R., et al. (2011). Mutations in genes encoding subunits of RNA polymerases I and III cause Treacher Collins syndrome. *Nat. Genet.* 43, 20–22.

Davenport, S.L., Hefner, M.A., and Mitchell, J.A. (1986). The spectrum of clinical features in CHARGE syndrome. *Clin. Genet.* 29, 298–310.

- Decorsière, A., Cayrel, A., Vagner, S., and Millevoi, S. (2011). Essential role for the interaction between hnRNP H/F and a G quadruplex in maintaining p53 pre-mRNA 3'-end processing and function during DNA damage. *Genes Dev.* 25, 220–225.
- El-Deiry, W.S., Kern, S.E., Pietenpol, J.A., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (1992). Definition of a consensus binding site for p53. *Nat. Genet.* 1, 45–49.
- DeLeo, A.B., Jay, G., Appella, E., Dubois, G.C., Law, L.W., and Old, L.J. (1979). Detection of a transformation-related antigen in chemically induced sarcomas and other transformed cells of the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76, 2420–2424.
- Deng, C., Zhang, P., Harper, J.W., Elledge, S.J., and Leder, P. (1995). Mice lacking p21CIP1/WAF1 undergo normal development, but are defective in G1 checkpoint control. *Cell* 82, 675–684.
- Deng, Y., Chan, S.S., and Chang, S. (2008). Telomere dysfunction and tumour suppression: the senescence connection. *Nat. Rev. Cancer* 8, 450–458.
- Denisov, E.V., Cherdyntseva, N.V., Litviakov, N.V., Malinovskaya, E.A., Babushkina, N.N., Belyavskaya, V.A., and Voevoda, M.I. (2012). TP53 Gene Polymorphisms in Cancer Risk: The Modulating Effect of Ageing, Ethnicity and TP53 Somatic Abnormalities. *Tumor Suppressor Genes*.
- Derry, W.B., Putzke, A.P., and Rothman, J.H. (2001). *Caenorhabditis elegans* p53: role in apoptosis, meiosis, and stress resistance. *Science* 294, 591–595.
- Dhanraj, S., Matveev, A., Li, H., Lauhasurayotin, S., Jardine, L., Cada, M., Zlateska, B., Taylor, C.S., Zhou, J., Mendoza-Londono, R., et al. (2017). Biallelic mutations in DNAJC21 cause Shwachman-Diamond syndrome. *Blood* 129, 1557–1562.
- Di Conza, G., Mancini, F., Buttarelli, M., Pontecorvi, A., Trimarchi, F., and Moretti, F. (2012). MDM4 enhances p53 stability by promoting an active conformation of the protein upon DNA damage. *Cell Cycle* 11, 749–760.
- Diskin, S.J., Capasso, M., Diamond, M., Oldridge, D.A., Conkrite, K., Bosse, K.R., Russell, M.R., Iolascon, A., Hakonarson, H., Devoto, M., et al. (2014). Rare variants in TP53 and susceptibility to neuroblastoma. *J. Natl. Cancer Inst.* 106, dju047.
- Dixon, J., Jones, N.C., Sandell, L.L., Jayasinghe, S.M., Crane, J., Rey, J.-P., Dixon, M.J., and Trainor, P.A. (2006). Tcof1/Treacle is required for neural crest cell formation and proliferation deficiencies that cause craniofacial abnormalities. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 13403–13408.
- Domchek, S.M., Tang, J., Stopfer, J., Lilli, D.R., Hamel, N., Tischkowitz, M., Monteiro, A.N.A., Messick, T.E., Powers, J., Yonker, A., et al. (2013). Biallelic deleterious BRCA1 mutations in a woman with early-onset ovarian cancer. *Cancer Discov* 3, 399–405.
- Donehower, L.A. (2009). Longevity regulation in flies: a role for p53. *Aging (Albany NY)* 1, 6–8.
- Donehower, L.A., Harvey, M., Slagle, B.L., McArthur, M.J., Montgomery, C.A., Butel, J.S., and Bradley, A. (1992). Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature* 356, 215–221.
- Dong, H., Nebert, D.W., Bruford, E.A., Thompson, D.C., Joenje, H., and Vasiliou, V. (2015). Update of the human and mouse Fanconi anemia genes. *Hum. Genomics* 9, 32.
- Dötsch, V., Bernassola, F., Coutandin, D., Candi, E., and Melino, G. (2010). p63 and p73, the ancestors of p53. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2, a004887.
- Dumont, P., Leu, J.I.-J., Della Pietra, A.C., George, D.L., and Murphy, M. (2003). The codon 72 polymorphic variants of p53 have markedly different apoptotic potential. *Nat. Genet.* 33, 357–365.

- Dutt, S., Narla, A., Lin, K., Mullally, A., Abayasekara, N., Megerdichian, C., Wilson, F.H., Currie, T., Khanna-Gupta, A., Berliner, N., et al. (2011). Haploinsufficiency for ribosomal protein genes causes selective activation of p53 in human erythroid progenitor cells. *Blood* *117*, 2567–2576.
- Esmer, C., Sánchez, S., Ramos, S., Molina, B., Frias, S., and Carnevale, A. (2004). DEB test for Fanconi anemia detection in patients with atypical phenotypes. *Am. J. Med. Genet. A* *124A*, 35–39.
- Fakharzadeh, S.S., Trusko, S.P., and George, D.L. (1991). Tumorigenic potential associated with enhanced expression of a gene that is amplified in a mouse tumor cell line. *EMBO J.* *10*, 1565–1569.
- Fan, C., and Wang, X. (2017). Mdm2 Splice isoforms regulate the p53/Mdm2/Mdm4 regulatory circuit via RING domain-mediated ubiquitination of p53 and Mdm4. *Cell Cycle* *16*, 660–664.
- Fargo, J.H., Kratz, C.P., Giri, N., Savage, S.A., Wong, C., Backer, K., Alter, B.P., and Glader, B. (2013). Erythrocyte adenosine deaminase: diagnostic value for Diamond-Blackfan anaemia. *Br. J. Haematol.* *160*, 547–554.
- Farrar, J.E., and Dahl, N. (2011). Untangling the phenotypic heterogeneity of Diamond Blackfan anemia. *Semin. Hematol.* *48*, 124–135.
- Farrar, J.E., Nater, M., Caywood, E., McDevitt, M.A., Kowalski, J., Takemoto, C.M., Talbot, C.C., Meltzer, P., Esposito, D., Beggs, A.H., et al. (2008). Abnormalities of the large ribosomal subunit protein, Rpl35a, in Diamond-Blackfan anemia. *Blood* *112*, 1582–1592.
- Farrar, J.E., Vlachos, A., Atsidaftos, E., Carlson-Donohoe, H., Markello, T.C., Arceci, R.J., Ellis, S.R., Lipton, J.M., and Bodine, D.M. (2011). Ribosomal protein gene deletions in Diamond-Blackfan anemia. *Blood* *118*, 6943–6951.
- Feng, Z., Zhang, C., Kang, H.-J., Sun, Y., Wang, H., Naqvi, A., Frank, A.K., Rosenwaks, Z., Murphy, M.E., Levine, A.J., et al. (2011). Regulation of female reproduction by p53 and its family members. *FASEB J.* *25*, 2245–2255.
- Finch, A.J., Hilcenko, C., Basse, N., Drynan, L.F., Goyenechea, B., Menne, T.F., González Fernández, A., Simpson, P., D’Santos, C.S., Arends, M.J., et al. (2011). Uncoupling of GTP hydrolysis from eIF6 release on the ribosome causes Shwachman-Diamond syndrome. *Genes Dev.* *25*, 917–929.
- Fischer, M., Steiner, L., and Engeland, K. (2014). The transcription factor p53: not a repressor, solely an activator. *Cell Cycle* *13*, 3037–3058.
- Fischer, M., Grossmann, P., Padi, M., and DeCaprio, J.A. (2016). Integration of TP53, DREAM, MMB-FOXM1 and RB-E2F target gene analyses identifies cell cycle gene regulatory networks. *Nucleic Acids Res.* *44*, 6070–6086.
- Fok, W.C., Niero, E.L. de O., Dege, C., Brenner, K.A., Sturgeon, C.M., and Batista, L.F.Z. (2017). p53 Mediates Failure of Human Definitive Hematopoiesis in Dyskeratosis Congenita. *Stem Cell Reports* *9*, 409–418.
- Frank, A.K., Leu, J.I.-J., Zhou, Y., Devarajan, K., Nedelko, T., Klein-Szanto, A., Hollstein, M., and Murphy, M.E. (2011). The codon 72 polymorphism of p53 regulates interaction with NF- κ B and transactivation of genes involved in immunity and inflammation. *Mol. Cell. Biol.* *31*, 1201–1213.
- Fridman, J.S., Hernando, E., Hemann, M.T., de Stanchina, E., Cordon-Cardo, C., and Lowe, S.W. (2003). Tumor promotion by Mdm2 splice variants unable to bind p53. *Cancer Res.* *63*, 5703–5706.
- Gadea, G., Arsic, N., Fernandes, K., Diot, A., Jorruiz, S.M., Abdallah, S., Meuray, V., Vinot, S., Anguille, C., Remenyi, J., et al. (2016). TP53 drives invasion through expression of its Δ 133p53 β variant. *Elife* *5*.

- Gajjar, M., Candeias, M.M., Malbert-Colas, L., Mazars, A., Fujita, J., Olivares-Illana, V., and Fåhræus, R. (2012). The p53 mRNA-Mdm2 interaction controls Mdm2 nuclear trafficking and is required for p53 activation following DNA damage. *Cancer Cell* 21, 25–35.
- Gamper, A.M., Kim, J., and Roeder, R.G. (2009). The STAGA subunit ADA2b is an important regulator of human GCN5 catalysis. *Mol. Cell. Biol.* 29, 266–280.
- Garaycochea, J.I., and Patel, K.J. (2014). Why does the bone marrow fail in Fanconi anemia? *Blood* 123, 26–34.
- García-Cao, I., García-Cao, M., Martín-Caballero, J., Criado, L.M., Klatt, P., Flores, J.M., Weill, J.-C., Blasco, M.A., and Serrano, M. (2002). ‘Super p53’ mice exhibit enhanced DNA damage response, are tumor resistant and age normally. *EMBO J* 21, 6225–6235.
- Gembarska, A., Luciani, F., Fedele, C., Russell, E.A., Dewaele, M., Villar, S., Zwolinska, A., Haupt, S., de Lange, J., Yip, D., et al. (2012). MDM4 is a key therapeutic target in cutaneous melanoma. *Nat. Med.* 18, 1239–1247.
- Gemignani, F., Moreno, V., Landi, S., Moullan, N., Chabrier, A., Gutiérrez-Enríquez, S., Hall, J., Guino, E., Peinado, M.A., Capella, G., et al. (2004). A TP53 polymorphism is associated with increased risk of colorectal cancer and with reduced levels of TP53 mRNA. *Oncogene* 23, 1954–1956.
- Geyer, R.K., Yu, Z.K., and Maki, C.G. (2000). The MDM2 RING-finger domain is required to promote p53 nuclear export. *Nat. Cell Biol.* 2, 569–573.
- Gilkes, D.M., Chen, L., and Chen, J. (2006). MDMX regulation of p53 response to ribosomal stress. *EMBO J.* 25, 5614–5625.
- Gilkes, D.M., Pan, Y., Coppola, D., Yeatman, T., Reuther, G.W., and Chen, J. (2008). Regulation of MDMX expression by mitogenic signaling. *Mol. Cell. Biol.* 28, 1999–2010.
- Glader, B.E., Backer, K., and Diamond, L.K. (1983). Elevated erythrocyte adenosine deaminase activity in congenital hypoplastic anemia. *N. Engl. J. Med.* 309, 1486–1490.
- Global Burden of Disease Cancer Collaboration, Fitzmaurice, C., Abate, D., Abbasi, N., Abbastabar, H., Abd-Allah, F., Abdel-Rahman, O., Abdelalim, A., Abdoli, A., Abdollahpour, I., et al. (2019). Global, Regional, and National Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived With Disability, and Disability-Adjusted Life-Years for 29 Cancer Groups, 1990 to 2017: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study. *JAMA Oncol.*
- Glusker, G., Touzot, F., Revy, P., Tzfati, Y., and Savage, S.A. (2015). Unraveling the pathogenesis of Hoyeraal-Hreidarsson syndrome, a complex telomere biology disorder. *Br. J. Haematol.* 170, 457–471.
- Goldberg, Z., Vogt Sionov, R., Berger, M., Zwang, Y., Perets, R., Van Etten, R.A., Oren, M., Taya, Y., and Haupt, Y. (2002). Tyrosine phosphorylation of Mdm2 by c-Abl: implications for p53 regulation. *EMBO J.* 21, 3715–3727.
- Gonzalez, K.D., Noltner, K.A., Buzin, C.H., Gu, D., Wen-Fong, C.Y., Nguyen, V.Q., Han, J.H., Lowstuter, K., Longmate, J., Sommer, S.S., et al. (2009). Beyond Li Fraumeni Syndrome: clinical characteristics of families with p53 germline mutations. *J. Clin. Oncol.* 27, 1250–1256.
- Gottlieb, E., Haffner, R., King, A., Asher, G., Gruss, P., Lonai, P., and Oren, M. (1997). Transgenic mouse model for studying the transcriptional activity of the p53 protein: age- and tissue-dependent changes in radiation-induced activation during embryogenesis. *EMBO J.* 16, 1381–1390.
- Grier, J.D., Xiong, S., Elizondo-Fraire, A.C., Parant, J.M., and Lozano, G. (2006). Tissue-specific differences of p53 inhibition by Mdm2 and Mdm4. *Mol. Cell. Biol.* 26, 192–198.

- Gripp, K.W., Curry, C., Olney, A.H., Sandoval, C., Fisher, J., Chong, J.X.-L., UW Center for Mendelian Genomics, Pilchman, L., Sahraoui, R., Stabley, D.L., et al. (2014). Diamond-Blackfan anemia with mandibulofacial dystostosis is heterogeneous, including the novel DBA genes TSR2 and RPS28. *Am. J. Med. Genet. A* *164A*, 2240–2249.
- Gu, J., Kawai, H., Nie, L., Kitao, H., Wiederschain, D., Jochemsen, A.G., Parant, J., Lozano, G., and Yuan, Z.-M. (2002). Mutual dependence of MDM2 and MDMX in their functional inactivation of p53. *J. Biol. Chem.* *277*, 19251–19254.
- Gu, L., Zhu, N., Zhang, H., Durden, D.L., Feng, Y., and Zhou, M. (2009). Regulation of XIAP translation and induction by MDM2 following irradiation. *Cancer Cell* *15*, 363–375.
- Hainaut, P., and Hollstein, M. (2000). p53 and human cancer: the first ten thousand mutations. *Adv. Cancer Res.* *77*, 81–137.
- Hamard, P.-J., Barthelery, N., Hogstad, B., Mungamuri, S.K., Tonnessen, C.A., Carvajal, L.A., Senturk, E., Gillespie, V., Aaronson, S.A., Merad, M., et al. (2013). 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.
- Han, X., Garcia-Manero, G., McDonnell, T.J., Lozano, G., Medeiros, L.J., Xiao, L., Rosner, G., Nguyen, M., Fernandez, M., Valentin-Vega, Y.A., et al. (2007). HDM4 (HDMX) is widely expressed in adult pre-B acute lymphoblastic leukemia and is a potential therapeutic target. *Mod. Pathol.* *20*, 54–62.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* *144*, 646–674.
- Hanel, W., Marchenko, N., Xu, S., Yu, S.X., Weng, W., and Moll, U. (2013). Two hot spot mutant p53 mouse models display differential gain of function in tumorigenesis. *Cell Death Differ.* *20*, 898–909.
- Harley, C.B., Futcher, A.B., and Greider, C.W. (1990). Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* *345*, 458–460.
- Hart, J., and Miriyala, K. (2017). Neural tube defects in Waardenburg syndrome: A case report and review of the literature. *Am. J. Med. Genet. A* *173*, 2472–2477.
- Hasegawa, M., Zhang, Y., Niibe, H., Terry, N.H., and Meistrich, M.L. (1998). Resistance of differentiating spermatogonia to radiation-induced apoptosis and loss in p53-deficient mice. *Radiat. Res.* *149*, 263–270.
- Hashemi, M., Sanaei, S., Hashemi, S.M., Eskandari, E., and Bahari, G. (2018). Association of Single Nucleotide Polymorphisms of the MDM4 Gene With the Susceptibility to Breast Cancer in a Southeast Iranian Population Sample. *Clin. Breast Cancer* *18*, e883–e891.
- Haupt, Y., Maya, R., Kazaz, A., and Oren, M. (1997). Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature* *387*, 296–299.
- Hira, A., Yoshida, K., Sato, K., Okuno, Y., Shiraishi, Y., Chiba, K., Tanaka, H., Miyano, S., Shimamoto, A., Tahara, H., et al. (2015). Mutations in the gene encoding the E2 conjugating enzyme UBE2T cause Fanconi anemia. *Am. J. Hum. Genet.* *96*, 1001–1007.
- 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.
- Hoever, M., Herrmann, C., and Montenarh, M. (1997). Biochemical properties of *Xenopus laevis* p53. *Int. J. Oncol.* *10*, 195–203.

- Honda, R., and Yasuda, H. (1999). Association of p19(ARF) with Mdm2 inhibits ubiquitin ligase activity of Mdm2 for tumor suppressor p53. *EMBO J.* *18*, 22–27.
- Honda, R., Tanaka, H., and Yasuda, H. (1997). Oncoprotein MDM2 is a ubiquitin ligase E3 for tumor suppressor p53. *FEBS Lett.* *420*, 25–27.
- Hu, W. (2009). The role of p53 gene family in reproduction. *Cold Spring Harb Perspect Biol* *1*, a001073.
- Hu, W., Feng, Z., Ma, L., Wagner, J., Rice, J.J., Stolovitzky, G., and Levine, A.J. (2007a). A single nucleotide polymorphism in the MDM2 gene disrupts the oscillation of p53 and MDM2 levels in cells. *Cancer Res.* *67*, 2757–2765.
- Hu, W., Feng, Z., Teresky, A.K., and Levine, A.J. (2007b). p53 regulates maternal reproduction through LIF. *Nature* *450*, 721–724.
- Hu, W., Feng, Z., Atwal, G.S., and Levine, A.J. (2008). p53: a new player in reproduction. *Cell Cycle* *7*, 848–852.
- Hu, W., Zheng, T., and Wang, J. (2011). Regulation of Fertility by the p53 Family Members. *Genes Cancer* *2*, 420–430.
- Huang, L., Yan, Z., Liao, X., Li, Y., Yang, J., Wang, Z.-G., Zuo, Y., Kawai, H., Shadfan, M., Ganapathy, S., et al. (2011). The p53 inhibitors MDM2/MDMX complex is required for control of p53 activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* *108*, 12001–12006.
- Huszno, J., and Grzybowska, E. (2018). TP53 mutations and SNPs as prognostic and predictive factors in patients with breast cancer. *Oncol Lett* *16*, 34–40.
- In, K., Zaini, M.A., Müller, C., Warren, A.J., von Lindern, M., and Calkhoven, C.F. (2016). Shwachman-Bodian-Diamond syndrome (SBDS) protein deficiency impairs translation re-initiation from C/EBP α and C/EBP β mRNAs. *Nucleic Acids Res.* *44*, 4134–4146.
- Inoue, K., and Fry, E.A. (2014). Alterations of p63 and p73 in human cancers. *Subcell. Biochem.* *85*, 17–40.
- Ito, A., Lai, C.-H., Zhao, X., Saito, S., Hamilton, M.H., Appella, E., and Yao, T.-P. (2001). p300/CBP-mediated p53 acetylation is commonly induced by p53-activating agents and inhibited by MDM2. *EMBO J* *20*, 1331–1340.
- Iwakuma, T., and Lozano, G. (2003). MDM2, an introduction. *Mol. Cancer Res.* *1*, 993–1000.
- Jaber, S., Toufektchan, E., Lejour, V., Bardot, B., and Toledo, F. (2016). p53 downregulates the Fanconi anaemia DNA repair pathway. *Nat Commun* *7*, 11091.
- Jackson, S.P., and Bartek, J. (2009). The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature* *461*, 1071–1078.
- Jain, A.K., and Barton, M.C. (2010). Making sense of ubiquitin ligases that regulate p53. *Cancer Biol. Ther.* *10*, 665–672.
- Jain, A.K., and Barton, M.C. (2018). p53: emerging roles in stem cells, development and beyond. *Development* *145*.
- Jin, Y., Zeng, S.X., Lee, H., and Lu, H. (2004). MDM2 mediates p300/CREB-binding protein-associated factor ubiquitination and degradation. *J. Biol. Chem.* *279*, 20035–20043.
- Joerger, A.C., and Fersht, A.R. (2008). Structural biology of the tumor suppressor p53. *Annu. Rev. Biochem.* *77*, 557–582.

- Joerger, A.C., and Fersht, A.R. (2010). The tumor suppressor p53: from structures to drug discovery. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2, a000919.
- Joksic, I., Vujic, D., Guc-Scekic, M., Leskovac, A., Petrovic, S., Ojani, M., Trujillo, J.P., Surralles, J., Zivkovic, M., Stankovic, A., et al. (2012). Dysfunctional telomeres in primary cells from Fanconi anemia FANCD2 patients. *Genome Integr* 3, 6.
- Jones, N.C., Lynn, M.L., Gaudenz, K., Sakai, D., Aoto, K., Rey, J.-P., Glynn, E.F., Ellington, L., Du, C., Dixon, J., et al. (2008). Prevention of the neurocristopathy Treacher Collins syndrome through inhibition of p53 function. *Nat Med* 14, 125–133.
- Jones, S.N., Roe, A.E., Donehower, L.A., and Bradley, A. (1995). Rescue of embryonic lethality in Mdm2-deficient mice by absence of p53. *Nature* 378, 206–208.
- Jones, S.N., Hancock, A.R., Vogel, H., Donehower, L.A., and Bradley, A. (1998). Overexpression of Mdm2 in mice reveals a p53-independent role for Mdm2 in tumorigenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 15608–15612.
- Jongmans, M.C.J., Admiraal, R.J., van der Donk, K.P., Vissers, L.E.L.M., Baas, A.F., Kapusta, L., van Hagen, J.M., Donnai, D., de Ravel, T.J., Veltman, J.A., et al. (2006). CHARGE syndrome: the phenotypic spectrum of mutations in the CHD7 gene. *J. Med. Genet.* 43, 306–314.
- Joo, H.M., Kim, J.Y., Jeong, J.B., Seong, K.M., Nam, S.Y., Yang, K.H., Kim, C.S., Kim, H.S., Jeong, M., An, S., et al. (2011). Ret finger protein 2 enhances ionizing radiation-induced apoptosis via degradation of AKT and MDM2. *Eur. J. Cell Biol.* 90, 420–431.
- Kaghad, M., Bonnet, H., Yang, A., Creancier, L., Biscan, J.C., Valent, A., Minty, A., Chalon, P., Lelias, J.M., Dumont, X., et al. (1997). Monoallelically expressed gene related to p53 at 1p36, a region frequently deleted in neuroblastoma and other human cancers. *Cell* 90, 809–819.
- Kamihara, J., Rana, H.Q., and Garber, J.E. (2014). Germline TP53 mutations and the changing landscape of Li-Fraumeni syndrome. *Hum. Mutat.* 35, 654–662.
- Kampen, K.R., Sulima, S.O., Vereecke, S., and De Keersmaecker, K. (2020). Hallmarks of ribosomopathies. *Nucleic Acids Res.* 48, 1013–1028.
- Kang, H.-J., Feng, Z., Sun, Y., Atwal, G., Murphy, M.E., Rebbeck, T.R., Rosenwaks, Z., Levine, A.J., and Hu, W. (2009). Single-nucleotide polymorphisms in the p53 pathway regulate fertility in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 9761–9766.
- Karakostis, K., Ponnuswamy, A., Fusée, L.T.S., Bailly, X., Laguerre, L., Worall, E., Vojtesek, B., Nylander, K., and Fähræus, R. (2016). p53 mRNA and p53 Protein Structures Have Evolved Independently to Interact with MDM2. *Mol. Biol. Evol.* 33, 1280–1292.
- Karlseder, J., Broccoli, D., Dai, Y., Hardy, S., and de Lange, T. (1999). p53- and ATM-dependent apoptosis induced by telomeres lacking TRF2. *Science* 283, 1321–1325.
- Karni-Schmidt, O., Lokshin, M., and Prives, C. (2016). The Roles of MDM2 and MDMX in Cancer. *Annu Rev Pathol* 11, 617–644.
- Kashiyama, K., Nakazawa, Y., Pilz, D.T., Guo, C., Shimada, M., Sasaki, K., Fawcett, H., Wing, J.F., Lewin, S.O., Carr, L., et al. (2013). Malfunction of nuclease ERCC1-XPF results in diverse clinical manifestations and causes Cockayne syndrome, xeroderma pigmentosum, and Fanconi anemia. *Am. J. Hum. Genet.* 92, 807–819.
- Kastan, M.B., Onyekwere, O., Sidransky, D., Vogelstein, B., and Craig, R.W. (1991). Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res.* 51, 6304–6311.

- Kawai, H., Wiederschain, D., and Yuan, Z.-M. (2003). Critical contribution of the MDM2 acidic domain to p53 ubiquitination. *Mol. Cell. Biol.* 23, 4939–4947.
- Kawai, H., Lopez-Pajares, V., Kim, M.M., Wiederschain, D., and Yuan, Z.-M. (2007). RING domain-mediated interaction is a requirement for MDM2's E3 ligase activity. *Cancer Res.* 67, 6026–6030.
- Kay, C., Jeyendran, R.S., and Coulam, C.B. (2006). p53 tumour suppressor gene polymorphism is associated with recurrent implantation failure. *Reprod. Biomed. Online* 13, 492–496.
- Khan, M.H., Khalil, A., and Rashid, H. (2015). Evaluation of the p53 Arg72Pro polymorphism and its association with cancer risk: a HuGE review and meta-analysis. *Genet Res (Camb)* 97, e7.
- Khan, S., Phulukdaree, A., Ramkaran, P., Moodley, D., and Chuturgoon, A.A. (2016). The Arg72 variant of the p53 functional polymorphism (rs1042522) is associated with coronary artery disease in young South Africans of Indian ancestry. *Gene* 593, 261–264.
- Khoury, M.P., and Bourdon, J.-C. (2010). The isoforms of the p53 protein. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2, a000927.
- Khoury, K., Popowicz, G.M., Holak, T.A., and Dömling, A. (2011). The p53-MDM2/MDMX axis - A chemotype perspective. *Medchemcomm* 2, 246–260.
- Kim, M.P., Zhang, Y., and Lozano, G. (2015). Mutant p53: Multiple Mechanisms Define Biologic Activity in Cancer. *Front Oncol* 5, 249.
- Kitami, K., Kitami, M., Kaku, M., Wang, B., and Komatsu, Y. (2018). BRCA1 and BRCA2 tumor suppressors in neural crest cells are essential for craniofacial bone development. *PLoS Genet.* 14, e1007340.
- Kitayner, M., Rozenberg, H., Kessler, N., Rabinovich, D., Shaulov, L., Haran, T.E., and Shakked, Z. (2006). Structural basis of DNA recognition by p53 tetramers. *Mol. Cell* 22, 741–753.
- Knight, S.W., Heiss, N.S., Vulliamy, T.J., Aalfs, C.M., McMahon, C., Richmond, P., Jones, A., Hennekam, R.C., Poustka, A., Mason, P.J., et al. (1999). Unexplained aplastic anaemia, immunodeficiency, and cerebellar hypoplasia (Hoyeraal-Hreidarsson syndrome) due to mutations in the dyskeratosis congenita gene, DKC1. *Br. J. Haematol.* 107, 335–339.
- Komarova, E.A., Chernov, M.V., Franks, R., Wang, K., Armin, G., Zelnick, C.R., Chin, D.M., Bacus, S.S., Stark, G.R., and Gudkov, A.V. (1997). Transgenic mice with p53-responsive lacZ: p53 activity varies dramatically during normal development and determines radiation and drug sensitivity in vivo. *EMBO J.* 16, 1391–1400.
- Kon, N., Kobayashi, Y., Li, M., Brooks, C.L., Ludwig, T., and Gu, W. (2010). Inactivation of HAUSP in vivo modulates p53 function. *Oncogene* 29, 1270–1279.
- Kon, N., Wang, D., and Gu, W. (2019). Loss of SET reveals both the p53-dependent and the p53-independent functions in vivo. *Cell Death Dis* 10, 237.
- Kress, M., May, E., Cassingena, R., and May, P. (1979). Simian virus 40-transformed cells express new species of proteins precipitable by anti-simian virus 40 tumor serum. *J. Virol.* 31, 472–483.
- Kruiswijk, F., Labuschagne, C.F., and Vousden, K.H. (2015). p53 in survival, death and metabolic health: a lifeguard with a licence to kill. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 16, 393–405.
- 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. U.S.A.* 102, 10188–10193.

- Kubbutat, M.H., Jones, S.N., and Vousden, K.H. (1997). Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature* 387, 299–303.
- Kulikov, R., Letienne, J., Kaur, M., Grossman, S.R., Arts, J., and Blattner, C. (2010). Mdm2 facilitates the association of p53 with the proteasome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 10038–10043.
- Kung, C.-P., Leu, J.I.-J., Basu, S., Khaku, S., Anokye-Danso, F., Liu, Q., George, D.L., Ahima, R.S., and Murphy, M.E. (2016). The P72R Polymorphism of p53 Predisposes to Obesity and Metabolic Dysfunction. *Cell Rep* 14, 2413–2425.
- Lahav, G., Rosenfeld, N., Sigal, A., Geva-Zatorsky, N., Levine, A.J., Elowitz, M.B., and Alon, U. (2004). Dynamics of the p53-Mdm2 feedback loop in individual cells. *Nat. Genet.* 36, 147–150.
- Landowski, M., O'Donohue, M.-F., Buros, C., Ghazvinian, R., Montel-Lehry, N., Vlachos, A., Sieff, C.A., Newburger, P.E., Niewiadomska, E., Matysiak, M., et al. (2013). Novel deletion of RPL15 identified by array-comparative genomic hybridization in Diamond-Blackfan anemia. *Hum. Genet.* 132, 1265–1274.
- Lane, D.P. (1992). Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* 358, 15–16.
- Lane, D., and Levine, A. (2010). p53 Research: the past thirty years and the next thirty years. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2, a000893.
- Lane, D.P., and Crawford, L.V. (1979). T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature* 278, 261–263.
- Langerød, A., Bukholm, I.R.K., Bregård, A., Lønning, P.E., Andersen, T.I., Rognum, T.O., Meling, G.I., Lothe, R.A., and Børresen-Dale, A.-L. (2002). The TP53 codon 72 polymorphism may affect the function of TP53 mutations in breast carcinomas but not in colorectal carcinomas. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 11, 1684–1688.
- Laptenko, O., and Prives, C. (2006). Transcriptional regulation by p53: one protein, many possibilities. *Cell Death Differ.* 13, 951–961.
- Lau, M.C.C., Kwong, E.M.L., Lai, K.P., Li, J.-W., Ho, J.C.H., Chan, T.-F., Wong, C.K.C., Jiang, Y.-J., and Tse, W.K.F. (2016). Pathogenesis of POLR1C-dependent Type 3 Treacher Collins Syndrome revealed by a zebrafish model. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1862, 1147–1158.
- Laurie, N.A., Donovan, S.L., Shih, C.-S., Zhang, J., Mills, N., Fuller, C., Teunisse, A., Lam, S., Ramos, Y., Mohan, A., et al. (2006). Inactivation of the p53 pathway in retinoblastoma. *Nature* 444, 61–66.
- Lavin, M.F., and Gueven, N. (2006). The complexity of p53 stabilization and activation. *Cell Death Differ.* 13, 941–950.
- Lee, J.H., Lee, E., Park, J., Kim, E., Kim, J., and Chung, J. (2003). In vivo p53 function is indispensable for DNA damage-induced apoptotic signaling in *Drosophila*. *FEBS Lett.* 550, 5–10.
- Lee, Y., Choi, I., Kim, J., and Kim, K. (2016). DNA damage to human genetic disorders with neurodevelopmental defects. *J Genet Med* 13, 1–13.
- Lessel, D., Wu, D., Trujillo, C., Ramezani, T., Lessel, I., Alwasiyah, M.K., Saha, B., Hisama, F.M., Rading, K., Goebel, I., et al. (2017). Dysfunction of the MDM2/p53 axis is linked to premature aging. *J. Clin. Invest.* 127, 3598–3608.
- Levine, A.J., Hu, W., and Feng, Z. (2006). The P53 pathway: what questions remain to be explored? *Cell Death Differ.* 13, 1027–1036.

- Levine, A.J., Tomasini, R., McKeon, F.D., Mak, T.W., and Melino, G. (2011). The p53 family: guardians of maternal reproduction. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *12*, 259–265.
- Li, F.P., Fraumeni, J.F., Mulvihill, J.J., Blattner, W.A., Dreyfus, M.G., Tucker, M.A., and Miller, R.W. (1988). A cancer family syndrome in twenty-four kindreds. *Cancer Res.* *48*, 5358–5362.
- Li, M., Chen, D., Shiloh, A., Luo, J., Nikolaev, A.Y., Qin, J., and Gu, W. (2002). Deubiquitination of p53 by HAUSP is an important pathway for p53 stabilization. *Nature* *416*, 648–653.
- Li, T., Kon, N., Jiang, L., Tan, M., Ludwig, T., Zhao, Y., Baer, R., and Gu, W. (2012). Tumor suppression in the absence of p53-mediated cell-cycle arrest, apoptosis, and senescence. *Cell* *149*, 1269–1283.
- Li, X., Wilson, A.F., Du, W., and Pang, Q. (2018). Cell-Cycle-Specific Function of p53 in Fanconi Anemia Hematopoietic Stem and Progenitor Cell Proliferation. *Stem Cell Reports* *10*, 339–346.
- Liang, M., Han, X., Vadhan-Raj, S., Nguyen, M., Zhang, Y.H., Fernandez, M., Drakos, E., Konoplev, S.N., Yin, C.C., Miranda, R.N., et al. (2010). HDM4 is overexpressed in mantle cell lymphoma and its inhibition induces p21 expression and apoptosis. *Mod. Pathol.* *23*, 381–391.
- Lieberman, P.M. (2016). Retrotransposon-derived p53 binding sites enhance telomere maintenance and genome protection. *Bioessays* *38*, 943–949.
- Lim, D.S., and Hasty, P. (1996). A mutation in mouse rad51 results in an early embryonic lethal that is suppressed by a mutation in p53. *Mol. Cell. Biol.* *16*, 7133–7143.
- Lin, J., Chen, J., Elenbaas, B., and Levine, A.J. (1994). 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*, 1235–1246.
- Linares, L.K., Kiernan, R., Triboulet, R., Chable-Bessia, C., Latreille, D., Cuvier, O., Lacroix, M., Le Cam, L., Coux, O., and Benkirane, M. (2007). Intrinsic ubiquitination activity of PCAF controls the stability of the oncoprotein Hdm2. *Nat. Cell Biol.* *9*, 331–338.
- Lindsley, R.C., Saber, W., Mar, B.G., Redd, R., Wang, T., Haagenon, M.D., Grauman, P.V., Hu, Z.-H., Spellman, S.R., Lee, S.J., et al. (2017). Prognostic Mutations in Myelodysplastic Syndrome after Stem-Cell Transplantation. *N. Engl. J. Med.* *376*, 536–547.
- Linke, K., Mace, P.D., Smith, C.A., Vaux, D.L., Silke, J., and Day, C.L. (2008). Structure of the MDM2/MDMX RING domain heterodimer reveals dimerization is required for their ubiquitylation in trans. *Cell Death Differ.* *15*, 841–848.
- Linzer, D.I., and Levine, A.J. (1979). Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell* *17*, 43–52.
- Lipton, J.M., and Ellis, S.R. (2009). Diamond-Blackfan anemia: diagnosis, treatment, and molecular pathogenesis. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* *23*, 261–282.
- Liu, D., Ou, L., Clemenson, G.D., 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.
- 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, T.X., Howlett, N.G., Deng, M., Langenau, D.M., Hsu, K., Rhodes, J., Kanki, J.P., D’Andrea, A.D., and Look, A.T. (2003). Knockdown of zebrafish Fancd2 causes developmental abnormalities via p53-dependent apoptosis. *Dev. Cell* *5*, 903–914.

- Livera, G., Petre-Lazar, B., Guerin, M.-J., Trautmann, E., Coffigny, H., and Habert, R. (2008). p53 null mutation protects mouse oocytes from radio-induced apoptosis. *Reproduction* *135*, 3–12.
- Lohrum, M.A.E., Ludwig, R.L., Kubbutat, M.H.G., Hanlon, M., and Vousden, K.H. (2003). Regulation of HDM2 activity by the ribosomal protein L11. *Cancer Cell* *3*, 577–587.
- Longerich, S., Li, J., Xiong, Y., Sung, P., and Kupfer, G.M. (2014). Stress and DNA repair biology of the Fanconi anemia pathway. *Blood* *124*, 2812–2819.
- López-Otín, C., Blasco, M.A., Partridge, L., Serrano, M., and Kroemer, G. (2013). The hallmarks of aging. *Cell* *153*, 1194–1217.
- Lozano, G. (2010). Mouse models of p53 functions. *Cold Spring Harb Perspect Biol* *2*, a001115.
- Lu, Z., Zhang, H., Tao, Y., Li, X., and Li, G. (2017). MDM4 genetic variants predict HPV16-positive tumors of patients with squamous cell carcinoma of the oropharynx. *Oncotarget* *8*, 86710–86717.
- MacCallum, D.E., Hupp, T.R., Midgley, C.A., Stuart, D., Campbell, S.J., Harper, A., Walsh, F.S., Wright, E.G., Balmain, A., Lane, D.P., et al. (1996). The p53 response to ionising radiation in adult and developing murine tissues. *Oncogene* *13*, 2575–2587.
- Mairinger, F.D., Walter, R.F.H., Ting, S., Vollbrecht, C., Kollmeier, J., Griff, S., Hager, T., Mairinger, T., Christoph, D.C., Theegarten, D., et al. (2014). Mdm2 protein expression is strongly associated with survival in malignant pleural mesothelioma. *Future Oncol* *10*, 995–1005.
- Malkin, D. (1993). p53 and the Li-Fraumeni syndrome. *Cancer Genet. Cytogenet.* *66*, 83–92.
- Malkin, D., Li, F.P., Strong, L.C., Fraumeni, J.F., Nelson, C.E., Kim, D.H., Kassel, J., Gryka, M.A., Bischoff, F.Z., and Tainsky, M.A. (1990). Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. *Science* *250*, 1233–1238.
- Maltzman, W., and Czyzyk, L. (1984). UV irradiation stimulates levels of p53 cellular tumor antigen in nontransformed mouse cells. *Mol. Cell. Biol.* *4*, 1689–1694.
- Mamrak, N.E., Shimamura, A., and Howlett, N.G. (2017). Recent discoveries in the molecular pathogenesis of the inherited bone marrow failure syndrome Fanconi anemia. *Blood Rev.* *31*, 93–99.
- Mancini, F., Di Conza, G., and Moretti, F. (2009a). MDM4 (MDMX) and its Transcript Variants. *Curr. Genomics* *10*, 42–50.
- Mancini, F., Di Conza, G., Pellegrino, M., Rinaldo, C., Prodosmo, A., Giglio, S., D’Agnano, I., Florenzano, F., Felicioni, L., Buttitta, F., et al. (2009b). MDM4 (MDMX) localizes at the mitochondria and facilitates the p53-mediated intrinsic-apoptotic pathway. *EMBO J.* *28*, 1926–1939.
- Manfredi, J.J. (2010). The Mdm2-p53 relationship evolves: Mdm2 swings both ways as an oncogene and a tumor suppressor. *Genes Dev.* *24*, 1580–1589.
- Mao, H., McMahon, J.J., Tsai, Y.-H., Wang, Z., and Silver, D.L. (2016). Haploinsufficiency for Core Exon Junction Complex Components Disrupts Embryonic Neurogenesis and Causes p53-Mediated Microcephaly. *PLoS Genet.* *12*, e1006282.
- Marcel, V., Dichtel-Danjoy, M.-L., Sagne, C., Hafsi, H., Ma, D., Ortiz-Cuaran, S., Olivier, M., Hall, J., Mollereau, B., Hainaut, P., et al. (2011). Biological functions of p53 isoforms through evolution: lessons from animal and cellular models. *Cell Death Differ.* *18*, 1815–1824.
- Marine, J.-C., Francoz, S., Maetens, M., Wahl, G., Toledo, F., and Lozano, G. (2006). Keeping p53 in check: essential and synergistic functions of Mdm2 and Mdm4. *Cell Death Differ.* *13*, 927–934.

- Martín-Caballero, J., Flores, J.M., García-Palencia, P., and Serrano, M. (2001). Tumor susceptibility of p21(Waf1/Cip1)-deficient mice. *Cancer Res.* *61*, 6234–6238.
- Matijasevic, Z., Krzywicka-Racka, A., Sluder, G., and Jones, S.N. (2008). MdmX regulates transformation and chromosomal stability in p53-deficient cells. *Cell Cycle* *7*, 2967–2973.
- Maya, R., Balass, M., Kim, S.T., Shkedy, D., Leal, J.F., Shifman, O., Moas, M., Buschmann, T., Ronai, Z., Shiloh, Y., et al. (2001). ATM-dependent phosphorylation of Mdm2 on serine 395: role in p53 activation by DNA damage. *Genes Dev.* *15*, 1067–1077.
- Mayo, L.D., and Donner, D.B. (2001). A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway promotes translocation of Mdm2 from the cytoplasm to the nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *98*, 11598–11603.
- Mayo, L.D., Turchi, J.J., and Berberich, S.J. (1997). Mdm-2 phosphorylation by DNA-dependent protein kinase prevents interaction with p53. *Cancer Res.* *57*, 5013–5016.
- McDonald-McGinn, D.M., Sullivan, K.E., Marino, B., Philip, N., Swillen, A., Vorstman, J.A.S., Zackai, E.H., Emanuel, B.S., Vermeesch, J.R., Morrow, B.E., et al. (2015). 22q11.2 deletion syndrome. *Nat Rev Dis Primers* *1*, 15071.
- 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.
- McMahon, J.J., Miller, E.E., and Silver, D.L. (2016). The exon junction complex in neural development and neurodevelopmental disease. *Int. J. Dev. Neurosci.* *55*, 117–123.
- Meek, D.W. (2015). Regulation of the p53 response and its relationship to cancer. *Biochem. J.* *469*, 325–346.
- Meek, D.W., and Anderson, C.W. (2009). Posttranslational modification of p53: cooperative integrators of function. *Cold Spring Harb Perspect Biol* *1*, a000950.
- Meetei, A.R., Levitus, M., Xue, Y., Medhurst, A.L., Zwaan, M., Ling, C., Rooimans, M.A., Bier, P., Hoatlin, M., Pals, G., et al. (2004). X-linked inheritance of Fanconi anemia complementation group B. *Nat. Genet.* *36*, 1219–1224.
- Mehta, P.A., and Tolar, J. (1993). Fanconi Anemia. In *GeneReviews®*, M.P. Adam, H.H. Ardinger, R.A. Pagon, S.E. Wallace, L.J. Bean, K. Stephens, and A. Amemiya, eds. (Seattle (WA): University of Washington, Seattle), p.
- 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.
- Meulmeester, E., Frenk, R., Stad, R., de Graaf, P., Marine, J.-C., Vousden, K.H., and Jochemsen, A.G. (2003). Critical role for a central part of Mdm2 in the ubiquitylation of p53. *Mol. Cell. Biol.* *23*, 4929–4938.
- 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.
- Migliorini, D., Danovi, D., Colombo, E., Carbone, R., Pelicci, P.G., and Marine, J.-C. (2002). Hdmx recruitment into the nucleus by Hdm2 is essential for its ability to regulate p53 stability and transactivation. *J. Biol. Chem.* *277*, 7318–7323.

- Mikolajczyk, M., Wirstlein, P., and Skrzypczak, J. (2007). The impact of leukemia inhibitory factor in uterine flushing on the reproductive potential of infertile women--a prospective study. *Am. J. Reprod. Immunol.* *58*, 65–74.
- Mills, A.A., Zheng, B., Wang, X.J., Vogel, H., Roop, D.R., and Bradley, A. (1999). p63 is a p53 homologue required for limb and epidermal morphogenesis. *Nature* *398*, 708–713.
- Mirabello, L., Macari, E.R., Jessop, L., Ellis, S.R., Myers, T., Giri, N., Taylor, A.M., McGrath, K.E., Humphries, J.M., Ballew, B.J., et al. (2014). Whole-exome sequencing and functional studies identify RPS29 as a novel gene mutated in multicase Diamond-Blackfan anemia families. *Blood* *124*, 24–32.
- Molchadsky, A., Rivlin, N., Brosh, R., Rotter, V., and Sarig, R. (2010). p53 is balancing development, differentiation and de-differentiation to assure cancer prevention. *Carcinogenesis* *31*, 1501–1508.
- Molina, B., Marchetti, F., Gómez, L., Ramos, S., Torres, L., Ortiz, R., Altamirano-Lozano, M., Carnevale, A., and Frias, S. (2015). Hydroxyurea induces chromosomal damage in G2 and enhances the clastogenic effect of mitomycin C in Fanconi anemia cells. *Environ. Mol. Mutagen.* *56*, 457–467.
- Momand, J., Zambetti, G.P., Olson, D.C., George, D., and Levine, A.J. (1992). The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell* *69*, 1237–1245.
- Momand, J., Jung, D., Wilczynski, S., and Niland, J. (1998). The MDM2 gene amplification database. *Nucleic Acids Res.* *26*, 3453–3459.
- Montes de Oca Luna, R., Wagner, D.S., and Lozano, G. (1995). Rescue of early embryonic lethality in mdm2-deficient mice by deletion of p53. *Nature* *378*, 203–206.
- Moon, D.H., Segal, M., Boyraz, B., Guinan, E., Hofmann, I., Cahan, P., Tai, A.K., and Agarwal, S. (2015). Poly(A)-specific ribonuclease (PARN) mediates 3'-end maturation of the telomerase RNA component. *Nat. Genet.* *47*, 1482–1488.
- Moore, L., Lu, X., Ghebranious, N., Tyner, S., and Donehower, L.A. (2007). Aging-Associated Truncated Form of p53 Interacts with Wild-Type p53 and Alters p53 Stability, Localization, and Activity. *Mech Ageing Dev* *128*, 717–730.
- Morgan, S.C., Lee, H.-Y., Relaix, F., Sandell, L.L., Levorse, J.M., and Loeken, M.R. (2008). Cardiac outflow tract septation failure in Pax3-deficient embryos is due to p53-dependent regulation of migrating cardiac neural crest. *Mech. Dev.* *125*, 757–767.
- Moyer, S.M., Larsson, C.A., and Lozano, G. (2017). Mdm proteins: critical regulators of embryogenesis and homeostasis. *J Mol Cell Biol.*
- Muller, P.A.J., and Vousden, K.H. (2013). p53 mutations in cancer. *Nat. Cell Biol.* *15*, 2–8.
- Muller, P.A.J., and Vousden, K.H. (2014). Mutant p53 in cancer: new functions and therapeutic opportunities. *Cancer Cell* *25*, 304–317.
- Myers, K.C., Davies, S.M., and Shimamura, A. (2013). Clinical and molecular pathophysiology of Shwachman-Diamond syndrome: an update. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* *27*, 117–128, ix.
- Nakamura, S., Roth, J.A., and Mukhopadhyay, T. (2000). Multiple lysine mutations in the C-terminal domain of p53 interfere with MDM2-dependent protein degradation and ubiquitination. *Mol. Cell. Biol.* *20*, 9391–9398.
- Newman, M., Sfaxi, R., Saha, A., Monchaud, D., Teulade-Fichou, M.-P., and Vagner, S. (2017). The G-Quadruplex-Specific RNA Helicase DHX36 Regulates p53 Pre-mRNA 3'-End Processing Following UV-Induced DNA Damage. *J. Mol. Biol.* *429*, 3121–3131.

- Nichols, K.E., Malkin, D., Garber, J.E., Fraumeni, J.F., and Li, F.P. (2001). Germ-line p53 mutations predispose to a wide spectrum of early-onset cancers. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* *10*, 83–87.
- Nigg, E.A., and Holland, A.J. (2018). Once and only once: mechanisms of centriole duplication and their deregulation in disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *19*, 297–312.
- Noack Watt, K.E., Achilleos, A., Neben, C.L., Merrill, A.E., and Trainor, P.A. (2016). The Roles of RNA Polymerase I and III Subunits Polr1c and Polr1d in Craniofacial Development and in Zebrafish Models of Treacher Collins Syndrome. *PLoS Genet* *12*.
- Okoro, D.R., Rosso, M., and Bargonetti, J. (2012). Splicing up mdm2 for cancer proteome diversity. *Genes Cancer* *3*, 311–319.
- Okoro, D.R., Arva, N., Gao, C., Polotskaia, A., Puente, C., Rosso, M., and Bargonetti, J. (2013). Endogenous human MDM2-C is highly expressed in human cancers and functions as a p53-independent growth activator. *PLoS ONE* *8*, e77643.
- Oliner, J.D., Kinzler, K.W., Meltzer, P.S., George, D.L., and Vogelstein, B. (1992). Amplification of a gene encoding a p53-associated protein in human sarcomas. *Nature* *358*, 80–83.
- de Oliveira, J.F., Sforça, M.L., Blumenschein, T.M.A., Goldfeder, M.B., Guimarães, B.G., Oliveira, C.C., Zanchin, N.I.T., and Zeri, A.-C. (2010). Structure, dynamics, and RNA interaction analysis of the human SBDS protein. *J. Mol. Biol.* *396*, 1053–1069.
- de Oliveira Reis, A.H., de Carvalho, I.N.S.R., de Sousa Damasceno, P.B., Ferman, S.E., Lucena, E., Lopez-Camelo, J.S., Seuánez, H.N., and Vargas, F.R. (2012). Influence of MDM2 and MDM4 on development and survival in hereditary retinoblastoma. *Pediatr Blood Cancer* *59*, 39–43.
- Olivier, M., Goldgar, D.E., Sodha, N., Ohgaki, H., Kleihues, P., Hainaut, P., and Eeles, R.A. (2003). Li-Fraumeni and related syndromes: correlation between tumor type, family structure, and TP53 genotype. *Cancer Res.* *63*, 6643–6650.
- Olivier, M., Hollstein, M., and Hainaut, P. (2010). TP53 mutations in human cancers: origins, consequences, and clinical use. *Cold Spring Harb Perspect Biol* *2*, a001008.
- Ollmann, M., Young, L.M., Di Como, C.J., Karim, F., Belvin, M., Robertson, S., Whittaker, K., Demsky, M., Fisher, W.W., Buchman, A., et al. (2000). Drosophila p53 is a structural and functional homolog of the tumor suppressor p53. *Cell* *101*, 91–101.
- Onel, K., and Cordon-Cardo, C. (2004). MDM2 and prognosis. *Mol. Cancer Res.* *2*, 1–8.
- Ortiz, G.J., and Lozano, G. (2018). SNPing away at mutant p53 activities. *Genes Dev.* *32*, 195–196.
- Ortiz, G.J., Li, Y., Post, S.M., Pant, V., Xiong, S., Larsson, C.A., El-Naggar, A.K., Johnson, D.G., and Lozano, G. (2018). Contrasting effects of an Mdm2 functional polymorphism on tumor phenotypes. *Oncogene* *37*, 332–340.
- O’Sullivan, R.J., and Karlseder, J. (2010). Telomeres: protecting chromosomes against genome instability. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *11*, 171–181.
- Ota, A., Nakao, H., Sawada, Y., Karnan, S., Wahiduzzaman, M., Inoue, T., Kobayashi, Y., Yamamoto, T., Ishii, N., Ohashi, T., et al. (2017). $\Delta 40p53\alpha$ suppresses tumor cell proliferation and induces cellular senescence in hepatocellular carcinoma cells. *J. Cell. Sci.* *130*, 614–625.
- Pan, Y., and Chen, J. (2003). MDM2 promotes ubiquitination and degradation of MDMX. *Mol. Cell. Biol.* *23*, 5113–5121.

- Pani, L., Horal, M., and Loeken, M.R. (2002). Rescue of neural tube defects in Pax-3-deficient embryos by p53 loss of function: implications for Pax-3- dependent development and tumorigenesis. *Genes Dev.* *16*, 676–680.
- Pankow, S., and Bamberger, C. (2007). The p53 tumor suppressor-like protein nvp63 mediates selective germ cell death in the sea anemone *Nematostella vectensis*. *PLoS ONE* *2*, e782.
- Pant, V., Xiong, S., Iwakuma, T., Quintás-Cardama, A., and Lozano, G. (2011). Heterodimerization of Mdm2 and Mdm4 is critical for regulating p53 activity during embryogenesis but dispensable for p53 and Mdm2 stability. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *108*, 11995–12000.
- Pant, V., Xiong, S., Jackson, J.G., Post, S.M., Abbas, H.A., Quintás-Cardama, A., Hamir, A.N., and Lozano, G. (2013). 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*, 1857–1867.
- Papadakis, E.D., Soultzlis, N., and Spandidos, D.A. (2002). Association of p53 codon 72 polymorphism with advanced lung cancer: the Arg allele is preferentially retained in tumours arising in Arg/Pro germline heterozygotes. *Br. J. Cancer* *87*, 1013–1018.
- Papangelis, I., and Scambler, P.J. (2013). Tbx1 genetically interacts with the transforming growth factor- β /bone morphogenetic protein inhibitor Smad7 during great vessel remodeling. *Circ. Res.* *112*, 90–102.
- Parant, J., Chavez-Reyes, A., Little, N.A., Yan, W., Reinke, V., Jochemsen, A.G., and Lozano, G. (2001). Rescue of embryonic lethality in Mdm4-null mice by loss of Trp53 suggests a nonoverlapping pathway with MDM2 to regulate p53. *Nat. Genet.* *29*, 92–95.
- Parry, E.M., Alder, J.K., Lee, S.S., Phillips, J.A., Loyd, J.E., Duggal, P., and Armanios, M. (2011). Decreased dyskerin levels as a mechanism of telomere shortening in X-linked dyskeratosis congenita. *J. Med. Genet.* *48*, 327–333.
- Paylor, R., Glaser, B., Mupo, A., Ataliotis, P., Spencer, C., Sobotka, A., Sparks, C., Choi, C.-H., Oghalai, J., Curran, S., et al. (2006). Tbx1 haploinsufficiency is linked to behavioral disorders in mice and humans: Implications for 22q11 deletion syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* *103*, 7729–7734.
- Pereg, Y., Shkedy, D., de Graaf, P., Meulmeester, E., Edelson-Averbukh, M., Salek, M., Biton, S., Teunisse, A.F.A.S., Lehmann, W.D., Jochemsen, A.G., et al. (2005). Phosphorylation of Hdmx mediates its Hdm2- and ATM-dependent degradation in response to DNA damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *102*, 5056–5061.
- Perriaud, L., Marcel, V., Sagne, C., Favaudon, V., Guédin, A., De Rache, A., Guetta, C., Hamon, F., Teulade-Fichou, M.-P., Hainaut, P., et al. (2014). Impact of G-quadruplex structures and intronic polymorphisms rs17878362 and rs1642785 on basal and ionizing radiation-induced expression of alternative p53 transcripts. *Carcinogenesis* *35*, 2706–2715.
- Perry, M.E. (2010). The regulation of the p53-mediated stress response by MDM2 and MDM4. *Cold Spring Harb Perspect Biol* *2*, a000968.
- Phillips, A., Teunisse, A., Lam, S., Lodder, K., Darley, M., Emaduddin, M., Wolf, A., Richter, J., de Lange, J., Verlaan-de Vries, M., et al. (2010). HDMX-L is expressed from a functional p53-responsive promoter in the first intron of the HDMX gene and participates in an autoregulatory feedback loop to control p53 activity. *J. Biol. Chem.* *285*, 29111–29127.
- Pim, D., and Banks, L. (2004). p53 polymorphic variants at codon 72 exert different effects on cell cycle progression. *Int. J. Cancer* *108*, 196–199.
- Pishas, K.I., Al-Ejeh, F., Zinonos, I., Kumar, R., Evdokiou, A., Brown, M.P., Callen, D.F., and Nielsen, P.M. (2011). Nutlin-3a is a potential therapeutic for ewing sarcoma. *Clin. Cancer Res.* *17*, 494–504.

- Porreca, R.M., Glousker, G., Awad, A., Matilla Fernandez, M.I., Gibaud, A., Naucke, C., Cohen, S.B., Bryan, T.M., Tzfati, Y., Draskovic, I., et al. (2018). Human RTEL1 stabilizes long G-overhangs allowing telomerase-dependent over-extension. *Nucleic Acids Res.* 46, 4533–4545.
- Post, S.M., Quintás-Cardama, A., Pant, V., Iwakuma, T., Hamir, A., Jackson, J.G., Maccio, D.R., Bond, G.L., Johnson, D.G., Levine, A.J., et al. (2010). A high-frequency regulatory polymorphism in the p53 pathway accelerates tumor development. *Cancer Cell* 18, 220–230.
- Poyurovsky, M.V., Priest, C., Kentsis, A., Borden, K.L.B., Pan, Z.-Q., Pavletich, N., and Prives, C. (2007). The Mdm2 RING domain C-terminus is required for supramolecular assembly and ubiquitin ligase activity. *EMBO J.* 26, 90–101.
- Poyurovsky, M.V., Katz, C., Laptenko, O., Beckerman, R., Lokshin, M., Ahn, J., Byeon, I.-J.L., 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.
- Pozniak, C.D., Radinovic, S., Yang, A., McKeon, F., Kaplan, D.R., and Miller, F.D. (2000). An anti-apoptotic role for the p53 family member, p73, during developmental neuron death. *Science* 289, 304–306.
- Prodosmo, A., Giglio, S., Moretti, S., Mancini, F., Barbi, F., Avenia, N., Di Conza, G., Schünemann, H.J., Pistola, L., Ludovini, V., et al. (2008). Analysis of human MDM4 variants in papillary thyroid carcinomas reveals new potential markers of cancer properties. *J. Mol. Med.* 86, 585–596.
- Rallapalli, R., Strachan, G., Cho, B., Mercer, W.E., and Hall, D.J. (1999). A novel MDMX transcript expressed in a variety of transformed cell lines encodes a truncated protein with potent p53 repressive activity. *J. Biol. Chem.* 274, 8299–8308.
- Rallapalli, R., Strachan, G., Tuan, R.S., and Hall, D.J. (2003). Identification of a domain within MDMX-S that is responsible for its high affinity interaction with p53 and high-level expression in mammalian cells. *J. Cell. Biochem.* 89, 563–575.
- Reed, S.M., and Quelle, D.E. (2014). p53 Acetylation: Regulation and Consequences. *Cancers (Basel)* 7, 30–69.
- Rice, C., and Skordalakes, E. (2016). Structure and function of the telomeric CST complex. *Comput Struct Biotechnol J* 14, 161–167.
- Rinon, A., Molchadsky, A., Nathan, E., Yovel, G., Rotter, V., Sarig, R., and Tzahor, E. (2011). p53 coordinates cranial neural crest cell growth and epithelial-mesenchymal transition/delamination processes. *Development* 138, 1827–1838.
- Roake, C.M., and Artandi, S.E. (2017). Control of Cellular Aging, Tissue Function, and Cancer by p53 Downstream of Telomeres. *Cold Spring Harb Perspect Med* 7.
- Rogler, A., Rogenhofer, M., Borchardt, A., Lunz, J.-C., Knoell, A., Hofstaedter, F., Tannapfel, A., Wieland, W., Hartmann, A., and Stoehr, R. (2011). P53 codon 72 (Arg72Pro) polymorphism and prostate cancer risk: association between disease onset and proline genotype. *Pathobiology* 78, 193–200.
- Rotter, V., Schwartz, D., Almon, E., Goldfinger, N., Kapon, A., Meshorer, A., Donehower, L.A., and Levine, A.J. (1993). Mice with reduced levels of p53 protein exhibit the testicular giant-cell degenerative syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 9075–9079.
- Rudolph, K.L., Chang, S., Lee, H.W., Blasco, M., Gottlieb, G.J., Greider, C., and DePinho, R.A. (1999). Longevity, stress response, and cancer in aging telomerase-deficient mice. *Cell* 96, 701–712.

- Sagne, C., Marcel, V., Amadou, A., Hainaut, P., Olivier, M., and Hall, J. (2013). A meta-analysis of cancer risk associated with the TP53 intron 3 duplication polymorphism (rs17878362): geographic and tumor-specific effects. *Cell Death Dis* 4, e492.
- Sah, V.P., Attardi, L.D., Mulligan, G.J., Williams, B.O., Bronson, R.T., and Jacks, T. (1995). A subset of p53-deficient embryos exhibit exencephaly. *Nat. Genet.* 10, 175–180.
- Saifudeen, Z., Dipp, S., Stefkova, J., Yao, X., Lookabaugh, S., and El-Dahr, S.S. (2009). p53 regulates metanephric development. *J. Am. Soc. Nephrol.* 20, 2328–2337.
- Sakai, D., and Trainor, P.A. (2016). Face off against ROS: Tcof1/Treacle safeguards neuroepithelial cells and progenitor neural crest cells from oxidative stress during craniofacial development. *Dev Growth Differ* 58, 577–585.
- Sakai, D., Dixon, J., Achilleos, A., Dixon, M., and Trainor, P.A. (2016). Prevention of Treacher Collins syndrome craniofacial anomalies in mouse models via maternal antioxidant supplementation. *Nature Communications* 7, 10328.
- Sam, K.K., Gan, C.P., Yee, P.S., Chong, C.E., Lim, K.P., Karen-Ng, L.P., Chang, W.S., Nathan, S., Rahman, Z.A.A., Ismail, S.M., et al. (2012). Novel MDM2 splice variants identified from oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* 48, 1128–1135.
- Sane, S., and Rezvani, K. (2017). Essential Roles of E3 Ubiquitin Ligases in p53 Regulation. *Int J Mol Sci* 18.
- Sankaran, V.G., Ghazvinian, R., Do, R., Thiru, P., Vergilio, J.-A., Beggs, A.H., Sieff, C.A., Orkin, S.H., Nathan, D.G., Lander, E.S., et al. (2012). Exome sequencing identifies GATA1 mutations resulting in Diamond-Blackfan anemia. *J. Clin. Invest.* 122, 2439–2443.
- Sarkari, F., Sheng, Y., and Frappier, L. (2010). USP7/HAUSP promotes the sequence-specific DNA binding activity of p53. *PLoS ONE* 5, e13040.
- Savage, S.A., and Alter, B.P. (2009). Dyskeratosis congenita. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* 23, 215–231.
- Schmid, P., Lorenz, A., Hameister, H., and Montenarh, M. (1991). Expression of p53 during mouse embryogenesis. *Development* 113, 857–865.
- Senturk, E., and Manfredi, J.J. (2012). Mdm2 and tumorigenesis: evolving theories and unsolved mysteries. *Genes Cancer* 3, 192–198.
- Serafini, P.C., Silva, I.D.C.G., Smith, G.D., Motta, E.L.A., Rocha, A.M., and Baracat, E.C. (2009). Endometrial claudin-4 and leukemia inhibitory factor are associated with assisted reproduction outcome. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 7, 30.
- Shadfan, M., Lopez-Pajares, V., and Yuan, Z.-M. (2012). MDM2 and MDMX: Alone and together in regulation of p53. *Transl Cancer Res* 1, 88–89.
- Shaikh, M.F., Morano, W.F., Lee, J., Gleeson, E., Babcock, B.D., Michl, J., Sarafraz-Yazdi, E., Pincus, M.R., and Bowne, W.B. (2016). Emerging Role of MDM2 as Target for Anti-Cancer Therapy: A Review. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 46, 627–634.
- Sharp, D.A., Kratowicz, S.A., Sank, M.J., and George, D.L. (1999). Stabilization of the MDM2 oncoprotein by interaction with the structurally related MDMX protein. *J. Biol. Chem.* 274, 38189–38196.
- Shimamura, A., and Alter, B.P. (2010). Pathophysiology and management of inherited bone marrow failure syndromes. *Blood Rev.* 24, 101–122.

- Shvarts, A., Steegenga, W.T., Riteco, N., van Laar, T., Dekker, P., Bazuine, M., van Ham, R.C., van der Houven van Oordt, W., Hateboer, G., van der Eb, A.J., et al. (1996). MDMX: a novel p53-binding protein with some functional properties of MDM2. *EMBO J.* 15, 5349–5357.
- Siddique, M., and Sabapathy, K. (2006). Trp53-dependent DNA-repair is affected by the codon 72 polymorphism. *Oncogene* 25, 3489–3500.
- Sieff, C.A., Yang, J., Merida-Long, L.B., and Lodish, H.F. (2010). Pathogenesis of the erythroid failure in Diamond Blackfan anaemia. *Br. J. Haematol.* 148, 611–622.
- Simeonova, I., Jaber, S., Draskovic, I., Bardot, B., Fang, M., Bouarich-Bourimi, R., Lejour, V., Charbonnier, L., Soudais, C., Bourdon, J.-C., et al. (2013). Mutant mice lacking the p53 C-terminal domain model telomere syndromes. *Cell Rep* 3, 2046–2058.
- Simoës-Costa, M., and Bronner, M.E. (2016). Reprogramming of avian neural crest axial identity and cell fate. *Science* 352, 1570–1573.
- Smith, A.R., and Wagner, J.E. (2012). Current clinical management of Fanconi anemia. *Expert Rev Hematol* 5, 513–522.
- Sogame, N., Kim, M., and Abrams, J.M. (2003). Drosophila p53 preserves genomic stability by regulating cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 4696–4701.
- Son, A., Park, J.-E., and Kim, V.N. (2018). PARN and TOE1 Constitute a 3' End Maturation Module for Nuclear Non-coding RNAs. *Cell Rep* 23, 888–898.
- Speidel, D. (2015). The role of DNA damage responses in p53 biology. *Arch. Toxicol.* 89, 501–517.
- Stad, R., Little, N.A., Xirodimas, D.P., Frenk, R., van der Eb, A.J., Lane, D.P., Saville, M.K., and Jochemsen, A.G. (2001). Mdmx stabilizes p53 and Mdm2 via two distinct mechanisms. *EMBO Rep.* 2, 1029–1034.
- Stegeman, S., Moya, L., Selth, L.A., Spurdle, A.B., Clements, J.A., and Batra, J. (2015). A genetic variant of MDM4 influences regulation by multiple microRNAs in prostate cancer. *Endocr. Relat. Cancer* 22, 265–276.
- Steinberg-Shemer, O., Keel, S., Dgany, O., Walsh, T., Noy-Lotan, S., Krasnov, T., Yacobovich, J., Quarello, P., Ramenghi, U., King, M.-C., et al. (2016). Diamond Blackfan Anemia: A Nonclassical Patient With Diagnosis Assisted by Genomic Analysis. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* 38, e260-262.
- Steinman, H.A., Sluss, H.K., Sands, A.T., Pihan, G., and Jones, S.N. (2004a). Absence of p21 partially rescues Mdm4 loss and uncovers an antiproliferative effect of Mdm4 on cell growth. *Oncogene* 23, 303–306.
- Steinman, H.A., Burstein, E., Lengner, C., Gosselin, J., Pihan, G., Duckett, C.S., and Jones, S.N. (2004b). An alternative splice form of Mdm2 induces p53-independent cell growth and tumorigenesis. *J. Biol. Chem.* 279, 4877–4886.
- Steinman, H.A., Hoover, K.M., Keeler, M.L., Sands, A.T., and Jones, S.N. (2005). Rescue of Mdm4-deficient mice by Mdm2 reveals functional overlap of Mdm2 and Mdm4 in development. *Oncogene* 24, 7935–7940.
- Stepensky, P., Chacón-Flores, M., Kim, K.H., Abuzaitoun, O., Bautista-Santos, A., Simanovsky, N., Siliqi, D., Altamura, D., Méndez-Godoy, A., Gijsbers, A., et al. (2017). Mutations in EFL1, an SBDS partner, are associated with infantile pancytopenia, exocrine pancreatic insufficiency and skeletal anomalies in a Shwachman-Diamond like syndrome. *J. Med. Genet.* 54, 558–566.
- Stiewe, T. (2007). The p53 family in differentiation and tumorigenesis. *Nat. Rev. Cancer* 7, 165–168.

- Stommel, J.M., Marchenko, N.D., Jimenez, G.S., Moll, U.M., Hope, T.J., and Wahl, G.M. (1999). A leucine-rich nuclear export signal in the p53 tetramerization domain: regulation of subcellular localization and p53 activity by NES masking. *EMBO J.* *18*, 1660–1672.
- Suh, E.-K., Yang, A., Kettenbach, A., Bamberger, C., Michaelis, A.H., Zhu, Z., Elvin, J.A., Bronson, R.T., Crum, C.P., and McKeon, F. (2006). p63 protects the female germ line during meiotic arrest. *Nature* *444*, 624–628.
- Sullivan, K.D., Galbraith, M.D., Andrysiak, Z., and Espinosa, J.M. (2018). Mechanisms of transcriptional regulation by p53. *Cell Death Differ.* *25*, 133–143.
- Tan, B.X., Liew, H.P., Chua, J.S., Ghadessy, F.J., Tan, Y.S., Lane, D.P., and Coffill, C.R. (2017). Anatomy of Mdm2 and Mdm4 in evolution. *J Mol Cell Biol* *9*, 3–15.
- Tan, S., Kermasson, L., Hoslin, A., Jaako, P., Faille, A., Acevedo-Arozena, A., Lengline, E., Ranta, D., Poirée, M., Fenneteau, O., et al. (2019). EFL1 mutations impair eIF6 release to cause Shwachman-Diamond syndrome. *Blood* *134*, 277–290.
- Tanimura, S., Ohtsuka, S., Mitsui, K., Shirouzu, K., Yoshimura, A., and Ohtsubo, M. (1999). MDM2 interacts with MDMX through their RING finger domains. *FEBS Lett.* *447*, 5–9.
- Tao, W., and Levine, A.J. (1999). P19(ARF) stabilizes p53 by blocking nucleo-cytoplasmic shuttling of Mdm2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *96*, 6937–6941.
- Tateossian, H., Morse, S., Simon, M.M., Dean, C.H., and Brown, S.D.M. (2015). Interactions between the otitis media gene, Fbxo11, and p53 in the mouse embryonic lung. *Dis Model Mech* *8*, 1531–1542.
- 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.
- Thurrow, H.S., Haack, R., Hartwig, F.P., Oliveira, I.O.D., Dellagostin, O.A., Gigante, D.P., Horta, B.L., Collares, T., and Seixas, F.K. (2011). TP53 gene polymorphism: importance to cancer, ethnicity and birth weight in a Brazilian cohort. *J. Biosci.* *36*, 823–831.
- Toki, T., Yoshida, K., Wang, R., Nakamura, S., Maekawa, T., Goi, K., Katoh, M.C., Mizuno, S., Sugiyama, F., Kanezaki, R., et al. (2018). De Novo Mutations Activating Germline TP53 in an Inherited Bone-Marrow-Failure Syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* *103*, 440–447.
- Toledo, F. (2016). p53: A two-faced regulator of telomere metabolism? (comment on DOI 10.1002/bies.201600078). *Bioessays* *38*, 938.
- 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., Lee, C.J., Krummel, K.A., Rodewald, L.-W., Liu, C.-W., and Wahl, G.M. (2007). Mouse mutants reveal that putative protein interaction sites in the p53 proline-rich domain are dispensable for tumor suppression. *Mol. Cell. Biol.* *27*, 1425–1432.
- Tomasini, R., Mak, T.W., and Melino, G. (2008). The impact of p53 and p73 on aneuploidy and cancer. *Trends Cell Biol.* *18*, 244–252.
- Tomás-Loba, A., Flores, I., Fernández-Marcos, P.J., Cayuela, M.L., Maraver, A., Tejera, A., Borrás, C., Matheu, A., Klatt, P., Flores, J.M., et al. (2008). Telomerase reverse transcriptase delays aging in cancer-resistant mice. *Cell* *135*, 609–622.

Tonks, I.D., Walker, G.J., Mould, A.W., Ferguson, B., Keith, P., Hayward, N.K., and Kay, G.F. (2012). Brca1 is involved in establishing murine pigmentation in a p53 and developmentally specific manner. *Pigment Cell Melanoma Res* 25, 530–532.

Toufektchan, E., and Toledo, F. (2018). The Guardian of the Genome Revisited: p53 Downregulates Genes Required for Telomere Maintenance, DNA Repair, and Centromere Structure. *Cancers (Basel)* 10.

Toufektchan, E., Lejour, V., Durand, R., Giri, N., Draskovic, I., Bardot, B., Laplante, P., Jaber, S., Alter, B.P., Londono-Vallejo, J.-A., et al. (2020). Germline mutation of MDM4, a major p53 regulator, in a familial syndrome of defective telomere maintenance. *Sci Adv* 6.

Tsai, H.D., Chang, C.C., Hsieh, Y.Y., and Lo, H.Y. (2000). Leukemia inhibitory factor expression in different endometrial locations between fertile and infertile women throughout different menstrual phases. *J. Assist. Reprod. Genet.* 17, 415–418.

Tummala, H., Walne, A., Collopy, L., Cardoso, S., de la Fuente, J., Lawson, S., Powell, J., Cooper, N., Foster, A., Mohammed, S., et al. (2015). Poly(A)-specific ribonuclease deficiency impacts telomere biology and causes dyskeratosis congenita. *J. Clin. Invest.* 125, 2151–2160.

Tutton, S., Azzam, G.A., Stong, N., Vladimirova, O., Wiedmer, A., Monteith, J.A., Beishline, K., Wang, Z., Deng, Z., Riethman, H., et al. (2016). Subtelomeric p53 binding prevents accumulation of DNA damage at human telomeres. *EMBO J.* 35, 193–207.

Tyner, S.D., Venkatachalam, S., Choi, J., Jones, S., Ghebranious, N., Igelmann, H., Lu, X., Soron, G., Cooper, B., Brayton, C., et al. (2002). p53 mutant mice that display early ageing-associated phenotypes. *Nature* 415, 45–53.

Uziel, O., Yerushalmi, R., Zuriano, L., Naser, S., Beery, E., Nordenberg, J., Lubin, I., Adel, Y., Shepshelovich, D., Yavin, H., et al. (2015). BRCA1/2 mutations perturb telomere biology: characterization of structural and functional abnormalities in vitro and in vivo. *Oncotarget* 7, 2433–2454.

Valentin-Vega, Y.A., Barboza, J.A., Chau, G.P., El-Naggar, A.K., and Lozano, G. (2007). High levels of the p53 inhibitor MDM4 in head and neck squamous carcinomas. *Hum. Pathol.* 38, 1553–1562.

Van Nostrand, J.L., Brady, C.A., Jung, H., Fuentes, D.R., Kozak, M.M., Johnson, T.M., Lin, C.-Y., Lin, C.-J., Swiderski, D.L., Vogel, H., et al. (2014). Inappropriate p53 activation during development induces features of CHARGE syndrome. *Nature* 514, 228–232.

Van Nostrand, J.L., Bowen, M.E., Vogel, H., Barna, M., and Attardi, L.D. (2017). The p53 family members have distinct roles during mammalian embryonic development. *Cell Death Differ.* 24, 575–579.

Varela, I., Cadiñanos, J., Pendás, A.M., Gutiérrez-Fernández, A., Folgueras, A.R., Sánchez, L.M., Zhou, Z., Rodríguez, F.J., Stewart, C.L., Vega, J.A., et al. (2005). Accelerated ageing in mice deficient in Zmpste24 protease is linked to p53 signalling activation. *Nature* 437, 564–568.

Veerakumarasivam, A., Scott, H.E., Chin, S.-F., Warren, A., Wallard, M.J., Grimmer, D., Ichimura, K., Caldas, C., Collins, V.P., Neal, D.E., et al. (2008). High-resolution array-based comparative genomic hybridization of bladder cancers identifies mouse double minute 4 (MDM4) as an amplification target exclusive of MDM2 and TP53. *Clin. Cancer Res.* 14, 2527–2534.

Vieler, M., and Sanyal, S. (2018). p53 Isoforms and Their Implications in Cancer. *Cancers (Basel)* 10.

Vincent, S.D., and Buckingham, M.E. (2010). How to make a heart: the origin and regulation of cardiac progenitor cells. *Curr. Top. Dev. Biol.* 90, 1–41.

- Virtanen, A., Henriksson, N., Nilsson, P., and Nissbeck, M. (2013). Poly(A)-specific ribonuclease (PARN): an allosterically regulated, processive and mRNA cap-interacting deadenylase. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* *48*, 192–209.
- Vogelstein, B., and Kinzler, K.W. (2004). Cancer genes and the pathways they control. *Nat. Med.* *10*, 789–799.
- Vogelstein, B., and Kinzler, K.W. (2015). The Path to Cancer --Three Strikes and You're Out. *N. Engl. J. Med.* *373*, 1895–1898.
- Vogelstein, B., Lane, D., and Levine, A.J. (2000). Surfing the p53 network. *Nature* *408*, 307–310.
- Wade, M., Li, Y.-C., and Wahl, G.M. (2013). MDM2, MDMX and p53 in oncogenesis and cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* *13*, 83–96.
- Walerych, D., Lisek, K., and Del Sal, G. (2015). Mutant p53: One, No One, and One Hundred Thousand. *Front Oncol* *5*, 289.
- Wang, A.T., and Smogorzewska, A. (2015). SnapShot: Fanconi anemia and associated proteins. *Cell* *160*, 354-354.e1.
- Wang, A.T., Kim, T., Wagner, J.E., Conti, B.A., Lach, F.P., Huang, A.L., Molina, H., Sanborn, E.M., Zierhut, H., Cornes, B.K., et al. (2015). A Dominant Mutation in Human RAD51 Reveals Its Function in DNA Interstrand Crosslink Repair Independent of Homologous Recombination. *Mol. Cell* *59*, 478–490.
- Wang, B., Feng, P., Xiao, Z., and Ren, E.-C. (2009). LIM and SH3 protein 1 (Lasp1) is a novel p53 transcriptional target involved in hepatocellular carcinoma. *J. Hepatol.* *50*, 528–537.
- Wang, D., Kon, N., Lasso, G., Jiang, L., Leng, W., Zhu, W.-G., Qin, J., Honig, B., and Gu, W. (2016). Acetylation-regulated interaction between p53 and SET reveals a widespread regulatory mode. *Nature* *538*, 118–122.
- Wang, L., He, G., Zhang, P., Wang, X., Jiang, M., and Yu, L. (2011a). Interplay between MDM2, MDMX, Pirh2 and COP1: the negative regulators of p53. *Mol. Biol. Rep.* *38*, 229–236.
- Wang, X., Wang, J., and Jiang, X. (2011b). MdmX protein is essential for Mdm2 protein-mediated p53 polyubiquitination. *J. Biol. Chem.* *286*, 23725–23734.
- Wang, X., Sheng, P., Guo, X., Wang, J., Hou, L., Hu, G., Luo, C., Dong, Y., and Lu, Y. (2013). Identification and expression of a novel MDM4 splice variant in human glioma. *Brain Res.* *1537*, 260–266.
- Wang, X.D., Morgan, S.C., and Loeken, M.R. (2011c). Pax3 stimulates p53 ubiquitination and degradation independent of transcription. *PLoS ONE* *6*, e29379.
- Weber, J.D., Taylor, L.J., Roussel, M.F., Sherr, C.J., and Bar-Sagi, D. (1999). Nucleolar Arf sequesters Mdm2 and activates p53. *Nat. Cell Biol.* *1*, 20–26.
- Wegman-Ostrosky, T., and Savage, S.A. (2017). The genomics of inherited bone marrow failure: from mechanism to the clinic. *Br. J. Haematol.* *177*, 526–542.
- Wei, C.-L., Wu, Q., Vega, V.B., Chiu, K.P., Ng, P., Zhang, T., Shahab, A., Yong, H.C., Fu, Y., Weng, Z., et al. (2006). A global map of p53 transcription-factor binding sites in the human genome. *Cell* *124*, 207–219.

- Weis, F., Giudice, E., Churcher, M., Jin, L., Hilcenko, C., Wong, C.C., Traynor, D., Kay, R.R., and Warren, A.J. (2015). Mechanism of eIF6 release from the nascent 60S ribosomal subunit. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 22, 914–919.
- Williams, A.B., and Schumacher, B. (2016). p53 in the DNA-Damage-Repair Process. *Cold Spring Harb Perspect Med* 6.
- Woloszynek, J.R., Rothbaum, R.J., Rawls, A.S., Minx, P.J., Wilson, R.K., Mason, P.J., Bessler, M., and Link, D.C. (2004). Mutations of the SBDS gene are present in most patients with Shwachman-Diamond syndrome. *Blood* 104, 3588–3590.
- Wu, D., and Prives, C. (2018). Relevance of the p53-MDM2 axis to aging. *Cell Death Differ.* 25, 169–179.
- Wu, X., Bayle, J.H., Olson, D., and Levine, A.J. (1993). The p53-mdm-2 autoregulatory feedback loop. *Genes Dev.* 7, 1126–1132.
- Wynendaele, J., Böhnke, A., Leucci, E., Nielsen, S.J., Lambertz, I., Hammer, S., Sbrzesny, N., Kubitza, D., Wolf, A., Gradhand, E., et al. (2010). An illegitimate microRNA target site within the 3' UTR of MDM4 affects ovarian cancer progression and chemosensitivity. *Cancer Res.* 70, 9641–9649.
- Xiong, S. (2013). Mouse models of Mdm2 and Mdm4 and their clinical implications. *Chin J Cancer* 32, 371–375.
- Xiong, S., Van Pelt, C.S., Elizondo-Fraire, A.C., Liu, G., and Lozano, G. (2006). Synergistic roles of Mdm2 and Mdm4 for p53 inhibition in central nervous system development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 3226–3231.
- Xiong, S., Van Pelt, C.S., Elizondo-Fraire, A.C., Fernandez-Garcia, B., and Lozano, G. (2007). Loss of Mdm4 results in p53-dependent dilated cardiomyopathy. *Circulation* 115, 2925–2930.
- Xiong, S., Pant, V., Suh, Y.-A., Van Pelt, C.S., Wang, Y., Valentin-Vega, Y.A., Post, S.M., and Lozano, G. (2010). Spontaneous tumorigenesis in mice overexpressing the p53-negative regulator Mdm4. *Cancer Res.* 70, 7148–7154.
- Xirodimas, D.P., Chisholm, J., Desterro, J.M.S., Lane, D.P., and Hay, R.T. (2002). P14ARF promotes accumulation of SUMO-1 conjugated (H)Mdm2. *FEBS Lett.* 528, 207–211.
- Xu, X., Qiao, W., Linke, S.P., Cao, L., Li, W.M., Furth, P.A., Harris, C.C., and Deng, C.X. (2001). Genetic interactions between tumor suppressors Brcal and p53 in apoptosis, cell cycle and tumorigenesis. *Nat. Genet.* 28, 266–271.
- Xu, X.L., Fang, Y., Lee, T.C., Forrest, D., Gregory-Evans, C., Almeida, D., Liu, A., Jhanwar, S.C., Abramson, D.H., and Cobrinik, D. (2009). Retinoblastoma has properties of a cone precursor tumor and depends upon cone-specific MDM2 signaling. *Cell* 137, 1018–1031.
- Yagi, H., Furutani, Y., Hamada, H., Sasaki, T., Asakawa, S., Minoshima, S., Ichida, F., Joo, K., Kimura, M., Imamura, S., et al. (2003). Role of TBX1 in human del22q11.2 syndrome. *The Lancet* 362, 1366–1373.
- Yang, A., and McKeon, F. (2000). P63 and P73: P53 mimics, menaces and more. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 1, 199–207.
- Yang, A., Kaghad, M., Wang, Y., Gillett, E., Fleming, M.D., Dötsch, V., Andrews, N.C., Caput, D., and McKeon, F. (1998). p63, a p53 homolog at 3q27-29, encodes multiple products with transactivating, death-inducing, and dominant-negative activities. *Mol. Cell* 2, 305–316.

- Yang, A., Schweitzer, R., Sun, D., Kaghad, M., Walker, N., Bronson, R.T., Tabin, C., Sharpe, A., Caput, D., Crum, C., et al. (1999). p63 is essential for regenerative proliferation in limb, craniofacial and epithelial development. *Nature* 398, 714–718.
- Yang, J.-Y., Zong, C.S., Xia, W., Wei, Y., Ali-Seyed, M., Li, Z., Broglio, K., Berry, D.A., and Hung, M.-C. (2006). MDM2 promotes cell motility and invasiveness by regulating E-cadherin degradation. *Mol. Cell. Biol.* 26, 7269–7282.
- Yelick, P.C., and Trainor, P.A. (2015). Ribosomopathies: Global process, tissue specific defects. *Rare Dis* 3, e1025185.
- Yu, Z., Zhang, B., Cui, B., Wang, Y., Han, P., and Wang, X. (2012). Identification of spliced variants of the proto-oncogene HDM2 in colorectal cancer. *Cancer* 118, 1110–1118.
- Zentner, G.E., Layman, W.S., Martin, D.M., and Scacheri, P.C. (2010). Molecular and phenotypic aspects of CHD7 mutation in CHARGE syndrome. *Am. J. Med. Genet. A* 152A, 674–686.
- Zhang, L.-N., and Yan, Y.-B. (2015). Depletion of poly(A)-specific ribonuclease (PARN) inhibits proliferation of human gastric cancer cells by blocking cell cycle progression. *Biochim. Biophys. Acta* 1853, 522–534.
- Zhang, Y., and Lu, H. (2009). Signaling to p53: ribosomal proteins find their way. *Cancer Cell* 16, 369–377.
- Zhang, F., Cheng, D., Wang, S., and Zhu, J. (2016). Human Specific Regulation of the Telomerase Reverse Transcriptase Gene. *Genes (Basel)* 7.
- Zhang, Y., Wolf, G.W., Bhat, K., Jin, A., Allio, T., Burkhart, W.A., and Xiong, Y. (2003). Ribosomal protein L11 negatively regulates oncoprotein MDM2 and mediates a p53-dependent ribosomal-stress checkpoint pathway. *Mol. Cell. Biol.* 23, 8902–8912.
- Zhu, Y., Poyurovsky, M.V., Li, Y., Biderman, L., Stahl, J., Jacq, X., and Prives, C. (2009). Ribosomal protein S7 is both a regulator and a substrate of MDM2. *Mol. Cell* 35, 316–326.

RÉSUMÉ

TP53 est le gène le plus fréquemment muté dans les cancers humains. Il code pour le facteur de transcription p53, bien connu aujourd'hui pour son rôle dans la suppression tumorale. Néanmoins, au cours de ces dernières années, p53 est apparue comme une protéine avec une grande variété de fonctions. En effet, elle est impliquée dans de nombreux processus physiologiques tels que le développement, le vieillissement ou la fertilité.

Grâce à un modèle murin qui exprime une protéine p53 tronquée de son domaine C-terminal, mon équipe a découvert qu'une suractivation de p53 peut conduire à une répression de nombreux gènes du métabolisme télomérique. Ceci entraîne un raccourcissement des télomères et le développement de phénotypes caractéristiques de la Dyskératose Congénitale (DC), un syndrome d'insuffisance médullaire héréditaire. Des expériences réalisées *in vitro* suggéraient que ce rôle de p53 dans le métabolisme des télomères soit conservé chez l'humain et qu'une altération de la voie p53 pourrait être à l'origine des formes idiopathiques de la DC. Toutefois, cette dernière hypothèse restait à démontrer car aucune mutation de p53 ou de ses principaux régulateurs n'avait encore jamais été associée à la DC.

Au cours de ma thèse, j'ai caractérisé les effets d'une mutation de *MDM4*, codant pour un des principaux régulateurs négatifs de p53, identifiée chez une famille présentant des phénotypes proches de la DC. A l'aide de modèles murins, j'ai contribué à démontrer que cette mutation conduit à une suractivation de p53, une insuffisance médullaire et un raccourcissement des télomères. L'ensemble de ces résultats a fourni des preuves convaincantes qu'une mutation d'un régulateur spécifique de p53 peut provoquer des phénotypes de DC chez l'Homme.

MOTS CLÉS

p53 – Suppression tumorale – Dyskératose Congénitale – Insuffisance médullaire – Télomères

ABSTRACT

TP53 is the gene most frequently mutated in human cancers. It codes for the transcription factor p53, well known today for its role in tumor suppression. In recent years however, p53 has emerged as a protein with a wide variety of functions. Indeed, p53 is implicated in many physiological processes such as development, aging and fertility.

By studying a mouse model which expresses a p53 protein lacking the C-terminal domain, my team discovered that a p53 hyperactivation can lead to a downregulation of many genes involved in telomere maintenance. This causes a telomere shortening and the development of features suggestive of Dyskeratosis Congenita (DC), an inherited bone marrow failure syndrome. *In vitro* experiments suggested that this role of p53 in telomere metabolism is conserved in humans and that an alteration of the p53 pathway could be responsible for the idiopathic forms of DC. However, this hypothesis remained to be demonstrated because mutations of p53 or its main regulators had never been associated with DC.

During my thesis, I characterized the effects of a mutation in *MDM4*, encoding one of the main negative regulators of p53, identified in a family with DC-like phenotypes. By using mouse models, I contributed to demonstrate that this mutation leads to p53 activation, bone marrow failure and short telomeres. Together, these results provided compelling evidence that a germline mutation affecting a specific p53 regulator may cause DC-like features in both humans and mice.

KEYWORDS

p53 – Tumor suppression – Dyskeratosis Congenita – Bone marrow failure - Telomeres