

2m11.3466.6

Université de Montréal

Clonage et analyse de la protéine suppresseur de tumeur p53 chez l'axolotl

Par
Éric Villiard

Département de biochimie
Faculté de médecine

Mémoire présenté à la faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Maîtrise
en biochimie

Août, 2006

©, Éric Villiard, 2006



W
4
U58
2007
v. 022

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :
Clonage et analyse de la protéine suppresseur de tumeur p53 chez l'axolotl

Présenté par :
Éric Villiard

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Gérardo Ferbeyre
Président-rapporteur

Dr. Stéphane Roy
Directeur de recherche

Dr. Pascal Chartrand
Membre du jury

Résumé

L'axolotl (*Ambystoma mexicanum*), un vertébré amphibien (urodèle), possède une capacité de régénérer parfaitement différentes parties de son corps, une résistance aux cancers et une longue espérance de vie. Comme cet organisme apparaît résistant au cancer (néoplasie) et régénère (néoplasie « contrôlée »), nous avons choisi d'étudier la protéine p53, susceptible d'être impliquée dans ces deux processus : cette protéine est mutée dans plus de 50% des cancers humains.

Le but de ce projet était de déterminer la séquence de la protéine p53 d'axolotl et d'étudier son activité suivant différents stress et durant la régénération. Notre hypothèse de départ prévoyait que la protéine p53 de l'axolotl serait stabilisée conformément à ce qui est connu chez les organismes supérieurs; qu'elle activerait la transcription de gènes cibles connus (Mdm2 et p21) et qu'elle serait impliqué durant la régénération.

La séquence de p53 d'axolotl isolée s'avère très homologue à celle de mammifère. En effet, elle répond de manière comparable aux stress induits par les UVs et le MNNG. De plus, la protéine active la transcription via les promoteurs Mdm2 et p21, comme la protéine p53 de mammifère. Contrairement à la protéine humaine, l'activation de la protéine p53 d'axolotl est sensible à la température, comme celle de *Xenopus laevis* (amphibien anoure). Une mutation au résidu 174 (R174K) de la protéine pourrait expliquer cette sensibilité à la température. L'inhibition de la protéine p53 à l'aide de pifithrine- α ralentit le processus de régénération, l'inhibe partiellement, ce qui peut prouver son implication lors de la régénération.

Mots clés : Axolotl, p53, suppresseur tumoral, cancer, régénération, évolution, vieillissement

Abstract

The axolotl (*Ambystoma mexicanum*) is a vertebrate amphibian (urodele) known for its capacity to perfectly regenerate lost body parts, cancer resistance and for being long living. Because of the cancer resistance (neoplasia) and regeneration (« controlled » neoplasia) attributes of the axolotl, we decided to study a protein possibly central for these two traits, the p53 protein. This protein is found mutated in over 50% of all human cancers.

The goal of this project was to isolate the axolotl p53 gene in order to study its activity following different exposures to stress and during regeneration. We hypothesise that the axolotl p53 protein is stabilized the same way in axolotl as in mammal, that it activates the transcription of known target genes of p53 (Mdm2 & p21) and that it is implicated in the regeneration process.

The sequenced axolotl p53 protein shares a high degree of homology with the mammalian p53 proteins. It is phosphorylated the same way as in mammals following UV and MNNG treatments. The axolotl protein activates transcription via the Mdm2 and p21 promoters as observed for the mammalian proteins. However, contrary to the human p53 protein, the axolotl p53 is temperature sensitive similar to the *Xenopus laevis* (tailless amphibian) p53 protein. A mutation at position 174 (R174K) in the axolotl p53 protein could explain this temperature sensitivity. Inhibition of p53 protein activity with the pharmacological inhibitor, pifithrin- α , inhibits partly the regeneration process, thereby providing evidence that p53 is required for regeneration.

Key words: Axolotl, p53, tumour suppressor, cancer, regeneration, evolution, aging

Table des matières

Résumé.....	iii
Abstract.....	iv
Table des matières.....	v
Liste des figures.....	viii
Liste des tableaux.....	ix
Liste des sigles et des abréviations.....	x
Chapitre 1. Introduction	
1.1 Avant-propos.....	1
1.2 L'axolotl, la régénération et la résistance aux cancers	
1.2.1 L'axolotl	
1.2.1.A Phylogénie de l'axolotl.....	2
1.2.1.B Habitat et historique de l'axolotl.....	2
1.2.1.C Stades de développement, métabolisme et mutants.....	2
1.2.2 Régénération	
1.2.2.A Les organismes pouvant régénérer.....	3
1.2.2.B Les types de régénération.....	4
1.2.2.C La régénération chez l'axolotl.....	5
1.2.2.D Régénération chez les anoures.....	7
1.2.3 Résistance aux cancers et régénération	
1.2.3.A Théorie de Waddington.....	7
1.2.3.B Amphibiens et néoplasie spontanée.....	10
1.2.3.C Résistance des amphibiens à développer un cancer.....	11
1.2.3.D Résistance des amphibiens à développer un cancer: Membres surnuméraires.....	12
1.2.3.E Résistance des amphibiens à développer un cancer : Néoplasie suivi de régression.....	12
1.2.3.F Résistance des amphibiens à développer un cancer : Tentative d'induire expérimentalement un cancer durant la régénération	13

1.3 Conclusion cancer et régénération.....	15
1.4 P53	
1.4.1 Historique.....	17
1.4.2 Structure de la protéine p53.....	18
1.4.3 Régulation, activation, cibles et actions de p53	
1.4.3.A Régulation de p53 : rôle de Mdm2 et de Mdmx.....	20
1.4.3.B Les voies d'activation de p53.....	22
1.4.3.C Les cibles et actions de p53.....	23
1.4.4 p53 et cancer : perte de l'activité tumo-suppresseur.....	26
1.4.5 p53 chez les organismes moins évolués, les amphibiens et spalax	
1.4.5.A p53 chez les organismes moins évolués.....	27
1.4.5.B p53 chez les amphibiens.....	27
1.4.5.C p53 et <i>Spalax</i> : un mammifère ayant une longévité élevée et résistant à l'hypoxie.....	29
1.4.6 p53 durant la régénération.....	31
1.4.7 Inhibition de p53 durant la régénération.....	33
Chapitre 2. Article	
2.1 Article : The p53 tumor suppressor in the amphibian <i>Ambystoma mexicanum</i> is temperature sensitive.	35
Chapitre 3. Matériels et méthodes	
3.1.1 Introduction.....	67
3.1.2 Matériels et méthodes contenu dans l'article.....	68
3.2 Matériels et Méthodes (supplémentaires)	
3.2.1 Clonage du p53 d'axolotl dans un vecteur d'expression (FG12/CMV).....	68
3.2.2 Soins des animaux, chirurgies.....	70
3.2.3 Protocole d'électroporation des cellules AL1.....	71
3.2.4 Traitement inhibiteur de p53 : pifithrine- α	71
Chapitre 4. Résultats supplémentaires	
4.1 Introduction.....	73
4.2 Résultats contenus dans l'article.....	73
4.3 Résultats supplémentaires	

4.3.1 Immunobuvardage de type « western » durant la régénération.....	74
4.3.2 Inhibition de la protéine p53 durant la régénération.....	77
Chapitre 5. Discussion	
5.1 Protéine p53 et structure.....	82
5.2 p53 en réponse aux stress et durant la régénération.....	85
5.3 Inhibition de p53 durant la régénération.....	87
Chapitre 6. Conclusion.....	89
Chapitre 7. Remerciements.....	91
Chapitre 8 Références.....	92
Chapitre 9 Annexe	
Annexe I : Stade de régénération	
Annexe II : Vecteur pCR [®] 4-TOPO	
Annexe III : Vecteur FG12/CMV	

Liste des figures

Chapitre 1

Figure 1 : L'axolotl (*Ambystoma mexicanum*)4

Chapitre 2

Figure 1 : Comparaison entre la protéine p53 humaine et celle de l'axolotl en fonction des différents domaines, régions et résidus.....58

Figure 2 : Arbre phylogénétique de la protéine p53.....60

Figure 3 : Activation du promoteur Hdm2 et p21 par la protéine p53 humaine et celle d'axolotl dans des cellules H1299.....62

Figure 4 : Activation du promoteur Hdm2 et p21 par la protéine p53 humaine et celle d'axolotl dans les cellules AL1.....64

Figure 5 : Détection de la protéine p53 dans les cellules AL1.....66

Chapitre 4

Figure 1 : Immunobuvardage de type « western » durant la régénération.....76

Figure 2 : Effets d'un traitement à la pifithrine- α sur la régénération de la patte d'axolotl.....79

Liste des tableaux**Chapitre 1**

Tableau I : Récapitulatif de la théorie de Waddington (Nature, 1935).....9

Tableau II : Homologie de séquences de la protéine p53 chez différentes espèces.....20

Chapitre 3

Tableau I : Les composantes de la PCR.....68

Chapitre 4

Tableau I : Comparaison de la croissance entre les animaux (larves) contrôles et ceux traités à la pifithrine- α (PFT: 1 μ M et 5 μ M) lors de la régénération des membres.

.....81

Liste des sigles et des abréviations

%	Pourcentage
®	Registered trademark
™	Trade Mark
μ	Micro (10 ⁻⁶)
μL	Microlitre
μM	Micromolaire
°C	Degré Celsius
4NQO	4-nitroquinoline 1-oxide
A	Adénine
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
ARN	Acide ribonucléique
BP	Benzopyrene
C	Cytosine
C-	Carboxy-
AEC	Coiffe Apicale Ectodermique
DEPC	Diéthyl pyrocarbonate
dNTP	Déoxynucléotidetriphosphate
EB	Bourgeon précoce (Early Bud)
ED	Différentiation précoce (Early Differentiation)
EDTA	Éthylènediamine tétra-acétate
<i>et al.</i>	Et collaborateurs
G	Guanine
g	Gramme
KDa	KiloDalton
L	Litre
LB	Bourgeon Tardif (Late Bud)
Lq	Quotient de Longévité (Longevity Quotient)
M	Molaire (mole/litre)

MC ou MCA	Methylcholanthrene
mg	Milligramme
min	minute
mL	millilitre
mM	millimolaire
MMP	Métalloprotéase de la Matrice (Matrix Metalloprotease)
MNNG	n-methyl-n-nitro-n-nytrosilguanidine
NER	Nucleotide Excision Repair
ORF	Cadre de lecture ouvert (Open Reading Frame)
PAL	Palette
pb	Paire de bases
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Réaction de polymérisation en chaîne
PEC	Cellules pigmentées de l'épithélium de l'iris
ROS	toxic Reactive Oxygen Species
RT	Reverse Transcription
SAM	Steric Alpha Motif
<i>sp.</i>	Species
sec	seconde
T	Thymine
TAE	Tampon tris-Acide Acétique et EDTA
v	volume
w	poids

Chapitre 1. Introduction

1.1 Avant-propos

La régénération du corps fascine l'imaginaire des hommes depuis toujours, nous n'avons qu'à penser à l'œuvre de Frank Herbert, en particulier au roman le messie de Dune [1], où des cuves « axolotl » permettent de recréer des corps... ou encore à un classique de l'horreur des années '80, l'Homme des marais [2], régénérant un bras amputé... La régénération est un domaine qui hante les espoirs de l'homme. Le cancer est une autre hantise de l'homme moderne, prenant de plus en plus de place aujourd'hui au sein de notre population vieillissante. Qui ne connaît pas quelqu'un ayant eu à combattre cette maladie, qui peut imaginer les sommes colossales qu'engouffre ce fléau en perte de potentiel humain, en coût de santé? Pourtant, entre régénération et cancer il n'y a peut-être qu'un pas à franchir.[3] Un cancer est une prolifération incontrôlable, anarchique de cellules ayant perdu leurs caractéristiques propres tandis que la régénération est une prolifération parfaitement orchestrée de cellules différenciées recréant un organe fonctionnel. Afin de découvrir les liens pouvant rapprocher la régénération et le cancer il est possible d'utiliser un modèle animal vertébré qui régénère, qui est très résistant au cancer (probablement à cause de sa capacité à régénérer) et qui possède un quotient de longévité élevé : j'ai nommé l'*Ambystoma mexicanum*, l'axolotl. Le quotient de longévité correspond ici à l'âge que peut atteindre un organisme en fonction de son poids, plus le quotient est élevé, plus il démontre une capacité à lutter contre le vieillissement et de manière détournée à lutter contre le cancer. Pour fin d'exemple, l'homme a un quotient de longévité de 5,1 tandis que la souris en a un de 0,7.[4, 5]

Le projet de maîtrise suivant avait pour but d'isoler la séquence du gène p53 de l'axolotl, gène qui lorsque muté est souvent associé au développement d'un cancer, de vérifier son activité à savoir si la protéine répond à divers stress en accord avec ce qui est connu dans la littérature et finalement de vérifier son implication durant la régénération.

1.2 L'axolotl, régénération et résistance aux cancers:

1.2.1 L'axolotl

1.2.1.A La phylogénie de l'axolotl

L'Axolotl, *Ambystoma mexicanum*, est un amphibien urodèle (amphibien avec queue) de la famille des Ambystomatidae, salamandres du nouveau monde, comprenant 30 espèces.[6] Il fait parti du Règne : Animalia ; Embranchement : Vertébré ; Classe : Amphibia ; Ordre : Caudata (urodela) ; Sous-ordre : Ambystomatoidea ; Famille : Ambystomatidae ; Genre : Ambystoma ; Espèce : Mexicanum. En 2006, 5918 espèces d'amphibiens au total ont été dénombrées (www.globalamphibians.org).

1.2.1.B Habitat et historique de l'axolotl

Les Axolotls *Ambystoma mexicanum* sont originaires de deux des lacs entourant la ville de Mexico : le lac Xochimilco et le lac Chalco. De nos jours, l'expansion urbaine ainsi que la pollution ont fortement réduit l'habitat de l'axolotl et celui-ci ne se retrouve maintenant que très rarement à l'état sauvage.[6, 7] C'est en 1863 que la première colonie d'axolotls fut créée au Musée d'Histoire Naturelle de Paris. Un général appelé Forey rapporta du Nouveau Monde 33 axolotls de « type sauvage » ainsi qu'un « type blanc » afin qu'on les étudie. Une grande partie des axolotls de laboratoire utilisés aujourd'hui sont les descendants de ce premier arrivage Européen.[6] Ainsi, la majorité des connaissances modernes acquises par l'étude de l'axolotl l'ont été à l'aide d'animaux d'élevage.

1.2.1.C Stades de développement, métabolisme et mutants

L'axolotl (*Ambystoma mexicanum*) est un urodèle néoténique, c'est-à-dire qu'il conserve des traits larvaires même au stade adulte.[8, 9] Il demeure, sa vie durant, purement aquatique et conserve donc ses branchies. Chez plusieurs autres espèces de salamandres, prenons comme exemple le triton (newt : *Notophthalmus v.*, *Pleurodeles w.* etc.), il y a passage d'un stade larvaire aquatique à un stade juvénile terrestre puis retour à un stade adulte aquatique pour la reproduction.[8] Bien que l'axolotl soit néoténique, il est possible de provoquer sa transformation en organisme terrestre, correspondant à l'état juvénile ou adulte chez les autres salamandres, en injectant à l'animal d'infimes quantités d'hormones thyroïdiennes (T3, T4, TSH de mammifère).[10]

L'axolotl est un animal poïkilotherme, au même titre que les invertébrés, poissons, amphibiens et reptiles, c'est-à-dire que : « leur température interne, leur métabolisme, leur taux de consommation d'oxygène et souvent leur degré d'activité sont variables en fonction de la température de leur milieu ambiant ; leur température interne diffère peu de celle de leur environnement... ».[11] Il vit idéalement dans un milieu où la température avoisine 20°C.[12] Il atteint sa maturité sexuelle vers 1 ans (entre 1 et 3 ans), peut vivre en captivité jusqu'à 25 ans et atteindre 30cm de longueur du rostre au bout de la queue.[9]

L'axolotl arbore plusieurs teintes en fonction du développement et/ou de la migration de ses cellules pigmentaires. L'axolotl de type sauvage possède 3 types de cellules pigmentées ; mélanophores contenant la mélanine (couleur noir), xantophores contenant le pigment jaune (cellules contenant de la ptéridine) et les cellules iridophores (cellules réfléchissantes contenant des purines). Ainsi, l'axolotl de type sauvage a une teinte allant du vert au brun. Différentes mutations entraînent différentes colorations chez l'axolotl; les « blancs » ayant une mutation récessive (*d*) n'ont pas de cellules mélanophores et apparaissent roses; les « mélanoïdes » ayant une mutation récessive (*m*) ont une production augmentée de cellules mélanophores ainsi qu'une diminution de leur cellules xantophores et iridophores, ces animaux sont donc noirs; les mutants albinos (*a*) ne peuvent, quant à eux, produire de cellules pigmentaires mélanophore mais ont des taux normaux de cellules xantophore et iridophores, ils apparaissent dorés et leurs yeux n'ont aucune pigmentation. Les « mutants » de couleurs sont particulièrement intéressants dans certains contextes de recherches, par exemple, lors d'hybridation « Whole-mount » sur des organismes entiers.[9, 13] Soulignons que l'axolotl possède 28 chromosomes (2n).[14, 15]

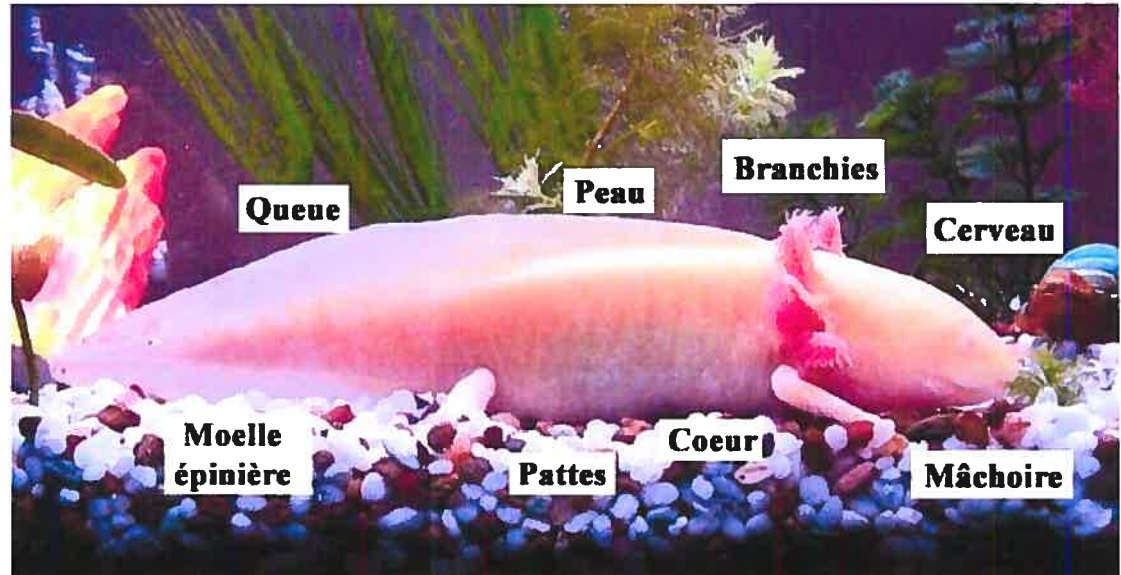
1.2.2 Régénération

1.2.2.A Les organismes pouvant régénérer

L'axolotl possède la capacité de régénérer parfaitement différentes parties de son corps, c'est-à-dire ses membres [16-18], sa queue, ses branchies, sa mâchoire, sa peau, l'apex de son cœur, sa moelle épinière [19-21], son cerveau... Par ailleurs, l'axolotl n'est pas le seul animal ayant la capacité. Les métazoaires démontrent une forte propension à la régénération. Il est possible d'inclure parmi ces animaux régénérant les cnidaires (*Hydra*), les vers plats (*Dugesia*), les vers annelés (*Nereis*) et les échinodermes (*Linckia*).[22] La

régénération observée ici serait aussi en lien avec la possibilité de reproduction asexuée. L'exemple le plus frappant concerne l'*Ascidia* (Ascidie, organismes filtreurs) où une simple cellule sanguine peut générer un organisme entier.[23] Il existe aussi plusieurs organismes « évolués », autres que les amphibiens, pouvant régénérer. Par contre, ceux-ci sont plus rares et ne régèrent souvent qu'imparfaitement. Nous pouvons penser ici à la blatte qui peut régénérer ses pattes, à certains lézards pouvant régénérer leur queue, aux poissons régénérant leurs nageoires (poisson zèbre : *Danio rerio*) [22], aux cervidés régénérant leur bois [23], ainsi qu'à l'homme pouvant régénérer le bout de ses doigts jusqu'au début de l'âge adulte.[24]

Figure 1 : L'axolotl (*Ambystoma mexicanum*)



Axolotl albinos adulte et différentes parties de son corps pouvant régénérer.

1.2.2.B Les types de régénération

Il existe deux principales formes de régénération soit celle dite morphologique et celle dite épimorphique.[23] La première est un type de régénération n'impliquant pas la prolifération de nouvelles cellules. L'organe perdu est recréé par restructuration des cellules restantes de l'organisme. Il y a ici dédifférenciation, migration et transdifférenciation cellulaire remplaçant ce qui a été perdu, donnant ainsi deux organismes complets de taille plus petite que l'original : la morphologie serait une régénération par transdifférenciation

de composants corporels pré-existant.[25] C'est la méthode de régénération qu'utilisent les métazoaires. L'axolotl ainsi que les autres animaux supérieurs régénérant utilisent, quant à eux, le deuxième type de régénération, c'est-à-dire la régénération épimorphique. Dans ce type de régénération, il y a repousse d'une nouvelle structure remplaçant celle qui a été perdue. Cette régénération implique la migration de cellules épithéliales, la dédifférenciation de cellules mésenchymateuses, leur prolifération ainsi que leur transdifférenciation générant une nouvelle structure : la régénération épimorphique est une régénération par addition de composants corporels néoformés.[25]

1.2.2.C La régénération chez l'axolotl

Bien que l'axolotl puisse régénérer la quasi-totalité de son corps, l'emphase des recherches régénératives fut mise sur la régénération des ses membres, structures relativement grosses, facilement accessibles et très faciles à manipuler chirurgicalement et chimiquement.[17] La régénération épimorphique s'opérant chez l'axolotl est habituellement considérée comme un processus de nature biphasique. Elle comprend une phase de préparation, propre à la régénération, suivi d'une phase de redéveloppement.[26]

Durant la phase de préparation, suivant l'amputation, il y a formation d'un épithélium de guérison composé de cellules issues de la couche basale de l'épiderme de la peau mature de l'animal [27], migrant des abords de la blessure et refermant la plaie. Ce mouvement cellulaire s'effectue en quelques heures [28] et recouvre, dans un premier temps, la plaie d'une unique couche de cellules. Cette couche cellulaire s'épaissit peu à peu afin de former la coiffe apicale ectodermique (AEC).[27] Les cellules près du site d'amputation (les cellules post mitotiques du mésenchyme, les cellules musculaires, osseuses, cartilagineuses, les fibroblastes...) perdent leurs caractéristiques propres, se dédifférencient en cellules pluripotentes mésenchymateuses.[17] Ce phénomène s'effectue jusqu'à 2 millimètres en amont du site d'amputation. Ce sont ces cellules qui migrent et prolifèrent afin de former le blastème. L'innervation est primordiale lors de la phase de préparation.[26] Si le blastème de la patte est dénervé durant les premiers moments de la régénération celle-ci est inhibée.[26, 29, 30] Il est même possible de remarquer une résorption du blastème. Par contre, suivant le stade de régénération du bourgeon tardif, l'apport nerveux n'est plus nécessaire.[31] (Annexe 1 : stades de régénération). De plus,

lorsqu'il y a dénervation lors de la régénération de la patte chez la larve, à la fois d'urodèle et d'anoure, il y a inhibition de la régénération et régression du bourgeon de la patte jusqu'à ce que l'apex de la blessure atteigne le nerf [32-34] : l'apport nerveux semble donc central à l'initiation ainsi qu'au déroulement de la régénération du membre lors de la phase de préparation. En plus de l'importance des nerfs, l'intégrité de l'épithélium de guérison/AEC ne doit pas être altérée car si c'était le cas, il y aurait inhibition de la régénération. Par exemple, l'amputation de l'épithélium de guérison ou de l'AEC inhibe la régénération tout comme une irradiation détruisant les cellules de l'épithélium ou encore une fermeture de la plaie par des points de suture ou la transplantation de peau mature... ces manipulations chirurgicales empêchant la formation de l'épithélium de guérison.[27]

Dans un deuxième temps, il y a phase de redéveloppement. Cette phase se calque sur le développement embryonnaire de l'organe ayant été perdu, amputé. Par ailleurs, l'importance qu'avait l'innervation durant la phase de préparation n'existe plus ici et la régénération peut s'effectuer sans la présence des nerfs, sans apports de substances neurothrophiques.[35, 36]

Fait notable, l'œil de l'axolotl est un des seuls organes qui lui est impossible de régénérer. Chose intéressante, chez différentes espèces de tritons (newt : *Triturus pyrrhogaster*), le cristallin, au même titre que la patte, fut grandement utilisé dans l'étude de la dédifférenciation cellulaire durant la régénération.[22, 37, 38] L'étude de la régénération du cristallin proposait plusieurs avantages dont une régénération issue d'un seul type cellulaire (cellules pigmentées de l'épithélium de l'iris : PEC). De plus, sa structure apparaît beaucoup plus simple que celle de la patte qui est composée de plusieurs types de cellules différentes et qui possède une architecture assez complexe.[22]

La régénération du cristallin s'initie toujours à partir de la portion marginale dorsale de l'épithélium de l'iris de l'œil, jamais de la portion ventrale. [37, 38] Une transplantation de la partie ventrale de l'iris dans un œil lentectomisé n'entraîne pas la régénération du cristallin alors que la transplantation de la partie dorsale initie sa régénération.[37] Plusieurs expériences ont été faites sur la régénération du cristallin et l'induction de sa régénération à l'aide de drogues cancérogènes. [37] Ces dernières expériences permettent un rapprochement entre la régénération et le cancer car il apparaît qu'une tentative d'induction de cancer dans l'iris de la salamandre est suivie d'une régénération normale ou encore

d'une super-régénération du cristallin et non d'un cancer, état de fait dont je discuterai plus loin.[37]

1.2.2.D Régénération chez les anoures

Comme je l'ai souligné plus haut, les anoures ont elles aussi la capacité de régénérer mais celle-ci est nettement limitée.[39] Au stade de têtard, les anoures sont capables de régénérer une patte arrière amputée. Plus l'amputation est précoce dans le développement de la grenouille plus la patte régénère parfaitement.[40, 41] Une fois métamorphosée, la plupart des grenouilles (ex. *Rana sylvatica*) voient leurs capacités de régénération disparaître.[31, 42] Par contre, une exception demeure, *Xenopus laevis* (xénope) adulte démontre une certaine capacité de régénération consistant en la repousse d'un appendice cartilagineux en forme de pointe remplaçant la patte perdue.[39] Les anoures n'ont donc pas une capacité de régénération égalant celle des urodèles. Des expériences de dénervation de pattes de xénope ont démontré l'importance de l'apport nerveux durant la régénération : s'il y a dénervation, il y a absence totale de régénération.[31, 32, 39, 40]

1.2.3 Résistance aux cancers et régénération

La prochaine partie traitera de cancer. Nous le définirons ici comme une masse de cellule issue d'une même lignée cellulaire (d'une seule cellule anormale), non encapsulée, envahissant et détruisant les tissus l'entourant.[43, 44] Pour s'y retrouver, les cancers sont classés selon leur cellule d'origine : les carcinomes proviennent de cellules épithéliales, les sarcomes proviennent de tissus conjonctif/musculaire et les leucémies proviennent des cellules hématopoïétiques et des cellules du système nerveux. Il est intéressant de noter que 90% des cancers humains sont des carcinomes.[44]

1.2.3.A Théorie de Waddington

Diverses théories ont vues le jour tentant de rapprocher cancer et régénération, de trouver des liens pouvant unir ces deux différents « générateurs de néoplasies » si semblables mais donnant des résultats absolument incomparables. Waddington [45], en 1935, proposait une théorie, découlant des travaux de Spemann sur le centre organisateur, voulant qu'un embryon, durant le développement, posséda des champs d'individuation

donnant naissance aux différentes parties de son corps en réponse à des évocateurs (protéines, hormones...). Ces évocateurs seraient sécrétés lors du développement mais aussi plus tard dans la vie, suite à différents stress pouvant toucher l'organisme par exemple, une blessure, l'amputation d'un membre, des signaux de croissance aberrants (oncogène), etc. Lors du développement, ces évocateurs auraient la possibilité d'engendrer la formation d'un organe donné seulement au moment opportun, introduisant l'idée de compétence de l'organisme, du champ d'individuation, à répondre à un stimulus habituellement présent lors du développement embryonnaire. Devenant adultes (n'étant plus compétents), la majorité des organismes perdrait la réceptivité qu'avaient les champs d'individuation à répondre à un évocateur par la production d'un organe/membre correspondant à celui-ci. Seuls les organismes pouvant régénérer, ayant des champs d'individuation demeuré « puissants », conserveraient jusqu'au stade adulte cette réceptivité aux signaux des évocateurs. Ces organismes auraient donc encore la capacité à répondre à des évocateurs divers. Par exemple, lors d'une blessure, source d'évocateurs, l'animal pourrait redévelopper (régénérer) la partie qu'il a perdu. Ainsi, chez un organisme aux champs d'individuation forts, des évocateurs découlant de la perte d'un membre permettrait sa régénération tandis que chez un organisme ayant des champs d'individuation faibles, la perte du même membre n'entraînerait pas une régénération mais une simple guérison. Waddington, avance aussi l'idée qu'un cancer, générant des évocateurs, peut être perçu comme étant une tentative de régénération chez un organisme ayant des champs d'individuation faibles (ne pouvant pas régénérer).[46-48] Donc, les organismes ayant des champs d'individuation forts pourraient aussi « ignorer » les évocateurs cancérigènes inhibant leurs effets tumorigéniques ou encore décoder ceux-ci comme étant un signal de développement de structure lié au champ « puissant ». Ces animaux seraient plus résistants aux cancers que les autres organismes et ce pour des raisons encore méconnues. Dans les faits, un axolotl, et même à la rigueur les anoues durant leur stade larvaire (Têtard : pouvant régénérer), ayant des champs d'individuation forts, sont plus résistants aux cancers que pourrait l'être un mammifère (une souris de laboratoire, par exemple). De prime abord, cette théorie supporterait ce qui est connu dans la littérature à propos de l'incidence du cancer chez les amphibiens. D'après Waddington [45] et Needham [49], un cancer serait la « fuite morphologique » de cellules tumorales, fuite de l'influence d'un champ

d'individuation « puissant » qui a faibli ou disparu. Selon Schlumberger (1948), les animaux régénérant semblent effectivement présenter moins de tumeurs spontanées.[50]

Tableau I : Récapitulatif de la théorie de Waddington (Nature, 1935) [45]

Champ d'individuation	Évocateur	Effet(s)
Puissant (embryon)	Développement	Développement
Normal (adulte)	Cancérigène	Cancer
Puissant (adulte)	Cancérigène	Sans effet/membre accessoire
Normal (adulte)	Blessure/amputation	guérison
Puissant (adulte)	Blessure/amputation	régénération

Bien que la théorie de Waddington donne un bon aperçu du lien pouvant unir régénération et cancer, il n'en demeure pas moins que les concepts d'évocateurs et de champs d'individuations peuvent être remplacés par des idées plus contemporaines. L'évocateur pourrait correspondre au concept plus actuel de morphogènes, substances actives dont la concentration varie dans l'organisme en développement, créant un gradient, permettant la formation de structures, « patterns », en affectant les cellules différemment en fonction de sa concentration.[23] De plus, comme pour l'évocateur, le morphogène n'a pas que des effets durant le développement. Ces morphogènes sont souvent impliqués dans l'initiation de différents cancers chez les organismes adultes.[51] Par exemple, Sonic hedgehog (Shh) est d'une importance primordiale lors du développement embryonnaire du membre ainsi que du système nerveux central. Par contre, chez l'adulte, une activation aberrante des voies l'impliquant peut entraîner des carcinomes, des médulloblastomes, des cancers de la gorge ainsi que de la prostate.[52] Ce morphogène a donc une répercussion très différente sur l'organisme en fonction du moment où il est exprimé ce qui correspond bien aux effets d'un évocateur selon Waddington.

Les champs d'individuation, quant à eux, peuvent correspondre aux champs morphogénétiques, théorie réapparue au début des années 1990 suite aux expériences impliquant les disques imaginaux chez la drosophile. Selon Gilbert: « Un champ morphogénétique est un domaine pouvant être isolé, transplanté, et est très bien caractérisé

chez l'embryon ».[52] En effet, chez la drosophile, le disque imaginal de la patte peut générer une patte, générer une patte complète même si le disque est endommagé (champ morphogénétique, croissance compensatoire, voir Chapitre 1 partie 1.4.6) et peut générer une patte s'il est transplanté ailleurs sur la larve de drosophile. Ainsi, un champ de « patte » peut être isolé et transplanté ailleurs sur l'embryon et formera une patte en réponse à un morphogène. Ainsi, dans le cas nous intéressant, l'axolotl posséderait des champs morphogénétiques pouvant répondre à l'activation d'un morphogène (activé par l'amputation d'un membre, par un oncogène...) même à l'état adulte, hors de la période de compétence normale ayant cours durant le développement. Cette activation de morphogènes permettrait une récapitulation du développement (régénération) menant à un remplacement de la structure lésé correspondant au champ morphogénétique.

1.2.3.B Amphibiens et néoplasie spontanée

Tsonis, en 1988 [53], compila toutes les observations de néoplasies chez les amphibiens et voulu déterminer si ceux-ci sont effectivement plus résistants aux cancers que le seraient, par exemple, les mammifères. Bien que plusieurs revues de littérature portaient déjà sur le cancer chez les amphibiens [50, 54, 55] celle de Tsonis [53] est beaucoup plus récente et comprend tous les cas rapportés de cancer chez les amphibiens entre 1948 et 1988. Il observa que 50% des cas rapportés de néoplasies l'ont été chez des amphibiens de trois espèces différentes, c'est-à-dire les amphibiens les plus utilisés comme modèles expérimentaux (2 espèces d'anoures : *Rana pipiens* (23 cas) & *Xenopus laevis* (20 cas) et 1 espèce d'urodèle : *Ambystoma mexicanum* (16 cas)). Ainsi, le nombre réduit de cancers observés chez les amphibiens moins utilisés en recherche autres que les trois ci-dessus, serait dû à un biais créé par la faible utilisation de ces organismes comme modèles expérimentaux. De plus, le manque d'études sur la propension aux cancers des amphibiens dans leur milieu naturel ne permet pas d'avoir une bonne appréciation de leur plus grande résistance aux cancers. Tsonis [53] dénote qu'il est normal de voir, à l'automne, des tumeurs de l'épiderme chez près de 6% des tritons (*Cynops pyrrhogaster*). Par contre, aucun cas de néoplasie n'a été rapporté touchant les pattes, les yeux et la queue des tritons (champs d'individuation forts), parties des animaux qui ont été intensivement disséqués depuis les débuts de l'étude de la régénération.[53] Depuis 1988, d'autres exemples de

cancer spontané ont été dénombrés chez les amphibiens. Harshbarger découvrit des mastocytomes (tumeurs localisées de la peau, habituellement bénignes, issues de mastocyte) chez 18 *Ambystoma mexicanum* et 6 *Ambystoma tigrinum*. [43] Ces mastocytomes touchaient de vieux spécimens, de 11 à 17 ans, et étaient situés dorsalement, ventralement ou sur la surface latérale de l'animal... jamais sur la queue ou les pattes.

Un moyen plus direct de mesurer la résistance au cancer est de tenter de l'induire dans l'organisme et c'est de cette façon que nous pouvons finalement apprécier la résistance des amphibiens à développer des cancers.

1.2.3.C Résistance des amphibiens à développer un cancer

C'est par le biais d'expériences d'induction de cancers qu'apparaît plus clairement la résistance des amphibiens à développer des néoplasies. Tsonis, en 1983 [56], a procédé à une revue de littérature sur l'implantation de substances cancérigènes chez les amphibiens. Ici, en accord avec la théorie de Waddington, les amphibiens ayant des champs d'individuation forts, se répercutant par la capacité de régénérer, n'ont que très rarement développé des cancers. En effet, une expérience effectuée sur 500 tritons (*Triturus viridescens*) ayant subi des injections de « goudron de charbon » (Coal tar) mêlé à différentes substances cancérigènes (methylcholanthrene (MC ou MCA), benzopyrene (BP), acetylaminofluorene et « rouge de scarlet » (scarlet red)) n'ont généré des sarcomes que chez deux des animaux traités (injection de goudron de charbon additionné de MC). [57] A titre d'exemple, des expériences utilisant de la peinture à base de « goudron de charbon » incorporée à l'eau de souris A/J, donnée 3 fois par jour durant 8 semaines, ont généré, selon la concentration utilisée (1mg, 10mg et 55mg/souris), des tumeurs pulmonaires chez 35%, 97% et 72% des animaux utilisés. De plus, 42% des souris traitées avec 55mg de peinture ont développé des papillomes ou carcinomes de la membrane gastrique. [58] Bien que la méthode d'incorporation du « goudron de charbon » ne soit pas la même ici, il est possible de voir que ses effets sont importants chez la souris et semblent minimes chez le triton.

1.2.3.D Résistance des amphibiens à développer un cancer: Membres surnuméraires

De manière encore plus surprenante, comme l'appréhendait Waddington [45], bien qu'il y ait eu absence de développement d'un cancer suite à l'incorporation d'un cancérigène dans une patte de triton, plusieurs cas d'apparition de membres surnuméraires sont observés.[57] C'est suite à l'introduction de substances cancérigènes dans le coude des tritons [57] que cet évocateur cancérigène a été traduit par le champ d'individuation comme étant un évocateur du développement du membre. Sur 500 tritons injectés avec un mélange de « goudron de charbon », 40% des 500 animaux ont développé des membres surnuméraires. Butler et Blum ont aussi généré un nombre important de membres surnuméraires en irradiant avec des rayons UVs la région du coude de la patte antérieure d'embryons d'*Amblystoma opacum* : 110 des 150 animaux irradiés ont développé un membre accessoire[59] précédé par une régression apparente de la patte déjà formée. Encore ici, en accord avec la pensée de Waddington (1935), des évocateurs découlant d'un stress (dommage à l'ADN par les rayons UVs) ont été interprétés par les champs d'individuation « puissants » comme étant des évocateurs de développement du membre. Butler et Blum ont tenté d'irradier la partie précédant et succédant au coude du membre antérieur ainsi que l'épaule ce qui n'a causé qu'un nombre infime de membres surnuméraires c.i.e. 0/115 et 2/170 respectivement [59], les champs d'individuation « puissants » seraient donc bien circonscrit. L'équipe de Tsonis [60], en 1981, a aussi généré 2 membres surnuméraires ainsi que plusieurs anomalies osseuses au niveau du coude du triton en implantant des cristaux de substances cancérigènes (MNNG (n-méthyl-n-nitro-n-nitrosilguanidine) , 4NQO (4-nitroquinoline 1-oxide)). Aucune tumeur n'est résultée des expériences de Tsonis.[60]

1.2.3.E Résistance des amphibiens à développer un cancer : Néoplasie suivi de régression

Dans plusieurs autres cas, l'introduction de substances cancérigènes entraîne la formation d'une masse se résorbant avec le temps. En effet, Arffmann, en 1961, observa l'apparition d'hyperplasie suite à l'application de MC, BP ou DBA au niveau des cellules de l'épithélium de queue de *T. cristatus*. [61] Ces hyperplasies régresaient après 20 à 30 jours suivant les traitements.[61] Seilern-Aspang et al. [62], en utilisant les mêmes

substances cancérigènes que l'équipe de Arffmann sur des tritons (*T. cristatus*), ont induit des tumeurs de l'épithélium des glandes muqueuses qui ont régressé et se sont différenciées en cellules non-cancéreuses. Ingram [63] a aussi tenté des expériences utilisant des substances cancérigènes (DBA et BP) injectées dans la région du cloaque de l'axolotl (injection dans la région postérieure du corps, sur le côté, près de la patte arrière, intradermal). Les 200 axolotls utilisés eurent une réaction au niveau de l'épiderme correspondant à l'infiltration de macrophages et prolifération de l'épiderme, réaction qui s'est résorbée avec le temps. Après 7 à 20 mois, 32 animaux ont généré des excroissances semblables à des papillomes (14/54 traités au DBA et 18/57 traités au BP) mais qui ne se sont jamais transformées en masses cancéreuses. Deux axolotls sur 200, après 2 et 3 ans, ont développé un cancer (1 sarcome et 1 hépatome). Par contre, un des cancers ne serait pas directement lié au traitement.[63]

1.2.3.F Résistance des amphibiens à développer un cancer : Tentative d'induire expérimentalement un cancer durant la régénération

Dans la revue de Tsonis [56] il est aussi question d'induction de cancer durant la régénération, c.i.e d'incorporation d'une substance cancérigène à même le blastème de régénération. Un bon nombre d'études d'introduction de cancérigènes dans des membres en régénération d'urodèles furent effectuées de 1940 à 1970, utilisant plusieurs cancérigènes connus (Dibenzathrecene, BP, MC, 4NQO, mitomycin C, MNNG...). Dans toutes ces études, la régénération de la patte traitée était soit normale, soit ralentie ou arborait des anomalies de régénération sous forme de doigts surnuméraires, d'arrêt précoce de la régénération ou d'hyperplasie de l'épiderme.[64] Tsonis [56] a aussi remarqué, que selon les différentes études, une petite dose de substance cancérigène produit généralement une régénération normale tandis qu'une dose importante entraîne un effet toxique inhibant la régénération. Les malformations issues de ces régénérations altérées ne seraient pas dues à un effet de toxicité car l'utilisation de produits ayant une toxicité analogue aux cancérigènes utilisés ne donna jamais de régénérations anormales.[56] Ces résultats sont encore une fois en accord avec ce que l'on pouvait prévoir avec la théorie de Waddington. Le blastème de régénération du membre serait un lieu d'extrême compétence, sous le contrôle d'un champ d'individuation très « puissant », qui permettrait de rallier l'effet des

évocateurs cancérigènes à ceux de la régénération du membre orchestrant l'ensemble de la prolifération cellulaire sans jamais générer de tissu cancéreux.

Une expérience très intéressante effectuée lors de la régénération du cristallin du triton a vérifié une fois de plus la théorie des champs « d'individuation fort » de Waddington. Précisons que le triton (*Cynops pyrrhogaster*), contrairement à l'axolotl, peut régénérer son cristallin. En effet, lorsque le cristallin est amputé, la régénération s'initie à partir des cellules épithéliales pigmentées de la partie dorsale de l'iris de l'œil : la régénération ne s'initie jamais par la partie ventrale de l'iris de l'œil.[38] Par contre, lorsqu'il y a implantation de MNNG dans l'iris ventrale de l'œil, il y a une initiation de la régénération d'une seconde lentille naissant de la partie ventrale de l'iris.[37] L'introduction d'une substance cancérigène durant la régénération du cristallin entraîne donc ici des résultats différents de ce qui est observé lors de l'introduction de cancérigènes durant la régénération de la patte. Dans ce dernier cas, lors de la régénération d'un membre, il n'y a jamais eu d'observation de membre surnuméraire mais seulement des déformations alors que dans le cas du cristallin il y a formation d'une lentille accessoire, d'un organe surnuméraire. Il pourrait exister des différences quant à la régénération d'un appendice versus un organe interne. Il est possible de se demander si le champ d'individuation comprenant l'œil des urodèles est aussi puissant que celui d'un membre. Les champs d'individuation de la patte et de l'œil seraient probablement de « puissances différentes ». Soulignons encore une fois que l'axolotl peut régénérer parfaitement plusieurs parties de son corps exception faite de son cristallin (champ d'individuation faible) et que le MNNG entraîne la régénération d'une lentille surnuméraire chez le triton mais jamais la régénération d'un membre surnuméraire.

Aucun cancer ne fut jamais observé durant la régénération d'un membre. Par contre, Okamoto en 1997, réussit à induire chimiquement des tumeurs dans 7 des 8 tritons (*Cynops pyrrhogaster*) lentectomisés, durant la régénération du cristallin, en utilisant un composé de Nickel Subsulfide.[65] C'est une injection de Nickel Subsulfide intra-oculaire (chambre postérieure de l'œil où se trouve l'humeur vitrée) qui généra les tumeurs. Les tumeurs ne semblent pas issues de l'iris ventral ou dorsal de l'œil. Donc, cette induction de cancer aurait lieu durant la régénération mais n'affecterait pas directement le blastème de régénération du cristallin. Il semblerait plutôt que le Nickel Subsulfide ait attaqué la cornée

et que la tumeur ait pris toute l'espace possible dans le globe oculaire, détruisant la structure de l'iris, de la rétine et de la choroïde par le fait même. Il semble donc possible de générer un cancer durant la régénération du cristallin, mais non en agissant directement sur celui-ci : que serait-il advenu d'une injection dans l'iris ventral ou dans l'iris dorsal? Il serait aussi intéressant d'incorporer du Nickel Subsulfide dans des blastèmes de pattes afin de mesurer son effet cancérigène durant la régénération d'un membre.

La première véritable induction de cancer dans un membre d'amphibien fut obtenue chez des anoues (*Rana pipiens*) à l'aide de MC. Un nombre de 22 sarcomes ont été produits chez 19 grenouilles adultes. Cependant, 13 de ces sarcomes sont apparus chez des grenouilles aux membres ayant été préalablement dénervés (incapacité à régénérer) et deux chez des grenouilles avec membres intacts.[66] Ce dernier résultat devient très intéressant si l'on pense à l'importance de l'apport nerveux durant la phase de préparation de la régénération dont j'ai parlé précédemment. La capacité de régénération protégerait du cancer donc, si la régénération apparaît impossible, cette protection disparaîtrait. À plus forte raison, les capacités de régénération des anoues adultes sont nulles (*Rana*) ou très imparfaites (*Xenopus laevis*) si on les comparent aux urodèles (voir 1.2.2.D), réduisant encore la protection anti-cancérigène qu'apporterait la capacité à régénérer. Il serait particulièrement intéressant de tenter d'induire des cancers, à l'aide de MC, sur des axolotls ayant les membres dénervés.

1.3 Conclusion cancer et régénération

Donc, si un champ d'individuation « puissant » est mis en présence d'un évocateur cancérigène durant la régénération (période de compétence), il n'y aurait pas développement d'un cancer mais régénération normale d'un organe en lien avec le champ d'individuation. C'est en effet ce qu'il est possible d'observer chez les urodèles car, à ce jour, toutes tentatives d'induction d'un cancer dans un blastème de patte se sont soldées par une régénération exempte de toute trace de cancer.

Il serait très intéressant de pouvoir comparer l'effet des cancérigènes utilisés lors des précédentes expériences sur des organismes autres que les amphibiens. Même s'il existe plusieurs études utilisant ces cancérigènes chez les mammifères, il s'avère pourtant impossible de comparer l'effet de ces substances pour plusieurs raisons. L'administration

des différents cancérigènes chez les amphibiens ne se fait pas de la même façon qu'avec les mammifères. Par exemple, dans la plupart des expériences il y a soit implantation d'un cristal sous l'épiderme ou dilution du produit dans l'eau qu'occupe l'animal. Chez les mammifères, les substances cancérigènes sont souvent administrées oralement, injectées, implantées sous la peau et la quantité du cancérigène est fonction du poids de l'animal, ce qui n'est pas le cas lors des expériences utilisant des amphibiens. Malgré ces difficultés à comparer la résistance aux cancers de différents modèles expérimentaux, il n'en demeure pas moins que les urodèles, même s'il est possible de leur induire des tumeurs, démontre une incidence moindre de cancer.[38] D'un point de vue strictement expérimental, les chercheurs désirant causer des précédents de tumeurs chez les urodèles ont assurément utilisés la dose maximum non-toxique pour leurs animaux de laboratoire et ceux-ci ne sont pas parvenus à générer de cancer massivement. Il est tout de même possible d'observer l'effet de différentes drogues cancérigènes chez les mammifères. Par exemple, chez le hamster, l'administration intragastrique de MNNG (LD₅₀) durant 25 semaines cause des papillomes et des carcinomes chez 80% des males et 30% des femelles.[67] Il est aussi connu que le « goudron de charbon », générant des membres accessoires chez les amphibiens, cause des ostéosarcomes chez le lapin.[57, 68]

Il semble bien exister un lien entre la régénération et la résistance au cancer. Le désir de comprendre plus en détail ce lien pousse donc à utiliser un modèle vertébré qui peut à la fois régénérer et qui apparaît très résistant à l'induction de cancer : l'axolotl. Afin d'entreprendre l'étude du lien «résistance au cancer» et régénération, il apparaissait logique de concentrer nos efforts sur la protéine p53, un tumeur-supresseur impliqué dans le contrôle du cycle cellulaire et de l'apoptose, une protéine qui est mutée dans près de 50% des cancers humains (90% de mutation dans les mélanomes humains).[69-71] Ainsi, nous avons entrepris d'étudier la protéine p53 chez l'axolotl et voulons comparer sa séquence et son activité avec ce qui est connu de d'autres espèces. De plus, nous espérons déterminer si p53 joue un rôle durant la régénération.

1.4 La protéine p53

1.4.1 Historique

Les débuts de l'étude de p53 ont été traversés par plusieurs erreurs d'interprétation. Aujourd'hui, nous savons que *p53* est un gène tumo-suppresseur, mais à l'origine tout n'était pas aussi clair. Les premières expériences touchant p53 datent de 1979. À cette époque deux équipes de chercheurs, celle de Lane et Linzer, observèrent une protéine de 54KDa immunoprécipitant avec le « large T antigen » du virus SV40 de cellules de souris et de hamster transformées à l'aide de ce même virus.[72, 73] Cette protéine de 54KDa fut aussi observée dans des cellules cancéreuses de souris.[73] La protéine p53 était perçue, à cette époque, comme étant un antigène tumoral.

Pendant un moment, *p53* fut aussi pris pour un oncogène, car on retrouvait la protéine p53 en grande quantité dans les cellules transformées.[74, 75] De plus, lorsque la protéine était introduite dans des fibroblastes d'embryons de rongeurs, les cellules s'immortalisaient.[74, 75] Cependant, ces dernières études utilisèrent toutes une séquence de *p53* mutée, masquant les véritables propriétés de régulation négative du cycle cellulaire et d'induction d'apoptose de la protéine p53.[76] Donc, c'est seulement plus tard, au début des années 90, que les véritables fonctions de *p53* ont été reconnues soit : ses capacités de tumo-suppression, permettant le maintien de l'intégrité génomique des cellules, par le biais de l'arrêt du cycle cellulaire ou de l'apoptose des cellules ayant leur double brin d'ADN endommagé. Les observations suivantes ont permis de comprendre les véritables fonctions de p53. La première observation : souvent, lors de cancer, une copie de l'allèle codant le gène *p53* est muté et génère, de ce fait, une protéine mutante. Il faut savoir que p53 agit comme facteur de transcription sous forme de tétramère. Si le tétramère comporte une protéine p53 mutée ceci inhibe son activité et peut entraîner un effet dominant négatif. Ainsi, lorsqu'il y a formation d'hétéro-tétramères de p53 il n'y a pas d'initiation de la transcription des gènes cibles.[77] La deuxième observation : les cellules transformées dans lesquelles un vecteur exprimant p53 « sauvage » est introduit prolifèrent moins.[78] La troisième observation : les patients souffrant du syndrome Li-Fraumeni, syndrome autosomique dominant (une seule copie d'un gène est muté sur un chromosome non sexuel) caractérisé par l'apparition de plusieurs néoplasies du mésenchyme et de l'épithélium, possèdent des mutations héréditaires sur un de leur gène codant pour *p53*, inhibant son effet

à l'image de la première observation.[79, 80] La quatrième observation : les souris homozygotes pour l'allèle nul p53 (p53 -/-) se développent normalement mais sont particulièrement sujettes aux cancers : à six mois, 74% des souris homozygotes « p53 nul » développent des néoplasies avec un temps moyen d'apparition des tumeurs de 20 jours tandis que les souris contrôles homozygotes « p53 sauvage » ne développent pas de cancers.[81] Ce sont ces observations qui ont permis de déterminer la vraie nature de p53 vis-à-vis le cancer. La protéine p53, en réponse à un stress cellulaire, peut activer la transcription de gènes menant à l'arrêt du cycle cellulaire, afin de permettre de réparer la cellule ou, si les dommages sont trop importants, d'enclencher, par le biais de l'activation de gènes cibles, la mort cellulaire programmée, l'apoptose. Lors d'un cancer, s'il y a mutation du gène *p53*, celui-ci n'a plus la même efficacité comme facteur de transcription et ne peut plus empêcher une cellule endommagée de répliquer ses erreurs.

Nous savons aujourd'hui que p53 fait partie d'une famille de protéines, facteurs de transcription, comprenant p63 et p73. Ces protéines ont une structure semblable et leur domaine de liaison à l'ADN comporte 63% d'identité. Il est donc plausible que ces protéines partagent certaines fonctions. Par exemple, p73 peut activer les gènes régulés par p53 donc arrêter le cycle cellulaire et enclencher l'apoptose.[82] La différence marquante entre la protéine p53 et p63/p73 consiste en la présence en C-terminal d'une séquence SAM (Steric Alpha Motif).[82-84] Ce motif serait impliqué dans la régulation du développement des organismes. P63 et p73 posséderaient un nombre important de « variantes » d'épissages modulant leurs effets au sein de la cellule.[85, 86] Malgré le chevauchement pouvant exister entre ces trois protéines, p53 aurait spécialement évolué pour devenir une protéine tumo-suppresseur répondant à différents stress cellulaires. La protéine p63 serait, quant à elle, indispensable au développement de l'ectoderme, tandis que p73 régulerait certaines réponses aux stress (par des voies différentes de p53) ainsi que le développement des tissus neuronaux.[82-84, 87]

1.4.2 Structure de la protéine p53

Parmi les différentes espèces chez qui p53 a été identifié, cette protéine conserve une organisation de domaines et régions similaires.[88] La protéine p53 humaine, qui compte 393 acides aminés, est composée de 5 principaux domaines fonctionnels.[89] Le

premier domaine est celui de transactivation situé sur la partie N-terminale de la protéine allant du résidu 1 à 60-63 dépendamment des études.[89-91] Ce domaine sert à l'activation de la transcription de gènes : des modifications post-traductionnelles au niveau de ce domaine activent la protéine p53. C'est aussi dans ce même domaine, sur les résidus F19, W23 et L26, que vient se lier la protéine ubiquitine ligase Mdm2, le régulateur négatif de p53.[92] Le domaine riche en proline, faisant partie du domaine N-terminal de la protéine, comprenant les résidus 61-94, est composé de 5 répétitions de séquences PXXP importantes pour les fonctions apoptotiques de p53.[90, 93, 94] Un domaine de liaison à l'ADN, résidus 94 à 312 [95], le siège de 90% des mutations touchant p53 [70, 96] empêchant la protéine de lier l'ADN et d'initier la transcription de certains gènes importants dans l'apoptose et l'arrêt du cycle cellulaire...ceci pouvant mener à un cancer en inhibant les activités tumeur-suppresseurs de p53.[97] La protéine p53 comprend aussi un domaine de tétramérisation (résidus 324-355) [98], favorisant la tétramérisation de la protéine lui permettant d'avoir son effet d'activation de transcription des gènes impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose. De plus, la région C-terminale contient un domaine de régulation négatif allant des résidus 360 à 393.[99] Cette partie est particulièrement importante pour le marquage de la protéine par l'ubiquitine, marquage impliquant la protéine Mdm2. Une mutation de p53 sur les lysines 370, 372, 373, 381, 382, 386 changeant celles-ci en arginine empêcherait l'ubiquitination de la partie C-terminale de p53 donc son marquage et sa dégradation ultérieure.[100] Parmi ces différents domaines, il existe aussi 5 régions excessivement conservées à travers l'évolution. Une de ces régions fait partie du domaine de transactivation alors que les 4 autres occupent le domaine de liaison à l'ADN (les régions II-IV-V lient l'antigène T de SV40).[88] Plusieurs résidus du domaine de tétramérisation (ou leur équivalent) sont aussi conservés dans la protéine p53 de tous les organismes, ces résidus sont : E326, G334, E339, M340, N345, L348, L350.[84, 88, 101] De plus, il existe deux autres parties de la protéine particulièrement conservées chez tous les organismes, soit le NLS (Signal de Localisation Nucléaire, résidus 296-314 chez l'homme [102]) ainsi que le NES (Signal d'Export Nucléaire, résidu 332 à 343 chez l'homme).[102] Ces deux derniers domaines régulent le transport de la protéine p53 au noyau afin qu'elle puisse remplir son rôle de facteur de transcription.[103, 104]

Tableau II : Homologie de séquences de la protéine p53 chez différentes espèces

	Pourcentage de résidus identiques	Pourcentage de résidus positifs
Humain/ <i>Mus musculus</i>	77%	82%
Humain/ <i>Spalax ehrenbergi</i> (Israeli mole rats)	82%	87%
Humain/ <i>Gallus gallus</i>	53%	64%
Humain/ <i>Danio rerio</i>	56%	68%
Humain/ <i>Xenopus laevis</i>	53%	65%
Human/axolotl*	52%	64%
Axolotl*/ <i>Mus musculus</i>	55%	64%
Axolotl*/ <i>Spalax ehrenbergi</i>	52%	64%
Axolotl*/ <i>Xenopus laevis</i>	54%	66%

Résultats issus de la comparaison des séquences contenues sur le site NCBI-BLAST, www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/

*séquence p53 d'axolotl que nous avons cloné

- résidus identiques = pourcentage comprenant les acides aminés identiques
- résidus positifs = pourcentage comprenant les substitutions par des acides aminés avec caractéristiques semblables

1.4.3 Régulation, activation, cibles et actions de p53

1.4.3.A Régulation de p53 : rôle de Mdm2 et de MdmX

La régulation de p53 s'effectue au niveau de la protéine [105] elle ne dépend donc pas d'ARNm attendant d'être traduit suite à un stress. L'augmentation de la demi-vie ainsi que l'activation de la protéine p53 s'opère grâce à des modifications post-traductionnelles changeant la conformation de la protéine. Plusieurs résidus de la protéine peuvent être modifiés suite à l'ajout ou au retrait d'un groupement phosphate, acétyl, glycosyl, ribose, ubiquitine ou sumo.[69, 106, 107] Ces modifications post-traductionnelles ont pour objectif d'augmenter la demi-vie de la protéine p53 et de changer sa conformation, exposant son site de liaison à l'ADN, afin qu'elle puisse être utilisée comme facteur de transcription sur ses gènes cibles. Certaines modifications (ubiquitination) peuvent aussi servir à marquer la protéine afin qu'elle devienne visible à la machinerie de protéolyse.

Dans une cellule saine, la protéine inactive est présente en faible quantité et durant un laps de temps allant de 5 à 20 minutes.[105] La présence de p53 est régulée

négativement par la protéine Mdm2 qui est elle-même régulée négativement par p53. Le fait que p53 régule Mdm2 et que Mdm2 régule p53 crée une boucle de régulation négative faisant varier hors phase la quantité de ces deux protéines.[69] Ceci permet de conserver un niveau constant de protéine p53 rapidement utilisable par la cellule. La protéine Mdm2 fait partie de la famille des E3 ubiquitine ligase, ici se liant spécifiquement à p53.[100] La régulation continue des deux protéines s'effectue comme suit : lorsque nous avons un haut niveau de la protéine p53, celle-ci va se lier à la région stimulant la transcription du gène *Mdm2*, augmentant son niveau d'ARNm et sa traduction en protéine; la protéine Mdm2, à son tour, va se lier à la protéine p53 stimulant l'ubiquitination de sa partie c-terminale qui devient ainsi accessible à la machinerie de dégradation protéolytique reconnaissant l'ubiquitine (26S Protéasome), ce qui réduit le niveau de la protéine p53... et ainsi de suite.[69] Un stress cellulaire, changeant la structure de la protéine par modifications post-traductionnelles (on peut penser ici à la phosphorylation de la sérine 15, thréonine 18 ou sérine 20 au niveau du n-terminal de la protéine p53) empêcherait l'interaction protéine-protéine entre Mdm2 et p53 ce qui prévient le marquage de p53 et sa dégradation subséquente.[69, 70, 108] Ces modifications post-traductionnelles changent la conformation de la protéine en la rendant plus stable et l'activant, lui permet de jouer son rôle de facteur de transcription.

La quantité de protéine Mdm2 pourrait avoir différents effets sur le devenir de la protéine p53. Lorsque le niveau Mdm2 est élevé, p53 serait poly-ubiquitinée et dégradée à même le noyau par le protéasome 26S. Ce qui va légèrement à l'encontre de l'idée généralement acceptée voulant que la protéine p53 doit sortir du noyau pour être dégradée.[100] Par contre, lorsque le niveau de Mdm2 est normal (bas), la protéine p53 serait mono-ubiquitinée et simplement exclue du noyau de la cellule (mais encore disponible à répondre à un stress) l'empêchant d'avoir son effet transactivateur.[109-111]

La capacité de Mdm2 à lier p53 peut aussi être modulée par la protéine MdmX, une protéine de structure très homologue à Mdm2 sans pour autant être une E3 ubiquitine ligase.[100, 108] Cette dernière protéine lie p53 l'empêchant d'être dégradée par Mdm2 (ubiquitination et sa destruction par protéasome) mais aussi empêche son action transactivatrice.[100, 112] MdmX lie aussi Mdm2 empêchant sa dégradation et augmentant son niveau cellulaire.[113] Mdmx empêche la dégradation à la fois de p53 et de Mdm2 en

inhibant leur boucle de rétroaction négative et permet de garder une quantité importante de protéine p53 pouvant être rapidement utilisée.[112] MdmX est donc directement impliquée dans la régulation de l'interaction Mdm2-p53.[108]

1.4.3.B Les voies d'activation de p53

La protéine p53 est normalement inactive dans une cellule saine mais se trouve très rapidement activée lorsqu'il y a stress cellulaire, c'est-à-dire perte de signaux de survie, présence d'inhibiteur des microtubules, érosion des télomères, hypoxie, anoxie, baisse de disponibilité des ribonucléotides, dommages à l'ADN ou action d'oncogènes. En réponse à ces différents stress et ce, en fonction de l'importance des dommages cellulaires rencontrés, p53 peut induire l'arrêt du cycle cellulaire, la différenciation cellulaire, la réparation de l'ADN, l'apoptose ou la sénescence de la cellule.[70] Différentes voies d'activation de p53 sont utilisées pour répondre à différents stress cellulaires. Il existerait trois principales voies d'activation de p53.

Premièrement, on retrouve la voie impliquant les deux protéines kinases ATM et Chk2.[69] Cette voie répond aux bris du double brin d'ADN suite à des radiations ionisantes, par exemple. ATM est ici activée par les dommages à l'ADN et elle active ensuite Chk2. Une fois les dommages survenus, ATM phosphoryle la sérine 15 de p53 tandis que Chk2, activée par ATM, phosphoryle la sérine 20.[114, 115] Cette phosphorylation augmente la demi-vie de la protéine p53 (en empêchant Mdm2 de lier la partie N-terminale de la protéine) lui permettant de transactiver les protéines p21 (arrêt du cycle cellulaire en G1) et Bax (induction d'apoptose).[116] Ainsi, cette voie cause un arrêt du cycle cellulaire au point de contrôle G1, un arrêt prolongé, ou même l'apoptose. ATM et Chk2 aurait aussi un rôle dans la phosphorylation de MdmX, contribuant à activer plus fortement l'accumulation de p53 afin de bonifier son effet.[116, 117]

Deuxièmement, une voie comprenant la protéine p14^{arf} répond aux signaux de croissance aberrants souvent liés aux proto-oncogènes Ras et Myc.[69] Cette voie permet une régulation très étroite du cycle cellulaire. Lorsqu'il y a activation de p14^{arf}, suite à des signaux mitogéniques incohérents, cette protéine inhibe l'action régulatrice de Mdm2 sur p53, en se liant sur la région centrale de Mdm2. Ceci empêche la dégradation de p53, lui

permettant d'agir comme facteur de transcription sur p21 afin de stopper le cycle cellulaire.[118, 119]

Une troisième voie implique la kinase ATR et la caséine kinase II.[69] Cette voie est enclenchée suivant des dégâts causés par des drogues chimiothérapeutiques, les UVs, les inhibiteurs de kinases et l'hypoxie.[120] ATR phosphoryle les sérines 15 et 37 avec une activité 20 fois inférieure à ATM.[107, 120] L'activation de CKII inhiberait p53 et, par le fait même, l'expression de p21 dans la cellule. Certains résultats obtenus par le groupe de Bae laisse entrevoir un rôle de CKII dans la sénescence et le vieillissement : des tissus plus âgés produiraient moins de CKII ce qui favorise l'activation de p53 transactivant plus de p21.[121]

En résumé, ces différentes voies apportent des modifications post-traductionnelles à la protéine p53 (phosphorylation, acétylation, glycosilation...) lui permettant de conserver plus longtemps sa stabilité et d'agir comme facteur de transcription modifiant l'expression de gènes en aval. Pour être actif comme facteur de transcription p53 doit être assemblé sous forme de tétramère. C'est en effet pour cette raison qu'il est possible qu'il y ait inactivation de p53 par la mutation d'un seul allèle contenant le gène, comme c'est le cas dans la maladie de Li-Fraumeni. Il y a alors formation d'un hétéro-tétramère incapable d'activer la transcription de gènes cibles.[80, 122]

1.4.3.C Les cibles et actions de p53

La régulation de p53 par Mdm2, qui est une cible de p53 impliquant une interaction protéine-protéine, vient d'être survolée. Il existe une multitude interactions découlant de l'activation de p53 résultant en la traduction de protéines impliquées dans l'apoptose/survie cellulaire, dans l'arrêt du cycle cellulaire/réparation de l'ADN ainsi que dans l'angiogénèse/invasion tumorale.[70]

Comme il a été dit plus haut, l'activation des voies de p53, lorsque la cellule est endommagée, peut entraîner différentes répercussions en fonction des cibles activées. Souvent, lorsque les bris ne sont pas trop importants, p53 commande l'arrêt du cycle cellulaire en régulant la transcription de p21^{WAF1/CIP1}, un inhibiteur des CDK (Cyclin-Dependent Kinase), bloquant le cycle en G1 ou G2.[69] La protéine p53 peut aussi activer la transcription du gène Réprimo bloquant le cycle cellulaire en G2 ou de 14-3-3 σ

séquestrant les complexes cyclin-CDKI hors du noyaux favorisant aussi un blocage en G2.[69] La protéine 14-3-3 σ jouerait aussi un rôle dans la stabilisation de p53 (rétroaction positive).[123] Cet arrêt, s'initiant de plusieurs façons différentes, utilisant plusieurs voies et protéines différentes, démontre l'importance et la robustesse que doit avoir le contrôle de l'arrêt du cycle cellulaire. Cet arrêt du cycle permet la réparation des bris aux doubles brins d'ADN par le mécanisme de réparation NER (Nucleotide Excision Repair) et empêcherait la cellule de répliquer des erreurs modifiant le fonctionnement/effet de protéines.[110, 124-126]

Si les bris au double brin d'ADN de la cellule sont trop importants, la protéine p53 peut mener la cellule vers l'apoptose, la mort cellulaire programmée. L'apoptose se caractérise par plusieurs changements dans la morphologie de la cellule. Il y a fragmentation du noyau (formation de corps apoptotiques), rétrécissement du cytoplasme et plusieurs changements au niveau de la membrane cellulaire (le « blebbing » de la membrane, retournement de la membrane). La mort cellulaire par apoptose est qualifiée de propre car elle n'endommage pas les cellules avoisinantes comme c'est le cas lors de nécrose. L'apoptose est excessivement régulée et a un rôle important à jouer dans le maintien de l'homéostasie de l'organisme.[44] La protéine p53 peut provoquer l'apoptose par le biais de l'activation de la transcription des protéines Bax (famille Bcl-2), NOXA, P53AIP1, etc.[110, 127] Il peut aussi activer directement la transcription de *Apaf1*, élément central de la voie apoptotique mitochondriale.[128, 129] La protéine p53 peut aussi engager l'apoptose directement en stimulant la mitochondrie à produire des substances oxydatives toxiques (ROS: toxic Reactive Oxygen Species).[69]

En activant la transcription du gène BAI1 (Brain specific angiogenesis inhibitor 1), p53 peut aussi empêcher l'irrigation sanguine de la tumeur, la privant d'oxygène et des nutriments essentiels à son développement.[69, 127]

La voie ATM/P53/p21 aurait aussi un rôle important à jouer dans la sénescence répllicative. Un signal de survie passant par la voie comprenant la kinase ATM [130] stimule, dans un premier temps, par le biais de p53, la transcription de p21^{WAF1}, bloquant le cycle cellulaire en G1 ou G2. Un second mécanisme activerait ensuite la transcription de p16 maintenant le cycle cellulaire arrêté.[130]

Par ses effets sur la cellule, c'est-à-dire blocage du cycle cellulaire pour fin de réparation, apoptose et entrée en sénescence des cellules trop endommagées, la protéine p53 peut-être qualifiée de gardienne de l'intégrité du génome.[131]

L'activation de la protéine p53 se fait par des modifications post-traductionnelles de résidus cibles de la protéine, modifiant sa conformation donc son activité. Les UVs, les rayons ionisants et les traitements avec drogues (passant par les voies ATM/ATR) engendrent des modifications post-traductionnelles aux différentes parties de la protéine.[132] Ces modifications ont lieux principalement dans la partie n-terminale et c-terminale de la protéine et touchent une vingtaine de résidus de la protéine humaine.[132] Des modifications de la partie N-terminal stabilisent la protéine [133], empêchant sa dégradation via Mdm2 [134], la stabilisant et lui permettant d'avoir son rôle d'activation de la transcription de protéines. Les résidus le plus souvent modifiés, ici par phosphorylation, suite à un bris de l'ADN, sont les sérines 9 et 15 (critique pour l'activité apoptotique) [133], 20 et 46 qui, à leur tour, permettent la phosphorylation de la sérine 6 et de la thréonine 18 (tous résidus de la partie n-terminale).[132] Des résidus de la partie C-terminale peuvent aussi être phosphorylés, pensons ici aux sérines 315 et 392, qui ont un rôle important à jouer dans la capacité d'oligomérisation de la protéine.[135] Les lysines de la partie C-terminale de la protéine jouent aussi un rôle important dans sa stabilisation. Lorsqu'elles sont acétylées (Lys-370, 371, 372, 381, 382), la protéine ne peut être marquée par l'ubiquitine et donc ne peut être dégradée par la machinerie protéolytique.[136] La phosphorylation des sérines 315 et 392 augmentent la capacité de la protéine à lier des séquences spécifiques d'ADN et prend part à l'activation des fonctions de p53.[137] Il a aussi été constaté que dans une cellule sénescence, p53 possède un patron de phosphorylation différent de ce qui est observé chez une cellule saine. Les Thr18 et Ser376 y sont plus souvent phosphorylées tandis que leurs Ser392 le sont moins que dans des cellules saines.[130] Il est donc clair que les modifications post-traductionnelles influencent la quantité de protéine p53 (stabilité) ainsi que sa spécificité à certaines séquences d'ADN.[133]

1.4.4 p53 et cancer : perte de l'activité tumo-suppresseur

L'inactivation de p53 est la principale cause de cancer. La protéine p53 est mutée dans 50 % des cancers humains et dans plus de 90 % des cancers humains n'étant pas liés à la présence de mélanomes.[69, 71, 138] Comme nous le savons, la modification de la structure de la protéine occupe un rôle central, autant dans l'ajustement de la quantité de p53 actif présent dans la cellule que dans sa capacité à transactiver d'autres protéines. S'il y a mutation de la protéine il y a très souvent modification de sa structure donc de son activité. Ainsi, la plupart des mutations touchant p53 ont des effets sur la demi-vie de la protéine [79, 139] et sur sa capacité à lier l'ADN. La formation d'hétéro-tétramères peut produire un effet dominant négatif, ce tétramère serait incapable d'initier la transcription de gènes entraînant l'arrêt du cycle cellulaire ou l'apoptose. Dans ce cas, la réparation/destruction de la cellule ne pourrait s'accomplir et celle-ci pourrait donc répliquer ses erreurs. Une mutation ne touchant qu'un acide aminé peut avoir de graves répercussions si celle-ci correspond à un résidu clé. Par exemple, la mutation d'un résidu important dans le site de liaison à l'ADN de la protéine pourrait inhiber le rôle de facteur de transcription de celle-ci. Il est intéressant de souligner que 95% des mutations à la protéine p53 se retrouvent dans son site de liaison à l'ADN.[70] De plus, 13000 points de mutations simples dans le domaine de liaison à l'ADN ont été dénombrés, plus particulièrement dans les 5 régions les plus conservées de la protéine p53 à travers l'évolution.[88, 97, 140, 141] D'autres résultats soulignent l'importance accrue de certains résidus ayant un taux de mutation très élevé. Effectivement, 28% des mutations rencontrées dans les cancers humains touchent les résidus 175, 245, 248, 249, 273, 282. Les protéines mutées en ces endroits seraient plus stables et agiraient comme dominants négatifs lors de la tétramérisation de p53.[70]

La perte de l'effet tumo-suppresseur de p53 n'est pas obligatoirement due à une mutation touchant la protéine. Il arrive souvent que certains problèmes surviennent au niveau des voies de signalisation en amont ou en aval de p53. Par exemple, une mutation de la protéine Mdm2, la rendant plus résistante à la dégradation, augmente sa capacité à ubiquitiner p53, favorisant sa dégradation protéolytique. L'activité de la protéine Mdm2 est en effet amplifiée dans approximativement 30% des sarcomes humains.[142] Une inactivation de Apaf1 (voie apoptotique mitochondriale), cible de p53, augmente le

potentiel de transformation de cellules murines primaires.[143] La protéine p53 peut être intacte sans pour autant être apte à induire la destruction ou l'arrêt du cycle cellulaire d'une cellule endommagée.

1.4.5 p53 chez les organismes moins évolués, amphibiens et *Spalax*

1.4.5.A p53 chez les organismes moins évolués

Il est bien connu que p53 a un rôle important dans le maintien de l'homéostasie et de l'intégrité génomique des organismes. Par contre, il est possible d'imaginer d'autres rôles pour p53 comme celui qu'il semble jouer dans le vieillissement et peut-être même dans la régénération. C'est pour cette raison qu'il est important d'étudier p53 chez des organismes démontrant des traits telle une longévité accrue (lien avec la résistance aux cancers) ainsi qu'une capacité à régénérer. Il devient alors impératif de recenser ce qui est connu de p53 chez des organismes plus bas dans l'échelle de l'évolution, organismes qui possèdent souvent des attributs intéressants que l'on ne retrouve pas, par exemple, chez la souris, telles la régénération, la résistance à l'hypoxie, une longévité accrue, etc.

Des organismes comme le poisson zébre (*Danio rerio*), le nématode (*Caenorhabditis elegans*) et la mouche à fruit (*Drosophila melanogaster*) possèdent des protéines très homologues à p53. Celles-ci ont des rôles semblables et sont impliquées dans le vieillissement des organismes.[144] Bien que ces protéines soient comparables et aient des rôles similaires, leur activité n'est pas nécessairement régulée de la même façon que chez les mammifères. Cela laisse soupçonner l'existence de plusieurs autres mécanismes de contrôle et de régulation de la protéine qui ne sont pas encore connus, par exemple, *C. elegans* et *drosophila* ne possèdent pas de protéines correspondant à Mdm2.[144]

1.4.5.B p53 chez les amphibiens

Comme nous venons de le voir, il appert que la protéine p53 n'est pas régulée de façon identique chez tous les organismes vivants.[144] Ainsi, utilisant un amphibien comme modèle, dans notre cas l'axolotl, il est important de retracer ce qui est connu à propos de la protéine p53 des amphibiens. La plupart des connaissances touchant le gène *p53* amphibien proviennent d'études sur le xénope (*Xenopus laevis*), une grenouille (anoure) que nous savons déjà différente de l'axolotl quant à sa capacité de régénération.

Xenopus Laevis possède une protéine de 355 ou 363 AA (deux codons de départ différents) très semblable à celle du p53 humain et murin.[145] La séquence en acide aminé de la protéine du xénope est à 51% homologues avec la séquence humaine et à 57% avec la séquence murine. Certains résultats indiquent que la protéine p53 de xénope possède des activités similaires à celles de l'humain, car il y a une accumulation de p53 suite à une exposition de cellules de xénope aux rayons UV. Dans des expériences utilisant des cellules de xénope en cultures (lignée A6), il est possible de voir une stabilisation de la protéine Xp53 (*Xenopus laevis* p53) après un dommage au double brin d'ADN (UV, IR et Adriamycin). Cette accumulation engendrée par la phosphorylation de p53 mène encore ici soit vers l'arrêt du cycle cellulaire ou l'apoptose.[141] De plus, Xp53 a la capacité de transactiver plusieurs promoteurs humains dont le promoteur de WAF-1 (p21), Mdm2 et bax qui contiennent un élément de réponse à p53.[141] Il apparaît que Xdm2 est capable de lier la protéine p53 de mammifère.[92, 146] De plus, la liaison de Hdm2 au Xp53 entraîne l'inactivation des propriétés de transactivation de la protéine p53 de xénope.[147] Autre expérience montrant la conservation de l'activité de Xp53 est sa capacité à lier le SV40 « large T antigen » comme le fait la protéine humaine augmentant son temps de demie vie de 20 fois.[148] Quelques différences subsistent pourtant, Xp53 est une protéine thermosensible qui n'a aucun effet à 37°C.[141, 149] Nous savons qu'il est possible de produire des mammifères KO pour *p53*, par exemple des souris *p53* *-/-*, qui sont viables mais meurent prématurément du fait qu'elles développent une multitude de tumeurs.[122, 150-152] Pour ce qui est du xénope, il apparaît que l'inhibition de p53 durant le développement embryonnaire (en utilisant des dominants négatifs et en surexprimant Xdm-2 régulant négativement p53) empêche la différenciation de ses blastomères. Son développement est donc très anormal et forme une masse de cellules semblable à une tumeur. Il est possible de faire un sauvetage « partiel » du phénotype en introduisant des protéines « p53 sauvages », ce qui permet à l'embryon de passer le stade de blastula moyenne mais celui-ci n'est toujours pas normal ni viable.[153] Le sauvetage du phénotype des embryons amphibiens « p53 null » requiert l'emploi d'une quantité très précise de protéine pour ne pas altérer la suite du développement embryonnaire ce qui démontre l'importance d'une régulation minutieuse de p53 chez l'amphibien : on ne peut pas seulement surexprimer massivement « p53 sauvage » pour sauver le phénotype.[153] Donc,

la présence de p53 est requise durant le développement embryonnaire des amphibiens, ce qui ne semble pas être le cas chez les mammifères.

1.4.5.C p53 et *Spalax* : un mammifère ayant une longévité élevée et résistant à l'hypoxie

Le *Spalax* (*Spalax ehrenbergi*, Israeli mole rats) est un mammifère fouisseur s'apparentant aux rongeurs qui vit dans un environnement ayant un niveau d'oxygène très faible. Cet animal est caractérisé par une résistance très importante à l'hypoxie et possède un quotient de longévité très élevé pour un rongeur, par exemple *Mus musculus* (en captivité) vit en moyenne 2 ans tandis que 80% des *Spalax* en captivité dépassent 24 ans.[4] Le *Spalax* possède un quotient de longévité (LQ) très semblable à celui de l'humain : l'humain a un quotient de 5,1 tandis que le *Spalax* en a un de 5.0.[4] Les premières études chez le *Spalax* touchaient le nombre de chromosome de l'animal qui semble varier en fonction de l'aridité de son environnement.[154]

Un fait très intéressant fut soulevé par les études sur le *Spalax*. Nous savons qu'une mutation d'un seul résidu dans le domaine de liaison à l'ADN de la protéine p53 peut avoir un effet dominant négatif et inhiber l'action de la protéine p53. C'est-à-dire inhiber l'arrêt du cycle cellulaire et/ou l'induction d'apoptose suite à des bris de l'ADN pouvant générer une néoplasie, un cancer. Chez le *Spalax*, la région III du site de liaison à l'ADN est le siège d'une mutation. L'arginine 174 (R174) a été remplacée par une lysine (K174) ce qui correspond à un changement vu dans plusieurs cas de cancer [128] atténuant l'activité apoptotique de p53. Soulignons que cet acide aminé est particulièrement conservé tout au long de la phylogénie ce qui laisse présager de son importance pour la structure de la protéine.[128] Il pourrait être possible que le *Spalax*, vivant dans un milieu fortement hypoxique, ait sélectionné cette modification afin de rendre ses cellules moins sensibles au manque d'oxygène et à l'hypercapnie (taux de CO₂ trop élevé) auquel il est en permanence confronté. Cette « adaptation » empêcherait les cellules en hypoxies d'entrer en apoptose. Il s'avère que plusieurs autres animaux vivant dans des milieux extrêmes présentent la même mutation c.i.e. le *Xénope laevis*, *Monodelphis domestica* (opossum), deux espèces de *Xiphophorus* (poissons tropicaux), *Loligo forbesi* (pieuvre) et *Mya arenaria* (softshell clam). Tous ces animaux, exception faite de l'opossum, vivent dans des milieux aquatiques

hypoxiques pouvant expliquer la substitution R174K.[128] Le *Spalax* peut demeurer plus de 14 heures dans un milieu n'ayant que 3% d'O₂ tandis qu'un rat, dans les mêmes conditions, ne peut survivre que de 2 à 4 heures.[128] Dans le même ordre d'idée, une mutation de la protéine p53 peut rendre une cellule plus apte à résister au microenvironnement souvent hypoxique d'une tumeur en formation.[155] Des essais de gènes rapporteurs ont montré que la protéine du *Spalax* est moins efficace dans l'induction de l'apoptose par le biais de Apaf1 et que les protéines impliquées dans l'arrêt du cycle cellulaire sont sur-activés (P21, cycG, PTEN, Mdm2 ...) ce qui permettrait une réparation des bris plutôt qu'une apoptose massive tuant l'animal.[128] Un trait particulièrement intéressant chez cet animal est qu'il possède une longévité importante en rapport à son poids. Le *Spalax* pèse approximativement 35 grammes et vit plus de 20 ans. Le plus vieux spécimen (capturé en nature) est mort à plus de 28,3 ans. On sait que la protéine p53 peut entraîner un vieillissement précoce chez la souris et la mouche lorsque celle-ci est mutée, exprimée sous une forme active en permanence ou lorsqu'un allèle mutant sensible à la température est utilisé dans la génération de souris transgéniques : p53 semble donc impliqué dans le vieillissement.[151] Autre fait intéressant, le *Spalax* semble démontrer une certaine résistance au cancer. En effet, aucune trace de cancer ne fut décelée chez 250 *Spalax* âgés de 2 à 25 ans lors de d'autopsie. De plus, aucune tumeur n'a jamais été observée sur un animal vivant, ce qui est plutôt rare chez des animaux pouvant vivre aussi longtemps.[4]

D'après nos résultats, l'axolotl montre la même mutation que le *Spalax* et le xénope sur l'acide aminé 174 (R174K). L'activité de sa protéine p53 semble sensible à la température comme celle du xénope. L'axolotl démontre une résistance au cancer ainsi qu'une longue espérance de vie comme semble montrer le *Spalax* et le xénope. Tous ces traits peuvent être liés à la protéine p53. Il est donc plus qu'intéressant d'étudier p53 chez l'axolotl suite à ces multiples observations préliminaires.

1.4.6 P53 durant la régénération

Il existe très peu de travaux liant p53 à la régénération. Ce qui s'en approche le plus sont des études d'apoptose durant le développement et la régénération du membre chez le triton (*Notophthalmus viridescens*).[156, 157]

Contrairement à ce qui est observé chez les mammifères, il n'y a pas d'apoptose interdigitale lors de l'embryogenèse chez les amphibiens (observé chez *Xenopus laevis*, *Bufo americanus*, *Ambystoma maxucanum*, *Ambystoma maculatum* et *Taricha torosa*).[158, 159] Il existe aussi une différence majeure entre le développement et la régénération des doigts chez le triton. C'est-à-dire que durant le développement, les doigts apparaissent séquentiellement tandis que lors de la régénération la pousse des doigts se fait simultanément à partir du stade palette.[157] Chez l'axolotl, contrairement au triton, les doigts apparaissent séquentiellement durant le développement ainsi que lors de la régénération.[160, 161] Chez le triton, il y a absence d'apoptose durant le développement de la « main » selon des observations allant du stade de bourgeon de patte au stade 4 doigts [157] mais il est possible d'observer la présence importante de cellules en apoptoses durant le premier jour suivant l'amputation du membre d'un triton adulte. Une seconde « vague » apoptotique serait observée plus tard durant la régénération et serait impliquée dans le recyclage du cartilage en os.[157] Mescher, quant à lui, fit des études similaires utilisant des larves d'axolotls (25-35mm), mesurant l'apoptose durant une régénération normale et lorsque la patte en régénération était dénervée. Pendant la première semaine après l'amputation il observa de 1 à 2% de cellules en apoptose lors de la régénération normale et jusqu'à 4% de cellules en apoptose dans la patte amputée et dénervée.[156] La présence plus importante d'apoptose dans la patte dénervée découlerait de la régression du blastème ne pouvant pas régénérer. Donc, d'après ces deux études, il semble y avoir présence d'apoptose au début de la régénération suite au stress intense que représente l'amputation en soi. Par la suite, il n'y aurait que peu d'apoptose durant le processus de régénération. Il est donc permis de penser que la protéine p53 serait activée dans les premiers jours suivant l'amputation au début du processus de régénération mais non durant la poursuite de celle-ci.

Des études récentes lient la protéine p53 à un certain type de régénération ayant lieu chez la drosophile durant le développement. En effet, la protéine p53 de la drosophile

(dp53) initie la croissance compensatoire de disques imaginaux endommagés lors de son développement.[162, 163] La protéine dp53 est impliquée, en parallèle avec la caspase DRONC, les gènes hid et reaper, dans le remplacement (régénération) de la partie manquante d'un disque imaginal endommagé. Chez les drosophiles ayant une mutation de la protéine dp53 ou de DRONC, le blastème requis pour la croissance compensatoire ne peut se former. La protéine dp53 est obligatoire dans l'initiation de ce type de régénération, décrivant pour la première fois, chez la drosophile, une action autre qu'apoptotique pour dp53. Par contre, il est difficile de faire un parallèle entre la croissance compensatoire et la régénération chez les vertébrés. Premièrement, la croissance compensatoire, prise ici comme un exemple de régénération des disques imaginaux, a lieu durant le développement ce qui ne peut être comparé à une régénération ayant lieu chez un organisme adulte. Deuxièmement, la séquence de la protéine dp53 semble correspondre à la protéine p63 humaine sans le domaine SAM et non à la protéine p53 humaine. Néanmoins, ces nouveaux résultats permettent d'observer que dp53 est essentiel dans un contexte de réparation/régénération de structures endommagées chez l'embryon de drosophile et lui donne, du même coup, un rôle à jouer durant la régénération.

L'équipe de Faden [164] a démontré, *in vivo*, l'importance de p53 lors de la régénération de neurones de souris suite à une axotomie de ses nerfs faciaux. L'utilisation de souris p53 ^{-/-} et WT ont permis de déterminer l'importance de p53 suite à ces axotomies. La régénération des axones, suite aux blessures infligées aux nerfs s'initierait par le biais de p53 activant la transcription de Coronin 1b et Rab 13. Cette activation initierait la croissance des axones lors de la régénération de celles-ci suivant une blessure aux nerfs. L'importance des protéines Coronin 1b et Rab 13 ont été étayées préalablement à l'aide de résultats utilisant des cultures primaires de cellules corticales de rats. Par contre, les auteurs soulignent l'importance d'une acétylation de la Lysine 320 de p53 dans l'activation de l'expression de la Coronin 1b et de Rab 13 menant à la régénération neuronale. Dans le cas des vertébrés spécialisés dans la régénération, c.i.e l'axolotl et le newt, il n'y a pas de lysine à cette position mais une arginine. Ainsi, les organismes régénérant le mieux, pouvant même régénérer leur système nerveux central, n'auraient pas le résidu requis dans l'activation des protéines permettant cette régénération, ce qui peut

paraître étrange. Il est possible que l'activation de la Coronin 1b et de Rab13 s'effectue différemment chez l'axolotl et le newt : de plus amples recherches devront être entreprises.

1.4.7 Inhiber p53 chez l'axolotl durant la régénération: Pifithrine- α (PFT- α : p-fifty three inhibitor- α)

Il existe différents moyens de bloquer l'effet d'une protéine dans un organisme. Chez les amphibiens, différentes méthodes ont été employées avec succès. Durant le développement du Xénope, des morpholinos ont été utilisés afin de bloquer l'expression de protéines en ciblant leurs ARNm. Par exemple, l'expression de p53 du xénope fut bloquée à l'aide de morpholinos, durant son développement embryonnaire, et c'est de cette façon qu'est apparu l'importance de p53 lors du développement du mésoderme ventral et dorsal de l'animal.[165] Il a aussi été démontré qu'il était possible d'inhiber l'activation de gènes en employant des inhibiteurs pharmacologiques spécifiques. En effet, l'équipe de Odelberg [166] a démontré qu'il était possible d'altérer le processus de régénération en inhibant les MMP (Matrix Metalloprotease) à l'aide de GM6001, un inhibiteur synthétique des MMP. Dans le même ordre d'idée, nous avons voulu observer si p53 prenait part à la régénération en inhibant son effet à l'aide d'un inhibiteur pharmacologique spécifique : la pifithrine- α (PFT : P-fifty three Inhibitor). Cet inhibiteur bloque la capacité de transactivation de p53, inhibe donc la transcription de p21^{waf1/cip1}, de Bax [167], l'interaction de p53 avec Mdm2 [168] ainsi que l'apoptose médiée par p53 [169]. La protéine p53 demeure confinée au cytoplasme suite à un stress.[168]

Fait intéressant, en inhibant p53, la pifithrine- α aurait un effet protecteur sur des cellules normales exposées à un stress intense en différant la destruction par apoptose de ces cellules, permettant aux mécanismes de réparation cellulaire de se mettre à l'oeuvre. Ainsi, lorsque les aptitudes de p53 sont recouvrées, les cellules ont préalablement eu le temps de réparer leurs bris et ne sont pas détruites massivement par apoptose. C'est ce qui est observé chez les souris exposées à des doses létales et sub-létales de rayons gamma ayant été préalablement traitées, ou non, avec la PFT : les souris traitées ont toutes survécu à une dose de radiation gamma tuant habituellement 60% des souris.[168]

Nous avons effectivement tenté d'inhiber massivement p53 durant la régénération de la patte de l'axolotl à l'aide de la PFT ce qui donna des résultats intéressants. Résultats qui seront discutés plus loin.

Chapitre 2. Article

Accord des coauteurs et permission de l'éditeur

1- Identification de l'étudiant et du programme

Étudiant : Éric Villiard

Programme : Maîtrise en biochimie (2-465-1-0)

2- Description de l'article

Auteurs: M. Éric Villiard, M. Henner Brinkmann, Dr. Olga Moiseeva, Mr. Frédérick A. Mallette, Dr. Gerardo Ferbeyre and Dr. Stéphane Roy.


L'article a pour titre: **The p53 tumor suppressor in the amphibian *Ambystoma mexicanum* is temperature sensitive.**

La revue dans lequel il sera probablement publié: International Journal of Cancer.

L'article fut soumis le 25 août 2006.

3- Déclaration de tous les coauteurs autres que l'étudiant

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Éric Villiard inclus cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre Clonage et analyse de la protéine supresseur de tumeur p53 chez l'axolotl.

<u>Henner Brinkmann</u>		<u>28/08/06</u>
Coauteur	Signature	Date
<u>Olga Moiseva</u>		<u>28/08/06</u>
Coauteur	Signature	Date
<u>Frédérick-Antoine Mallette</u>		<u>28/08/06</u>
Coauteur	Signature	Date
<u>Stéphane Roy</u>		<u>11/09/06</u>
Coauteur	Signature	Date
<u>Gerardo ferbeyre</u>		<u>28/11/06</u>
Coauteur	Signature	Date



Submission Confirmation

Thank you for submitting your manuscript to *International Journal of Cancer*.

Manuscript ID: IJC-06-1896

Title: The p53 tumor suppressor in the amphibian *Ambystoma mexicanum* is temperature sensitive.

Authors: Villiard, Eric
Brinkmann, Henner
Moiseeva, Olga
Malette, Frederick
Ferbeyre, Gerardo
Roy, Stephane

Date Submitted: 25-Aug-2006

Print Return to

Manuscript Central™ v3.4.2 (patent pending). © ScholarOne, Inc., 2006. All Rights Reserved.
Manuscript Central is a trademark of ScholarOne, Inc. ScholarOne is a registered trademark of ScholarOne, Inc.
[Terms and Conditions of Use](#) - [ScholarOne Privacy Policy](#)

The p53 tumor suppressor in the amphibian *Ambystoma mexicanum* is temperature sensitive.

Éric Villiard¹, Henner Brinkmann¹, Olga Moiseeva¹, Frédérick A. Mallette¹, Gerardo
Ferbeyre^{1*} and Stéphane Roy^{1,2*}.

1- Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, 2- Department of Stomatology,
Faculty of Dentistry, Université de Montréal, Montréal, QC, Canada, H3C 3J7

*Corresponding authors:

Gerardo Ferbeyre, MD, PhD
Université de Montréal, Département de Biochimie, E-515
C.P. 6128, Succ. Centre-Ville
Montréal, Qc
H3C 3J7
Canada
Phone (514) 343-7571
Fax (514) 343-2210
Email: [REDACTED]

Stéphane Roy, PhD
Université de Montréal, Department of Stomatology, D-555, Faculty of Dentistry,
C.P. 6128, Succ. Centre-Ville
Montréal, QC,
H3C 3J7
Canada
Phone (514)-343-6111 ext. 1780
Fax (514) 343-2233
Email: [REDACTED]

Key words: Axolotl, p53, aging, evolution, tumor suppressor

Abstract

Urodele amphibians like the axolotl are unique among vertebrates in their ability to regenerate most part of their bodies and their resistance to develop cancers. In order to help understand these traits, we have initiated studies on the most important tumor suppressor gene known in humans: *p53*. We cloned the axolotl *p53* gene and compared its sequence with other organisms. Intriguingly, the axolotl *p53* has a lysine residue at position 174 instead of the wild type arginine. This sequence change is found in some human tumors and in several species such as the frog *Xenopus* and the mole *Spalax*. Phylogenetic analysis of *p53* protein sequences from various species indicated that the rate of evolution of this tumor suppressor can be correlated to the longevity of animals. The faster *p53* evolves the shorter the life span. In vitro functional assays of the axolotl *p53* protein in mammalian and axolotl cells (H1299 and AL1) using *p53* promoter reporters demonstrated a temperature dependent function with the axolotl protein being much more active at 30°C and the human protein being more active at 37°C. We also analyzed the regulation of endogenous *p53* in axolotl cells following UV irradiation (100j/m²) and treatment with an alkylating agent. Our results show that the axolotl *p53* is regulated via post-translational modifications as in other vertebrates. Further characterization of *p53* in these animals may shed light into the evolution of the *p53* tumor suppressor pathways and its intriguing relationship with the aging process.

Introduction

Inactivation of p53 by mutations or viral oncogenes is the most frequent alteration found in human cancers ¹. P53 counteracts the process of neoplastic transformation and tumor progression by preventing the proliferation of cells with genomic abnormalities ¹. Multiple stress conditions activate p53 including DNA damage, hypoxia, redox stress, ribonucleotide imbalance, cell adhesion and oncogenes ²⁻⁵. In response to these signals, p53 undergoes a variety of post-translational modifications, such as phosphorylation, acetylation and sumolation, which modulate its stability and activity ⁵.

The effects of p53 are mediated through the induction of a variety of genes that have not yet been fully characterized. These genes induce transient cell cycle arrest, permanent cell cycle arrest program (senescence) or a cell death program (apoptosis) ^{1,6}. For instance, p53 regulates cell death through the induction of genes that activate the apoptosis machinery (*Bax*, *Apaf1*, *Fas*, *DR5*) or genes that prevent the action of anti-apoptotic survival factors (*IGFBP3*) ^{1, 7}. Genes mediating p53 dependent apoptosis are often inactivated in human tumors making them highly resistant to chemotherapy ⁸.

Most of the research trying to resolve the function of p53 has been accomplished on transformed cells. However, cell culture experiments represent only a limited perspective of the non-autonomous function of p53 as it occurs in whole organisms. Hence, the function of p53 beyond that observed in isolated cells remains largely a black box. Needless to say, that the actual role of p53 in vivo is not well understood. For these reasons researchers have turned to the mouse as an in vivo model system to study p53 functions ⁹. The mouse system circumvents many of the problems associated with the use of cultured cells to study p53, but fail to model the human

condition in a number of important issues. One critical difference is the short life span exhibited by laboratory mice. Longevity in humans imposes a high selective pressure to develop and refine tumor suppression pathways that might be better studied in other long living animal models. In addition, *p53* null mice are surprisingly normal¹⁰. In contrast, disabling *p53* in *Xenopus laevis* led to a failure in gastrulation and impaired expression of some TGF β -target genes¹¹. The longevity factor is even more important considering the ability of *p53* to promote aging in mice¹². For these reasons, knowledge of the *p53* pathway in other animal models may contribute critical insights into its biological functions.

So far, *p53* has been characterized in several mammalian species where its biology follows more or less what is known in mice and humans¹³. However, selective pressures associated to certain life styles may modify the properties of *p53* and its signalling pathway. For example, the Israeli mole rat (*Spalax*) who lives in hypoxic conditions does not activate *p53* in response to hypoxia^{14, 15}. In addition, ground squirrels have lower levels of *p53* in their nucleus during hibernation in comparison with animals during the hot summer season¹⁶. The discovery of *p53* in model organisms such as *Drosophila* and *C. elegans* revealed that *p53* evolved in connection with the regulation of apoptotic pathways in response to DNA damage^{17, 18}. Since these animals do not develop tumors, the *p53* tumor suppressor functions probably evolved later in evolution. Unfortunately, little is known about *p53* biology in non-mammalian vertebrates, where tumor suppressor functions may play an important role. *P53* has been characterized in zebrafish where its biology and tumor suppressor functions seem to be similar to mammals¹⁹. In contrast, a recent study in rainbow trout cells seems to indicate that *p53* is not up-regulated following exposure to chemotherapeutic drugs²⁰. Altogether, these studies reveal a surprising adaptive

capability of the p53 system to different life styles and suggest that more interesting variations are still to be found in nature.

In the present study, we used the Mexican salamander, axolotl (*Ambystoma mexicanum*), which is a urodele amphibian with a remarkable longevity and resistance to tumour induction^{21, 22}. Since p53 is a tumor suppressor that can also accelerate aging¹², we reasoned that long living animal models may teach us lessons on how the p53 system is properly modulated to ensure both long life span and efficient tumor suppression. Here, we present the cloning and initial characterization of *p53* in axolotls. We discuss the unique properties of the axolotl p53 sequence compared to both short living (mice, flies) and long living species (moles, humans). By understanding the evolutionary changes that have occurred in genes such as *p53*, we may be able to understand better why mutations in this gene cause neoplasia¹⁹.

Material and methods

Cell lines

H1299 (*p53*-null lung cancer cell line) and IMR90 (human Caucasian fetal lung fibroblast) cell lines grown in culture were maintained at a constant temperature of 37°C with CO₂ in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM with 1X L-glutamine, 1X penicillin-streptomycin and 10% Fetal Bovine Serum) (Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA). Axolotl cells (AL1) were obtained from Dr. S.V. Bryant and Dr. D.M. Gardiner at the University of California Irvine. AL1 cells grown in culture were maintained at a constant temperature of 25°C without CO₂ in Leibovitz's L-15 medium (L-15 60.0% with 1X L-glutamine, 1X antibiotic-antimycotic, 1X insulin-transferrin-selenium and 5% Fetal Bovine Serum) (Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA).

Cloning and sequence analysis of axolotl p53 cDNA

Partial axolotl p53 cDNA sequences were cloned by RT-PCR using degenerate primers [partial axolotl p53 forward (DFPROP53)] 5'-GG(A/C/G/T)(C/T)T(A/C/G/T)GC(A/C/G/T)AA(A/G)ACITG(C/T)CC - 3' and [partial axolotl p53 reverse (DRPROP53)] 5'-G(G/T)(A/G)TTCAT(G/T)CC(G/T)CCCAT(A/G)CA-3'. To obtain the full length p53 gene, we performed a screening of Salamander (axolotl) Larvae Lambda cDNA Library (Stratagene, La Jolla, CA), with the partial p53 cDNA sequence obtained. The open reading frame of the p53 protein was identified after sequencing several cDNA isolates from the library. Two primers with a restriction site on each side (5'Xho1 and 3'BstX1) were made to facilitate the cloning of full length axolotl p53 in the FG12/CMV vector (M. Soengas, Ann Arbor). Full length p53 cDNA was subsequently amplified by PCR using [axolotl p53 forward XHO (APFXHO)] 5'-GAGCCTCGAGGAATCGGAAACCACCATGGA -3' and [axolotl p53 reverse BSTX (APRBSTX)] 5'-GCGCCCATCTTTATGGGAATACAGGCACCATTGCAG -3' primers. PCR reactions were performed using Taq DNA polymerase (Invitrogen, USA). All PCR products were purified by Rapid gel extraction (Gibco), cloned into the pCR 4-TOPO vector (Invitrogen, USA) and sequenced by the McGill Genome Sequencing Centre with M13R and M13F primers. Resulting sequences were assembled using SeqManII (DNASTAR Inc., USA). All sequences were analysed on the NCBI BLAST database.

Transfection of human cells and Dual Luciferase Reporter Assay

H1299 cells were transfected at a confluence of 90% in 6 wells plates, with 2.5µg of the firefly luciferase reporter plasmid (p21 waf-1-luc or Hdm2 in pGL3 vector; Promega), 0.5µg of a plasmid expressing either human p53 (pLPChp53 containing the CMV promoter), axolotl p53 (FG12/CMV-Ap53) or FG12/CMV as control. A plasmid expressing *Renilla* luciferase under the β-globin promoter was co-transfected (0.5µg) to normalize the results of the assays. Transfection was done with lipofectamine 2000 (Invitrogen, U.S.A.) according to the manufacturer's instructions. H1299 cells were incubated at different temperatures (37°C, 30°C or 25°C) following transfection. 24 hours after transfection H1299 cells were rinsed with Hank's buffer and harvested with trypsin (Invitrogen, CA). They were resuspended in 200 µl of fresh passive lysis buffer (Promega), vortexed, frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C. Luciferase assay was performed following the standard protocol for the Dual-Luciferase[®] Reporter Assays System (Promega, Madison, WI). The assays were read on a Fusion α-FP luminometer (Packard Instrument Company, Inc., Meriden, CT). For the experiments combining the human and axolotl p53 we used 0,5µg of plasmids expressing human and axolotl p53 (or FG12/CMV for control), 2.5µg of the firefly luciferase reporter plasmid (Hdm2 in pGL3 vector) and 0.5µg of plasmid expressing *Renilla* luciferase under the β-globin promoter.

Electroporation of Axolotl cells and Dual Luciferase Reporter Assay

An electroporation protocol was developed to transfect the AL1 cells for the Dual Luciferase[®] Reporter Assay. Cells were co-transfected with 5µg of the firefly luciferase reporter plasmid (p21 waf-1-luc or Hdm2 in pGL3 vector; Promega) and with 1µg of a plasmid expressing either human p53 (pLPChp53), axolotl p53

(FG12/CMV-Ap53) or empty FG12/CMV as control. The same plasmid expressing *Renilla* luciferase under the β -globin promoter (1 μ g) was used to normalize. The transfection was performed using a Gene-Pulser Xcell Eukaryotic System (Bio-Rad) generating a single electrosquare pulse of 250 volts during 35 milliseconds, in a 4mm cuvette (VWR) containing approximately 60,000 AL1 cells resuspended in 100 μ l of ice cold 0,7X PBS. 48 hours after electroporation, axolotl cells were rinsed twice with 0,7X PBS, lysed with 250 μ l of fresh 1X passive lysis buffer and placed on a shaker plate for 20 minutes. The cells were collected, frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C. Luciferase assays were performed as described above.

Colony Assays

The H1299 cells used for the colony assays were transfected with lipofectamine 2000 according to the manufacturer's instructions. The pLPChp53, the FG12/CMV-Ap53 or the FG12/CMV empty vectors (12 μ g) were co-transfected with a puromycin resistant vector (12 μ g, pBabe-lacZ) for colony selection. The colony assay was performed on a period of 1 week at 37, 30 and 25°C in DMEM. The selection was made with 1 μ g/ml of puromycin (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO). Colonies were colored with crystal violet (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO).

Immunoblots

AL1 cells used in western blotting were exposed to UV (100j/m²) using a XL-1000UV Crosslinker (Spectronics Corporation, NY, USA). AL1 cells were harvested 6, 12 and 24 hours post-irradiation. Total proteins of axolotl cells were extracted by sonication in sodium dodecyl sulphate (SDS) sample buffer. AL1 cells used in western blotting were also treated with MNNG (1-methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine,

Sigma-Aldrich, St-Louis, MO), during 1, 3, 6, 12 and 24 hours, then harvested post-treatment. Total proteins were prepared by sonication as mentioned above. The protein quantification was done using the Bradford technique²³. 40µg of axolotl and IMR90 proteins were denatured by boiling and loaded on 10% polyacrylamide-SDS gels following the Laemmli method²⁴. Proteins were then transferred onto polyvinylidene difluoride membranes (Immobilon-P, Millipore, Bedford, MA). Anti-Pp53 ser15 (#9284, Cell Signaling technology, Can) and Anti-p53 CM5 (NCL-p53-CM5p, Novo Castra laboratory, UK) rabbit affinity isolated antibodies, which specifically recognize their respective proteins, were used to detect axolotl p53. Immunodetection of primary antibodies was visualized using the ECL Western blotting kit (Amersham Pharmacia, Amersham, United Kingdom) or Lumi-light Western Blotting Substrate (Roche) following manufacturer's guidelines. Anti- α -tubulin (Tubulin- α Ab-2 clone DM1A, Neo Marker distributed by Medicorp, Qc) was used as loading control. IMR90 cells were used as a positive control for normal expression of p53 protein.

Sequence handling and phylogenetic analyses

All protein sequences were retrieved from NCBI GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) after identification by a BLASTP search, with the salamander p53 protein sequence as query. Clustal V was used to create the original alignment that was manually further optimised and redundant sequences were discarded using the edit option of the MUST package. G-blocks was used to eliminate variable regions of the alignment. The maximum likelihood phylogenetic tree was inferred by the program Treefinder using the WAG matrix of amino acid replacement under the assumption of four discrete gamma-distributed rates. The statistical

robustness of internal nodes was estimated by the bootstrap method, based on 100 replicates using the same program and model as before. The consensus tree of these 100 bootstrap replicates was generated with the consense option of the PHYLIP package. The bootstrap support values given in percent are indicated on the corresponding nodes.

Statistics

Statistics for the Dual Luciferase[®] Reporter Assay System were performed with SysStat[®] (Systat Software Inc, USA). One-sample t-test was used to calculate the p-value between control and experimental assays. A two-sample t-test was used to calculate the p-value between experimental assays in same condition. Graphics were made with Origin[®] (OriginLab Corporation, USA).

Results

Axolotl p53 protein, sequence comparison and phylogeny

We have cloned the axolotl full-length *p53* cDNA by a combination of PCR and cDNA library screening approaches. The axolotl *p53* protein has an open reading frame of 387 amino acids with significant sequence homology with the human *p53* protein (Fig. 1*a-b*). Functional domains of the axolotl *p53* protein that correspond to the human protein sequence can be readily identified, namely the N-terminal domain (transactivation domain (residues 1-53 of the human protein), proline rich domain²⁵ (residues 60-92), the DNA binding domain (residues 80-301), the tetramerization domain (residues 316-347), and the C-terminal regulatory domain (residues 352-388)²⁶. The critical residues for protein stability and protein-protein interactions in the N-terminus corresponding to serine 15 and serine 20 are conserved. Since these residues

are the target of p53 regulation by phosphorylation in response to DNA damage, they suggest that axolotl p53 is also activated by DNA damage inducing stress. The residues F19, W23 and L26, important for the binding of mdm2, are also present²⁷. Furthermore, regions I of the transactivation domain as well as regions II-V of the DNA binding domain (II-IV-V bind to SV40 T Antigen) can be easily distinguished²⁸ (Fig. 1b). Several residues present in the tetramerization domain of p53 proteins such as: E326, G334, E339, M340, N345, L348, and L350 are conserved as well (Fig. 1b)²⁹. Finally, it is possible to observe the NLS (Nuclear Localization Signal, residues 296-314) and the NES (Nuclear Export Signal, residues 332-343) (Fig. 1b)³⁰.

We also compared the sequence of axolotl p53 with the *Spalax* (Israeli mole rat) p53. We found that R174 in the human sequence is substituted by a lysine both in *Spalax* and the axolotl. K174 in *Spalax* is believed to be linked to a reduced ability of p53 to induce apoptosis¹⁴. In human tumors, R174 has been found mutated into several different amino acids including lysine³¹ (www.iarc.fr/p53/index.html). In vivo analysis, in a yeast model of p53 transactivation, showed that p53K174 was able to transactivate several p53 promoter-reporters similar to wild type p53³².

We used our new axolotl sequence and many already published p53 protein sequences from vertebrates to construct a maximum likelihood based phylogenetic tree (34 sequences and 292 unambiguously aligned amino acid positions). The phylogenetic tree of p53 generated agrees with the known vertebrate phylogeny (Fig. 2), although some nodes of the tree are not highly supported in the corresponding bootstraps analysis. The taxonomic distribution is biased with 22 mammalian and eight ray-finned fish sequences. Nevertheless, there are clear differences in the evolutionary rates among the different groups and also between species of the same

group, indicated by the branch length of the rooted tree. There is a pronounced acceleration observed for the rodents, with a striking exception represented by the sequence of the already mentioned mole rat *Spalax*. There also seems to be a rough inverse correlation between the evolutionary rates inferred for the p53 sequences and the longevity of the species i.e. the faster the rate the shorter the life span. This is evident for all rodents except *Spalax*. This is further supported by the observation that the rather big and long-living organisms, human and dolphin, have the shortest branches within the mammals (Fig. 2).

Axolotl p53 can activate the transcription of human p53 target promoters in human cells.

The conservation of the axolotl p53 protein sequence strongly suggests that this protein should be able to recognize and regulate human p53 target genes. To confirm this prediction, we used a Dual-Luciferase Reporter assay in the human p53 deficient cell line H1299. We co-transfected either human or axolotl p53 expressing plasmids with luciferase reporter constructs fused to the human Hdm2 and p21 promoters. We performed these assays at three different temperatures (37°C, 30°C and 25°C) for two main reasons. First, the p53 protein from *Xenopus laevis* was shown to be temperature sensitive, and also contains the K174 sequence variation³³. Second, Kato and colleagues did not report a defect for the human p53K174 variant in their yeast system at 30°C, however, the protein from *Spalax* was clearly defective on some p53 promoters when tested at 37°C¹⁴.

Human p53, as expected, stimulated the Hdm2 promoter, at 37°C. However, the axolotl protein was relatively inactive at this temperature (Fig. 3a). In contrast, at 30°C, we observed that the human p53 stimulated the Hdm2 promoter by a factor of

24 fold and that the axolotl p53 stimulated a similar increase of 17 fold (Fig. 3*b*). Further reduction of the temperature to 25°C shifted the activity pattern on the Hdm2 promoter. At this temperature the axolotl protein was twice as active as the human p53 protein (Fig. 3*c*). Thus, for the Hdm2 reporter, the human p53 is more active at 37°C and less active at 25°C while the axolotl p53 activity is less active at 37°C and more active at 25°C.

On the p21 promoter luciferase reporter, human p53 stimulated 28 folds the activity at 37°C, 10.5 folds at 30°C and 1.6 folds at 25°C (Fig. 3*c-e*). When the axolotl p53 was assayed, we observed an increase of 1.7 fold at 37°C, an 8.9 folds increase at 30°C increase and 1.5 fold increase at 25°C. The peak activity of the axolotl p53 on this promoter seems to be near 30°C as opposed to 37°C for the human p53 protein.

Next we assayed the human and the axolotl p53 in combination to activate the Hdm2 promoter luciferase reporter at 37°C. We noted a decrease in the expression of luciferase when the axolotl protein was transfected together with the human protein compared with the human p53 alone (Fig. 3*g*). Hence, the axolotl p53 seems to have a dominant negative effect on the activity of the human p53 on the Hdm2 promoter at 37°C.

To have an idea of the functionality of axolotl p53 on a biological assay, we transfected H1299 cells with constructs driving the expression of human p53, axolotl p53 or an empty vector. We could not assay p53 functions at 30°C in these cells because they did not efficiently attach to the plate at that temperature for the required amount of time. However, as expected from the luciferase assays, axolotl p53 did not reduce colony formation of H1299 cells, while human p53 had a dramatic inhibitory effect in this assay (Fig. 3*h*). These results are consistent with the idea that axolotl p53 is a temperature sensitive protein.

Axolotl p53 activation in axolotl cells

The axolotl AL1 cell line was used for the subsequent dual-luciferase reporter assay to measure the activity of human p53 or axolotl p53. The assays were done at 25 °C since axolotl cells are unable to grow at 37°C or 30 °C. The Hdm2 and p21 reporter genes were used for the assays.

With the Hdm2 promoter, there is a 12.6 fold increase with human p53 protein and a 26.4 fold increase with the axolotl p53 protein (Fig. 4a). Therefore, the axolotl p53 protein activity is significantly more efficient than the human protein at 25°C ($p < 0.001$) on the Hdm2 promoter in axolotl cells. In contrast, with the p21 promoter, there is a two-fold increase with the human p53 and 1.9 fold increase with axolotl p53 protein (Fig. 4b).

DNA damage and activation of axolotl p53

We also looked at the post-translational modifications that are associated with p53 activation following DNA damage or chemical exposure to an alkylating agent. Since p53 activity has been shown to be modulated by close to 50 post-translational modifications on the protein itself, we decided to look at specific phospho-serine residues following different treatments. We used the axolotl cell line AL1³⁴ to assess the effect of ultraviolet irradiation on axolotl p53 levels and phosphorylation. Western blots were performed against phospho p53 ser-15 on axolotl AL1 cells exposed to UV radiation or the alkylating agent (N-methyl-n-nitro-n-nitrosoguanidine ; MNNG) which causes DNA breaks^{35,36}. The cells exposed to UV show an increased phosphorylation of p53 at serine 15 in comparison to the non-exposed control cells (Fig. 5a). We noticed that anti-p53 antibodies recognized two

bands that followed the same induction pattern in response to DNA damage. These bands may represent alternatively spliced p53 isoforms as described in mammals³⁷. Treatment with MNNG (10^{-5} M) also increased p53 phosphorylation at serine 15. The signal increase for phospho p53 ser-15 was detectable one hour after drug application and up to 24 hours later (Fig. 5b). On the other hand, an antibody against “total” p53 (CM5) was used on Western blot analysis to determine total protein levels in AL1 cells exposed to UV and to MNNG and showed no increase in expression (Fig. 5c-d). These results suggest that the axolotl p53 activity is regulated mainly by post-translational modifications and not by stabilization as reported in many experiments with human p53.

Discussion

The p53 sequences of lower vertebrates (amphibians and fishes) that have been identified to date are quite divergent from their mammalian counterparts. However, they all conserve the basic domain organization described for human p53. We investigated the axolotl p53 protein for various reasons: First, this is a well characterized lower vertebrate that has been used as a model organism for over 100 years; second, axolotls displays a remarkable resistance to cancer; and third axolotl is long living, up to 25 years in captivity³⁸. We are interested to determine to which extent p53 biology in axolotls is linked to their remarkable ability to regenerate lost tissues, their cancer resistance and their longevity.

To address these questions, we first cloned the axolotl full-length p53 sequence and compared it to that of other species, in particular human and the naked mole rat *Spalax*. We found an overall conservation of the p53 functional domains as described for mammals. However, we also found interesting amino acid changes. The residue at

position R174 in the human sequence is changed to lysine in *Spalax* and the axolotl. The p53 protein from *Spalax* was unable to regulate several promoters of pro-apoptotic p53 targets and it was suggested that this trait is an adaptation to hypoxic life¹⁴. In the model of human tetrameric p53 bound to the DNA, R174 does not contact the DNA and it was proposed that it interacts with R181 in an adjacent monomer¹⁴. The neighboring R175 mediates interactions between the loops that contact the DNA and may stabilize the core structure of the DNA binding domain³⁹. Mutations in R175 to histidine makes DNA binding by p53 temperature sensitive⁴⁰. Mice expressing R175H-p53 revealed not only a dysfunctional protein but also gain of function activities such as the ability to have a dominant negative effect on wild type p53 and other p53 family members such as p73^{41, 42}. Intriguingly, we found that the axolotl p53 was largely inactive at 37°C suggesting that R174 may also stabilizes the DNA binding domain of p53 as reported for R175. Consistent with this model, the *Xenopus* p53 is temperature sensitive and also possesses a lysine at position 174³³.

We characterized the activity of axolotl p53 as a transactivator both in human and axolotl cells. The axolotl p53 is almost completely inactive at 37°C in human cells when assayed on the Hdm2 and the p21 promoters. In agreement, the axolotl protein was unable to reduce cell proliferation at 37°C in human cells. In addition, the axolotl p53 reduced transactivation by the human protein at 37 °C, suggesting a dominant negative effect. At 30°C, on the other hand, the axolotl p53 activity on reporter assays increased about 10 fold and the human activity decreased approximately 10 fold compared to 37°C (Fig. 3a-c). At 25°C, in human cells, the axolotl p53 retained good activity (about 6 fold increase), but the activity of the human p53 protein decreased even more, to less than a 4 fold increase in transactivation. A similar trend, although not as striking, was noticed for the p21 promoter construct. The better performance of

axolotl p53 as a transactivator at 25°C was also observed in axolotl cells in culture. An interesting observation can also be made in that the transactivating capacity of the axolotl p53 protein on the Hdm2 promoter was much more important in the axolotl cells than the transactivation through the same promoter at the same temperature of 25°C in human cells. These observations point to an adaptive transactivating activity for p53 that correlates to the organism's physiology. In other words, R174 might have been selected to increase activity at 25°C, but this change makes the protein sensitive to higher temperatures.

We also studied the response of axolotl p53 to DNA damaging agents such as UV light and an alkylating agent. These results clearly indicate that p53 is up-regulated following UV irradiation in axolotl cells as reported in human cells⁴³. Again, our time course experiments showed an increase in phospho-ser15 p53 in axolotl cells treated with 10 µM of MNNG. Our data clearly confirms that p53 is activated in salamanders through similar mechanisms as described for mammalian cells under similar conditions.

In conclusion, our results present for the first time the p53 system in axolotls and open the way to study whether this interesting protein is linked to the remarkable traits that have evolved in these amphibians.

Acknowledgements

This work was funded by grants from the Fonds de Recherche en Santé du Québec (SR) and the Cancer Research Society (GF). S. R. is a Chercheur Boursier Junior 1 from the Fond de Recherche en Santé du Québec and G. F. is a CIHR New Investigator Fellow. We would like to thank P. Rompré from statistical analysis and Dr R. Lippé for the electroporator.

References

1. Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. Surfing the p53 network. *Nature* 2000;408:307-10.
2. Ferbeyre G, de Stanchina E, Lin AW, Querido E, McCurrach ME, Hannon GJ, Lowe SW. Oncogenic ras and p53 cooperate to induce cellular senescence. *Mol Cell Biol* 2002;22:3497-508.
3. Ferbeyre G, de Stanchina E, Querido E, Baptiste N, Prives C, Lowe SW. PML is induced by oncogenic ras and promotes premature senescence. *Genes Dev* 2000;14:2015-27.
4. Gaumont-Leclerc MF, Mukhopadhyay UK, Goumard S, Ferbeyre G. PEA-15 is inhibited by adenovirus E1A and plays a role in ERK nuclear export and Ras-induced senescence. *J Biol Chem* 2004;279:46802-9.
5. Giaccia AJ, Kastan MB. The complexity of p53 modulation: emerging patterns from divergent signals. *Genes Dev* 1998;12:2973-83.
6. de Stanchina E, Querido E, Narita M, Davuluri RV, Pandolfi PP, Ferbeyre G, Lowe SW. PML is a direct p53 target that modulates p53 effector functions. *Mol Cell* 2004;13:523-35.
7. Sionov RV, Haupt Y. The cellular response to p53: the decision between life and death. *Oncogene* 1999;18:6145-57.
8. Soengas MS, Capodieci P, Polsky D, Mora J, Esteller M, Opitz-Araya X, McCombie R, Herman JG, Gerald WL, Lazebnik YA, Cordon-Cardo C, Lowe SW. Inactivation of the apoptosis effector Apaf-1 in malignant melanoma. *Nature* 2001;409:207-11.
9. Johnson TM, Attardi LD. Dissecting p53 tumor suppressor function in vivo through the analysis of genetically modified mice. *Cell Death Differ* 2006;13:902-8.
10. Donehower LA, Harvey M, Slagle BL, McArthur MJ, Montgomery CA, Jr., Butel JS, Bradley A. Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature* 1992;356:215-21.
11. Cordenonsi M, Dupont S, Maretto S, Insinga A, Imbriano C, Piccolo S. Links between tumor suppressors: p53 is required for TGF-beta gene responses by cooperating with Smads. *Cell* 2003;113:301-14.
12. Tyner SD, Venkatachalam S, Choi J, Jones S, Ghebranious N, Igelmann H, Lu X, Soron G, Cooper B, Brayton C, Hee Park S, Thompson T, et al. p53 mutant mice that display early ageing-associated phenotypes. *Nature* 2002;415:45-53.
13. Moro F, Ottaggio L, Bonatti S, Simili M, Miele M, Bozzo S, Abbondandolo A. p53 expression in normal versus transformed mammalian cells. *Carcinogenesis* 1995;16:2435-40.
14. Ashur-Fabian O, Avivi A, Trakhtenbrot L, Adamsky K, Cohen M, Kajakaro G, Joel A, Amariglio N, Nevo E, Rechavi G. Evolution of p53 in hypoxia-stressed *Spalax* mimics human tumor mutation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:12236-41.
15. Avivi A, Ashur-Fabian O, Amariglio N, Nevo E, Rechavi G. p53--a key player in tumoral and evolutionary adaptation: a lesson from the Israeli blind subterranean mole rat. *Cell Cycle* 2005;4:368-72.
16. Fleck CC, Carey HV. Modulation of apoptotic pathways in intestinal mucosa during hibernation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005;289:R586-R95.
17. Brodsky MH, Nordstrom W, Tsang G, Kwan E, Rubin GM, Abrams JM. *Drosophila* p53 binds a damage response element at the reaper locus. *Cell* 2000;101:103-13.

18. Derry WB, Putzke AP, Rothman JH. *Caenorhabditis elegans* p53: role in apoptosis, meiosis, and stress resistance. *Science* 2001;294:591-5.
19. Lu WJ, Abrams JM. Lessons from p53 in non-mammalian models. *Cell Death Differ* 2006;13:909-12.
20. Rau Embry M, Billiard SM, Di Giulio RT. Lack of p53 induction in fish cells by model chemotherapeutics. *Oncogene* 2006;25:2004-10.
21. Brookes JP. Regeneration and cancer. *Biochim Biophys Acta* 1998;1377:M1-11.
22. Tsonis PA, Eguchi G. Carcinogens on regeneration. Effects of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine and 4-nitroquinoline-1-oxide on limb regeneration in adult newts. *Differentiation* 1981;20:52-60.
23. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-54.
24. Laemmli U. Cleavage of structural proteins during the assembly of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680-9.
25. Walker KK, Levine AJ. Identification of a novel p53 functional domain that is necessary for efficient growth suppression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:15335-40.
26. Veprintsev DB, Freund SM, Andreeva A, Rutledge SE, Tidow H, Canadillas JM, Blair CM, Fersht AR. Core domain interactions in full-length p53 in solution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:2115-9.
27. Kussie PH, Gorina S, Marechal V, Elenbaas B, Moreau J, Levine AJ, Pavletich NP. Structure of the MDM2 oncoprotein bound to the p53 tumor suppressor transactivation domain. *Science* 1996;274:948-53.
28. Soussi T, Caron de Fromentel C, May P. Structural aspects of the p53 protein in relation to gene evolution. *Oncogene* 1990;5:945-52.
29. Wang Y, Farmer G, Soussi T, Prives C. *Xenopus laevis* p53 protein: sequence-specific DNA binding, transcriptional regulation and oligomerization are evolutionarily conserved. *Oncogene* 1995;10:779-84.
30. Liang SH, Clarke MF. Regulation of p53 localization. *Eur J Biochem* 2001;268:2779-83.
31. Kyritsis AP, Bondy ML, Xiao M, Berman EL, Cunningham JE, Lee PS, Levin VA, Saya H. Germline p53 gene mutations in subsets of glioma patients. *J Natl Cancer Inst* 1994;86:344-9.
32. Kato S, Han SY, Liu W, Otsuka K, Shibata H, Kanamaru R, Ishioka C. Understanding the function-structure and function-mutation relationships of p53 tumor suppressor protein by high-resolution missense mutation analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:8424-9.
33. Ridgway PJ, Soussi T, Braithwaite AW. Functional characterization of *Xenopus laevis* p53: evidence of temperature-sensitive transactivation but not of repression. *J Virol* 1994;68:7178-87.
34. Levesque M, Guimond JC, Pilote M, Leclerc S, Moldovan F, Roy S. Expression of heat-shock protein 70 during limb development and regeneration in the axolotl. *Dev Dyn* 2005;233:1525-34.
35. Haerlin R, Sussmuth R, Lingens F. Mechanism of mutagenesis by N-methyl-N'-nitro-N-nitroso-guanidine (MNNG) V. Methylation of DNA by N-trideuteriomethyl-N'-nitro-N-nitroso-guanidine (D(3)-MNNG). *FEBS Lett* 1970;9:175-6.

36. Walker IG. Letter: Single-strand breaks in DNA--treated with MNNG. *Cancer Res* 1975;35:267-8.
37. Bourdon JC, Fernandes K, Murray-Zmijewski F, Liu G, Diot A, Xirodimas DP, Saville MK, Lane DP. p53 isoforms can regulate p53 transcriptional activity. *Genes Dev* 2005;19:2122-37.
38. Armstrong JB, Malacinski GM. *Developmental biology of the axolotl*. New York: Oxford University Press, 1989.
39. Cho Y, Gorina S, Jeffrey PD, Pavletich NP. Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: understanding tumorigenic mutations. *Science* 1994;265:346-55.
40. Friedlander P, Legros Y, Soussi T, Prives C. Regulation of mutant p53 temperature-sensitive DNA binding. *J Biol Chem* 1996;271:25468-78.
41. Lang GA, Iwakuma T, Suh YA, Liu G, Rao VA, Parant JM, Valentin-Vega YA, Terzian T, Caldwell LC, Strong LC, El-Naggar AK, Lozano G. Gain of function of a p53 hot spot mutation in a mouse model of Li-Fraumeni syndrome. *Cell* 2004;119:861-72.
42. Olive KP, Tuveson DA, Ruhe ZC, Yin B, Willis NA, Bronson RT, Crowley D, Jacks T. Mutant p53 gain of function in two mouse models of Li-Fraumeni syndrome. *Cell* 2004;119:847-60.
43. Nelson WG, Kastan MB. DNA strand breaks: the DNA template alterations that trigger p53-dependent DNA damage response pathways. *Mol Cell Biol* 1994;14:1815-23.
44. Appella E, Anderson CW. Post-translational modifications and activation of p53 by genotoxic stresses. *Eur J Biochem* 2001;268:2764-72.

Figure 1 - Comparison between Human and axolotl p53 important domains, regions and residues. (a) Schematic structure of p53 protein (adapted from Appella, 2001⁴⁴): TA, Transactivation Domain; DBD, DNA Binding Domain; NLS, Nuclear Localisation Signal; TET, tetramerisation domain; REG, Regulatory domain; Regions I-V, highly conserved regions. Lysine (K), serine (S) and threonine (T) residues implicated in post-translational modifications are indicated. The protein domains depicted in the diagrams are not to scale. (b) Sequences alignment of human and axolotl p53 proteins. The conserved regions I to V are highlighted and the human R174 (in region III) is identified (arrow).

Figure 1

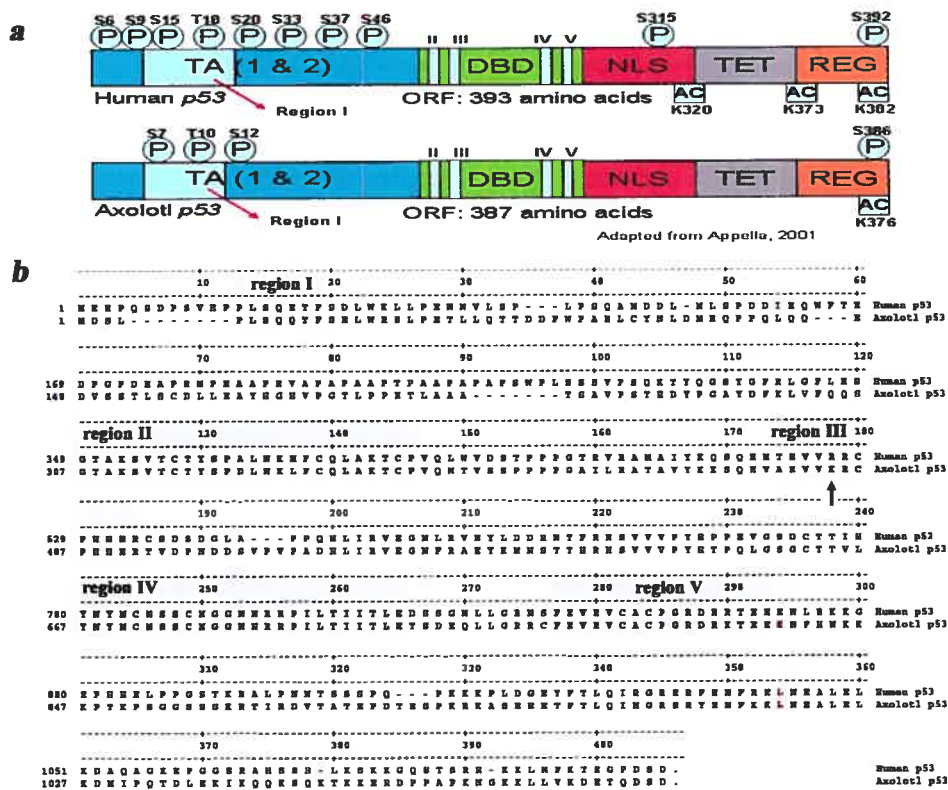


Figure 2 - Phylogenetic tree of p53 protein sequences in vertebrates with bootstrap values. Due to the dense species sampling within the mammals many interesting aspects of mammalian evolution are becoming apparent. There are clear differences of the evolutionary rates among the different groups and also between species of the same group, indicated by the branch length of the rooted tree. There is a pronounced acceleration observed for the rodents, with a striking exception represented by the sequence of the mole rat *Spalax*, which is despite the fact of being a rodent even more slowly evolving than the related lagomorphs including the rabbit (*Oryctolagus*). In fact the only sequences that are still more slowly evolving than the one from *Spalax* are from human and the dolphin *Delphinapterus*.

Figure 2

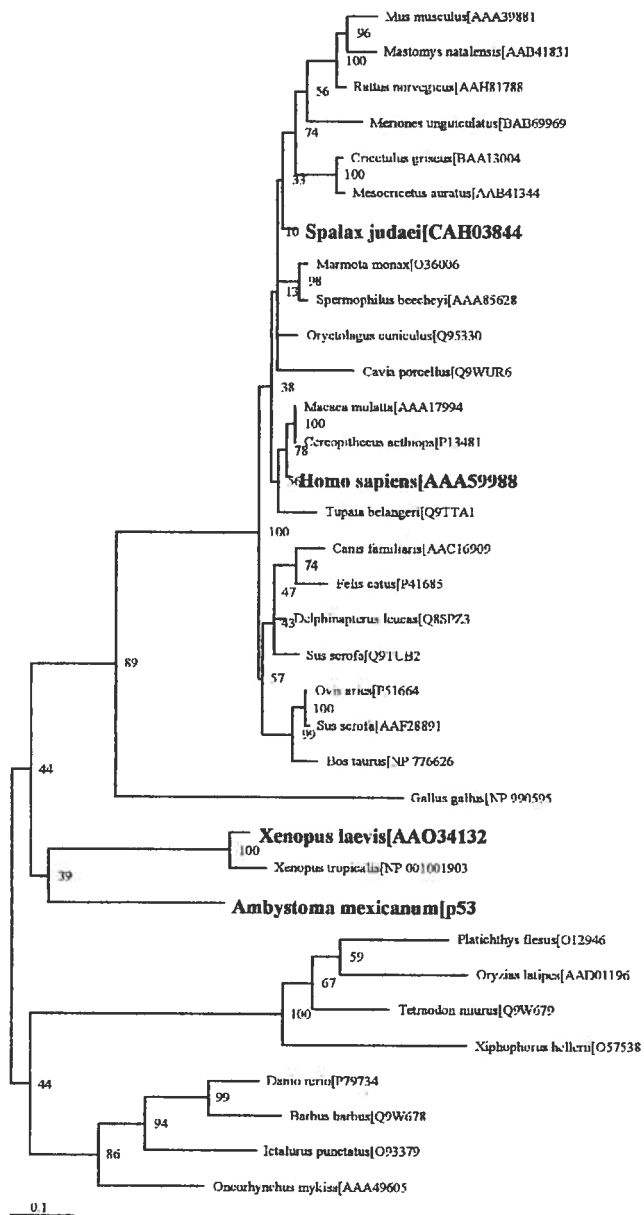


Figure 3 - Activation of Hdm2 and p21 promoters by human and axolotl p53 in H1299 cells. (a-c) Dual-luciferase assays in H1299 cells with Hdm2 promoter at 37°C, 30°C and 25°C. (d-f) Dual-luciferase assays in H1299 cells with the human p21 promoter at 37°C, 30°C and 25°C. Luciferase activities stimulated by human or axolotl p53 was significantly different than non-p53 controls (at least $p < 0.05$, data not shown). Error bars are \pm s.e.m. human and axolotl p53 luciferase transactivation were significantly different during the same assay using the Hdm2 promoter (a-c) or the human p21 promoter at 37°C (d) (at least $p < 0.01$). Each assay was performed in triplicate at least 3 separate times. (g) Inhibition of the activation of Hdm2 promoter by the combined expression of human and axolotl p53 in H1299 cells. All luciferase activities were significantly different than non-p53 controls (at least $p < 0.05$, data not shown). Error bars are \pm s.e.m. human + axolotl and human p53 luciferase transactivation were significantly different during the same assay using the Hdm2 promoter at 37°C ($p = 0.006$). Each assay was performed in triplicate. (h) Growth assays at 37°C on H1299 cells transfected with human or axolotl p53 protein.

Figure 3

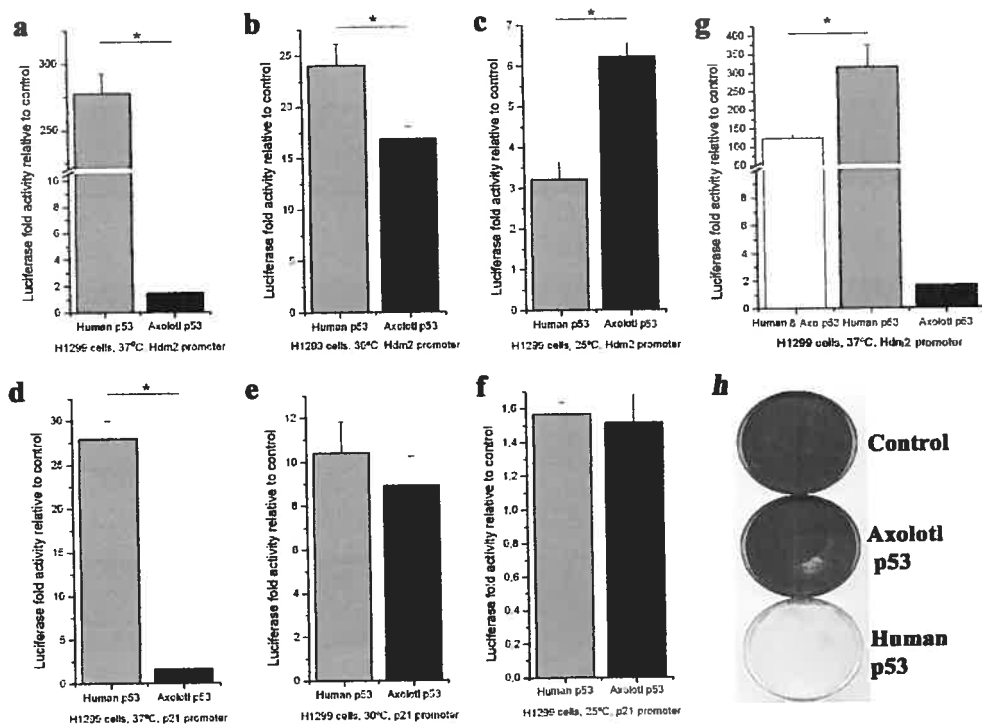


Figure 4 - Activation of Hdm2 and p21 promoters by human and axolotl p53 in AL1 cells. (*a-b*) Dual-luciferase assays in AL1 cells with Hdm2 and p21 promoters at 25°C. All Luciferase activities were significantly different from non-p53 controls (at least $p < 0.05$, data not shown). Error bar are \pm s.e.m. human and axolotl p53 induced luciferase expression were significantly different with the Hdm2 promoter ($p < 0.01$). Each assay was performed in triplicate at least 3 separate times.

Figure 4

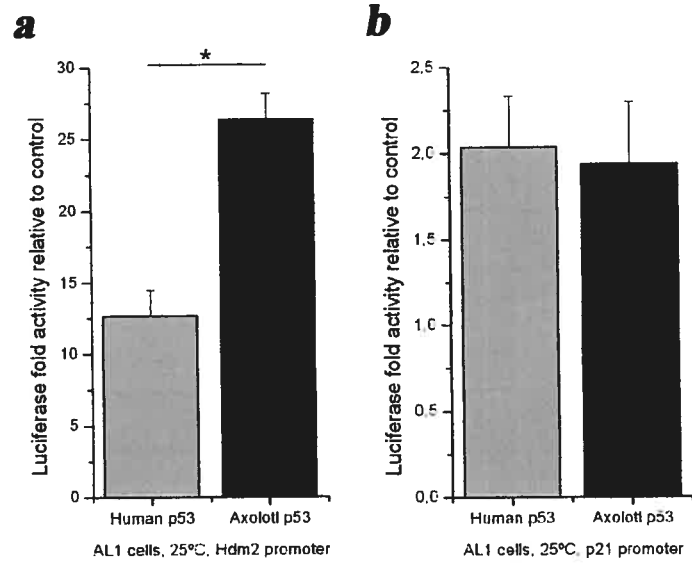
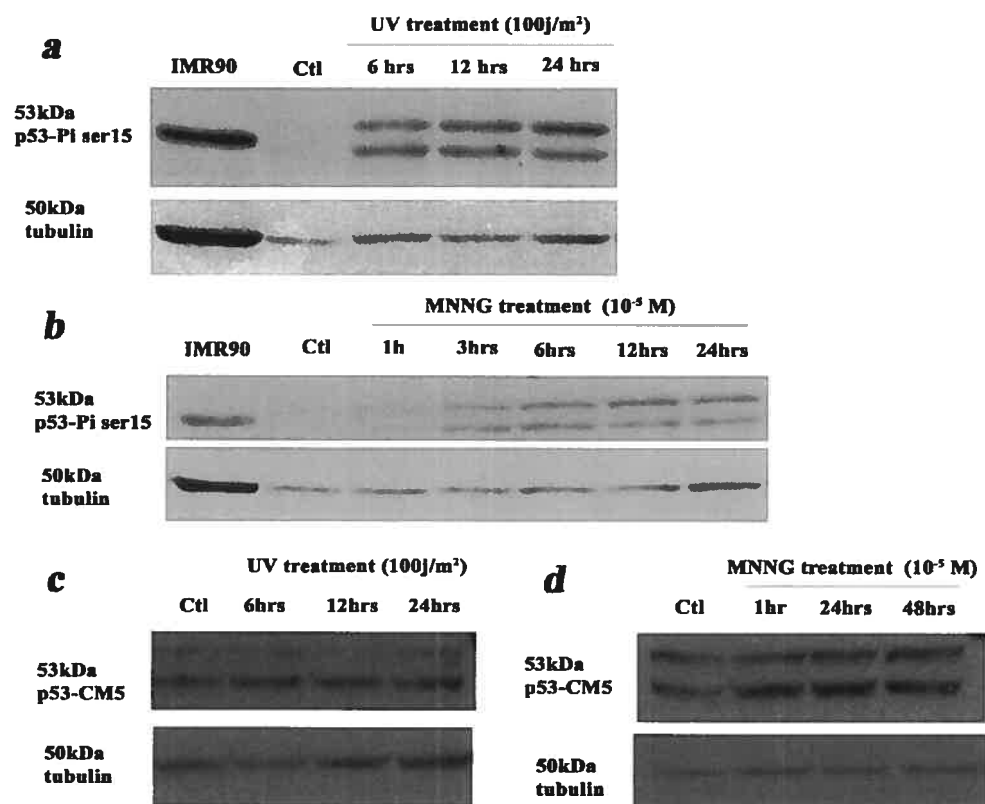


Figure 5 - Detection of p53 protein in AL1 cells. (*a-b*) Western blot analysis of phospho-ser15 p53 in AL1 cells exposed to UV or treated with MNNG. (*c-d*) Western blot analysis of total p53 protein (CM5 antibody) on AL1 cells exposed to UV or treated with MNNG.

Figure 5



Chapitre 3. Matériels et méthodes

3.1.1 Introduction

L'article présenté au chapitre deux contient une section de matériels et méthodes (Chapitre 2, p.41) donnant des explications générales sur les méthodes employées dans l'article. Ces méthodes ne seront pas répétées dans cette section du mémoire. Par contre, la portion matériel et méthode de l'article, se devant d'être concise, ne pouvait contenir qu'une description très sommaire de la façon dont certaines expériences ont été menées. Ces pourquoi certaines méthodes utilisées, requérant de plus longues explications, seront présentées plus en détail ici. Donc, des informations supplémentaires concernant la construction du vecteur FG12/CMV-Ap53 permettant l'expression\surexpression de la protéine p53 d'axolotl (Chapitre 3, section 3.2.1) ainsi que certaines directives supplémentaires lors de la transfection par électroporation des cellules d'axolotl (Chapitre 3, section 3.2.3) seront données dans cette partie du mémoire. Ces deux techniques ont permis d'utilisation de tests de gènes rapporteurs (Dual Luciferase Assay) permettant l'évaluation de l'activation de la protéine p53 dans des cellules (H1299 et A11).

Les soins apportés aux axolotls occupent aussi une part non négligeable de notre temps de laboratoire. L'alimentation des animaux ainsi que le changement de leur milieu (solution de Holfreter's) sera discuté à la partie 3.2.2 de ce chapitre. Le bien-être des animaux est aussi très important dans l'obtention d'échantillons de qualité avec lesquels il faut travailler par la suite. Les procédures suivies durant les chirurgies visant à recueillir ces échantillons, c.i.e amputations des pattes en régénération en vue d'obtenir la matière première nous permettant de mener nos expérimentations, sera décrite dans la partie 3.2.2 de ce chapitre.

Certains résultats préliminaires particulièrement intéressants n'ont pas été inclus dans l'article présenté au chapitre 2. Des résultats d'inhibition de l'expression de p53 lors de la régénération des membres d'axolotls en utilisant la pifithrine- α , un inhibiteur pharmacologique ciblant p53, a permis de constater un effet dû à l'absence de cette protéine durant la régénération. La méthodologie entourant l'obtention de ces résultats, qui n'est pas présentés dans l'article, est donc expliquée en détail à la partie 3.2.4 de la présente section.

3.1.2 Matériels et méthodes contenu dans l'article

L'article présenté au chapitre 2 contient les points méthodologiques suivants:

- La préparation des cellules (lignées cellulaires H1299 et AL1)
- L'isolement de p53 par criblage de librairie
- Les informations concernant la technique de gène rapporteur « Dual-Luciferase[®] Reporter Assay System »
- Transfection des cellules H1299 utilisées pour le test de gène rapporteur
- Transfection par électroporation des cellules AL1 utilisées pour le test de gène rapporteur (protocole plus détaillée ci-dessous)
- Protocole pour les essais de colonies (survie cellulaire)
- Protocole d'immunobuvardage de type « Western »
- Méthodologie entourant la construction des arbres phylogénétiques
- Les statistiques (analyse des résultats aux « Dual-Luciferase[®] Reporter Assay System »)

3.2 Matériels et Méthodes (supplémentaires)

3.2.1 Clonage du p53 d'axolotl dans un vecteur d'expression (FG12/CMV)

Premièrement, la séquence p53 d'axolotl a été isolée par criblage d'une librairie d'ADN complémentaire d'embryon d'axolotl de stade 15 (Salamander Larvae Lambda cDNA, Stratagène, La Jolla, CA). Pour débiter, l'ORF (open reading frame : cadre de lecture ouvert) du gène *p53* a été amplifié par PCR à l'aide d'amorces contenant les sites de restrictions Xho1 et Bstx1 (Sigma-Genosys, On Canada). La conception de ces amorces est décrite à la page 42.

La réaction de PCR se fait dans un thermocycleur (Thermo Hybaid, MBS, MA) et la réaction regroupe les éléments du tableau suivant :

Tableau I : Les composantes de la PCR

Composantes de la PCR (Invitrogen, CA)	Concentration finale
Matériel de départ :cDNA	Selon le cas
Amorces	1µL du « stock » 25µM (sens et anti-sens) (1 ou 0,5µM en fonction du volume final)
dNTP	1µL du « stock » 10mM (0,4 ou 0,2µM en fonction du volume final)
MgCl ₂	1,5mM
Tampon-Mg	1X
Taq	2U

Le programme utilisé pour l'amplification par PCR de l'ORF est le suivant :

Dénaturation de 5 minutes à 95°C suivi d'une redescente à 75°C où le thermocycleur est en attente. L'enzyme Taq (Invitrogen, CA) est ajouté à la PCR durant cette période d'attente (Hot Start). La PCR se compose ensuite de 35 cycles de dénaturation, de liaison des amorces et d'élongation. Pour amplifier l'ORF d'axolotl, chacun des 35 cycles comprenait une période de dénaturation durant 20 secondes à 94°C, une période de liaison des amorces durant 20 secondes à 60°C (température correspondant à la température de liaison spécifique des amorces contenant le site de restriction Bstx1 ou Xho1) puis une période d'élongation de 45 secondes à 72°C. Ces 35 cycles sont suivis d'une période d'élongation finale de 15 minutes à 72°C.

Les produits de PCR sont ensuite chargés sur un gel diagnostique d'agarose 1% dans TAE (0,02M tris base, 0,01M acide acétique glaciale, 0,1mM EDTA pH 8,0) contenant 1µg/ml de Bromure d'éthidium (Invitrogen, CA). Les produits nucléiques issus de la PCR migrent dans le gel à 96 volts durant environ 20 minutes et sont révélés à l'aide du système Fluorchemtm 8900 (CA). Ce gel permet de visualiser si ce qui a été amplifié est de la bonne longueur. Les bandes ayant une longueur d'environ 1,2 Kb ont été extraites à l'aide de la méthode d'extraction Phénol/Chloroform puis précipité à l'éthanol. Le produit extrait et purifié a été cloné dans pCR[®]4-TOPO[®] (annexe II), à l'aide d'un kit TOPO TA cloning (Invitrogen, CA). Des cellules électrocompétentes (One Shot[®] GeneHogs[®] Electrocomp[™] E. Coli, Invitrogen, CA) ont été transformées (insert p53 dans pCR4-TOPO) par électroporation à l'aide de l'électroporateur MicroPulser[™] de Bio-Rad (Bio-Rad, USA) selon le protocole de la compagnie. Les transformants sont ensuite cultivés sur un milieu sélectif LB (Luria Broth) additionné d'ampicilline, d'IPTG, et de X-Gal. Une douzaine de colonies blanches sont repiquée et cultivées dans un milieu liquide LB additionné d'ampicilline. L'extraction des plasmides se fait à l'aide d'un kit GenElute[™] Plasmid Miniprep (Sigma, On, Canada). De petit échantillon des plasmides sont ensuite digéré en utilisant les enzymes de restriction Xho1 et Bstx1 (Invitrogen, Ca) afin de vérifier si l'insert est présent et de la bonne longueur. Les échantillons potentiellement positifs sont séquencés (IRIC, Université de Montréal) afin de confirmer la séquence. Les échantillons plasmidiques dont la séquence de p53 est complète et sans erreurs sont digérés avec les

enzymes de restriction Hho1 et Bstx1. L'insert est chargé sur gel, migre et est ensuite extrait en utilisant la méthode Phénol/chloroforme suivi d'une précipitation à l'éthanol. Le fragment issu de cette digestion double est cloné dans la bonne orientation dans le vecteur FG12/CMV (Annexe III) préalablement digéré avec les mêmes enzymes. La ligation s'effectue en utilisant la T4 DNA ligase (Invitrogen, CA) conformément au protocole de la compagnie. Un ratio de 1ng de vecteur pour 3ng d'insert p53 a été utilisé lors de la réaction. Ces échantillons ont ensuite été incubés toute la nuit à 16°C dans un thermocycleur (Thermo Hybaid, MBS, MA). Les nouvelles constructions issues de la ligation ont ensuite été électroporés dans des cellules bactériennes GeneHogs électrocompétentes (Invitrogen, CA). Les cellules transformées ont été étalées sur des géloses LB additionnées d'ampicilline, puis incubées durant toute une nuit à 37°C. Plusieurs colonies ont été repiquées, dans du LB avec ampicilline, afin d'amplifier le plasmide contenu dans les bactéries. De nouvelles digestions diagnostiques permettent ensuite de confirmer la ligation ainsi que la bonne orientation de l'insert p53 dans le vecteur FG12/CMV.

3.2.2 Soins des animaux, chirurgies

Les axolotls (*Ambystoma mexicanum*), proviennent de la colonie d'axolotl de l'Université d'Indiana (Bloomington, IN). Les axolotls vivent dans une solution saline de Holtfreter à 20% ou 40% en fonction de la grosseur de l'animal. La solution de Holtfreter concentrée se compose de 38mM MgSO₄, 25mM CaCl₂, 23mM KCl, 1,7M NaCl et 9g/L de Trizma Fishgrade 7.4. (Fisher Scientific, USA; Sigma, On, Canada) La température du milieu de l'axolotl varie de 18 à 21°C et le temps d'illumination est constant : 12 heures de clarté et 12 heures de noirceur. Pour les chirurgies, les animaux sont anesthésiés dans une solution de MS222 0,1g/ml pH 7.4 (3-aminobenzoic acidethyl ester ou methanesulfonate salts) dans une solution de 1X ou 2X, selon la taille de l'animal. Le pH du MS222 est ajusté à 7,4 avec Na₂HPO₄ 10%. La chirurgie est effectuée sur un support humide et l'animal est aspergé de solution Holtfreter fréquemment. L'amputation se fait à l'aide de ciseaux microchirurgicaux (Fine Science Tools, B.C., Canada). L'amputation de la patte peut être proximale (entre l'épaule et le coude) ou distale (entre le coude et le poignet). La patte est

donc amputée et l'os raccourci en amont du plan d'amputation afin qu'il ne forme pas une pointe sortant de la blessure, ce qui pourrait rendre la régénération imparfaite.

3.2.3 Protocole d'électroporation des cellules AL1

Les cellules AL1 sont cultivées tel que décrit au chapitre 2 (Chapitre 2, page 41). Le présent protocole d'électroporation a été développé afin de transformer des cellules AL1, dans le but de nous permettre d'effectuer un test de gène rapporteur (Dual Luciferase Reporter Assay Promega, Madison, WI) décrit lui aussi au chapitre 2 (page 43,44,48). Les cellules AL1 sont recueillies par trypsination (trypsine 0,7X) et comptées à l'aide d'un hématimètre (Hausser Scientific, Horsham, PA). Elles sont culottées et rincées 2 fois à l'aide de PBS 0,7X froid. Les cellules sont maintenues sur la glace durant toute la procédure. Les cellules sont resuspendues dans le PS 0,7X froid de manière à obtenir 60 000 cellules par volume de 100 μ L. Chacune des électroporations se fait donc dans 100 μ L auquel nous ajoutons la quantité adéquate de vecteur (Chapitre 2, page 43,44). Une pulsation électrique de forme carrée (electrosquare) de 250 volts durant 35 millisecondes avec le Gene-Pulser Xcell Eukaryotic System (Bio-rad, USA) et une pulsation électrique de forme carrée de 200 volts durant 35 millisecondes avec le ECM 830 Electro Square Porator de BTX (BTX, Harvard Apparatus, Holliston, MA) ont donné les meilleurs résultats. L'électroporation s'effectue dans des cuvettes de 4mm (VWR, West Chester, PA) qui ne sont utilisées qu'une seule fois. Suite à l'électroporation, les cellules sont resuspendues rapidement dans 900 μ l de médium L15 complet, pour être ensuite déposé dans un puit d'une plaque de 24 puits. Le lendemain, le milieu L15 est remplacé par du milieu frais.

3.2.4 Traitement inhibiteur de p53 : Pifithrine- α

Des larves d'axolotl ont été amputées proximale et distalement, aux membres antérieurs, afin d'observer les résultats de l'inhibition de l'activation de p53 durant la régénération. Les animaux sont exposés à la pifithrine- α (Tocris, Bioscience, USA) (diluée dans le DMSO) immédiatement après la chirurgie. Les animaux exposés à 1 μ M de pifithrine- α ont été maintenus dans 5 mL de solution Holfreter à laquelle 2 μ L de pifithrine- α 2500 μ M et 8 μ L de DMSO étaient ajoutés. Les animaux exposés à 5 μ M de pifithrine- α ont été maintenus dans 5 mL de solution Holfreter à laquelle 10 μ L de pifithrine- α 2500 μ M

étaient ajoutés. Les animaux contrôles étaient maintenus dans 5 mL de solution Holfreter à laquelle 10 μ L de DMSO étaient ajoutés. Leur milieu, contenant la pifithrine- α , était changé à tous les jours et ce tout au long de la période de régénération des animaux contrôles. Après 24 jours, fin de la régénération des animaux contrôles, toutes les pattes avant de tous les animaux ont été photographiées (Nikon Coolpix4500, Japan) et classées.

Chapitre 4. Résultats

4.1 Introduction

L'article présenté au chapitre 2 contient une partie des résultats générés au laboratoire dans le cadre des recherches concernant la protéine p53 chez l'axolotl. Les résultats discutés dans cet article décrivent la protéine p53 de l'axolotl et amorcent une analyse de son activité. Ces résultats dressent, de façon générale, un portrait très sommaire de l'action de p53 chez cet organisme ayant des attributs plus qu'intéressant.

De concert à cette analyse de la protéine p53 chez l'axolotl nous avons tenté d'observer son implication, son activité, durant le processus de régénération de l'axolotl. Sachant que la protéine p53 inhibe la prolifération cellulaire désordonnée menant au développement de cancer (néoplasie) nous étions très intéressé à observer son activité durant la régénération de l'animal, cette régénération pouvant correspondre à une prolifération cellulaire structurée. Une mesure de l'activité de p53 durant les différents stades de régénération a été tentée à l'aide d'immunobuvardage de type western utilisant des anticorps contre p53 ainsi que contre son régulateur négatif, Mdm2.

L'inhibition de l'activité de p53 était une deuxième possibilité permettant d'observer l'action de p53 durant la régénération. En effet, il existe un inhibiteur pharmacologique spécifique à la protéine p53, la pifithrine- α (voir Chapitre 1, section 1.4.7), permettant de générer une inhibition durant la régénération, fournissant un aperçu des répercussions physiques de l'absence de la protéine durant la régénération. De plus, cet inhibiteur pharmacologique ainsi que l'absence de p53 qui découle de son utilisation ne semble pas perturber la croissance de l'axolotl.

Les résultats qui seront présentés par la suite dans cette section de résultats ne sont donc que des résultats préliminaires ayant néanmoins un potentiel certain et qui devront être répétés encore à quelques reprises.

4.2 Résultats contenus dans l'article

L'article présenté au chapitre 2 contient les résultats suivants :

- La structure de la protéine p53 d'axolotl (Figure 1, Chapitre 2)
- L'arbre phylogénétique de la protéine p53 (Figure 2, Chapitre 2)

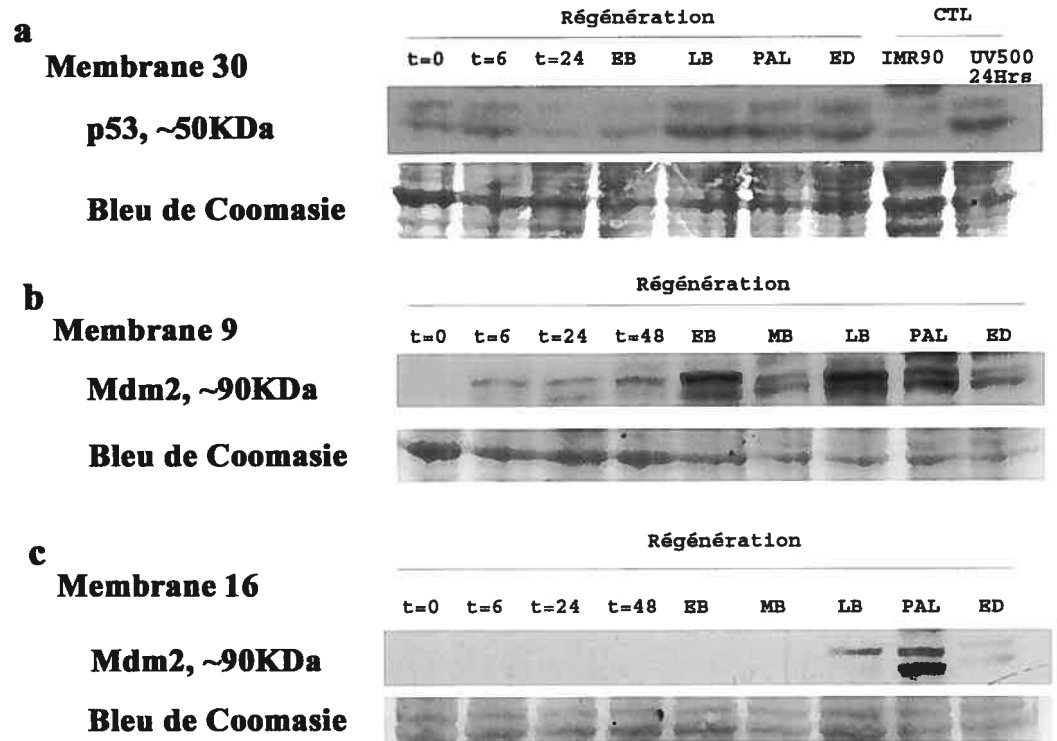
- Les essais de gènes rapporteurs démontrant que l'activation de la protéine p53 de l'axolotl est sensible à la température (Figure 3 et 4, Chapitre 2)
- La détection de la protéine p53 par immunobuvardage de type « western » suite à différents stress (UV et MNNG) (Figure 5, Chapitre 2)

4.3 Résultats supplémentaires

4.3.1 Immunobuvardage de type « western » durant la régénération (Figure 1a-c, Chapitre 4)

La figure 1a (Chapitre 4) montre une quantité fluctuante de la protéine p53 durant les différents stades de la régénération (mesuré ici avec l'anticorps anti-p53 total NCL-p53-CM5p, Novo castra). Il semblerait y avoir plus de protéines stabilisées au début de la régénération (t=0 et t=6) et à la fin de celle-ci (LB, PAL, ED). Même s'il a été impossible de déterminer un patron de stabilisation de p53 il n'en demeure pas moins qu'il y a incontestablement présence de la protéine durant la régénération. Il est possible d'observer une stabilisation de la protéine Mdm2 (mesuré avec l'anticorps anti-MDM2 ab-1 (clone SMP14), medicorp, Qc, CAN), un doublet entre 90 et 95 KDa, durant la régénération (Figure 2b-c, Chapitre 4). Cette stabilisation apparaît commencer, à la membrane 9, au stade EB (bourgeon précoce) tandis que d'après la membrane 16, cette stabilisation ne débiterait qu'au stade LB (bourgeon tardif). Ces résultats, pourraient donner des indices sur la stabilisation (l'activation) de p53 durant la régénération. Sachant que Mdm2 est le régulateur négatif de p53, il serait possible de penser que plus la protéine Mdm2 est présente, stabilisée, plus celle-ci tente d'ubiquitiner p53 afin de rendre la protéine p53 accessible à la machinerie protéolytique.

Figure 1 : Immunobuvardage de type « western » durant la régénération. (a) Détection de la protéine p53 totale durant la régénération (b-c) Détection de la protéine Mdm2 dans des blastèmes de pattes en régénération. Le contrôle de l'uniformité du chargement des protéines a été fait par coloration au bleu de Coomassie sur chacune des membranes.



4.3.2 Inhibition de la protéine p53 durant la régénération (Figure 2, Chapitre 4)

Il est possible d'observer, 24 jours post-amputation, une régénération complète des membres des axolotls contrôles, autant leur patte ayant subie une amputation proximale que distale. Par contre, pour ce qui est des animaux traités avec la pifithrine- α (Chapitre 1, p.30), il est évident qu'après 24 jours, la régénération est encore incomplète. En effet, il semble que le traitement à la pifithrine- α , inhibant p53, ait ralenti leur processus de régénération. Les animaux expérimentaux ont atteint, après 24 jours, un stade de régénération se situant entre celui de palette et ce lui de différenciation précoce. L'inhibition de p53 semble avoir des répercussions sur la vitesse de régénération mais non sur l'initiation et le déroulement de celle-ci car bien que plus lente, la régénération semble normale.

Il était possible de croire, suite aux résultats montrant un ralentissement de la régénération (Figure 2, Chapitre 4), que l'ensemble du développement de la larve d'axolotl était affecté par le traitement à la pifithrine- α . Un ratio de croissance fut donc mesuré afin de déterminer si la croissance des animaux traités se déroulait au même rythme que celle des animaux contrôles. Le tableau 1 (Tableau I, Chapitre 4) montre que les contrôles (DMSO) et les animaux traités avec 1 μ M et 5 μ M ont un ratio de croissance semblable, c'est-à-dire qu'ils ne sont pas significativement différents entre eux. Ces ratios de croissance ne sont pas significativement différents d'une condition à l'autre ($p > 0,05$).

Figure 2 : Effets d'un traitement à la pifithrine- α (PFT, 1 μ M et 5 μ M) sur la régénération de la patte d'axolotl ayant subi une amputation proximale (patte gauche) ou distale (patte droite).

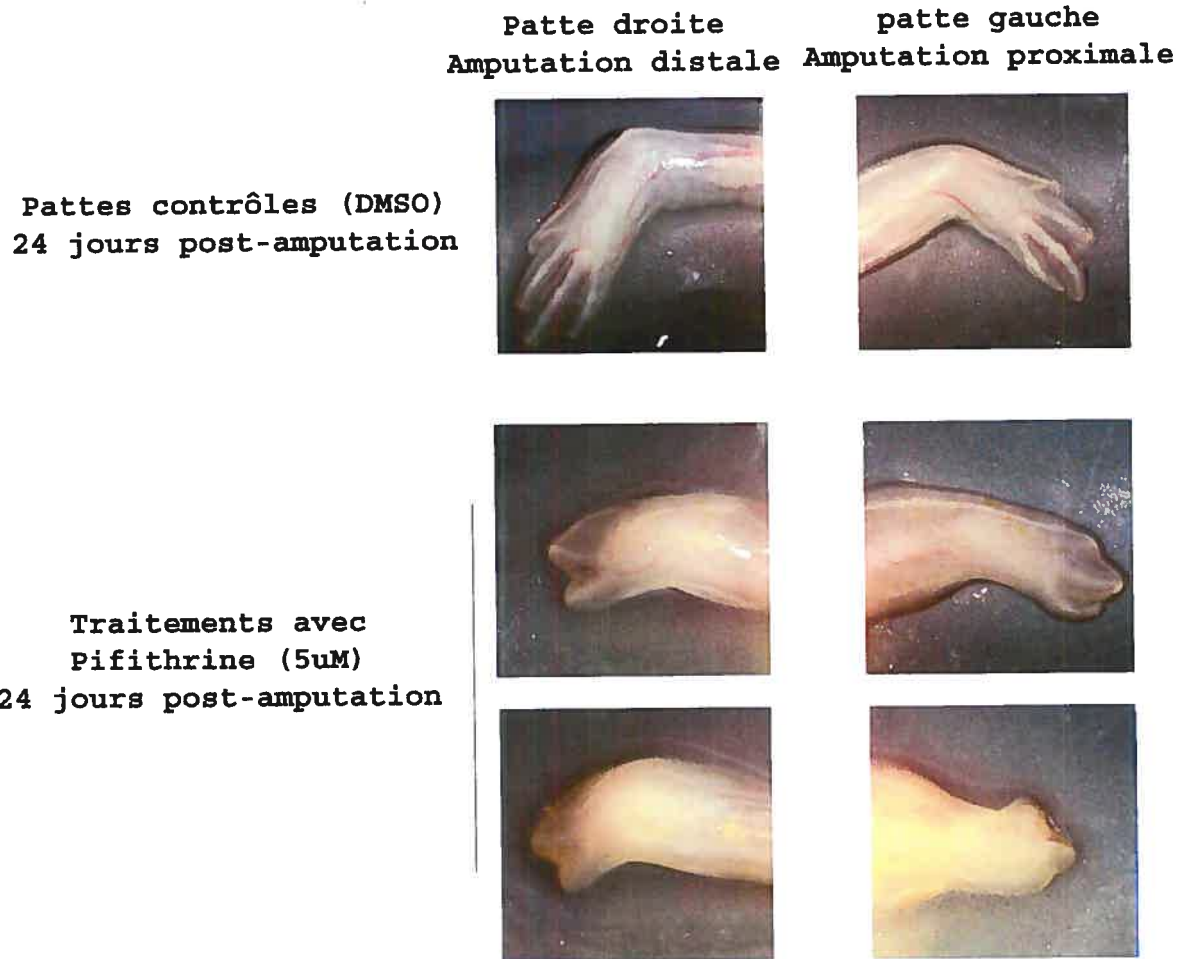


Tableau I : Comparaison de croissance entre les animaux (larves) contrôles et ceux traités à la pifithrine- α (PFT, 1 μ M et 5 μ M) lors de la régénération des membres. Les ratios de croissance ne sont pas significativement différents d'une condition à l'autre ($p > 0,05$).

Animal	traitements	Longueur de l'animal pré-amputation	Longueur de l'animal 24 jours post-traitements et amputation	Ratio de croissance (pre-amp/post-amp)
E13	Control DMSO	3,5 cm	4 cm	0,88
E14	Control DMSO	3,5 cm	3,9 cm	0,90
E15	Control DMSO	3,0 cm	3,5 cm	0,86
E16	Pifithrine- α 1 μ M	3,5 cm	4,1 cm	0,85
E17	Pifithrine- α 1 μ M	3,2 cm	3,7 cm	0,86
E18	Pifithrine- α 1 μ M	3,1 cm	3,5 cm	0,89
E19	Pifithrine- α 5 μ M	3,0 cm	3,5 cm	0,86
E20	Pifithrine- α 5 μ M	3,2 cm	3,7 cm	0,86
E21	Pifithrine- α 5 μ M	3,0 cm	3,4 cm	0,88

CTL: ratio de croissance moyen: 0,88

PFT 1 μ M : ratio de croissance moyen : 0,87

PFT 5 μ M : ratio de croissance moyen : 0,87

Chapitre 5. Discussion

5.1 Protéine p53 et structure

La protéine p53 de l'axolotl est très semblable à la protéine humaine (Figure 1a-b, Chapitre 2) et contient les mêmes domaines standards, c'est-à-dire le *Transactivation domain* et le *leucine rich domain* de la partie N-terminale, le *DNA binding domain*, le *tetramerization domain* et le *REG domain* dans la partie C-terminale de la protéine. Les 5 régions très conservées lors de l'évolution des organismes sont aussi présentes. Dans la 3^e de ces régions, il est possible d'y retrouver la mutation observée chez le *Spalax* (R174K), mutation jugée responsable de sa grande résistance aux stress hypoxiques.[128] Cette mutation permettrait la transactivation de protéines favorisant l'arrêt du cycle cellulaire (p21, pTEN et Mdm2) à des fins de réparation du génome, au détriment de protéines engendrant l'apoptose (Apaf1).[128] Plusieurs exemples de mutants entraînant une inactivation partielle de la protéine p53 (inactivation de la voie apoptotique seulement) ont été observées et, fait encore plus intéressant, plusieurs de ces mutations inactivantes touchent des résidus avoisinant l'arginine 174. Une mutation de l'arginine 175 a des effets similaires (R175L/I/S-p53) sur l'activité de la protéine p53.[170] Suite à la création d'une souris mutante R175P-p53 il est apparu que sa protéine p53 conserve la capacité à arrêter le cycle cellulaire mais non à induire l'apoptose.[171] Il est donc possible que le résidu K174 chez l'axolotl et le xénope, rend leur protéine p53 plus efficace à freiner le cycle cellulaire qu'à induire l'apoptose, ce qui est observé chez le *Spalax* ainsi que chez des mutants du résidu 175.

Autre fait intéressant, une mutation de la protéine p53 R175H rend celle-ci sensible à la température. Cette protéine p53 est inactive à 37°C mais capable d'activer la transcription à 26°C.[172] Le xénope, ayant une lysine en position 174 (au lieu de R174-p53 humain) voit l'activité de sa protéine p53 dépendante de la température, c'est-à-dire qu'elle est incapable de fonctionner à 37°C mais fonctionne à 32°C.[149] Chez l'axolotl, nous retrouvons aussi une lysine en position 174 (Figure 1-b, Chapitre 2). D'après nos résultats aux tests de gènes rapporteurs, un patron d'activation dépendant de la température a pu être remarqué. La protéine p53 de l'axolotl apparaît inefficace, à 37°C, à transactiver Hdm2 et p21 mais obtient des résultats probants à 30°C (Figure 3, Chapitre 2). De plus, à

25°C, dans des cellules d'axolotl (AL1), la protéine p53 d'axolotl est incontestablement plus efficace dans la transactivation du promoteur de Hdm2 que la protéine humaine (Figure 4, Chapitre 2). Il serait très intéressant d'observer si l'activité de la protéine p53 du *Spalax* (K174-p53 humain) est elle aussi affectée par la température : p53 du *Spalax* apparaît incapable d'activer la production de luciférase durant certains tests de gènes rapporteurs à 37°C (promoteur Apaf1 par exemple) : est-ce que ce serait la même chose à 30°C?

Il semble que la combinaison de la protéine p53 d'axolotl (inactive à 37°) et celle humaine (active à 37°) engendre une baisse de la transcription de luciférase, sous le promoteur Hdm2, à 37°C et dans les cellules H1299. Il y aurait ici un effet dominant négatif. La protéine humaine seule est beaucoup plus active comme facteur de transcription. (Figure 1, Chapitre 4) La protéine p53 d'axolotl, n'ayant pas d'activité à 37°C, pourrait se tétramériser avec les protéines humaines empêchant celles-ci d'avoir leur effet d'activation de la transcription sur le promoteur Hdm2 à sa température optimale. Ce genre d'effet dominant négatif est vu chez les gens souffrant du syndrome Li-Fraumeni et serait ici une preuve supplémentaire que l'activité de la protéine p53 de l'axolotl est sensible à la température.

Donc, cette lysine en 174 pourrait avoir un effet semblable à la mutation R175H-p53 sur la structure de la protéine p53 (protéine humaine) et ses aptitudes de liaison/tétramérisation selon la température. Cette même lysine pourrait aussi avoir un effet semblable à la mutation R175P-p53 sur la capacité de p53 à induire l'apoptose. Ainsi, la protéine p53 de l'axolotl aurait été sélectionnée, aurait évolué afin d'avoir un effet optimal à base température, autour de 25°C, température du milieu de vie de l'animal. De plus, cette sélection pourrait être simultanément responsable d'une plus faible propension de la protéine p53 à induire l'apoptose au profit d'un arrêt du cycle cellulaire. Ceci pourrait peut-être jouer un rôle dans la capacité à résister au cancer ainsi que dans l'aptitude à régénérer que démontre l'axolotl. Il va sans dire que de plus amples recherches devront éclaircir ces derniers points.

Selon l'équipe de Rechavi [128], travaillant chez le *Spalax*, la pression sélective ayant favorisé la mutation R174K correspondrait à un changement de la protéine inhibant son effet apoptotique, permettant à l'animal de résister aux conditions hypoxiques extrêmes

auxquelles il est souvent confronté dans son milieu. Effectivement, l'utilisation de plusieurs promoteurs différents lors de test de gène rapporteurs ont démontrés que l'activation, à 37°C, des gènes impliqués dans l'apoptose étaient inhibées, contrairement à ceux impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire [128, 173]. L'axolotl, le xénope et le newt (Brockes, résultats non-publiés) possèdent la même mutation au résidu 174 (R174K) de leur protéine p53. Pour ces animaux, cette mutation ne serait pas en lien avec un besoin de pouvoir résister à un environnement hypoxique comme ce serait le cas pour le *Spalax*. En effet, ces animaux poïkilothermes, prenant la température de leur milieu, vivent dans un environnement aqueux frais (près de 20°C) qui, selon la loi de Henry [174], permet à une plus grande quantité d'oxygène d'y être dissoute. Comme nous l'avons mesuré lors des essais luciférase, la protéine p53 de l'axolotl est inactive à 37°C mais devient active à plus basse température soit à 30 et 25°C (Figure 3 et 4, Chapitre 2). Il semble que des pressions sélectives liées à la température aient mené à des modifications de la protéine p53 de l'axolotl afin de favoriser son rôle de facteur de transcription à base température, rendant du même coup la protéine sensible à des températures plus élevée. Cette sensibilité ne serait pas nécessairement liée à la mutation R174K mais pourrait découler de mutations se retrouvant dans des domaines moins conservés de la protéine p53 de l'axolotl. Nous pourrions être tentés de croire que l'activité de la protéine p53 de *Spalax* est elle aussi sensible à la température vue son incapacité à activer la transcription via les promoteurs de gène apoptotique à 37°C.[128, 173] En fait, à cette température, la transcription par le biais de plusieurs promoteurs liés à l'arrêt du cycle cellulaire est possible (promoteur p21 par exemple [128]). Cette dichotomie entre la transcription de promoteurs apoptotiques versus ceux stoppant le cycle cellulaire, à 37°C, laisse présager que la protéine p53 du *Spalax* n'est pas sensible à la température mais aurait évolué afin de favorisé l'arrêt du cycle cellulaire au profit de l'apoptose rendant cet organisme plus résistant à l'hypoxie. Il aurait été possible de croire que le *Spalax* puisse expérimenter des périodes de torpeur ou tout simplement d'hibernation comme c'est le cas de plusieurs rongeurs. La température interne de l'animal aurait pu alors chuter drastiquement comme c'est souvent le cas chez les animaux hibernant.[175] Ce dernier point nous aurait permis d'envisager le fait que la protéine du *Spalax* puisse être elle aussi sensible à la température comme l'est celle de l'axolotl ce aurait pu permettre une réponse apoptotique à plus faible température. Il ne

semble pas que cette dernière hypothèse puisse être retenue car le *Spalax* maintiendrait une température constante tout au long des saisons, n'expérimentant aucune baisse de température corporelle qui pourrait permettre une activation des voies apoptotique de p53.[176, 177] L'équipe de Rechavi devrait tout de même vérifier l'activité de la protéine p53 du *Spalax* à basse température.

Il est connu que p53 influence le vieillissement selon des recherches faites sur la souris et la drosophile.[151, 178] Dans ces expériences, une surexpression de p53 chez les souris entraîna un vieillissement prématuré tandis qu'une inhibition de p53, chez la drosophile, entraîna un vieillissement plus tardif. Ainsi, en étudiant des organismes ayant une espérance de vie élevée, comme c'est le cas du *Spalax*, de l'axolotl et du xénope il serait possible de recueillir des informations intéressantes sur ce qui unit p53 au vieillissement. Dans le même ordre d'idée, l'arbre phylogénétique de l'évolution de p53 (Figure 2, Chapitre 2) nous montre que les mammifères, plus particulièrement les rongeurs, démontrent une évolution rapide (branche longue dans l'arbre phylogénétique) de la protéine p53, exception faite pour le *Spalax* chez qui p53 a évolué plus lentement. Dans cet arbre, chez les mammifères, seul le dauphin et l'humain présentent une évolution aussi lente allant de pair avec une longévité relativement importante, ce qui souligne encore une fois un lien entre p53 et la longévité/vieillesse. Il faudrait idéalement ajouter des séquences d'autres espèces (faisant partie, par exemple, de l'ordre des monotrèmes, c.i.e échidnés, marsupiaux ; des squamates, etc.) afin de compléter l'arbre phylogénétique de la protéine p53 permettrait une meilleure appréciation du processus évolutif ainsi que de l'évolution des organismes contenus dans l'arbre.

5.2 P53 en réponse aux stress et durant la régénération

Dans un autre ordre d'idée, il a été possible de constater que la protéine p53 d'axolotl semble « fonctionner » de façon similaire à celle de mammifères. En effet, les cellules AL1 d'axolotl exposées aux rayons UV ainsi qu'au MNNG (agent alkylant) sont stabilisées par une phosphorylation de la sérine 15 de p53 (Figure 5a-b, Chapitre 2). Ces résultats correspondent à ce qui est connu concernant la stabilisation de p53 suite à différents bris au niveau de l'ADN par des UVs ou contact avec MNNG, entraînant la

phosphorylation de la sérine 15. La protéine p53 d'axolotl semble donc réagir de la même façon aux bris d'ADN que le fait son homologue chez les mammifères.[179, 180]

Nous savons que la protéine p53 est d'une importance majeure dans le contrôle de l'apparition de cancers. La protéine p53 pourrait aussi avoir une fonction dans le cadre de la régénération, que l'on pourrait qualifier de néoplasie « structurée ». Il existe, en effet, quelques articles faisant état de la présence d'apoptose durant le premier jours suivant l'amputation du membre de triton.[157] La protéine p53 serait probablement stabilisée suite au stress extrême que représente l'amputation du membre en soi. En utilisant la technique d'immunobuvardage de type « western », il a été possible de mesurer clairement la présence de p53 durant la régénération (Figure 2a, Chapitre 4). Les immunobuvardages utilisant des anticorps primaires reconnaissant la protéine p53 totale n'ont pas été en mesure de présenter un signal stable de la protéine p53 durant la régénération comme ce qui était observé chez les cellules AL1 exposées aux UVs et MNNG (Figure 5c-d, Chapitre 2). Sachant que ce sont les modifications post-traductionnelles qui activent la protéines p53, nous avons aussi tenté des immunobuvardages « western » utilisant l'anticorps contre la phospho-ser 15 de p53 (#9284, Cell Signaling Technology, Can) ayant déjà donné de bons résultats durant les immunobuvardages « western » sur les cellules AL1 suite aux stress infligés par UV et MNNG (Figure 5a-b, Chapitre 2). Il est possible qu'il y ait bel et bien une stabilisation de p53 suite à l'amputation puis durant la régénération du membre de l'axolotl. Il fut, par contre, impossible de mesurer clairement cette stabilisation par immunobuvardage de type « western » car les modifications post-traductionnelles nous permettant de mesurer son activation touchent probablement des résidus autre que la sérine 15, résidus que nous n'avons pas encore testé. En effet, il existe au moins 20 sites pouvant être acétylés ou phosphorylés dans la partie N-terminale et C-terminale de la protéine p53 humaine.[132, 181] Il se peut aussi que les modifications post-traductionnelles touchent des résidus propres à la protéine p53 d'axolotl pour lesquels il n'existerait pas d'anticorps primaires commercialement accessibles reconnaissant ces épitopes.

Simultanément, nous avons tenté de mesurer l'activation de p53 par le biais de son régulateur négatif Mdm2. La stabilisation de Mdm2 correspondrait à une tentative de réduire la quantité de p53 actif dans la cellule, de rétablir son niveau basal. Ainsi, Mdm2 stabilisé peut plus efficacement cibler et ubiquitiner la protéine p53, la rendant visible au

protéasome 26S qui la dégradera. Donc, d'après les résultats obtenus (Figure 2b-c, Chapitre 4), même si nos membranes d'immunobuvardage de type « western » montrent des bandes parasites, il est possible d'observer une plus grande présence de Mdm2 durant les derniers stades de régénération de la patte, c.i.e. durant les stades allant de bourgeon primitif à différenciation précoce. Il semblerait donc y avoir une intention d'éliminer la protéine p53 en fin de régénération mais non en ses débuts, ce qui peut concorder avec l'induction d'apoptose observée en début de régénération. Fait étrange, il est connu que la phosphorylation de la sérine 15 est importante dans l'apoptose mais nous n'avons pas été en mesure de l'observer et ce, malgré l'utilisation d'un anticorps anti-phospho ser-15 reconnaissant la protéine d'axolotl.

5.3 Inhibition de p53 durant la régénération

Une autre alternative permettant de souligner l'importance de p53 suite à l'amputation et durant la régénération fut d'en inhiber son activité. L'inactivation de p53 durant la régénération fut possible grâce à l'utilisation d'un inhibiteur pharmacologique de p53, la pifithrine- α (P-fifty-three-Inhibitor). Après plusieurs tests, il a été possible de cibler une concentration de pifithrine- α non-toxique pour l'animal, mais ayant un effet sur la régénération. En utilisant 5 μ M de pifithrine- α nous avons été en mesure d'observer un ralentissement évident de la régénération du membre de l'axolotl (Figure 3, Chapitre 4). Les animaux traités semblent se trouver de 2 à 3 stades de régénération derrière les animaux contrôles après 24 jours de traitement suivant l'amputation. Donc, malgré le fait qu'il ait été impossible d'observer directement un patron de stabilisation de p53 par immunobuvardage de type « western » suivant l'amputation, il apparaît ici que l'inhibition de p53 ralentisse de façon marquée la régénération. Il se pourrait que l'inhibition empêche p53 d'avoir son rôle apoptotique suite à l'amputation ralentissant dès ce moment le processus de régénération. Il était aussi possible de croire en un effet plus général de la pifithrine- α sur la croissance des animaux, donc sur la régénération, car nous utilisons des larves d'axolotl d'approximativement 3 cm. Les animaux contrôles ainsi que les animaux traités expérimentalement ont donc été mesurés afin de déterminer l'effet de la pifithrine- α sur la croissance de ceux-ci. (Tableau I, Chapitre 4) Tous les animaux, sans exception, avaient une valeur de croissance équivalente. Donc, il est possible de croire en un effet

ciblé de la pifithrine- α inhibant seulement l'activité de p53, ralentissant le processus de régénération des animaux traités comparativement aux contrôles : p53 aurait donc un rôle à jouer durant la régénération, rôle qui demeure, pour l'instant, à préciser.

Il est possible d'imaginer que la protéine p53 puisse avoir un rôle dans l'inhibition de la réponse inflammatoire suite à l'amputation d'une patte chez l'axolotl. En effet, il semble exister un lien entre l'absence de p53 et une faible réponse inflammatoire : des souris « sauvages » montrent une réponse inflammatoire plus importante que les souris « p53 null ».[182] Il est donc possible de soupçonner ce dit effet chez l'axolotl car, lors des chirurgies et suivant celles-ci, les animaux ne démontrent qu'une réponse inflammatoire minimale : il ne semble pas y avoir de rougeur, de saignement important (vasodilatation locale), de gonflement ni de douleur (l'animal s'appuie sur sa patte amputées...), ce qui serait très différent chez tout autre animal (mammifères) ayant subi les mêmes types de chirurgies.

Chapitre 6. Conclusion

Le clonage de la protéine p53 d'axolotl a permis de constater que sa séquence est très semblable à celle des mammifères. Elle présente par contre une mutation sur son arginine 174 (R174K), tout comme le xénope et le *Spalax*. Cette mutation favoriserait l'arrêt du cycle cellulaire et inhiberait l'activation de l'apoptose chez le *Spalax*. Nous avons aussi observé par le biais de tests de gènes rapporteurs, que l'activation de la protéine p53 d'axolotl est sensible à la température, comme l'est la protéine du xénope. Cette activation serait optimale à de basses température (entre 25 et 30°C) et pourrait correspondre à une adaptation de ces animaux poïkilothermes à leur milieu de vie se situant près de 25°C : leur protéine p53 aurait été sélectionnées, aurait évolué, en fonction d'une meilleure activité à base température. D'après les résultats aux immunobuvardages de type « western », la protéine p53 de l'axolotl semble stabilisée de la même façon que la protéine de mammifères suite à des bris causés à son ADN par des irradiations UV ou l'alkylant MNNG. Elle serait aussi présente durant la régénération. De plus, des expériences d'inhibition de p53 durant la régénération, à l'aide de pifithrine- α , montrent un ralentissement marqué de la régénération renforçant l'idée selon laquelle la protéine p53 aurait un rôle à jouer durant la régénération. Les résultats obtenus sont donc autant de nouveaux éléments à ajouter à notre connaissance de l'action de la protéine p53 chez l'axolotl, de son implication durant la régénération ainsi que lors de la résistance au cancer. Il serait très intéressant de continuer l'étude de la protéine p53 chez cet organisme modèle régénérant parfaitement, résistant au cancer et possédant une longévité importante. Dans le futur, il serait bon de trouver un anticorps permettant de visualiser une modulation de la protéine p53 d'axolotl durant la régénération. Il serait aussi très intéressant de procéder à des tests de gènes rapporteurs utilisant des promoteurs de gènes cible de p53 impliqués dans l'apoptose ce qui permettrait de voir si la protéine d'axolotl peut induire facilement l'apoptose et ce, à différentes températures (utiliser les promoteurs bax et Apaf1, par exemple). D'autres expériences d'inhibition avec la pifithrine- α pourraient être tentées afin d'inhiber p53 durant la régénération d'une patte suite à l'implantation d'un agent cancérigène dans le blastème, ce qui pourrait générer la première tumeur dans un blastème de patte en régénération.

Dernièrement, l'équipe de Tanaka est parvenue à créer des axolotls transgéniques GFP+.[183] Cette dernière percée laisse entrevoir la possibilité de produire sous peu des axolotls transgéniques possédant un ARNi sous le contrôle d'un promoteur inductible. Il serait donc possible de produire un axolotl transgénique possédant un ARNi contre p53 sous le contrôle d'un promoteur inductible et d'observer les répercussions d'une inhibition massive de p53 durant la régénération, ou encore suite à l'incorporation d'un agent cancérigène dans le blastème d'une patte en régénération. Il est aussi à noter que des puces à ADN ont été développées chez l'axolotl, pour la première fois, en 2006.[184] Il existe aussi un projet de séquençage du génome de l'axolotl, « l'*Ambystoma mexicanum* EST sequencing project », qui a déjà séquencé de 10 à 25% de ses gènes.[185] La génération de données ainsi que la mise au point de différents outils moléculaires, à l'image de l'axolotl transgénique et des puces à ADN, facilitera, dans le futur, les recherches entourant l'axolotl et ses fascinantes capacités.

Chapitre 7. Remerciements

Je tiens à remercier ma famille et particulièrement mes parents pour leur soutien et leurs encouragements. Ensuite mes amis de longues dates, que j'ai malheureusement trop souvent négligés, et qui, je l'espère, ne m'en tiennent pas trop rigueur (je pense ici plus particulièrement à Martin, Julie, Jasmin et Stéphane...). J'aimerais aussi remercier Dr. Stéphane Roy, mon directeur de recherche, qui en partageant son savoir m'a permis d'apprendre tellement de choses. Je veux aussi remercier toute l'équipe du labo, ceux avec qui je vis et/ou ai vécu depuis trois ans, c'est-à-dire Mathieu, Cara, Sophie, Jean-Charles, Christina et Mireille (pas nécessairement dans l'ordre et dépendant des moments)... je vais assurément m'ennuyer. Je n'oublie pas les stagiaires Gabriel, Rébecca, Gurpal, Olivier, Audrey, Pierre-Luc, Dao, Adrian et Samuel qui sont venus mettre de l'action dans le labo. Je tiens aussi à remercier le Dr, Gerardo Ferbeyre ainsi que les membres de son laboratoire pour avoir répondu à plusieurs de mes questions à propos de p53. Je veux remercier, en rafale, Audrey pour sa présence, André pour ses conseils et son expérience ainsi que Mylène pour toutes les thérapies « sur le bras »...
Merci à tous... rien n'aurait été possible sans vous.

Chapitre 8. Références

1. Herbert, F., *Dune Messiah*. 1969: Galaxy Publishing Corporation. 211.
2. Craven, W., *Swamp Thing*. 1982: United States. p. 91 mins.
3. Wolsky, A., *Regeneration and cancer*. Growth, 1978. **42**(4): p. 425-6.
4. Buffenstein, R., *The naked mole-rat: a new long-living model for human aging research*. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2005. **60**(11): p. 1369-77.
5. Austad, S.N., *An experimental paradigm for the study of slowly aging organisms*. Exp Gerontol, 2001. **36**(4-6): p. 599-605.
6. Brandon, R.A., *Natural History of the Axolotl and Its Relationship to Other Ambystomatid Salamanders*, in *Developmental Biology of the Axolotl*, J.B. Armstrong and G.M. Malacinsky, Editors. 1989, Oxford University Press: New York. p. 320.
7. Smith, H.M., *Discovery of the Axolotl and Its Early History in Biological Research*, in *Developmental Biology of the Axolotl*, J.B. Armstrong and G.M. Malacinsky, Editors. 1989, Oxford University Press: New York. p. 320.
8. Brockes, J. and A. Kumar, *Newts*. Curr Biol, 2005. **15**(2): p. R42-4.
9. Gresens, J., *An introduction to the Mexican axolotl (Ambystoma mexicanum)*. Lab Anim (NY), 2004. **33**(9): p. 41-7.
10. Kühn, E.R. and G.F.M. Jacobs, *Metamorphosis*, in *Developmental Biology of the Axolotl*, J.B. Armstrong and G.M. Malacinsky, Editors. 1989, Oxford University Press: New York. p. 320.
11. McNeil, R., *Écologie Adaptative*, in *Écologie Adaptative*. 1999: Montréal. p. 248.
12. Armstrong, J.B., S.T. Duchon, and G.M. Malacinsky, *Raising the Axolotl in Captivity*, in *Developmental Biology of the Axolotl*, J.B. Armstrong and G.M. Malacinsky, Editors. 1989, Oxford University Press: New York. p. 320.
13. Frost, S.K., *Pigmentation and Color Variants*, in *Developmental Biology of the Axolotl*, J.B. Armstrong and G.M. Malacinsky, Editors. 1989, Oxford University Press: New York. p. 320.
14. Fankhauser, G., *Induction of triploidy and haploidy in axolotl eggs by cold treatment*. Biol. Bull. mar. biol. Lab., 1942. **83**: p. 367-374.
15. Callan, H.G., *Chromosomes and nucleoli of the axolotl, Ambystoma mexicanum*. J Cell Sci, 1966. **1**(1): p. 85-108.
16. Endo, T., S.V. Bryant, and D.M. Gardiner, *A stepwise model system for limb regeneration*. Dev Biol, 2004. **270**(1): p. 135-45.
17. Nye, H.L., et al., *Regeneration of the urodele limb: a review*. Dev Dyn, 2003. **226**(2): p. 280-94.
18. Lo, D.C., F. Allen, and J.P. Brockes, *Reversal of muscle differentiation during urodele limb regeneration*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(15): p. 7230-4.
19. Chernoff, E.A., et al., *Urodele spinal cord regeneration and related processes*. Dev Dyn, 2003. **226**(2): p. 295-307.
20. Echeverri, K. and E.M. Tanaka, *Electroporation as a tool to study in vivo spinal cord regeneration*. Dev Dyn, 2003. **226**(2): p. 418-25.
21. Butler, E.G. and M.B. Ward, *Reconstitution of the spinal cord following ablation in urodele larvae*. J Exp Zool, 1965. **160**(1): p. 47-65.

22. Brockes, J.P., *Amphibian limb regeneration: rebuilding a complex structure*. Science, 1997. **276**(5309): p. 81-7.
23. Wolpert, L., *Regeneration*, in *Principles of Development*. 2001, Oxford University Press: New York. p. 526.
24. Illingworth, C.M., *Trapped fingers and amputated finger tips in children*. J Pediatr Surg, 1974. **9**(6): p. 853-58.
25. Caruelle, J.P., P. Cassier, and J. Houdry, *La Régénération*, ed. S.B. Sup. 2000, Belin: Belin. 224.
26. Gardiner, D.M., M.R. Carlson, and S. Roy, *Towards a functional analysis of limb regeneration*. Semin Cell Dev Biol, 1999. **10**(4): p. 385-93.
27. Gardiner, D.M., T. Endo, and S.V. Bryant, *The molecular basis of amphibian limb regeneration: integrating the old with the new*. Semin Cell Dev Biol, 2002. **13**(5): p. 345-52.
28. Repesh, L.A. and J.C. Oberpriller, *Scanning electron microscopy of epidermal cell migration in wound healing during limb regeneration in the adult newt, *Notophthalmus viridescens**. Am J Anat, 1978. **151**(4): p. 539-55.
29. Bryant, S.V., D. Fyfe, and M. Singer, *The effects of denervation on the ultrastructure of young limb regenerates in the newt, *Triturus**. Dev Biol, 1971. **24**(4): p. 577-95.
30. Schotte, O.E. and E.G. Butler, *Phases in regeneration of urodele limb and their dependence upon the nervous system*. Journal of Experimental Zoology, 1944. **97**: p. 98-121.
31. Wallace, H., *Vertebrate Limb Regeneration*. 1981: A Wiley-Interscience Publication. 277.
32. Schotte, O.E. and M. Harland, *Effects of denervation and amputation of hindlimbs in anuran tadpoles*. Journal of Experimental Zoology, 1943. **93**: p. 453-493.
33. Schotte, O.E. and E.G. Butler, *Morphological effects of denervation and amputation of limbs in urodele larvae*. Journal of Experimental Zoology, 1941. **87**: p. 279-322.
34. Butler, E.G. and O.E. Schotte, *Histological alteration in denervated non-regenerating limbs of urodele larvae*. Journal of Experimental Zoology, 1941. **88**: p. 307-341.
35. Grim, M. and B.M. Carlson, *The formation of muscles in regenerating limbs of the newt after denervation of the blastema*. J Embryol Exp Morphol, 1979. **54**: p. 99-111.
36. Roy, S. and M. Levesque, *Limb Regeneration in Axolotl : Is It Superhealing ?* TSW Developmental & Embryology, 2006. **1**(S1): p. 12-25.
37. Eguchi, G. and K. Watanabe, *Elicitation of lens formation from the "ventral iris" epithelium of the newt by a carcinogen, *N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine**. J Embryol Exp Morphol, 1973. **30**(1): p. 63-71.
38. Brockes, J.P., *Regeneration and cancer*. Biochim Biophys Acta, 1998. **1377**(1): p. M1-11.
39. Robinson, H. and K. Allenby, *The effect of nerve growth factor on hindlimb regeneration in *Xenopus laevis* froglets*. J Exp Zool, 1974. **189**(2): p. 215-26.
40. Dent, J.N., *Limb regeneration in larvae and metamorphosing individuals of the South African clawed toad*. J Morphol, 1962. **110**: p. 61-77.

41. Overton, J., *Patterns of Limb Regeneration in Xenopus Laevis*. J Exp Zool, 1963. **154**: p. 153-61.
42. Rzehak, K. and M. Singer, *Limb regeneration and nerve fiber number in Rana sylvatica and Xenopus laevis*. J Exp Zool, 1966. **162**(1): p. 15-21.
43. Harshbarger, J.C., et al., *Cutaneous mastocytomas in the neotenic caudate amphibians Ambystoma mexicanum (axolotl) and Ambystoma tigrinum (tiger salamander)*. J Cancer Res Clin Oncol, 1999. **125**(3-4): p. 187-92.
44. Alberts, B., et al., *Molecular Biology of the cell*. 2000, New York: Garland Publishing. 1294.
45. Waddington, C.H., *Cancer and the theory of organizers*. Nature Lond., 1935. **135**: p. 606-608.
46. Waddington, C.H., *Studies on the Nature of the Amphibian Organization Centre, III The Activation of the Evocator*. Proc. Roy. Soc., 1936. **120**: p. 173-198.
47. Waddington, C.H., *Studies on the Nature of the Amphibian Organization Centre, IV Further Experiments on the Chemistry of the Evocator*. Proc. Roy. Soc., 1936. **120**: p. 199-207.
48. Waddington, C.H. and T. Yao, *Studies on regional specificity within the organization centre of urodeles*. J Exp Biol, 1950. **27**(2): p. 126-44.
49. Needham, J., *New advances in the chemistry and biology of organized growth*. Proc Roy. Soc. B., 1936. **29**: p. 1577-1626.
50. Schlumberger, H., *Tumors of fishes, amphibians and reptiles*. Cancer Research, 1948(8): p. 657-754.
51. Tsikolia, N., *The role and limits of a gradient based explanation of morphogenesis: a theoretical consideration*. Int J Dev Biol, 2006. **50**(2-3): p. 333-40.
52. Gilbert, S.F., J.M. Opitz, and R.A. Raff, *Resynthesizing evolutionary and developmental biology*. Dev Biol, 1996. **173**(2): p. 357-72.
53. Tsonis, P.A. and K. Del Rio-Tsonis, *Spontaneous neoplasms in amphibia*. Tumour Biol, 1988. **9**(4): p. 221-4.
54. Balls, M., *Spontaneous neoplasms in Amphibia: a review and descriptions of six new cases*. Cancer Res, 1962. **22**: p. 1142-54.
55. Balls, M. and R.H. Clothier, *Spontaneous tumours in amphibia. A review*. Oncology, 1974. **29**(6): p. 501-19.
56. Tsonis, P.A., *Effects of carcinogens on regenerating and non-regenerating limbs in amphibia (review)*. Anticancer Res, 1983. **3**(3): p. 195-202.
57. Breedis, C., *Induction of accessory limbs and of sarcoma in the Newt (Triturus viridescens) with carcinogenic substances*. Cancer Res, 1952. **12**(12): p. 861-6.
58. Robinson, M., et al., *Carcinogenic effects in A/J mice of particulate of a coal tar paint used in potable water systems*. Cancer Lett, 1987. **34**(1): p. 49-54.
59. Butler, E.G. and H.F. Blum, *Regenerative growth in the urodele forelimb following ultraviolet radiation*. J Natl Cancer Inst, 1955. **15**(4): p. 877-89.
60. Tsonis, P.A. and G. Eguchi, *Carcinogens on regeneration. Effects of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine and 4-nitroquinoline-1-oxide on limb regeneration in adult newts*. Differentiation, 1981. **20**(1): p. 52-60.
61. Ar Ffmann, E. and B.C. Christensen, *Studies on the newt test for carcinogenicity. I. Benzo[a]pyrene, dibenz[a,h] anthracene and 3-methylcholanthrene*. Acta Pathol Microbiol Scand, 1961. **52**: p. 330-42.

62. Seilern-Aspang, F. and K. Kratochwil, *Induction and differentiation of an epithelial tumour in the newt (Triturus cristatus)*. J Embryol Exp Morphol, 1962. **10**: p. 337-56.
63. Ingram, A.J., *The reactions to carcinogens in the axolotl (Ambystoma mexicanum) in relation to the "regeneration field control" hypothesis*. J Embryol Exp Morphol, 1971. **26**(3): p. 425-41.
64. Vousden, K.H., *Activation of the p53 tumor suppressor protein*. Biochim Biophys Acta, 2002. **1602**(1): p. 47-59.
65. Okamoto, M., *Simultaneous demonstration of lens regeneration from dorsal iris and tumour production from ventral iris in the same newt eye after carcinogen administration*. Differentiation, 1997. **61**(5): p. 285-92.
66. Outzen, H.C., R.P. Custer, and R.T. Prehn, *Influence of regenerative capacity and innervation on oncogenesis in the adult frog (Rana pipiens)*. J Natl Cancer Inst, 1976. **57**(1): p. 79-84.
67. Ketkar, M., G. Reznik, and U. Green, *Carcinogenic effect of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) in European hamsters*. Cancer Lett, 1978. **4**(4): p. 241-4.
68. Dutra, F.R. and E.J. Largent, *Osteosarcoma induced by beryllium oxide*. Am J Pathol, 1950. **26**(2): p. 197-209.
69. Vogelstein, B., D. Lane, and A.J. Levine, *Surfing the p53 network*. Nature, 2000. **408**(6810): p. 307-10.
70. Vousden, K.H. and X. Lu, *Live or let die: the cell's response to p53*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(8): p. 594-604.
71. Wang, J., et al., *Loss of tumor suppressor p53 decreases PTEN expression and enhances signaling pathways leading to activation of activator protein 1 and nuclear factor kappaB induced by UV radiation*. Cancer Res, 2005. **65**(15): p. 6601-11.
72. Lane, D.P. and L.V. Crawford, *T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells*. Nature, 1979. **278**(5701): p. 261-3.
73. Linzer, D.I. and A.J. Levine, *Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells*. Cell, 1979. **17**(1): p. 43-52.
74. Eliyahu, D., et al., *Participation of p53 cellular tumour antigen in transformation of normal embryonic cells*. Nature, 1984. **312**(5995): p. 646-9.
75. Parada, L.F., et al., *Cooperation between gene encoding p53 tumour antigen and ras in cellular transformation*. Nature, 1984. **312**(5995): p. 649-51.
76. Hinds, P., C. Finlay, and A.J. Levine, *Mutation is required to activate the p53 gene for cooperation with the ras oncogene and transformation*. J Virol, 1989. **63**(2): p. 739-46.
77. Hollstein, M., et al., *p53 mutations in human cancers*. Science, 1991. **253**(5015): p. 49-53.
78. Finlay, C.A., P.W. Hinds, and A.J. Levine, *The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation*. Cell, 1989. **57**(7): p. 1083-93.
79. Srivastava, S., et al., *Germ-line transmission of a mutated p53 gene in a cancer-prone family with Li-Fraumeni syndrome*. Nature, 1990. **348**(6303): p. 747-9.
80. Malkin, D., et al., *Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms*. Science, 1990. **250**(4985): p. 1233-8.

81. Donehower, L.A., et al., *Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours*. Nature, 1992. **356**(6366): p. 215-21.
82. Levrero, M., et al., *The p53/p63/p73 family of transcription factors: overlapping and distinct functions*. J Cell Sci, 2000. **113** (Pt 10): p. 1661-70.
83. Melino, G., et al., *Functional regulation of p73 and p63: development and cancer*. Trends Biochem Sci, 2003. **28**(12): p. 663-70.
84. Yang, A. and F. McKeon, *P63 and P73: P53 mimics, menaces and more*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2000. **1**(3): p. 199-207.
85. De Laurenzi, V., et al., *Two new p73 splice variants, gamma and delta, with different transcriptional activity*. J Exp Med, 1998. **188**(9): p. 1763-8.
86. De Laurenzi, V.D., et al., *Additional complexity in p73: induction by mitogens in lymphoid cells and identification of two new splicing variants epsilon and zeta*. Cell Death Differ, 1999. **6**(5): p. 389-90.
87. Irwin, M.S. and W.G. Kaelin, *p53 family update: p73 and p63 develop their own identities*. Cell Growth Differ, 2001. **12**(7): p. 337-49.
88. Soussi, T., C. Caron de Fromentel, and P. May, *Structural aspects of the p53 protein in relation to gene evolution*. Oncogene, 1990. **5**(7): p. 945-52.
89. Veprintsev, D.B., et al., *Core domain interactions in full-length p53 in solution*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(7): p. 2115-9.
90. Dawson, R., et al., *The N-terminal domain of p53 is natively unfolded*. J Mol Biol, 2003. **332**(5): p. 1131-41.
91. Fields, S. and S.K. Jang, *Presence of a potent transcription activating sequence in the p53 protein*. Science, 1990. **249**(4972): p. 1046-9.
92. Kussie, P.H., et al., *Structure of the MDM2 oncoprotein bound to the p53 tumor suppressor transactivation domain*. Science, 1996. **274**(5289): p. 948-53.
93. Walker, K.K. and A.J. Levine, *Identification of a novel p53 functional domain that is necessary for efficient growth suppression*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(26): p. 15335-40.
94. Venot, C., et al., *The requirement for the p53 proline-rich functional domain for mediation of apoptosis is correlated with specific PIG3 gene transactivation and with transcriptional repression*. Embo J, 1998. **17**(16): p. 4668-79.
95. Cho, Y., et al., *Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: understanding tumorigenic mutations*. Science, 1994. **265**(5170): p. 346-55.
96. Chene, P. and E. Bechter, *p53 mutants without a functional tetramerisation domain are not oncogenic*. J Mol Biol, 1999. **286**(5): p. 1269-74.
97. Donehower, L.A. and A. Bradley, *The tumor suppressor p53*. Biochim Biophys Acta, 1993. **1155**(2): p. 181-205.
98. Clore, G.M., et al., *Interhelical angles in the solution structure of the oligomerization domain of p53: correction*. Science, 1995. **267**(5203): p. 1515-6.
99. Ahn, J. and C. Prives, *The C-terminus of p53: the more you learn the less you know*. Nat Struct Biol, 2001. **8**(9): p. 730-2.
100. Michael, D. and M. Oren, *The p53-Mdm2 module and the ubiquitin system*. Semin Cancer Biol, 2003. **13**(1): p. 49-58.
101. Wang, Y., et al., *Xenopus laevis p53 protein: sequence-specific DNA binding, transcriptional regulation and oligomerization are evolutionarily conserved*. Oncogene, 1995. **10**(4): p. 779-84.

102. Liang, S.H. and M.F. Clarke, *Regulation of p53 localization*. Eur J Biochem, 2001. **268**(10): p. 2779-83.
103. Moll, U.M., et al., *Cytoplasmic sequestration of wild-type p53 protein impairs the G1 checkpoint after DNA damage*. Mol Cell Biol, 1996. **16**(3): p. 1126-37.
104. Ryan, J.J., et al., *c-myc and bcl-2 modulate p53 function by altering p53 subcellular trafficking during the cell cycle*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(13): p. 5878-82.
105. Giaccia, A.J. and M.B. Kastan, *The complexity of p53 modulation: emerging patterns from divergent signals*. Genes Dev, 1998. **12**(19): p. 2973-83.
106. Prives, C. and P.A. Hall, *The p53 pathway*. J Pathol, 1999. **187**(1): p. 112-26.
107. Meek, D.W., *Mechanisms of switching on p53: a role for covalent modification?* Oncogene, 1999. **18**(53): p. 7666-75.
108. Marine, J.C. and A.G. Jochemsen, *Mdmx as an essential regulator of p53 activity*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. **331**(3): p. 750-60.
109. Shmueli, A. and M. Oren, *Regulation of p53 by Mdm2: fate is in the numbers*. Mol Cell, 2004. **13**(1): p. 4-5.
110. Oren, M., *Decision making by p53: life, death and cancer*. Cell Death Differ, 2003. **10**(4): p. 431-42.
111. Li, M., et al., *Mono- versus polyubiquitination: differential control of p53 fate by Mdm2*. Science, 2003. **302**(5652): p. 1972-5.
112. Stad, R., et al., *Hdmx stabilizes Mdm2 and p53*. J Biol Chem, 2000. **275**(36): p. 28039-44.
113. Sharp, D.A., et al., *Stabilization of the MDM2 oncoprotein by interaction with the structurally related MDMX protein*. J Biol Chem, 1999. **274**(53): p. 38189-96.
114. Chehab, N.H., et al., *Chk2/hCds1 functions as a DNA damage checkpoint in G(1) by stabilizing p53*. Genes Dev, 2000. **14**(3): p. 278-88.
115. Shieh, S.Y., et al., *The human homologs of checkpoint kinases Chk1 and Cds1 (Chk2) phosphorylate p53 at multiple DNA damage-inducible sites*. Genes Dev, 2000. **14**(3): p. 289-300.
116. Chen, L., et al., *ATM and Chk2-dependent phosphorylation of MDMX contribute to p53 activation after DNA damage*. Embo J, 2005. **24**(19): p. 3411-22.
117. Lohrum, M. and K.H. Scheidtmann, *Differential effects of phosphorylation of rat p53 on transactivation of promoters derived from different p53 responsive genes*. Oncogene, 1996. **13**(12): p. 2527-39.
118. Sherr, C.J. and J.D. Weber, *The ARF/p53 pathway*. Curr Opin Genet Dev, 2000. **10**(1): p. 94-9.
119. Weber, J.D., et al., *Cooperative signals governing ARF-mdm2 interaction and nucleolar localization of the complex*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(7): p. 2517-28.
120. Hammond, E.M., M.J. Dorie, and A.J. Giaccia, *ATR/ATM targets are phosphorylated by ATR in response to hypoxia and ATM in response to reoxygenation*. J Biol Chem, 2003. **278**(14): p. 12207-13.
121. Ryu, S.W., et al., *Downregulation of protein kinase CKII is associated with cellular senescence*. FEBS Lett, 2006. **580**(3): p. 988-94.
122. Venkatachalam, S., et al., *Retention of wild-type p53 in tumors from p53 heterozygous mice: reduction of p53 dosage can promote cancer formation*. Embo J, 1998. **17**(16): p. 4657-67.

123. Lee, M.H. and G. Lozano, *Regulation of the p53-MDM2 pathway by 14-3-3 sigma and other proteins*. *Semin Cancer Biol*, 2006. **16**(3): p. 225-34.
124. de Laat, W.L., N.G. Jaspers, and J.H. Hoeijmakers, *Molecular mechanism of nucleotide excision repair*. *Genes Dev*, 1999. **13**(7): p. 768-85.
125. Ishikawa, T., et al., *DNA repair and cancer: lessons from mutant mouse models*. *Cancer Sci*, 2004. **95**(2): p. 112-7.
126. Therrien, J.P., et al., *Human cells compromised for p53 function exhibit defective global and transcription-coupled nucleotide excision repair, whereas cells compromised for pRb function are defective only in global repair*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. **96**(26): p. 15038-43.
127. Nakamura, Y., *Isolation of p53-target genes and their functional analysis*. *Cancer Sci*, 2004. **95**(1): p. 7-11.
128. Ashur-Fabian, O., et al., *Evolution of p53 in hypoxia-stressed Spalax mimics human tumor mutation*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. **101**(33): p. 12236-41.
129. Kannan, K., et al., *DNA microarray analysis of genes involved in p53 mediated apoptosis: activation of Apaf-1*. *Oncogene*, 2001. **20**(26): p. 3449-55.
130. Itahana, K., G. Dimri, and J. Campisi, *Regulation of cellular senescence by p53*. *Eur J Biochem*, 2001. **268**(10): p. 2784-91.
131. Lane, D.P., *Cancer. p53, guardian of the genome*. *Nature*, 1992. **358**(6381): p. 15-6.
132. Saito, S., et al., *Phosphorylation site interdependence of human p53 post-translational modifications in response to stress*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(39): p. 37536-44.
133. Chehab, N.H., et al., *Phosphorylation of Ser-20 mediates stabilization of human p53 in response to DNA damage*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. **96**(24): p. 13777-82.
134. Shieh, S.Y., et al., *DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2*. *Cell*, 1997. **91**(3): p. 325-34.
135. Sakaguchi, K., et al., *Phosphorylation of serine 392 stabilizes the tetramer formation of tumor suppressor protein p53*. *Biochemistry*, 1997. **36**(33): p. 10117-24.
136. Li, M., et al., *Acetylation of p53 inhibits its ubiquitination by Mdm2*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(52): p. 50607-11.
137. Hao, M., et al., *Mutation of phosphoserine 389 affects p53 function in vivo*. *J Biol Chem*, 1996. **271**(46): p. 29380-5.
138. Gervin, C.M., et al., *Dysfunction of p53 in photocarcinogenesis*. *Front Biosci*, 2003. **8**: p. s715-7.
139. Levine, A.J., J. Momand, and C.A. Finlay, *The p53 tumour suppressor gene*. *Nature*, 1991. **351**(6326): p. 453-6.
140. Ory, K., et al., *Analysis of the most representative tumour-derived p53 mutants reveals that changes in protein conformation are not correlated with loss of transactivation or inhibition of cell proliferation*. *Embo J*, 1994. **13**(15): p. 3496-504.
141. Bensaad, K., D. Rouillard, and T. Soussi, *Regulation of the cell cycle by p53 after DNA damage in an amphibian cell line*. *Oncogene*, 2001. **20**(29): p. 3766-75.
142. Momand, J., H.H. Wu, and G. Dasgupta, *MDM2--master regulator of the p53 tumor suppressor protein*. *Gene*, 2000. **242**(1-2): p. 15-29.

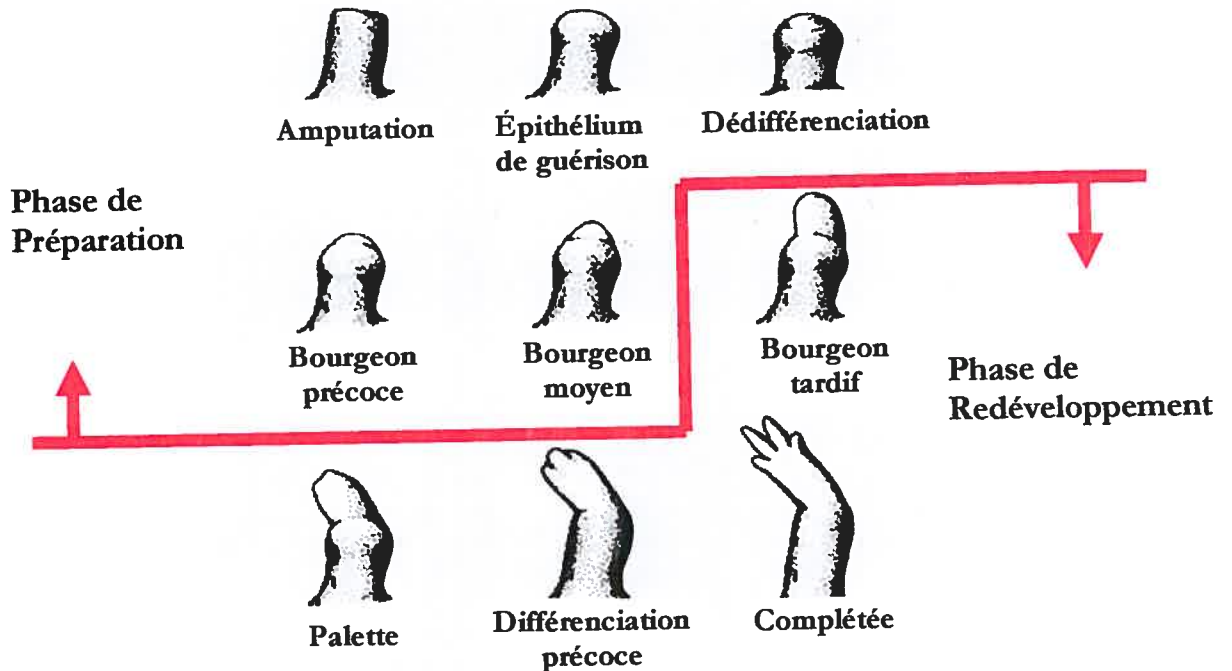
143. Soengas, M.S., et al., *Apaf-1 and caspase-9 in p53-dependent apoptosis and tumor inhibition*. Science, 1999. **284**(5411): p. 156-9.
144. Lu, W.J. and J.M. Abrams, *Lessons from p53 in non-mammalian models*. Cell Death Differ, 2006. **13**(6): p. 909-12.
145. Soussi, T., et al., *Cloning and characterization of a cDNA from Xenopus laevis coding for a protein homologous to human and murine p53*. Oncogene, 1987. **1**(1): p. 71-8.
146. Marechal, V., et al., *Conservation of structural domains and biochemical activities of the MDM2 protein from Xenopus laevis*. Oncogene, 1997. **14**(12): p. 1427-33.
147. Bessard, A.C., et al., *Regulation of the specific DNA binding activity of Xenopus laevis p53: evidence for conserved regulation through the carboxy-terminus of the protein*. Oncogene, 1998. **16**(7): p. 883-90.
148. Soussi, T., et al., *Evolutionary conservation of the biochemical properties of p53: specific interaction of Xenopus laevis p53 with simian virus 40 large T antigen and mammalian heat shock proteins 70*. J Virol, 1989. **63**(9): p. 3894-901.
149. Ridgway, P.J., T. Soussi, and A.W. Braithwaite, *Functional characterization of Xenopus laevis p53: evidence of temperature-sensitive transactivation but not of repression*. J Virol, 1994. **68**(11): p. 7178-87.
150. Sansom, O.J. and A.R. Clarke, *P53 null mice: damaging the hypothesis?* Mutat Res, 2000. **452**(2): p. 149-62.
151. Tyner, S.D., et al., *p53 mutant mice that display early ageing-associated phenotypes*. Nature, 2002. **415**(6867): p. 45-53.
152. Lozano, G. and G. Liu, *Mouse models dissect the role of p53 in cancer and development*. Semin Cancer Biol, 1998. **8**(5): p. 337-44.
153. Wallingford, J.B., et al., *p53 activity is essential for normal development in Xenopus*. Curr Biol, 1997. **7**(10): p. 747-57.
154. Wahrman, J., R. Goitein, and E. Nevo, *Mole rat Spalax: evolutionary significance of chromosome variation*. Science, 1969. **164**(875): p. 82-4.
155. Royds, J.A., et al., *Response of tumour cells to hypoxia: role of p53 and NFkB*. Mol Pathol, 1998. **51**(2): p. 55-61.
156. Mescher, A.L., G.W. White, and J.J. Brokaw, *Apoptosis in regenerating and denervated, nonregenerating urodele forelimbs*. Wound Repair Regen, 2000. **8**(2): p. 110-6.
157. Vlaskalin, T., C.J. Wong, and C. Tsilfidis, *Growth and apoptosis during larval forelimb development and adult forelimb regeneration in the newt (Notophthalmus viridescens)*. Dev Genes Evol, 2004. **214**(9): p. 423-31.
158. Zuzarte-Luis, V. and J.M. Hurlle, *Programmed cell death in the embryonic vertebrate limb*. Semin Cell Dev Biol, 2005. **16**(2): p. 261-9.
159. Cameron, J.A. and J.F. Fallon, *The absence of cell death during development of free digits in amphibians*. Dev Biol, 1977. **55**(2): p. 331-8.
160. Nye, H.L., et al., *Extending the table of stages of normal development of the axolotl: limb development*. Dev Dyn, 2003. **226**(3): p. 555-60.
161. Tank, P.W., B.M. Carlson, and T.G. Connelly, *A staging system for forelimb regeneration in the axolotl, Ambystoma mexicanum*. J Morphol, 1976. **150**(1): p. 117-28.

162. Wells, B.S., E. Yoshida, and L.A. Johnston, *Compensatory proliferation in Drosophila imaginal discs requires Dronc-dependent p53 activity*. *Curr Biol*, 2006. **16**(16): p. 1606-15.
163. Baehrecke, E.H., *Growth control: p53, the guardian angel of compensatory proliferation*. *Curr Biol*, 2006. **16**(19): p. R840-2.
164. Di Giovanni, S., et al., *The tumor suppressor protein p53 is required for neurite outgrowth and axon regeneration*. *Embo J*, 2006. **25**(17): p. 4084-96.
165. Takebayashi-Suzuki, K., et al., *Interplay between the tumor suppressor p53 and TGF beta signaling shapes embryonic body axes in Xenopus*. *Development*, 2003. **130**(17): p. 3929-39.
166. Vinarsky, V., et al., *Normal newt limb regeneration requires matrix metalloproteinase function*. *Dev Biol*, 2005. **279**(1): p. 86-98.
167. Strosznajder, R.P., et al., *Effects of p53 inhibitor on survival and death of cells subjected to oxidative stress*. *J Physiol Pharmacol*, 2005. **56 Suppl 4**: p. 215-21.
168. Komarov, P.G., et al., *A chemical inhibitor of p53 that protects mice from the side effects of cancer therapy*. *Science*, 1999. **285**(5434): p. 1733-7.
169. Fraser, M., et al., *Regulation of p53 and suppression of apoptosis by the soluble guanylyl cyclase/cGMP pathway in human ovarian cancer cells*. *Oncogene*, 2006. **25**(15): p. 2203-12.
170. Ryan, K.M. and K.H. Vousden, *Characterization of structural p53 mutants which show selective defects in apoptosis but not cell cycle arrest*. *Mol Cell Biol*, 1998. **18**(7): p. 3692-8.
171. Liu, G., et al., *Chromosome stability, in the absence of apoptosis, is critical for suppression of tumorigenesis in Trp53 mutant mice*. *Nat Genet*, 2004. **36**(1): p. 63-8.
172. Friedlander, P., et al., *Regulation of mutant p53 temperature-sensitive DNA binding*. *J Biol Chem*, 1996. **271**(41): p. 25468-78.
173. Avivi, A., et al., *P53 in blind subterranean mole rats - loss-of-function versus gain-of-function activities on newly cloned Spalax target genes*. *Oncogene*, 2006.
174. Chang, R., *Physical Chemistry with Applications to Biological Systems second edition*. 1981, United States of America: Macmillan Publishing Co. Inc.
175. Geiser, F., *Metabolic rate and body temperature reduction during hibernation and daily torpor*. *Annu Rev Physiol*, 2004. **66**: p. 239-74.
176. Goldman, B.D., et al., *Circadian patterns of locomotor activity and body temperature in blind mole-rats, Spalax ehrenbergi*. *J Biol Rhythms*, 1997. **12**(4): p. 348-61.
177. Shanas, U. and J. Terkel, *Grooming secretions and seasonal adaptations in the blind mole rat (Spalax ehrenbergi)*. *Physiol Behav*, 1996. **60**(2): p. 653-6.
178. Bauer, J.H., et al., *Neuronal expression of p53 dominant-negative proteins in adult Drosophila melanogaster extends life span*. *Curr Biol*, 2005. **15**(22): p. 2063-8.
179. Nelson, W.G. and M.B. Kastan, *DNA strand breaks: the DNA template alterations that trigger p53-dependent DNA damage response pathways*. *Mol Cell Biol*, 1994. **14**(3): p. 1815-23.
180. Parra, M., et al., *p53 Phosphorylation at serine 15 is required for transcriptional induction of the plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) gene by the alkylating*

- agent N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine*. J Biol Chem, 2001. **276**(39): p. 36303-10.
181. Appella, E. and C.W. Anderson, *Post-translational modifications and activation of p53 by genotoxic stresses*. Eur J Biochem, 2001. **268**(10): p. 2764-72.
 182. Komarova, E.A., et al., *p53 is a suppressor of inflammatory response in mice*. Faseb J, 2005. **19**(8): p. 1030-2.
 183. Sobkow, L., et al., *A germline GFP transgenic axolotl and its use to track cell fate: dual origin of the fin mesenchyme during development and the fate of blood cells during regeneration*. Dev Biol, 2006. **290**(2): p. 386-97.
 184. Page, R.B., et al., *Microarray analysis identifies keratin loci as sensitive biomarkers for thyroid hormone disruption in the salamander Ambystoma mexicanum*. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol, 2006.
 185. Habermann, B., et al., *An Ambystoma mexicanum EST sequencing project: analysis of 17,352 expressed sequence tags from embryonic and regenerating blastema cDNA libraries*. Genome Biol, 2004. **5**(9): p. R67.

Annexe I : Stade de régénération

Stades de régénération du membre



Tank, 1976¹⁵⁸

La phase de préparation est dépendante de l'innervation : si la patte est dénervé, la régénération est inhibée. La phase de redéveloppement est indépendante de l'innervation : si la patte est dénervée durant cette phase, la régénération se complète.

Annexe II : Vecteur pCR[®]4-TOPO

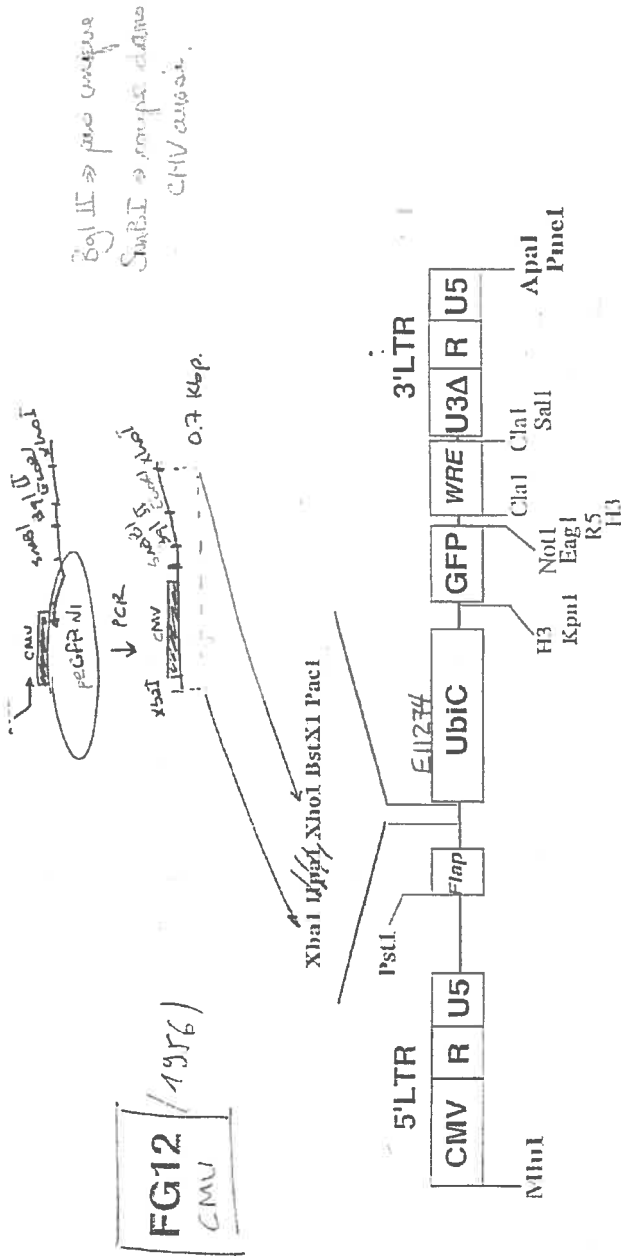
	LacZα reporter codes				Cloning sites			
303	CACTGCTGAGG	CACTGCTGAGG	CACTGCTGAGG	CACTGCTGAGG	CACTGCTGAGG	CACTGCTGAGG	CACTGCTGAGG	CACTGCTGAGG
304	CACTGCTGAGG	CACTGCTGAGG	CACTGCTGAGG	CACTGCTGAGG	CACTGCTGAGG	CACTGCTGAGG	CACTGCTGAGG	CACTGCTGAGG
305	CACTGCTGAGG	CACTGCTGAGG	CACTGCTGAGG	CACTGCTGAGG	CACTGCTGAGG	CACTGCTGAGG	CACTGCTGAGG	CACTGCTGAGG
306	CACTGCTGAGG	CACTGCTGAGG	CACTGCTGAGG	CACTGCTGAGG	CACTGCTGAGG	CACTGCTGAGG	CACTGCTGAGG	CACTGCTGAGG
307	CACTGCTGAGG	CACTGCTGAGG	CACTGCTGAGG	CACTGCTGAGG	CACTGCTGAGG	CACTGCTGAGG	CACTGCTGAGG	CACTGCTGAGG
308	CACTGCTGAGG	CACTGCTGAGG	CACTGCTGAGG	CACTGCTGAGG	CACTGCTGAGG	CACTGCTGAGG	CACTGCTGAGG	CACTGCTGAGG
309	CACTGCTGAGG	CACTGCTGAGG	CACTGCTGAGG	CACTGCTGAGG	CACTGCTGAGG	CACTGCTGAGG	CACTGCTGAGG	CACTGCTGAGG
310	CACTGCTGAGG	CACTGCTGAGG	CACTGCTGAGG	CACTGCTGAGG	CACTGCTGAGG	CACTGCTGAGG	CACTGCTGAGG	CACTGCTGAGG
311	CACTGCTGAGG	CACTGCTGAGG	CACTGCTGAGG	CACTGCTGAGG	CACTGCTGAGG	CACTGCTGAGG	CACTGCTGAGG	CACTGCTGAGG



Comments for pCR[®]4-TOPO[®] 3956 nucleotides

- ori (pMB1) region: bases 2-216
- ori (pUC) region: bases 269-395
- HHV polymerase landing site: bases 132-178
- Lac repressor landing site: bases 179-189
- Start of transcription: base 179
- M13 forward (+SD) priming site: bases 204-221
- LacZα-coding gene fusion: bases 217-810
- LacZα portion of fusion: bases 217-497
- configuration of LacZα: bases 528-810
- T3 priming site: bases 242-262
- TOPO[®] cloning site: bases 261-265
- T7 priming site: bases 232-247
- M13 forward (+SD) priming site: bases 323-370
- Kanamycin promoter: bases 1051-1070
- Kanamycin resistance gene: bases 1159-1850
- Ampicillin (bla) resistance gene: bases 2503-3993 (cc)
- Ampicillin (bla) promoter: bases 3094-3180 (cc)
- pUC origin: bases 3161-3684
- (c) = complementary strand

Annexe III : Vecteur FG12/CMV



Plasmid name: FG12
Plasmid size: ~10 kb
Constructed by: Xiao-Feng Qin/Baltimore Lab
Construction date: 6/02
Comments: Derived from FUGW (Lois, et al., Science 259, 868, 2002) with multiple cloning sites been rearranged. Unique sites are in bold.
Reference: Qin, et al, PNAS, 100, 183-188, 2002

Modified by C. Denoyelle (Soengas' Lab, Univ. Michigan)

PLEASE DO NOT DISTRIBUTE WITHOUT PERMISSION.

