



**HAL**  
open science

# Développement d'un biosenseur fluorescent d'un mutant de p53 sujet à l'agrégation dans les cancers

Morgan Pellerano

► **To cite this version:**

Morgan Pellerano. Développement d'un biosenseur fluorescent d'un mutant de p53 sujet à l'agrégation dans les cancers. Cancer. Université Montpellier, 2019. Français. NNT : 2019MONTT053 . tel-02479578

**HAL Id: tel-02479578**

**<https://theses.hal.science/tel-02479578>**

Submitted on 14 Feb 2020

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

# THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En Biologie Santé

École doctorale : Science Chimique et Biologique pour la Santé CBS2

Unité de recherche : Institut des Biomolécules Max Mousseron

## DÉVELOPPEMENT D'UN BIOSENSEUR FLUORESCENT D'UN MUTANT DE p53 SUJET À L'AGRÉGATION DANS LES CANCERS

Présentée par MORGAN PELLERANO

Le 26 Novembre 2019

Sous la direction du Dr May C. Morris

Devant le jury composé de

Madame May C. MORRIS, DR2, IBMM, UMR5247 CNRS

Monsieur Loïc BLUM, Professeur, ICBMS Université de Lyon 1

Madame Marie ERARD, Professeur, LCP Université Paris Sud

Monsieur Pierre ROUX, DR2 INSERM, UMR5237 CNRS

Directrice de thèse

Rapporteur

Rapporteur

Président du jury



UNIVERSITÉ  
DE MONTPELLIER



# Remerciements

J'aimerais remercier le Professeur Pascal Dumy de m'avoir accueilli au sein de l'IBMM.

Je remercie le Professeur Marie Erard et le Professeur Loïc Blum de m'avoir fait l'honneur d'accepter d'évaluer mon travail de thèse.

Je remercie également le Dr Pierre Roux d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Je remercie chaleureusement ma directrice de thèse, le Dr May C. Morris. Merci de ta confiance depuis le tout début et de m'avoir donné l'opportunité d'évoluer au sein de l'équipe jusqu'à pouvoir faire un doctorat d'apprendre la biologie. Merci de me faire profiter de ton expertise scientifique, merci pour tous tes conseils, ton soutien et ton écoute. Depuis le premier jour je ne cesse d'apprendre et à tes cotés.

Je tiens à remercier le Dr Florence Mahuteau-Bezter pour sa présence lors de mes comités de suivis de thèse mais aussi pour toute son expertise en chimie des sondes et en fluorescence.

Depuis maintenant 12 ans (déjà !!) que je suis dans l'équipe de May, d'abord au CRBM (ancien bâtiment, puis nouveau bâtiment) et maintenant à l'IBMM, j'ai pu croiser de nombreuses personnes dans l'équipe. De Jérôme et son futoir organisé, en passant par Laëtitia avec qui j'ai pu faire mes gammes d'ingénieurs et faire le 1er déménagement de laboratoire, Ngoc (et sa fille) dont les rouleaux de printemps n'ont rien à envier aux plus grands restaurants, Camille avec qui la mise en place du crible fut une grande aventure (tout comme le 2ème déménagement, vers l'IBMM) qui nous a valu des moments de frustration mais surtout beaucoup de bons moments, Marion et sa bonne humeur contagieuse, Carmen et son professionnalisme mais avec une zénitude absolue et un petit côté rêveuse, Juan-Antonio le roi des lanthanides et des sondes fluos en général autant supporter (voire plus) de foot et de son club Grenade que moi je le suis de Nîmes Olympique, puis les 2 derniers en date

Sébastien le toulousain et Arthur le monégasque (ou Tic et Tac pour les intimes) vous m'apprenez beaucoup sur les nouvelles technologies d'aujourd'hui (oui vous êtes des geeks) et merci pour vos chansons qui me restent dans la tête toute la journée. Je pense aussi à toutes les autres personnes qui sont passées par notre laboratoire et qui sont venues apprendre à nos côtés et à qui j'ai pris plaisir de transmettre ce que je savais.

Je remercie les personnes que j'ai croisées au CRBM, Monia, Naima, Karidia, Daouda, et toutes les autres dont le nom m'échappe mais avec qui j'ai beaucoup appris.

Je souhaite remercier la plateforme Synbio 3 présente à l'IBMM et plus particulièrement Pascal et Manon de m'avoir permis moi biologiste d'apprendre à synthétiser des peptides

Je souhaite remercier Bruno Maurel, le roi du bricolage, d'avoir toujours été là pour nous sauver de situations parfois un peu catastrophiques.

Je remercie les équipes de Marcel Garcia et de Jean-Louis Banères pour leur gentillesse et pour nous avoir si souvent dépannés en matériels ou produits.

J'aimerais remercier Jocelyne Gauthier, Muriel Fitoussi et Sylvie Corneille, pour leur aide administrative et leur réactivité.

Un grand merci à mes amis qui certes ne savent pas exactement quel est mon métier (j'avoue n'avoir jamais pris le temps de vous expliquer), et qui pensent que je vais pouvoir leur délivrer une ordonnance.

Enfin un grand merci à ma famille, mes grands-parents Ginette et Pierre décédés lors de mon doctorat mais dont je sais qu'ils étaient fiers de moi et cela n'a pas de prix, mon grand frère Grégory qui m'a montré qu'avec la « gnaque » on pouvait réussir et qu'il ne faut jamais baisser les bras, mon neveu Mathias qui me donne le sourire tous les jours et qui je suis sûr deviendra un très bon scientifique ou un youtubeur.

Et enfin un grand, énorme MERCI à ma mère sans qui je ne serais pas qui je suis maintenant, tu m'as appris la politesse, le respect et tellement d'autres choses que je ne peux les citer. Tu as tout fait pour que je puisse faire mes études dans les meilleures conditions, tu n'as jamais

été à l'encontre de mes envies, tu m'as toujours soutenu dans les bons mais aussi moins bons moment de notre vie. Ce travail et là ou j'en suis maintenant c'est en grande grâce à toi et pour toi.



2.2.	Mutations et cancer .....	28
2.2.1.	Contexte général .....	28
2.2.2.	Type de mutants .....	30
2.2.2.1.	Les mutants de contact .....	30
2.2.2.2.	Les mutants structuraux .....	31
2.2.3.	Agrégation des mutants .....	33
2.2.3.1.	Principe de l'agrégation de type amyloïde .....	34
2.2.3.2.	Agrégation de p53 et cancer .....	35
2.3.	Gain de fonction : Mécanisme.....	36
2.3.1.	Interaction avec p63 et p73.....	37
2.3.2.	Interaction avec les facteurs de transcription .....	38
2.3.3.	Interaction directe avec l'ADN.....	38
2.3.4.	Interaction avec d'autres partenaires protéiques.....	39
2.3.5.	Régulation des ARNmi .....	39
2.3.6.	Approches thérapeutiques pour restaurer les fonctions de p53.....	40
2.3.6.1.	Thérapie génique .....	41
2.3.6.2.	Réactivation des fonctions de p53 WT à l'aide de petites molécules .....	41
2.3.6.3.	Inactivation ou déstabilisation des p53 mutants à l'aide de petites molécules .....	42
2.3.6.4.	Réactivation des fonctions dans les formes mutantes .....	43
3.	Biocapteurs / Biosenseurs .....	45
3.1.	Définition d'un biocapteur / biosenseur .....	45
3.2.	Biosenseurs fluorescents .....	48



3.2.1.	Principes de la fluorescence .....	48
3.2.2.	Biosenseurs fluorescents génétiquement codés .....	51
3.2.3.	Biosenseurs peptidiques/protéiques fluorescents .....	54
3.3.	Biosenseurs fluorescents : outils pour le diagnostic et application biomédicale...	58
3.4.	Biocapteurs / Biosenseurs de p53 .....	60
Objectif.....		61
Résultats .....		63
1.	Conception et synthèse du biosenseur .....	64
1.1.	Conception .....	64
2.	Validation <i>In Vitro</i> .....	66
2.1.	Reconnaissance de la séquence d'agrégation .....	66
2.2.	Validation sur protéine recombinantes .....	67
2.2.1.	Purification des protéines recombinantes .....	67
2.2.2.	Titration de p254C avec les protéines recombinantes purifiées .....	68
2.2.3.	Optimisation de la réponse de p254C : Choix de la sonde.....	71
2.2.4.	Validation de la reconnaissance de la séquence d'agrégation sur protéines recombinantes .....	72
2.3.	Etude du comportement de p254C-TP2Rho en solution .....	74
2.3.1.	Calcul du rendement quantique $\phi$ de P254C-TP2Rho .....	74
2.3.2.	Etude de l'auto-agrégation possible de p254C-TP2Rho par spectrofluorimétrie .....	76
2.3.3.	Etude de la formation de Nanoparticules de P254C-TP2Rho .....	77
3.	Validation de p254C <i>In Extracto</i> .....	79
3.1.	Calcul de la quantité de p53 R248Q dans les PC9 .....	79

3.2.	Optimisation des conditions d'utilisation de P254C-TP2Rho .....	81
3.3.	Quantification sur extraits cellulaires .....	83
3.4.	Application pour déterminer si p53 R248Q est induit .....	84
4.	Application de P254C-TP2Rho sur cellules vivantes .....	85
4.1.	Internalisation cellulaire .....	85
4.1.1.	Optimisation des conditions d'internalisation.....	86
4.1.1.1.	Complexation avec Pep1 .....	86
4.1.1.2.	Temps de recouvrement .....	87
4.2.	Toxicité de P254C-TP2Rho .....	87
4.3.	Application de p254C-TP2Rho à la microscopie à fluorescence .....	88
	Discussion et perspectives .....	90
1.	Stratégie de conception du biosenseur .....	91
2.	Spécificité de p254C : Biosenseur de mutants de p53 sujets à l'agrégation.....	93
3.	Réponse et sensibilité du biosenseur.....	95
4.	Applications Biologiques .....	98
5.	Futures applications : Diagnostiques et thérapeutiques .....	100
	Matériels et Méthodes .....	102
1.	Conception, synthèse et marquage du biosenseur peptidique .....	103
2.	Production et purification de protéines recombinantes .....	105
2.1.	Préparation de <i>E. coli</i> BL21 DEA 3 compétentes .....	105
2.2.	Transformation bactérienne .....	105
2.3.	Induction des protéines recombinantes GST-p53 WT et GST-p53 R248Q.....	105
2.4.	Purification des protéines recombinantes GST-p53 WT et GST-p53 R248Q ....	106

2.5.	Induction de la protéine recombinante His-TAU .....	107
2.6.	Purification de la protéine recombinante His-TAU .....	107
3.	Biochimie .....	107
3.1.	Gels SDS-PAGE (SDS-polyacrylamide Gel Electrophoresis).....	107
3.2.	Western-Blot.....	108
4.	Expériences de titrations fluorescentes.....	110
4.1.	Interaction Peptide / peptide ou protéine / peptide .....	110
	Intéraction directe.....	110
4.2.	Thermo-dénaturation de protéines recombinantes.....	113
4.3.	Réponse fluorescente dans les extraits cellulaires.....	114
5.	Biologie cellulaire.....	114
5.1.	Lignée cellulaire et milieu de culture .....	114
5.2.	Préparation des extraits cellulaires .....	115
5.3.	Traitement des cellules .....	116
5.4.	Test de prolifération cellulaire (toxicité).....	116
5.5.	Irradiation au UV-B (induction de p53).....	117
5.6.	Internalisation cellulaire .....	117
5.7.	Fixation cellulaire et coloration de Hoechst.....	118
6.	Microscopie .....	118
6.1.	Acquisition sur cellules fixées .....	118
6.2.	Analyse d'image et quantification ratiométrique .....	118
7.	Caractérisation du biosenseur .....	119
7.1.	NTA (Nanoparticle Tracking Analysis) ou analyse de suivi des nanoparticules.....	119

7.2. Détermination du rendement quantique ( $\phi$ ).....	119
Annexe A .....	121
Annexe B .....	123
Annexe C .....	125
Annexe D .....	141
Références.....	144
Article .....	157

# **Abréviations**

ADN : Acide désoxyribonucléique

AIE : Aggregation Induced Emission

AMP : Adénosine monophosphate

AMPK : AMP-activated protein kinase

APC : Adenomatous polyposis coli

ARF : alternate reading frame

ARNm : Acide Ribonucléique messenger

ASPP2 : Apoptosis-stimulating of p53 protein 2

ATCC : American Type Culture Collection

ATM : Ataxia Telangiectasia Mutated

BAX : Bcl-2-associated X

BBC3 : BCL2 binding component 3

BCL : B-cell lymphoma

CDK : Cyclin-Dependent Kinase

CFP : Cyan Fluorescent Protein

CHK1/2 : Checkpoint kinase 1/2

CK2 : Casein kinase 2

CML : Chronic Myeloid Leukemia

CPP : Cell-Penetrating Peptide

CTD : C-terminal domain

DANSYL : Dimethyl(Amino)Naphthalene-1-SulfonYL

DMSO : Dimethylsulfoxyde

DO : Densité Optique

EDTA : EthyleneDiamineTetraAcetic acid

ECL : Enhanced chemiluminescence

EGF : Epidermal Growth Factor

EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor

EGR1 : Early growth response protein 1

ERK 1/2 : Extracellular signal-Regulated Kinase 1/2

FITC : Fluorescein isothiocyanate

FLIM : Fluorescence lifetime imaging

FP : Fluorescent Protein

FPLC : Fast Protein Liquid Chromatography

FRET : Förster Resonance Energy Transfer

Gadd45 : Growth Arrest and DNA Damage

GFP : Green Fluorescent Protein

HDAC : Histone deacetylase

HPLC : High Performance Liquid Chromatography

Hsp90 : Heat shock protein 90

IARC : International Agency for Research on Cancer

IGF1R : Insulin-like growth factor 1 receptor

IGF2 : Insulin-like growth factor 2

IR : InfraRed

LB : Luria-Bertani (habituellement mais incorrect), historiquement “Lysogeny Broth” (Bertani, 2004)

LC-MS : Liquid chromatography-mass spectrometry

LOD : Limite Of Detection

MDM2 : Mouse double minute 2 homolog

NADPH : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit

NES : Nuclear Exportation Sequence

NF1/2 : Neurofibromin ½

NF-κB2 : Nuclear Factor Kappa B Subunit 2

NIR : Near InfraRed

NLS : Nuclear Localization Sequence

NP40 : Nonidet P-40

NTA : Nanoparticle Tracking Analysis

NTD : N-terminal domain

PAABD : Phospho Amino Acid Binding Domain



PAI1 : plasminogen activator inhibitor-1

PBS : Phosphate Buffer Salin

PCNA : Proliferating Cell Nuclear Antigen

PDB : Protein Data Base

PFA : paraformaldéhyde

Pin1 : Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase NIMA-interacting 1

PMD : Protein Misfolding Diseases

PML : Promyelocytic leukemia

PRD : Proline Rich Domain

PRIMA-1 : p53 reactivation and induction of massive apoptosis

PUMA : p53 upregulated modulator of apoptosis

PVDF : PolyVinyliDene Fluoride

Rb : Retinoblastoma

RETRA : Reactivation of transcriptional reporter activity

RITA : Reactivation of p53 and Induction of Tumor cell Apoptosis

RMN : Résonance magnétique nucléaire

ROI : Region Of Interest

ROS : Reactive oxygen species

RPMI : Roswell Park Memorial Institute

SAHA : Suberoylanilide hydroxamic acid

SDS-PAGE : Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis

SH3 : Src Homology 3 Domain

SMYD2 : SET and MYND domain containing 2

SPR : Surface Plasmon Resonance

SREBP : Sterol Regulatory Element-Binding Protein

SVF : Sérum de Veau Foetal

TAD : Transactivation domain

TBS : Tris Buffer Salin

TEM : Transition épithélio-mésenchymateuse

TFIIH : Transcription factor II Human

TIGAR : Tp53-Inducible Glycolysis and Apoptosis Regulator

TSS : Transformation and Storage Solution

UV-B : Ultra Violet B

VEGFA : Vascular endothelial growth factor A

VDR : Vitamin D Receptor

VLH : Von Hippel–Lindau tumor suppressor

WT : Wild Type

YFP : Yellow Fluorescent Protein

# **Introduction**

# **1. Structure et fonctions de p53**

## **1.1. Historique**

En 1979, plusieurs laboratoires travaillant sur des cellules transformées avec le virus simien SV40 observent simultanément qu'une protéine, de 53kDa à 56kDa, co-précipite avec l'antigène T produit par le virus. Leurs études ont montré que la transformation de cellules de souris et de hamster induisait la production de cette protéine. Ils en ont déduit, en comparant la séquence de cette protéine avec les séquences des différents variants de l'antigène T, que cette protéine n'était pas d'origine virale mais produite par la cellule hôte en réponse à cette transformation (Chang et al., 1979; Kress et al., 1979; Lane and Crawford, 1979; Linzer and Levine, 1979; Smith et al., 1979). Ce n'est finalement qu'en 1983 lors du 1<sup>er</sup> rassemblement des groupes travaillant sur cette protéine ((à Oxted, Royaume-Unis), que la nomenclature p53 fut choisi pour décrire cette protéine (Levine and Oren, 2009).

## **1.2. Fonctions**

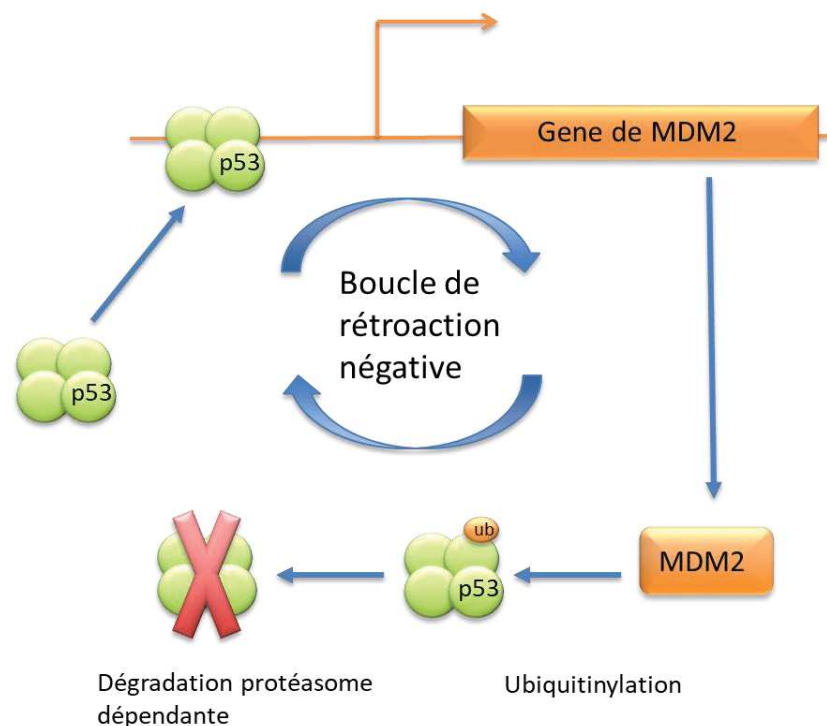
Les études suivantes ont conforté que p53 pourraient être un oncogène (Rotter, 1983). Par exemple car elle est aussi produite suite à la transformation cellulaire par l'adénovirus E1b-58 kD (Sarnow et al., 1982), ou parce qu'elle coopère avec les oncogènes Ras (Eliyahu et al., 1984; Parada et al., 1984). Ce n'est qu'après avoir comparé les séquences d'ADN de tous les clones utilisés qu'il a été établi que seuls les mutants de p53 permettaient la transformation d'une cellule et non pas la forme sauvage de p53 (Levine and Oren, 2009). Des études ont alors montré qu'une surexpression de la forme sauvage de p53 pouvait inhiber l'effet

d'oncogènes, tels que c-myc et H-ras, dans les cellules (Eliyahu et al., 1989; Finlay et al., 1989). Il est établi depuis que p53 est un suppresseur de tumeur.

### 1.2.1. p53 : suppresseur de tumeur

Il a été montré que p53 est un facteur de transcription, induit lors d'un stress, qui se lie à l'ADN sous forme tétramérique. Il régule l'expression de gènes requis pour la réparation de l'ADN, afin de préserver son intégrité (Lane, 1992).

Le taux de p53 est très faible (dans le sérum humain, sa concentration a été estimée à 0.19 ng/ml soit 4.3 pM (Attallah et al., 2003)). Celui-ci est régulé par la protéine MDM2, qui va ubiquitinyler p53, engendrant sa dégradation par le protéasome. MDM2 étant transcrit lui-même par p53, le faible taux de p53 dans la croissance cellulaire normale est dû à une boucle de rétroaction négative (Vousden, 2000) ( Figure 1 ).



**Figure 1 : Régulation du taux de p53 avec une boucle de rétroaction négative : La transactivation par p53 de MDM2 engendre son ubiquitinylation et sa dégradation via le protéasome.**

Le taux de p53 augmente rapidement en réponse à un stress intra et extracellulaire tels que l'endommagement de l'ADN, l'hypoxie, le métabolisme oxydant, les signaux oncologiques (Harms et al., 2004; Lane, 1992; Levine and Oren, 2009; Vousden and Lane, 2007). Plusieurs voies métaboliques peuvent être activées : la voie ATM/CHK1 qui va permettre la phosphorylation de p53 (et par conséquent l'impossibilité d'être ubiquitinylée par MDM2) ; la voie CDK/Cycline permettant la production de la protéine ARF, via la dérégulation de E2F, qui va inhiber MDM2 (Lavin and Gueven, 2006; Vousden, 2002). Différentes modifications Post-Traductionnelles (Phosphorylation S15/S46/S315/S366/T387, Acétylation K120/K164/K320, Méthylation K372/K373/K381/K382) vont permettre la transcription d'une grande variété de gènes modulant les fonctions cellulaires et notamment l'arrêt du cycle cellulaire en G1 ou G2 via l'induction de p21 (G1 et G2), 14-3-3s et Gadd45 (G2), l'apoptose via l'induction de BAX, BBC3 ou PUMA et la sénescence via l'induction de PAI1 (Figure 2) (Harms et al., 2004; Lane, 1992; Lavin and Gueven, 2006; Levine and Oren, 2009; Vousden and Lane, 2007; Vousden and Prives, 2009).

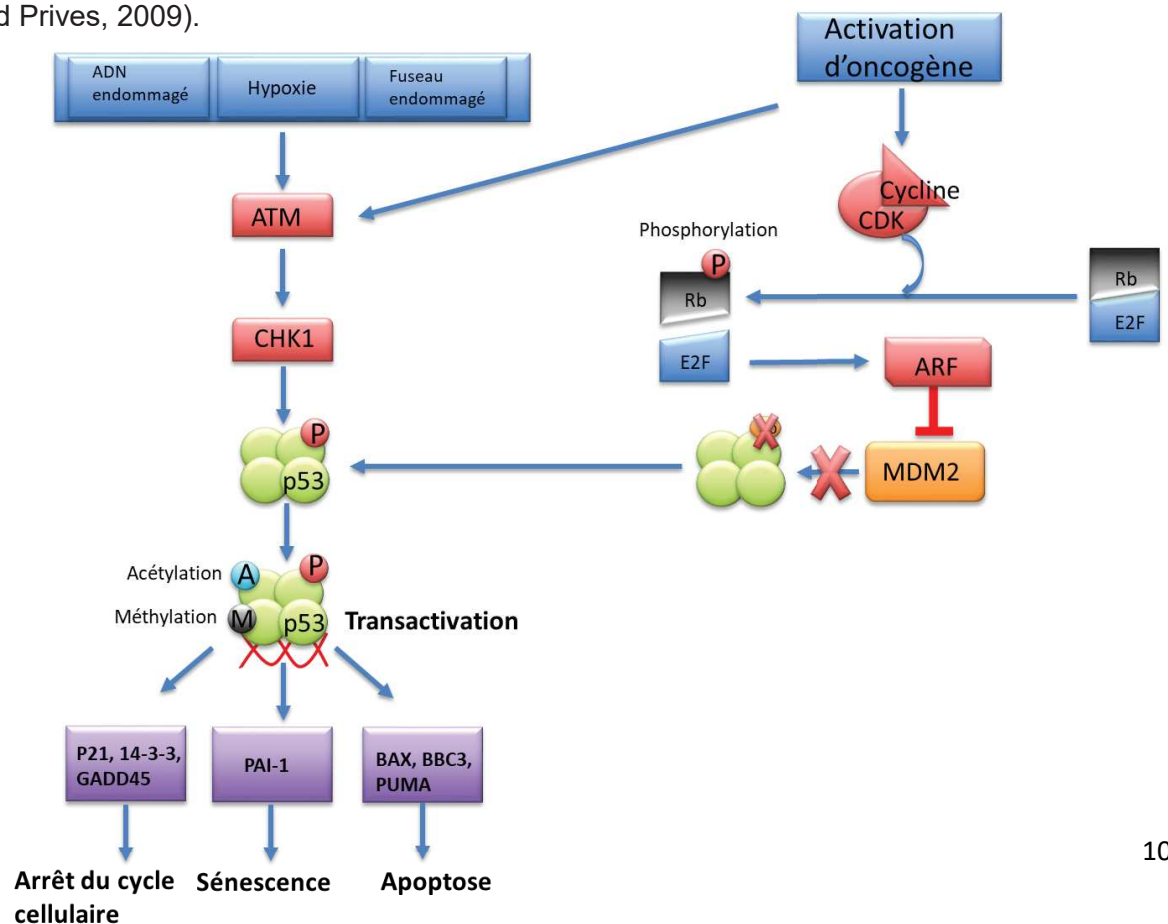


Figure 2 : Activation de p53 et transactivation de gènes en réponse à un stress cellulaire.

La transactivation de gènes impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire ou la mort dépend du tissu, de l'environnement cellulaire et de la nature du stress subi par la cellule. Un modèle suggère que les mécanismes sont différents en fonction de la gravité des dégâts cellulaires causés par le stress et par sa durée. Si le stress est d'une durée faible et cause relativement peu de dégâts, la survie de la cellule est choisie via l'arrêt du cycle cellulaire permettant la réparation de l'ADN. A contraire si les dégâts sont irréparables, la voie de la mort cellulaire est préférée (Vousden and Prives, 2009).

### 1.2.2. p53 : fonctions métaboliques et oxydatives

Au-delà de son rôle de suppresseur de tumeur il a été montré que p53 avait d'autres fonctions métaboliques moins connues mais tout aussi importantes (Vousden and Lane, 2007).

#### 1.2.2.1. Régulation du métabolisme du glucose et de la respiration

##### mitochondriale

Des études ont démontré l'importance de p53 dans la réponse de la cellule au stress nutritionnel et à la régulation des voies d'utilisation du glucose et du métabolisme énergétique. L'hypoglycémie active p53 via sa phosphorylation sur la sérine 15 par l'AMPK conduisant à l'activation de p21 et la survie de la cellule (Jones et al., 2005) (Figure 3A).

Il a été aussi prouvé que p53 induisait l'expression du transporteur de cuivre SCO2, nécessaire à l'assemblage de la cytochrome c oxydase permettant ainsi l'amélioration de la phosphorylation oxydative (Matoba et al., 2006) (Figure 3C). De même, il a été démontré que

p53 joue un rôle dans la régulation de l'expression de AIF, une protéine mitochondriale contribuant également à une phosphorylation oxydative efficace (Stambolsky et al., 2006).

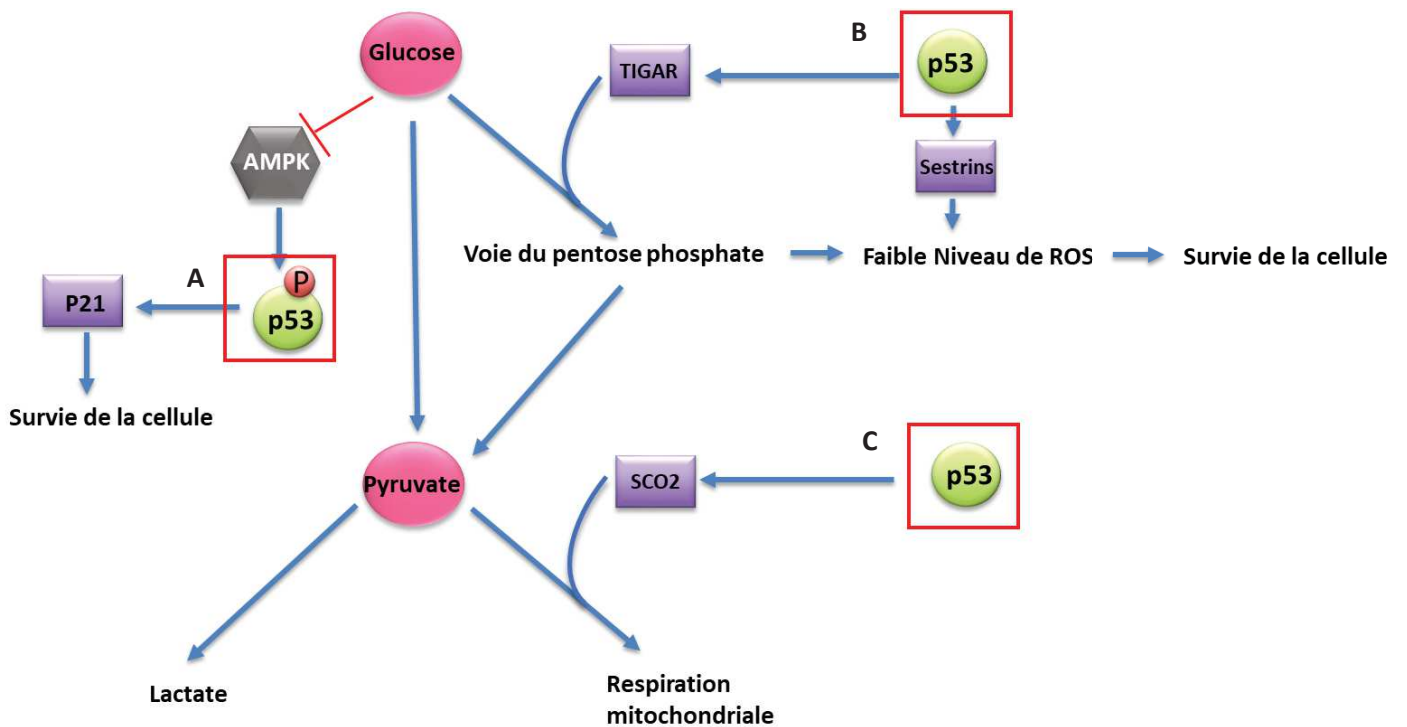
Il est à noter que même dans ces cas-là, p53 joue un rôle important dans la non-prolifération de cellules cancéreuses. En effet une perte de fonction de p53 dans les tumeurs pourrait contribuer à la prolifération des cellules cancéreuses dans des conditions de manque de nutriments. Une perte de fonction de p53 génèrerait une réduction de la consommation d'oxygène que les cellules cancéreuses sont capables de contourner par une augmentation drastique de la glycolyse, appelé effet Warburg, favorisant leur développement (Matoba et al., 2006).

#### 1.2.2.2. Fonctions anti-oxydantes

Il a été montré que p53 induit d'autres gènes comme TIGAR (Tp53-Inducible Glycolysis and Apoptosis Regulator) (Bensaad et al., 2006) ou Sestrins. TIGAR code pour une protéine qui dévie la voie glycolytique principale vers la voie du pentose phosphate, générant une augmentation de NADPH et une diminution des espèces réactives de l'oxygène (ou ROS). Sestrins a un effet similaire en provoquant une diminution du taux de ROS dans les cellules (Figure 3B).

Cette fonction anti-oxydante de p53 est importante lors de l'absence de stress aigue car elle évite l'accumulation de dommage de l'ADN lors de stress quotidien.





**Figure 3 : p53 et métabolisme : A : activation de p53 via AMPK suite à un manque de nutrition de la cellule, permettant sa survie. B : Régulation du taux de ROS dans la cellule via l'activation de TIGAR ou Sestrins. C : Régulation de la respiration mitochondriale via SCO2.**

### 1.3. Structure

Comme décrit précédemment, les nombreuses fonctions de p53 se reflètent dans sa structure, qui se décompose en 3 parties comprenant plusieurs domaines. Elle est caractérisée par une grande flexibilité qui lui permet d'adopter différentes fonctions (Okorokov et al., 2006) :

- La partie N-terminale (résidus 1-100), acide et non structurée comprenant 2 domaines de transactivation (TAD1 et TAD2) le domaine de liaison à MDM2, et un domaine riche en proline et un NES (Nuclear Exportation Sequence)
- Le domaine de liaison à l'ADN (résidus 102-292) qui constitue un domaine structuré indépendant dont la résolution par cristallographie aux rayons X fut réalisée pour la 1ere fois en 1994 (Cho et al., 1994).

- La partie C-terminale (résidus 293-393) comprenant un domaine de signalisation de localisation nucléaire ou NLS (Nuclear localisation Sequence) et également un NES

(Figure 4)



**Figure 4 : Schéma de la structure de p53 divisé en 3 domaines : Domaine N-terminal : comprenant les TAD1 et TAD2, les régions de liaison à MDM2 et p300 et une NES, le domaine de liaison à l'ADN, et le domaine C-terminal comprenant la région de tétramérisation, une NLS principale, une NES et le domaine de régulation.**

### 1.3.1. Domaine N-Terminal (NTD : N-Terminal Domain)

Le domaine N-ter de p53 est un domaine acide et non structuré (Joerger and Fersht, 2008) qui comprend deux domaines de transactivation TAD 1 (résidus 1-40) et TAD 2 (résidus 41-61). Ce domaine peut se structurer partiellement lorsqu'il se lie à des partenaires protéiques. Par exemple il est décrit que lors de la liaison avec son régulateur négatif MDM2, les résidus 15 à 29 adoptent une structure en hélice  $\alpha$ . Les résidus impliqués plus particulièrement dans cette liaison avec MDM2 sont Phe19, Leu26 et Trp23 (Kussie et al., 1996; Popowicz et al., 2007). Il en est de même pour certaines régions comprises dans le TAD2 qui se replient en hélice  $\alpha$  amphipathique lors de la liaison de p53 avec la protéine de réplication A ou avec la sous-unité Tfb1 de la levure TFIIH (Joerger and Fersht, 2008).

Il a aussi été montré qu'une région plus large (résidus 1 à 57), englobant une grande partie des deux TAD, se liait avec le coactivateur de transcription p300. En interagissant avec p53 dans une région comprenant le site de liaison à MDM2 (résidus 15-29), p300 empêche ainsi MDM2 de se lier à p53 pour induire son ubiquitinylation et sa dégradation protéasome dépendante (Teufel et al., 2007). Inversement lorsque MDM2 est liée à p53, p300 ne peut interagir et ainsi lancer la machinerie de la transcription.

Il existe aussi une région riche en proline (PRD Proline Rich Domain) qui relie le TAD2 au domaine de liaison à l'ADN. Cette région contient 4 répétitions du motif PXXP. Bien que le rôle exact de cette région riche en proline ne soit pas réellement connu, il semblerait qu'il joue un rôle important dans la transduction. En effet le motif PXXP est décrit comme interagissant avec le domaine SH3 (Src Homology 3 Domain). p53 interagirait donc avec différentes protéines possédant ce domaine via le motif PXXP et participerait ainsi à la transmission de signaux antiprolifératifs via un mécanisme indépendant de l'activation de la transcription (Walker and Levine, 1996). Il est à noter que des mutations dans le PRD n'affectent pas significativement la fonction de suppresseur de tumeur de p53 mais plutôt sa stabilité (Toledo and Wahl, 2006). Ce domaine aurait plutôt un rôle de modulation et serait comme un « espaceur » entre différentes régions fonctionnelles de p53 (Joerger and Fersht, 2008).

Il a été montré que le domaine N-terminal possède une séquence d'exportation nucléaire ou NES (Nuclear Exportation Sequence) (résidus 11-27), nécessaire à l'exportation nucléaire de p53 pour sa dégradation. Suite à un endommagement de l'ADN, la sérine 15 est phosphorylée inhibant à la fois la liaison de MDM2 à p53 et son exportation nucléaire. (Zhang and Xiong, 2001).

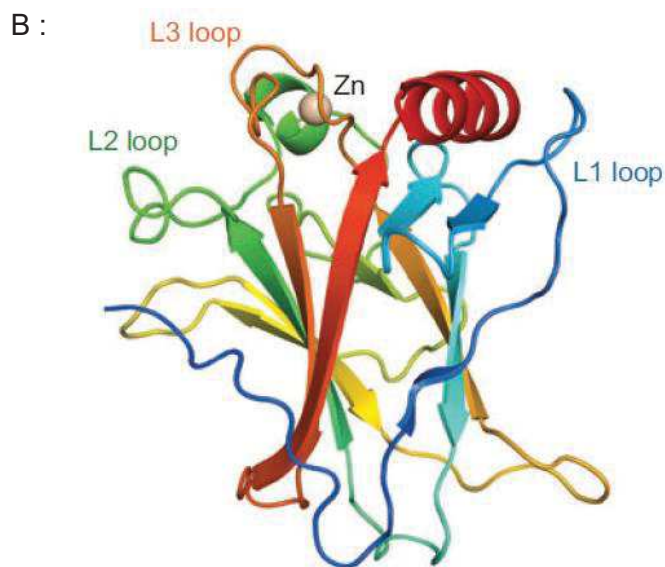
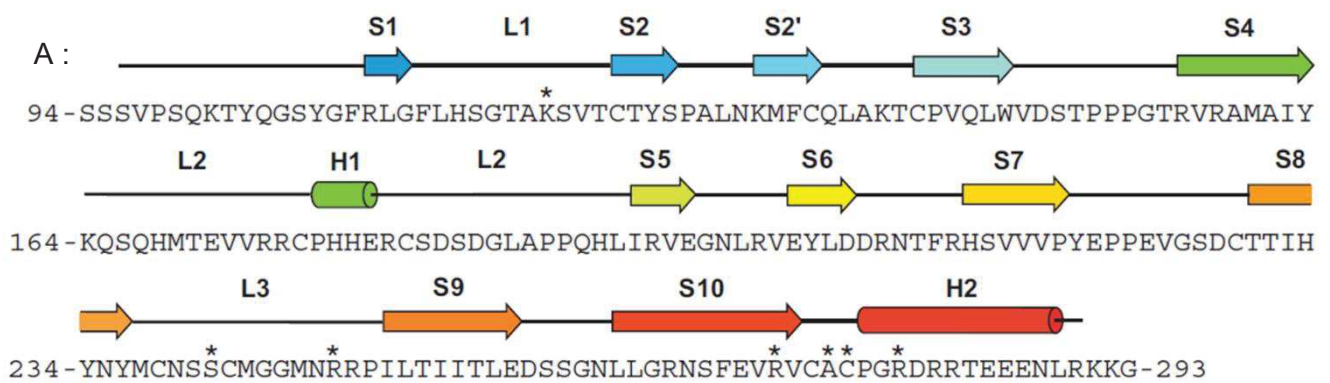
### 1.3.2. Domaine de liaison à l'ADN : p53C

#### 1.3.2.1. Structuration du domaine

Il s'agit du domaine principal de p53 dont la 1<sup>ère</sup> étude complète de sa structure en complexe avec l'ADN fut publié en 1994 (Cho et al., 1994). Depuis de nombreuses études ont été menées sur ce domaine et de nombreuses structures furent publiées (non lié à l'ADN, complexé avec différents ADN ; lié à des protéines de signalisation ou à des oncoprotéines virales ; de forme mutées du domaine). Ceci a permis de mieux comprendre les mécanismes de la reconnaissance de gènes cibles spécifiques ainsi que l'inactivation de p53 dans le cancer (Joerger and Fersht, 2008).

La structure en sandwich  $\beta$  de type immunoglobuline constitue le support de base pour la surface de liaison à l'ADN. Elle peut être divisée en 2 régions structurées (Figure 5) :

- La 1<sup>ère</sup> région comprend le motif boucle-feuillet  $\beta$ -hélice  $\alpha$  qui se lie au sillon majeur de l'ADN. Elle contient la boucle L1, les brins  $\beta$  S2 et S2', une partie du brin S10 et l'hélice  $\alpha$  C-terminale H2.
- La 2<sup>ème</sup> région est constituée de deux grandes boucles, L2 et L3, stabilisées par un ion Zinc. Cet ion est important pour la stabilité thermodynamique de p53 et dans la structuration de la boucle L2. Une perte cet ion de zinc augmente le risque d'agrégation, génère une fluctuation structurelle des boucles voisines entraînant une perte de spécificité de la liaison à l'ADN (Bullock et al., 2000; Butler and Loh, 2003; Duan and Nilsson, 2006).



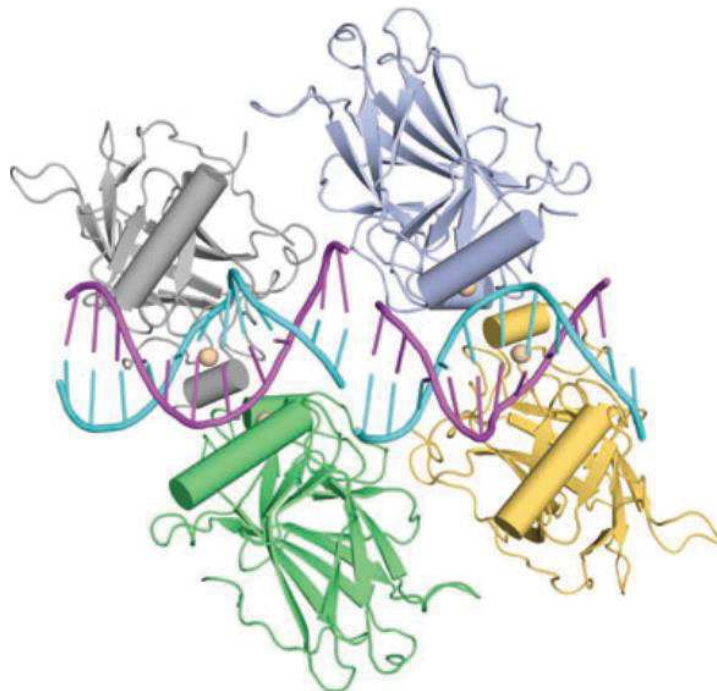
**Figure 5 : Structure de domaine de liaison à l'ADN de p53 : A : Séquence et structure secondaire du domaine principal de p53, les résidus de contact avec l'ADN sont marqués d'un astérisque (Joerger et Fersht 2008) B : Structure de p53C sans ADN représentée avec un dégradé de couleur arc-en-ciel, du bleu au N-terminal au rouge au C-terminal ; PDB : 2OCJ (Joerger et Fersht 2008).**

Le domaine p53C est très instable. Il a été montré que dans ce domaine de nombreux groupes polaires enfouis ne sont pas stabilisés par des liaisons hydrogènes, ce qui pourraient expliquer cette instabilité (Cañadillas et al., 2006). En effet la substitution d'un tel couple enfoui (Tyr236 et Thr253) avec les résidus hydrophobes correspondants, trouvés dans les paralogues p63 et

p73 qui eux sont très stables, augmente la stabilité de p53C (Cañadillas et al., 2006). Des études phylogénétiques suggèrent que les gènes des paralogues p63 et p73 sont plus anciens que p53, cela impliquerait que l'instabilité de p53 soit une évolution permettant une flexibilité et une rapide transition entre l'état replié et non replié. Cette flexibilité de p53C fournit la plasticité structurelle nécessaire pour une fonctionnalité optimale (Joerger and Fersht, 2008).

#### 1.3.2.2. Mécanisme de liaison à l'ADN

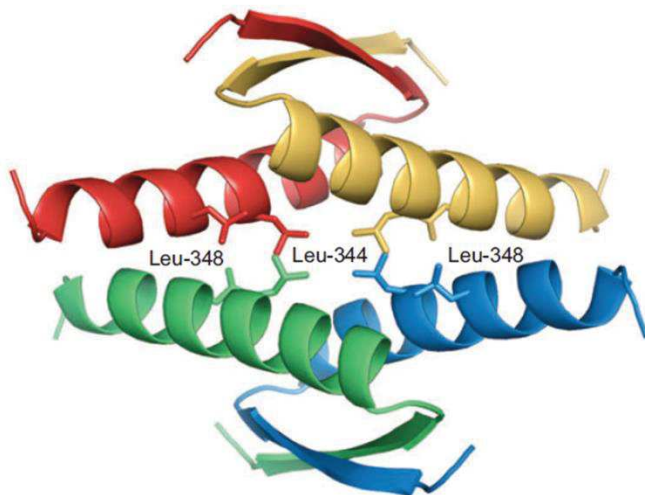
Une séquence spécifique d'ADN double brin sur laquelle se lie p53 afin de réguler la transcription des différents gènes a été identifiée : 5'-RRRCWWGYYY<sub>n0-13</sub>RRRCWWGYYY-3' ((A) adénine ; (T) thymine; (C) cytosine; (G) guanine; (R) purine; (Y) pyrimidine; (W) A/T; (n) nucléotides) (El-Deiry et al., 1992). Il a été démontré que 4 domaines p53C se lient à l'ADN de manière très coopérative donnant un complexe avec une stœchiométrie 1 ADN pour 4 p53 (Balagurumoorthy et al., 1995; Weinberg et al., 2004) (Figure 6). Ceci génère une flexion et une torsion de l'ADN (Nagaich et al., 1999). Il n'y a que quelques résidus de p53 qui interviennent dans l'interaction directe avec l'ADN : Lys120, Ser241, Arg248, Arg273, Ala276, Cys277, et Arg280 (Cho et al., 1994; Kitayner et al., 2006).



**Figure 6 : Représentation de 4 p53C lié à deux motifs consécutifs de demi-sites d'ADN (PDB 2AIH) : (Joerger et Fersht 2008).**

### 1.3.3. Domaine C-Terminal : CTD (C-Terminal Domain)

La partie principale du domaine C-terminal de p53 est le domaine de tétramérisation (résidus 323-356). Il comprend un feuillet  $\beta$  et une hélice  $\alpha$  reliée par un coude (Gly334). Deux feuillets  $\beta$  s'associent dans un 1<sup>er</sup> temps pour former un dimère, stabilisé par un feuillet  $\beta$  intermoléculaire antiparallèle et une hélice  $\alpha$  antiparallèle où 3 résidus, Leu330, Ile332, et Phe341, forment le noyau hydrophobe de ce dimère. Ensuite deux de ces dimères s'associent via leurs hélices  $\alpha$  pour former un tétramère, stabilisé par des interactions hydrophobes en particulier grâce à deux résidus hydrophobes, Leu344 et leu348 (Figure 7). C'est dans ce domaine que se trouvent trois séquences de localisation nucléaire ou NLS dont la principale est PQPKKKP ainsi qu'une séquence d'exportation nucléaire ou NES (Liang and Clarke, 1999).

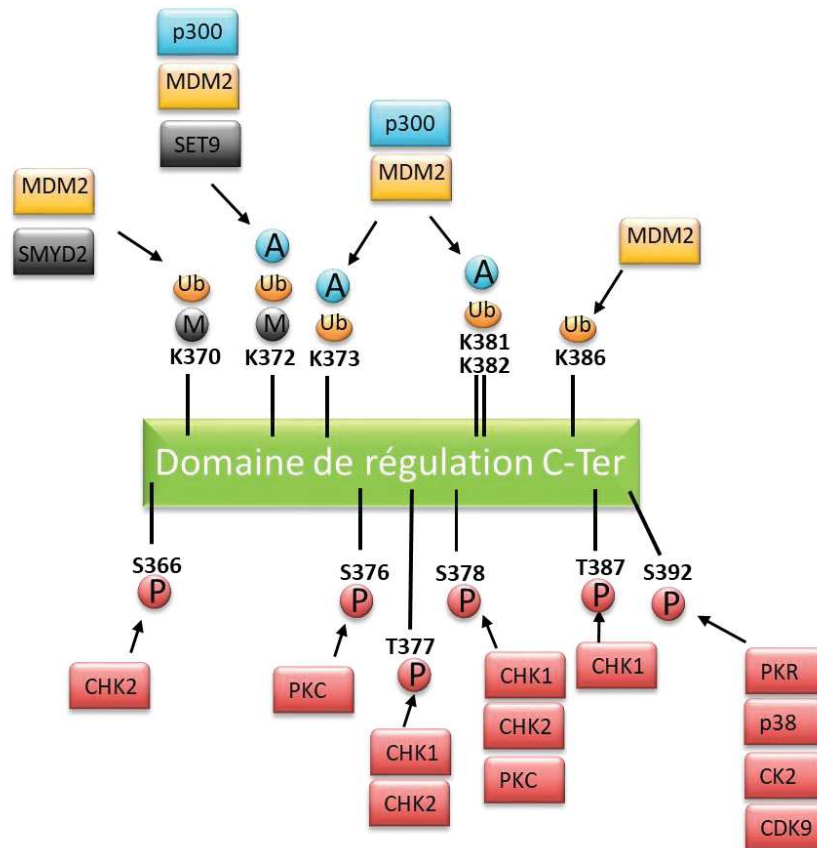


**Figure 7: Représentation du domaine de tétramérisation de p53 (PDB IC26) : Association de deux dimères en un tétramère de 4 hélices stabilisés par les résidus Leu344 et Leu348 (Joerger et Fersht 2008).**

La 2<sup>ème</sup> partie du domaine C-terminal, c'est-à-dire la partie extrême (résidus 367-392) est particulièrement désordonnée. elle est aussi appelée « domaine de régulation négatif »



(Friedler et al., 2005; Rust et al., 2000). En effet ce domaine subit de nombreuses modifications post-traductionnelles modulant et régulant ainsi les fonctions de p53 (Figure 8)



**Figure 8 : Représentation de modification post-traductionnelle du domaine de régulation en C-ter de p53 : A signifie Acétylation ; M Méthylation, P Phosphorylation et Ub Ubiquitinylation.**

Le rôle individuel de toutes ces modifications post-traductionnelles n'est pas clairement connu (Joerger and Fersht, 2008). On sait toutefois que l'ubiquitinylation par MDM2 favorise la dégradation de p53 via le protéasome. Il a aussi été montré qu'après un stress cellulaire et donc la phosphorylation du N-ter, la liaison de p300 avec le domaine C-ter est favorisée, générant son acétylation et stabilisant et activant ainsi p53 (Toledo and Wahl, 2006). Le domaine C-ter lie aussi l'ADN de façon non spécifique via des interactions électrostatiques



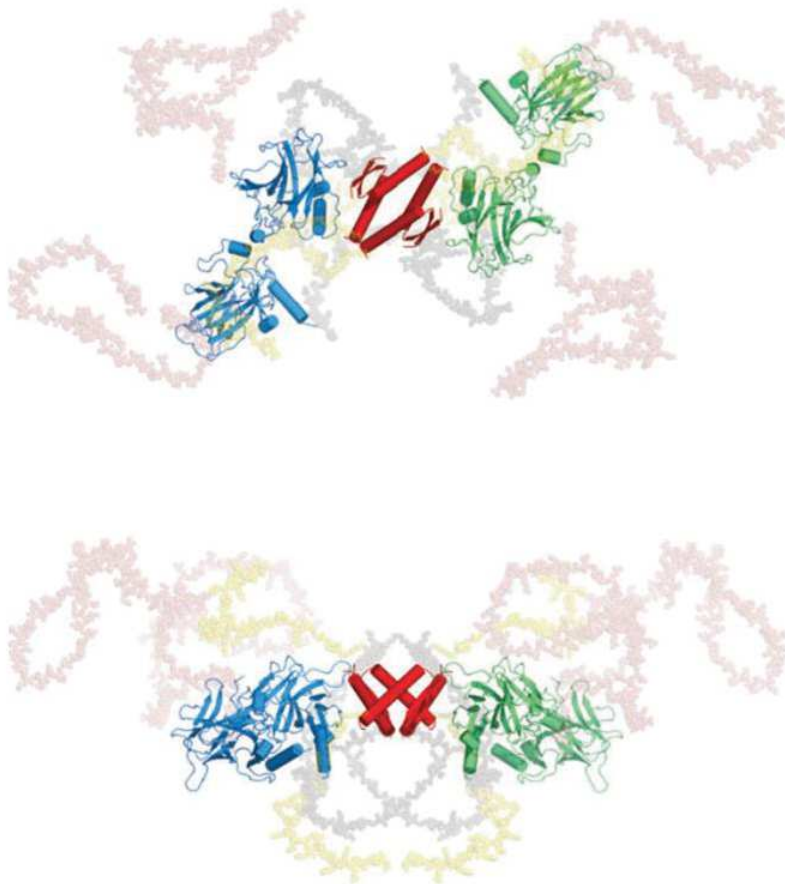
avec plusieurs lysines. Ceci inhibe la liaison du domaine p53C à l'ADN (Weinberg et al., 2004). Cette liaison du C-ter diminue lorsque les lysines sont acétylées (Friedler et al., 2005). L'acétylation des lysines améliorerait donc la liaison à l'ADN du domaine p53C, modulant ainsi l'activité de transcription de p53 (Luo et al., 2004).

Les résultats parfois contradictoires sur le rôle de ces modifications post-traductionnelles du domaine C-ter de p53 reflètent parfaitement la complexité de p53 et de ses différentes fonctions. La régulation des fonctions de p53 par les différentes acétylations implique d'autres mécanismes tel que des modifications de la liaison à l'ADN, la régulation du taux de p53 nucléaire et le recrutement de coactivateurs (Joerger and Fersht, 2008).

#### 1.3.4. Structure de la protéine « totale »

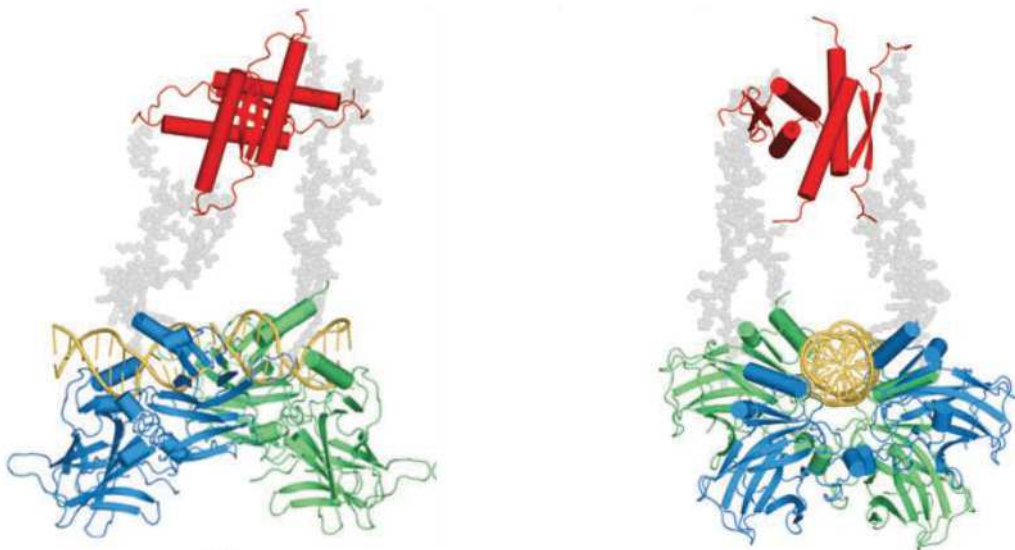
Les structures individuelles de chaque domaine de p53 sont étudiées depuis de longues années, mais l'analyse de la structure de p53 « dans son ensemble » et donc de son comportement dynamique est plus récente. Ceci permet d'approfondir encore un peu les connaissances sur les fonctions de p53. De nombreux obstacles ont été contournés, comme la taille de la protéine, trop grande pour une analyse RMN classique, le nombre important de régions non structurées de p53 qui a empêché l'obtention d'une structure cristalline réellement représentative de la protéine (Joerger and Fersht, 2008) ainsi que son instabilité dont l'ingénierie d'un quadruple mutant (M133L ; V203A ; N239Y ; N268D) a permis de stabiliser la protéine entière tout en gardant virtuellement ses fonctions (Nikolova et al., 1998). L'analyse de la structure quaternaire de p53, a été possible en combinant des approches de RMN, rayon X et microscopie électronique (Tidow et al., 2007).

La structure de p53 non liée à l'ADN forme un tétramère allongé en forme de croix où les dimères p53C sont faiblement associés et les domaines N-ter et C-ter sont étendus (Joerger and Fersht, 2008) (Figure 9). Le fait que les dimères soient faiblement associés quand p53 n'est pas lié à l'ADN permet une association avec des protéines régulatrices telles que ASPP2 via la boucle L3 (Gorina and Pavletich, 1996; Tidow et al., 2006), ou encore différentes protéines de la famille Bcl-2 impliquées dans l'apoptose dans la mitochondrie indépendante de la transcription que p53 effectue (Chipuk et al., 2005; Tomita et al., 2006).



**Figure 9 : Représentation de la structure quaternaire tétramérique de p53 non lié à l'ADN sous 2 orientations différentes : Modèle obtenu à partir de la diffusion de rayons X à petit angle. Le domaine de liaison à l'ADN (en bleu et vert) et le domaine de tétramérisation (en rouge) sont représentés en « cartoon ». Les domaines flexibles : « linker » (gris), N-terminal (rose) et C-terminal (jaune) sont représentés en semi-transparence. Les domaines N-ter et C-ter sont des représentations approximatives permettant d'illustrer l'espace occupé par ces régions flexibles. (Joerger et Fersht 2008).**

Lors de la liaison à l'ADN, p53 s'enroule autour de l'hélice d'ADN grâce à la flexibilité de la protéine. Cette liaison rend la structure globale beaucoup plus rigide. Deux « super domaines » peuvent être décrits : Le « super domaine I » formé de 4 domaines p53C (domaine de liaison à l'ADN) lié à une molécule d'ADN comme décrit plus haut. « Le super domaine II » qui est le domaine de tétramérisation situé entre 40 et 120 Å « du super domaine I » (Figure 10). L'orientation relative de ces deux super domaines varie en fonction des différents éléments de l'ADN liés, ainsi que des partenaires protéiques associés ou non à p53. Il a été montré que la séquence de localisation nucléaire (NLS) se trouve dans la région flexible séparant les deux super domaines. Elle est accessible que p53 soit lié ou non à l'ADN (Liang and Clarke, 1999). Au contraire la séquence d'exportation nucléaire (NES) du domaine C-terminal est enfoui et inaccessible. Il est donc nécessaire que le tétramère se dissocie pour le NES soit accessible et que p53 soit exporté du noyau (Stommel et al., 1999).



**Figure 10 : Représentation de la structure quaternaire tétramérique de p53 lié à l'ADN sous 2 orientations différentes : Modèle obtenu à partir de la diffusion de rayons X à petit angle. Le domaine de liaison à l'ADN (en bleu et vert) et le domaine de tétramérisation (en rouge) sont représentés en « cartoon ». Les domaines flexibles : « linker » (gris), N-terminal (rose) et C-terminal (jaune) sont représentés en semi-transparence. Les domaines N-ter et C-ter sont des représentations approximatives permettant d'illustrer l'espace occupé par ces régions flexibles. (Joerger et Fersht 2008).**

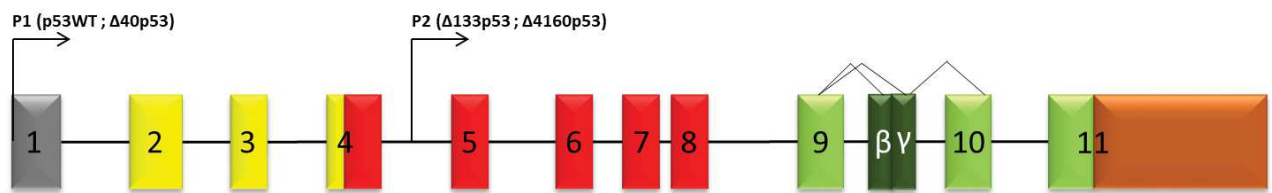
## 2. Isoformes, mutations et Cancer

### 2.1. Isoformes

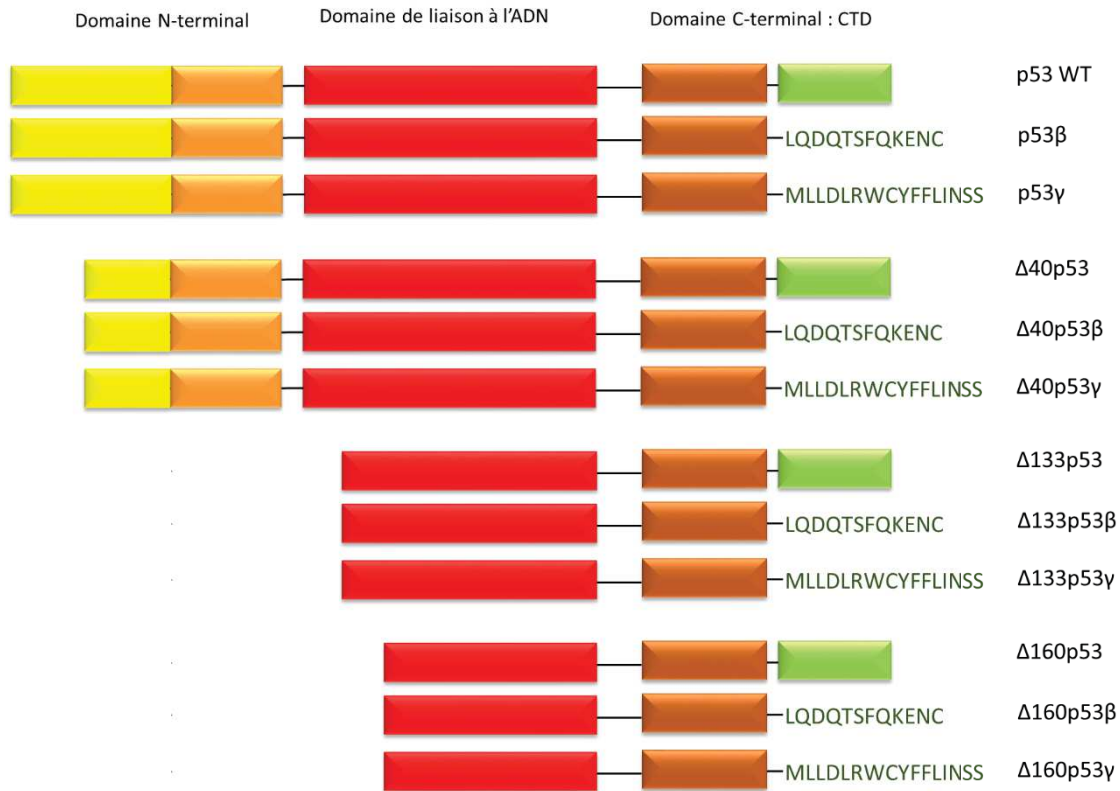
#### 2.1.1. Transcription des isoformes

Il a été montré que le gène TP53 possède 2 promoteurs : 1 à proximité de l'exon 1 (P1 et un promoteur interne (P2) dans l'intron-4 générant une protéine où les 133 premiers acides aminés sont tronqués ( $\Delta 133p53$ ). L'intron-9 de l'ARNm peut être épissé de trois manières différentes générant l'expression d'isoforme de p53 avec des domaines C-terminaux différents (p53 WT, p53 $\beta$ , p53 $\gamma$ ). Enfin l'intron-2 de l'ARNm peut aussi être épissé de deux manières, générant soit la protéine sauvage soit un isoforme où les 40 premiers acides aminés en N-terminal sont manquants (p53 WT ;  $\Delta 40p53$ ) (Bourdon et al., 2005; Khoury and Bourdon, 2010) (Figure 11 A). En 2010, un nouvel isoforme de p53 a été découvert, où les 160 premiers résidus sont absents. Ce nouvel isoforme est transcrit à partir du même promoteur que celui générant  $\Delta 133p53$  (Marcel et al., 2010). p53 peut être exprimé pour générer 12 isoformes différents : p53 WT, p53 $\beta$ , p53 $\gamma$ ,  $\Delta 40p53$ ,  $\Delta 40p53\beta$ ,  $\Delta 40p53\gamma$ ,  $\Delta 133p53$ ,  $\Delta 133p53\beta$ ,  $\Delta 133p53\gamma$ ,  $\Delta 160p53$  ;  $\Delta 160p53\beta$ ,  $\Delta 160p53\gamma$  (Figure 11 B).

A :



B :



**Figure 11 : 12 isoformes de p53 : A : Schéma du gène TP53, avec 2 promoteurs, P1 régulant la transcription de p53WT et Δ40p53 et P2 régulant la transcription de Δ133p53 et Δ160p53. Les exons sont numérotés. La taille des rectangles n'est pas proportionnelle à la taille des exons. B : Schéma des différents isoformes de p53.**

### 2.1.2. Expression et régulation des isoformes

Les isoformes de p53 sont exprimés dans de nombreux tissus normaux et cela de manière indépendante, suggérant que ceux-ci peuvent être régulés indépendamment les uns des autres (Bourdon et al., 2005). Ils ont aussi une localisation subcellulaire différente suggérant

différentes activités biologiques. P53 $\gamma$  est localisé dans le noyau dans la plupart des cellules mais aussi dans le cytoplasme dans certains types cellulaires. Ceci montre que cet isoforme est capable de faire la navette entre le noyau et le cytoplasme.  $\Delta 133p53\beta$  est à la fois cytoplasmique et cellulaire alors que  $\Delta 133p53\gamma$  se retrouve exclusivement dans le cytoplasme, montrant que la partie C-terminale, qui diffère chez ces 2 mutants, joue un rôle dans la localisation cellulaire (Bourdon et al., 2005).

### 2.1.3. Fonctions de ces isoformes

Plusieurs études ont démontré que p53 $\beta$  se liait préférentiellement au promoteur de Bax (un gène pro-apoptotique) et très faiblement au promoteur de MDM2, à l'inverse de p53 WT (Bourdon et al., 2005). Il a été montré que p53 $\beta$  augmentait l'activité transcriptionnelle de p53WT sur le promoteur de Bax, mais n'avait aucune influence sur le promoteur de p21, suggérant une interaction fonctionnelle entre p53 $\beta$  et p53WT (Bourdon et al., 2005). p53 $\beta$  favorise la sénescence répllicative dans des fibroblastes lorsqu'il est co-exprimé avec p53 WT (Fujita et al., 2009).

L'induction de  $\Delta 133p53$  dans des cellules H1299 inhibe l'apoptose induite par p53 WT. En effet cet isoforme inhibe l'activité transcriptionnelle de p53 WT sur les promoteurs de BAX et de p21, possiblement par interaction directe entre  $\Delta 133p53$  et p53 WT. Contrairement à p53 $\beta$ ,  $\Delta 133p53$  inhibe la sénescence répllicative et favorise la prolifération cellulaire de fibroblastes en modulant aussi l'activité transcriptionnelle de p53 WT (Fujita et al., 2009).

p53 $\beta$  et  $\Delta 133p53$  agissent donc comme des modulateurs de l'activité de suppresseur de tumeur de p53 WT en modulant son activité transcriptionnelle et modifiant le destin de la cellule (Khoury and Bourdon, 2010).

#### 2.1.4. Isoformes et cancer

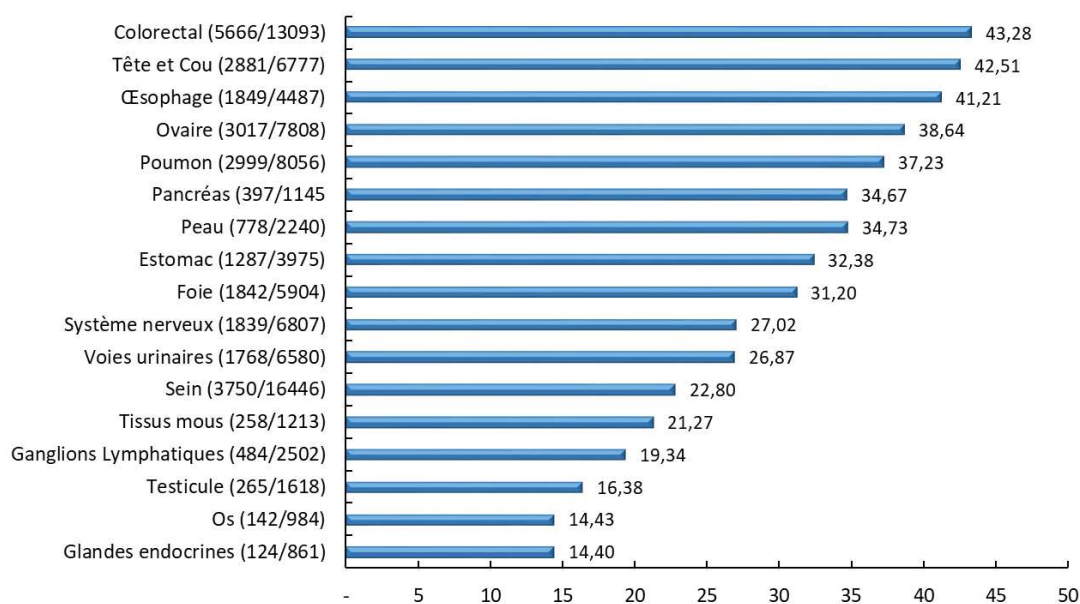
Plusieurs de ces isoformes sont associés au développement de cancers humains.

$\Delta 40p53$  est exprimé 50 fois plus dans les cancers du sein que l'isoforme le moins exprimé  $p53\gamma$ . Le niveau de  $p53$  est significativement plus important dans les cellules cancéreuses du sein que dans les cellules du sein normales, et il a été associé à un sous-type de cancer du sein triple négatif très agressif (Avery-Kiejda et al., 2014).  $\Delta 40p53$  est aussi présent dans des mélanomes et inhibe la transcription de  $p21$  et de  $PUMA$  (2 protéines engendrant l'apoptose) par  $p53$  (Avery-Kiejda et al., 2008). Dans les carcinomes du côlon, l'inhibition de la senescence répliquative est associée à une augmentation de l'expression de  $\Delta 133p53$  (Fujita et al., 2009). Une surexpression significative de l'ARNm de  $\Delta 133p53$  a été observée dans les cancers du poumon et corrèle avec la diminution de l'expression de  $p21$  (Fragou et al., 2017). Une étude récente a montré que  $\Delta 133p53$  favorisait l'invasion et le développement de métastases via l'activation de l'interleukine 6 (Campbell et al., 2018).  $\Delta 133p53\beta$  est le seul isoforme qui a été détecté uniquement dans les tumeurs et non pas dans des tissus normaux (Song et al., 2009). Récemment il a été démontré que dans le cancer colorectal,  $\Delta 133p53\beta$  inhibe l'apoptose en se liant avec la protéine anti-apoptotique  $RhoB$  (Arsic et al., 2017). Il a été montré sur 30 tumeurs primaires de sein que 60% avaient perdu  $p53\beta$  et  $p53\gamma$  alors que 40% étaient caractérisées par une augmentation de l'expression de  $\Delta 133p53$ . Il est donc à noter que si les isoformes de  $p53$  peuvent réguler l'activité de suppression de tumeur de  $p53$ , leur expression anormale peut également expliquer la perte de cette activité dans les cancers du sein. De manière plus générale l'expression anormale de ces isoformes peut perturber l'activité de  $p53$  WT et contribuer à la formation de tumeurs par l'absence de sa fonction sauvage de suppresseur de tumeur (Khoury and Bourdon, 2010).

## 2.2. Mutations et cancer

### 2.2.1. Contexte général

L'activité transcriptionnelle de p53 est essentielle pour ses fonctions de suppresseur de tumeurs, et une mutation de p53 dans les cancers humains peut engendrer soit une perte soit perturber cette activité (Vogelstein and Kinzler, 1992). Malheureusement p53 est la protéine la plus mutée dans les cancers humains. Ces mutations, ou épissages alternatifs, aboutissent à une perte de la fonction de p53 dans environ 50% des cancers humains (Levine and Oren, 2009; Muller and Vousden, 2013; Vousden and Lane, 2007). Les récentes statistiques mises à jour en juillet 2019 sur le site de l'IARC (International Agency for Research on Cancer) (<http://p53.iarc.fr>) montrent que le gène TP53 (localisé sur le chromosome 17q13.1) est muté dans plus de 40% des cancers du colorectaux, de la tête et du cou, et de l'œsophage. Dans plus de 30% des cancers ovariens, du poumon, du pancréas, de la peau, de l'estomac, et du foie. Dans plus de 20% dans les cancers du système nerveux, des voies urinaires et du sein. Et dans plus de 10% des lymphomes, du cancer des testicules, des os et des glandes endocriniennes (Figure 12).

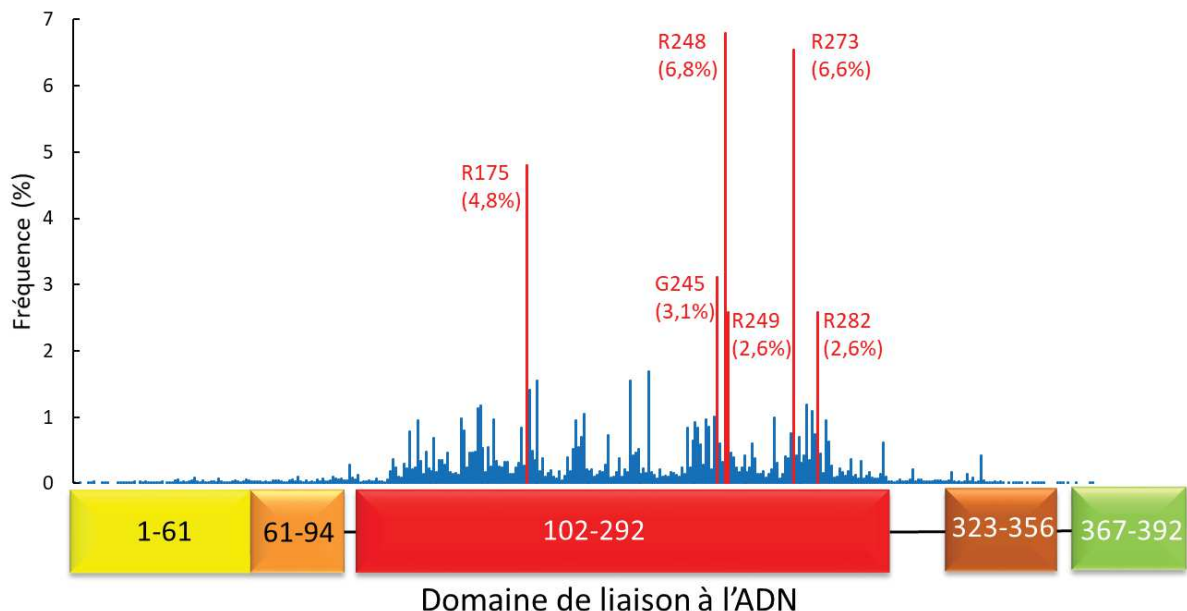


28

**Figure 12: Prévalence des mutations du gène TP53 dans les cancers sporadiques. : La proportion de tumeurs avec des mutations somatiques de TP53 est indiquée. Source IARC juillet 2019.**



Le gène TP53 subit fréquemment des mutations faux-sens (« missense ») (73% des cas de mutation selon l'IARC en juillet 2019) générant une substitution d'un acide aminé et entraînant la perte de la fonction de p53 WT. Ces mutants exercent aussi un effet négatif dominant en se liant directement et en inhibant p53 WT. Ceci est différent de la majorité des suppresseurs de tumeurs (tels que RB1, APC, NF1, NF2 et VHL), où les mutations primaires sont soit une délétion soit une mutation non-sens, conduisant à une expression faible voire nulle des protéines respectives (Freed-Pastor and Prives, 2012). Environ 80% des mutations faux sens sont localisés dans le domaine de liaison à l'ADN, et environ un tiers d'entre elles se produisent sur six résidus critiques (« hot spots ») : R175, G245, R248, R249, R273 et R282 (source IARC, juillet 2019) (Figure 13).



**Figure 13 : Spectre des mutations faux-sens du gène TP53 : données obtenue sur le site de l'IARC (juillet 2019) et tracées en fonction des acides aminés. En rouge les 6 « hot spots » avec entre parenthèse le pourcentage de mutation observé pour chacun ces acides aminés).**

Bien que p53 WT dans des conditions physiologiques soit une protéine à très courte durée de vie (de 6 à 20min), ces mutations faux-sens conduisent à la production de la protéine p53 mutantes avec une demi-vie prolongée (de 1h à 24h) (Strano et al., 2007)

### 2.2.2. Type de mutants

Sur la base de la structure cristalline du domaine de liaison à l'ADN de p53 en complexe avec l'ADN, les mutants ont été classés en deux catégories : les mutants de contact, où l'acide aminé muté est un acide aminé directement lié à l'ADN (ex : R248W, R273H ou R273C) et les mutants structurels qui comportent des mutations au niveau des résidus essentiels pour l'architecture globale de la surface de liaison d'ADN (ex : R248Q, R175H, G245S, R249S et R282W) (Cho et al., 1994) (Figure 14).

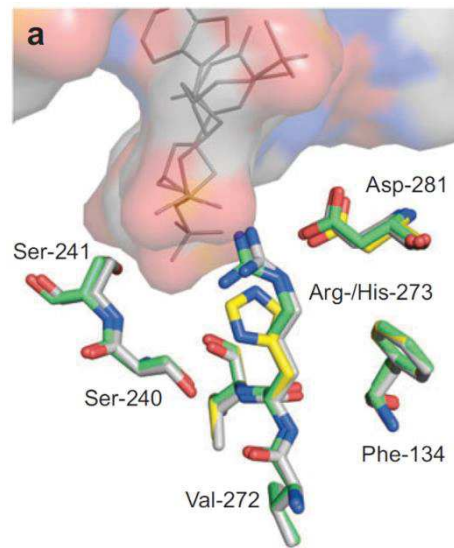


**Figure 14 : Représentation schématique des différentes formes de p53 : A : p53 WT se liant à l'ADN ; B : Mutant de contact gardant la même structure mais ne pouvant plus se lier à l'ADN ; C : Mutant structurel ou la conformation de p53 est affectée l'empêchant de se lier à l'ADN.**

#### 2.2.2.1. Les mutants de contact

Les mutations de p53 sont dans 20% des cas, des mutations d'un acide aminé en contact direct avec l'ADN, où les résidus 248 et 273 sont les plus mutés (Joerger and Fersht, 2008). Les deux mutations les plus fréquentes sont R273H et R273C (Joerger and Fersht, 2008). Dans les deux cas la thermodynamique de la protéine n'est que très faiblement affectée (Joerger et al., 2006). Les changements structurels sont très localisés et ne perturbent pas l'architecture globale de la surface de liaison à l'ADN et de la protéine (Figure 15). De plus, la conformation des chaînes latérales voisines, telles que Asp281 et Phe134, est pratiquement inchangée dans les structures cristallines de ces mutants (Joerger et al., 2005). La liaison du mutant R273H à l'ADN de GADD45 est environ 1000 fois moins importantes qu'avec la forme

sauvage, passant de  $4\text{nM} \pm 2$  pour p53 WT à  $1400\text{nM} \pm 200$  pour p53 R273H (Ang et al., 2006).

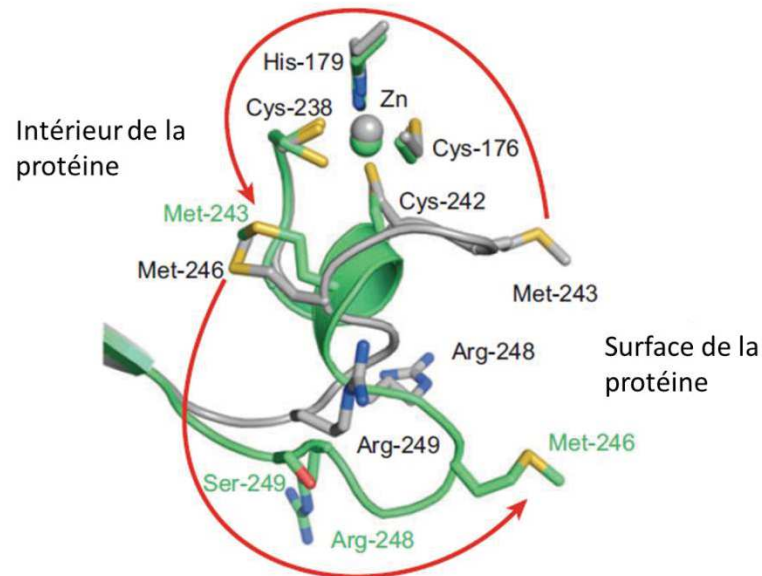


**Figure 15 : Structure du mutant p53 R273H (jaune : PDB 2BIM) superposé avec la structure de p53C (vert : PDB : 1UOL) ; L'ADN est présenté sous forme d'une représentation en surface. (Joerger et Fersht 2008).**

#### 2.2.2.2. Les mutants structuraux

Les mutations structurelles déstabilisent la conformation de p53 à des degrés divers, allant de légèrement déstabilisée pour le mutant p53 G245S à fortement déstabilisée pour le mutant p53 R282W (Bullock et al., 2000). La boucle L3 est le site des mutations G245S et R249S. La mutation G245S induit de petits changements conformationnels affectant principalement les résidus dans l'interface de dimérisation du complexe p53-ADN, affaiblissant la liaison à l'ADN (Joerger and Fersht, 2008). Les changements induits par le mutant R249S sont beaucoup plus importants, car le groupe guanidinium de R249 joue un rôle crucial dans la stabilisation de la conformation de la boucle L3. La mutation de R249 en serine rend la boucle beaucoup plus flexible générant un changement conformationnel de la protéine (Figure 16), affectant la liaison

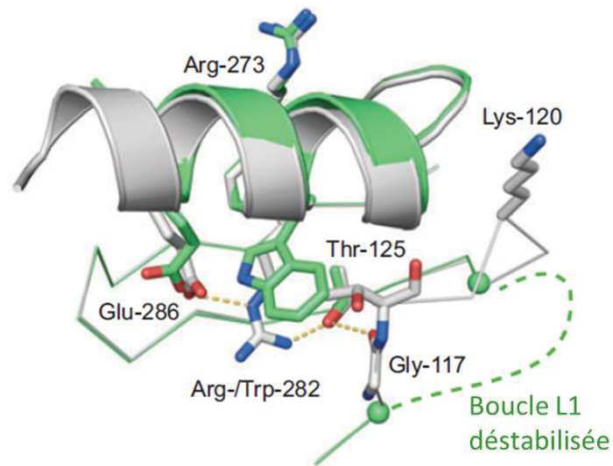
à l'ADN (via R248) et l'interface de dimérisation ce qui entraîne une diminution de la capacité de p53 à se lier à l'ADN (Joerger and Fersht, 2008). Enfin ces changements de structure induits par les mutants G245S et R249S perturbent la liaison à ASPP2 décrite plus haut (Tidow et al., 2006).



**Figure 16 : Boucle L3 de p53 R249S (PDB : 2BIO : vert) superposé à la boucle L3 de p53 WT (PDB : 2OCJ : Gris) : cette boucle subit un important changement suite à la mutation de l'Arg249 par une sérine. La Met243 exposée au solvant dans p53 WT et faisant partie de l'interface de dimérisation lors de la liaison à l'ADN, prend la place de la Met246 dans une poche hydrophobe (flèches rouge) dans p53 R249S (Joerger et Fersht 2008).**

La mutation R175H produit des changements similaires, perturbant probablement la région de liaison au zinc (Joerger and Fersht, 2008).

L'Arg282 située à l'opposé de la surface de liaison à l'ADN, est primordiale pour la stabilisation du motif boucle-feuillet-boucle. En effet celle ci relie l'hélice terminale du brin  $\beta$  S2 à la boucle L1 grâce à un réseau de de liaisons hydrogènes (Joerger and Fersht, 2008). Quand l'Arg282 est mutée en tryptophane (mutant R282W), cette liaison est perdue. De plus, la boucle L1 est perturbée par l'encombrement stérique de la chaîne latérale du tryptophane (Joerger and Fersht, 2008) (Figure 17).



**Figure 17: Motif boucle-feuillet-boucle de p53 R282W (PDB : 2J21, vert) superposé au même motif chez p53 WT (PDB : 1UOL, gris) (Joerger et Fersht 2008).**

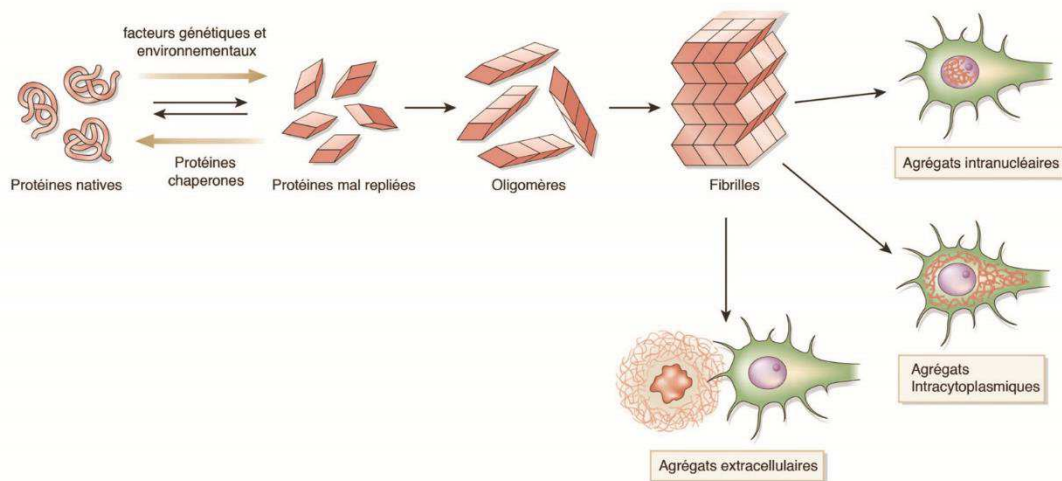
Il a été montré que le mutant R248Q induit des changements conformationnels tout le long du domaine de liaison à l'ADN. Ces changements sont semblables et aussi étendus que ceux engendrés par le mutant R249S et affectent aussi la structure des boucles L2 et L3. Bien que décrits dans un premier temps comme un mutant de contact, R248Q est aussi un mutant structurel (Ng et al., 2015; Wong et al., 1999).

### 2.2.3. Agrégation des mutants

Une des hypothèses pour expliquer la perte de fonction de transactivation, les effets dominants négatifs et le gain de fonction des mutants de p53 et donc la formation de tumeurs, serait que certains de ces mutants forment des agrégats de type amyloïde (Kim and An, 2016).

### 2.2.3.1. Principe de l'agrégation de type amyloïde

Le mauvais repliement des protéines menant à l'agrégation des protéines est présent dans de nombreuses pathologies humaines. Ces maladies sont appelées maladies PMD pour « Protein Misfolding Diseases » (maladies de mauvais repliement des protéines). Les PMD sont caractérisées par la formation d'oligomères de protéines, de protofibrilles et de fibrilles matures, qui peuvent s'accumuler de manière intra- ou extracellulaire dans plusieurs tissus (Figure 18) (Aguzzi and Rajendran, 2009; Chiti and Dobson, 2006).



**Figure 18 : Principe schématique de formation de fibrilles (<https://planet-vie.ens.fr/article/2383/maladies-neurodegeneratives>)**

Depuis le début des années 2000, de nombreuses maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer ( $\beta$ -amyloïde, tau), la maladie de Parkinson ( $\alpha$ -synucléine), la maladie de Huntington (polyglutamine-huntingtine), la polyneuropathie amyloïde familiale (transthyrétine), les maladies à prion (prion, PrPsc), la sclérose latérale amyotrophique (superoxyde dismutase 1) et le diabète de type II (polypeptide amyloïde des îlots) ont été étudiés pour comprendre comment le mauvais repliement et l'agrégation de protéines pouvaient générer des

pathologies (Aguzzi and Rajendran, 2009). Dans les années 1980, Stanley Prusiner parvient à expliquer la transmission de ces agrégats, ceci est appelé Hypothèse du prion (Prusiner, 1982). Les tendances récentes en matière d'agrégation de p53 reposent sur cette hypothèse du prion (Kim and An, 2016).

#### 2.2.3.2. Agrégation de p53 et cancer

En 1991, des formes de haut poids moléculaires de p53 furent décrites, et l'hypothèse émise était que ces agrégats formaient une structure quaternaire empêchant la dégradation rapide de p53 (Kraiss et al., 1991). Les recherches menées depuis ont prouvé que cette agrégation était de type amyloïde et pouvaient engendrer diverses pathologies dont des cancers. Il a été démontré que les domaines N-terminal et p53C forment des agrégats fibrillaires riches en feuillets  $\beta$  dans des conditions de dénaturation légère ou à pH acide (Ishimaru et al., 2003; Silva et al., 2010). Il a été montré que ces mutants colocalisaient avec des agrégats de type amyloïdes dans des biopsies de cancer (Levy et al., 2011).

Récemment, plusieurs études ont montré que les mutants structuraux, et en particulier le mutant R248Q, favorisent l'exposition d'un domaine naturellement enfoui dans p53 WT (251-257), conduisant à la formation d'agrégats de type amyloïde dans le cytoplasme et donc à une protéine dysfonctionnelle (Soragni et al., 2016; Xu et al., 2011). Il a été démontré que le segment 251-257 : ILTIITL était nécessaire et suffisant pour l'agrégation de p53 *in vitro* et dans des lignées cellulaires (Xu et al., 2011). Cependant des études de prédiction de structure secondaire de la propension à l'agrégation du domaine de liaison à l'ADN p53C révèlent que plusieurs autres régions sont également sujettes à l'agrégation (Ano Bom et al., 2012; Ghosh et al., 2014; Soragni et al., 2016). De plus, il a été démontré que les agrégats pouvaient être

formés de mutants associés à p53 WT ou avec les paralogues p63 et p73 (Ano Bom et al., 2012; Xu et al., 2011). Un certain nombre d'études décrivent l'agrégation des mutants de p53 dans différents contextes (Tableau 1).

Mutation	<i>In vitro/in vivo</i>	Conditions	Références
R248Q	<i>In vitro</i>	37°C ; pH 7,2	(Ano Bom et al., 2012)
R248Q	<i>In vitro</i>	Dénaturation douce par pression ou température	(Ishimaru et al., 2003)
R248Q	<i>In vivo</i>	tissus cancéreux du sein	(Levy et al., 2011)
R175H	<i>In vitro</i>	Protéine sans Zinc (ApoDBD)	(Butler and Loh, 2003)
R337H	<i>In Vitro</i>	pH 4 ; Haute température	(Lee et al., 2009)
G334V	<i>In vitro</i>	Température et pH physiologique	(Higashimoto et al., 2006)
R248Q	<i>In cellulo</i>	Cellules primaires de cancer ovarien	(Soragni et al., 2016)

**Tableau 1 : Exemples d'études montrant la propension à l'agrégation de mutants de p53.**

Ensemble, ces résultats impliquant une agrégation de p53 dans les cancers confortent l'hypothèse d'une activité de type prion.

### 2.3. Gain de fonction : Mécanisme

Plusieurs mutations entraînent un gain de fonction, ce qui confère aux mutants p53 des activités contribuant à l'hyperprolifération cellulaire, à une tumorigénicité accrue, à la formation de métastases, la diminution de la sensibilité aux médicaments chimio-thérapeutiques etc. Par



exemple le mutant R175H favorise l'activation du gène de la multirésistance aux médicaments, MDR1 (Chin et al., 1992). Les mutants R248Q et R273C induisent une surexpression de HER2 dans les cellules cancéreuses (Román-Rosales et al., 2018). De plus, il a été démontré que p53 R248Q, renforçait le caractère invasif in vitro des cellules cancéreuses du cancer du poumon humain NCI-H1299 (Yoshikawa et al., 2010). Lors d'un stress oxydatif, le mutant R273H inhibe l'activation et la fonction de NRF2, un facteur de transcription qui induit la réponse antioxydante, générant un taux élevé et une accumulation de ROS dans les cellules cancéreuses (Kalo et al., 2012). Les mutants R248QW, R249S et R175H favorisent une des anomalies du centrosome, comme par exemple l'augmentation de sa taille du entraînant des défauts mitotiques et une multinucléation (Noll et al., 2012).

Une liste exhaustive des gains de fonction des différents mutants a été établie (Muller and Vousden, 2014), dont certains exemples sont décrits ci-dessous.

Différentes études ont proposé plusieurs mécanismes qui permettent aux mutants de p53 d'acquérir de nouvelles fonctions d'oncogéniques dans les cellules tumorales (Figure 14).

### 2.3.1. Interaction avec p63 et p73

P63 et p73 sont deux protéines aux structures et fonctions homologues de p53, capables de se lier et d'activer de nombreux gènes cibles de p53 en réponse à un stress cellulaire (Levrero et al., 2000). P63 et p73 forment des homo-tétramères mais aussi des hétéro-tétramères entre eux mais pas avec p53. Or Il a été montré que plusieurs formes de p53 mutantes interagissaient avec p63 et p73 par l'intermédiaire de leurs domaines de liaison à l'ADN afin d'inhiber les activités de transcription de p63 et p73 (Gaiddon et al., 2001). Par exemple, plusieurs mutants de p53 sont capables de se lier à p63, ce qui engendre l'activation de TGF $\beta$

fortement impliquée dans la migration cellulaire et le développement de métastases (Adorno et al., 2009).

### 2.3.2. Interaction avec les facteurs de transcription

Certaines formes mutantes de p53 peuvent interagir avec d'autres facteurs de transcription, modulant ainsi l'expression de leurs gènes cibles. Par exemple, les mutants R175H et R273H interagissent avec le facteur de transcription NF- $\gamma$ , menant à une augmentation aberrante de l'expression de gènes cibles du cycle cellulaire et en particulier une sur-activation du complexe CDK1/Cycline B (Di Agostino et al., 2006). Le mutant R175H se lie au récepteur de vitamine (VDR) augmentant la transactivation de certains gènes et inhibant la répression d'autres. De plus cette interaction converti la vitamine D en un agent anti-apoptotique (Stambolsky et al., 2010). Une interaction a été montrée avec la famille de facteurs de transcription SREBP (protéine régulatrice d'élément de stérol) qui régule l'expression de gènes dans la voie du mévalonate afin de perturber l'architecture tissulaire dans les cellules cancéreuses du sein (Freed-Pastor and Prives, 2012).

### 2.3.3. Interaction directe avec l'ADN

Les formes mutantes de p53 sont aussi des facteurs de transcription qui régulent, positivement ou négativement un certain nombre de gènes impliqués dans les différentes étapes de la formation d'une tumeur (ex : Myc, Fos, PCNA, IGF1R, EGR1, NF- $\kappa$ B2, BCL-xL, IGF2, VEGFA etc.) (Liu et al., 2014). La régulation de ces gènes par les mutants favorise donc la prolifération, l'anti-apoptose, l'inflammation et l'angiogenèse. Alors que la forme sauvage de p53 se lie à

une séquence spécifique d'ADN bien caractérisée, cela n'a pas été déterminé pour les formes mutantes qui se lient directement à l'ADN en fonction de leur structure (Liu et al., 2014). L'exemple le plus décrit est l'interaction des mutants avec les régions d'attachement à la matrice nucléaire (MARs) (Will et al., 1998).

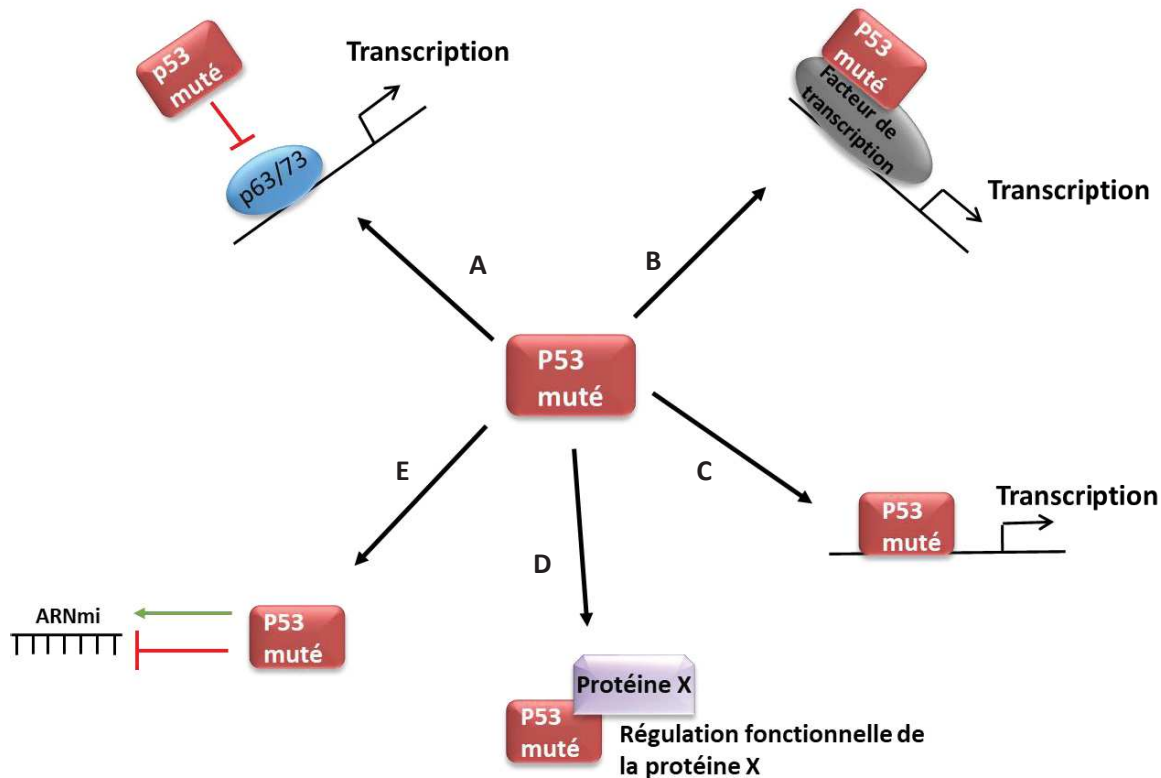
#### 2.3.4. Interaction avec d'autres partenaires protéiques

Alors que p53 WT agit principalement comme un facteur de transcription, les mutants acquièrent d'autres fonctions non transcriptionnelles à travers l'interaction directe avec d'autres protéines. Par exemple, les mutants R248W et R273H interagissent avec MRE11, une ADN nucléase nécessaire pour la réparation de l'ADN, favorisant l'instabilité génomique et la progression tumorale (Song et al., 2007). La protéine PML (promyelocytic leukemia) se lie à différents mutants augmentant ainsi leur activité transcriptionnelle (Haupt et al., 2009). Dans les cellules du cancer du sein, la Prolyl isomérase Pin 1 se lie à différents mutants de p53 augmentant leur activité transcriptionnelle et favorisant l'agressivité tumorale (Girardini et al., 2011).

#### 2.3.5. Régulation des ARNmi

Enfin il a été montré que différents mutants de p53 pouvaient réguler la transcription des ARNmi contribuant ainsi à leur gain de fonction. Les mutants R273H, R175H, C135Y et R248Q se lient directement au promoteur de miR-130b et inhibent sa transcription, ce qui favorise la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) et l'invasion des cellules cancéreuses dans le cancer de l'endomètre (Dong et al., 2013). Le mutant R273H se lie à la région du promoteur

miR-27a et réprime son expression. EGFR est une cible directe de miR-27a, en réprimant miR-27a, p53 R273H favorise une activation prolongée de ERK1 / 2 induite par EGF, favorisant ainsi la prolifération cellulaire et la tumorigenèse (Wang et al., 2013).



**Figure 19 : Mécanismes de gain de fonction des mutants de p53 : A : Inhibition de p63/73 ; B : Interaction et régulation de différents facteurs de transcription ; C : Liaison directe avec l'ADN ; D : Interaction avec d'autres protéines ; E : régulation de ARNmi.**

### 2.3.6. Approches thérapeutiques pour restaurer les fonctions de p53

Ces formes mutantes de p53 mal repliées et formant des agrégats constituent des cibles attractives pour les thérapies capables de restaurer la structure et la fonction du p53 WT. De nombreuses études ont montré que la réactivation de p53 était préjudiciable aux cellules cancéreuses. Par exemple, la réexpression de p53 WT dans des cellules cancéreuses sans

p53 conduit à une apoptose ou à une sénescence dans des cellules en culture. Dans des modèles murins, la réintroduction de p53 WT dans des tumeurs déficientes en p53 conduit à une régression tumorale (Ventura et al., 2007; Xue et al., 2007), tandis que la réintroduction de p53 de type sauvage dans des tumeurs porteuses de p53 mutant inhibe la croissance tumorale (Wang et al., 2011). Au cours des dernières années, plusieurs stratégies ont été développées afin de réactiver les fonctions de p53 (Freed-Pastor and Prives, 2012; Muller and Vousden, 2014) (Figure 20).

#### 2.3.6.1. Thérapie génique

Le 1<sup>er</sup> transfert du gène p53 induit par des adénovirus a été effectué en 1996 pour le traitement du carcinome du poumon non à petites cellules (Roth et al., 1996). L'adénovirus recombinant exprimant p53 (rAd-p53) a été développé plus tard, ce qui offre une meilleure efficacité de transduction et une toxicité inférieure. Le rAd-p53, connu sous le nom de gendicine, a été approuvé pour un usage clinique pour le traitement du cancer de la tête et du cou en Chine (Tazawa et al., 2013).

#### 2.3.6.2. Réactivation des fonctions de p53 WT à l'aide de petites molécules

MDM2 étant le régulateur négatif de p53, il est fréquemment surexprimé dans les cancers, entraînant un dysfonctionnement de p53. Une petite molécule non génotoxique, appelée

**Nutlin-3**, fut la 1<sup>ère</sup> à être développée pour se lier à MDM2 et ainsi inhiber l'interaction MDM2-p53, conduisant à l'inactivation de p53 WT dans les cellules tumorales. Nutlin-3 induit un arrêt du cycle cellulaire, l'apoptose et d'autres activités anti tumorales régulées par p53 dans diverses cellules tumorales en culture dans des xénogreffes chez la souris (Vassilev, 2004). Depuis d'autres molécules ciblant MDM2 ont été développées et certaines sont en phase clinique 1 (Burgess et al., 2016).

Une autre molécule, appelée **RITA**, se lie directement à p53 et perturbe la liaison avec MDM2. Activant ainsi p53 et supprimant la croissance tumorale in vivo (Issaeva et al., 2004).

**CP-31398**, un dérivé de quinazoline, stabilise p53 WT et augmente son activité transcriptionnelle dans les cellules (Wang et al., 2011). Cependant, une étude a montré que CP-31398 était toxique pour le foie et d'autres tissus dans des modèles animaux, suggérant la nécessité de modifier la structure du CP-31398 pour réduire sa toxicité (Johnson et al., 2011).

D'autres études sur des dérivés de quinazoline ont montré une réactivation des fonctions de p53 dans des cellules tumorales, fournissant ainsi une base pour le développement de nouveaux médicaments (Sutherland et al., 2012).

#### 2.3.6.3. Inactivation ou déstabilisation des p53 mutants à l'aide de petites molécules

L'inactivation ou la déstabilisation des mutants de p53 mutant est une stratégie importante en cours de développement pour le traitement du cancer.

Des études récentes ont montré que les protéines HDAC6 / Hsp90 jouent un rôle important dans la stabilisation des mutants dans les cellules tumorales. L'inhibition de HDAC6 ou de

Hsp90 déstabilise les formes mutantes de p53 spécifiquement dans les cellules cancéreuses et réduit ainsi la formation de tumeur ou la croissance tumorale. De plus, il a été démontré que **SAHA**, un inhibiteur de HDAC, déstabilisait la p53 mutante dans les cellules tumorales (Li et al., 2011a, 2011b). Il faut cependant veiller à déterminer le statut de p53 dans les tumeurs lorsque des inhibiteurs d'HDAC sont utilisés en tant qu'agents thérapeutiques. En effet il a été récemment démontré que SAHA (suberoylanilide hydroxamic acid) diminuait l'expression de p53 WT (Yan et al.2013).

Une petite molécule, nommée **RETRA** (Reactivation of transcriptional reporter activity), inhibe l'interaction p53muté-p73 et libère ainsi p73 restaurant sa fonction de transcription. RETRA transactive les gènes cibles de p53 dans des tumeurs porteuses de p53 mutés et empêche la croissance tumorale de xénogreffes chez la souris (Kravchenko et al., 2008).

#### 2.3.6.4. Réactivation des fonctions dans les formes mutantes

Des études ont permis d'identifier une classe de petites molécules qui convertissent les protéines p53 mutantes en formes présentant des fonctions p53 de type sauvage.

**PRIMA-1** (p53 réactivation and induction of massive apoptosis) est une molécule capable de rétablir la liaison à l'ADN spécifique de séquences et de convertir la conformation de p53 muté en conformation de type sauvage, conduisant ainsi à la transactivation des gènes cibles de p53. PRIMA-1 sensibilise les cellules cancéreuses à la chimiothérapie et inhibe la croissance tumorale in vivo (Bykov et al., 2002).

L'analogue de PRIMA-1, **APR-246**, fait l'objet d'un essai clinique de phase Ib / II (PiSARRO) chez des patientes atteintes d'un cancer de l'ovaire (code d'essai clinique NCT02098343) (Duffy et al., 2017).

Une étude récente a démontré qu'un peptide, **ReAcp53**, dérivé du domaine d'agrégation de p53, pouvait inverser l'agrégation du mutant p53 R248Q et restaurer sa localisation nucléaire et sa fonction de facteur de transcription *in vivo* (Soragni et al., 2016).

Une étude de modélisation moléculaire a permis d'identifier une poche de liaison ouverte de manière transitoire entre la boucle L1 et le feuillet  $\beta$  S3 du domaine principal p53. Le criblage virtuel contre cette poche a montré que l'acide stictique peut être un composé potentiel de réactivation de p53. Cette étude indique que la poche L1 / S3 est une cible pour la réactivation pharmaceutique des mutants p53 (Wassman et al., 2013)

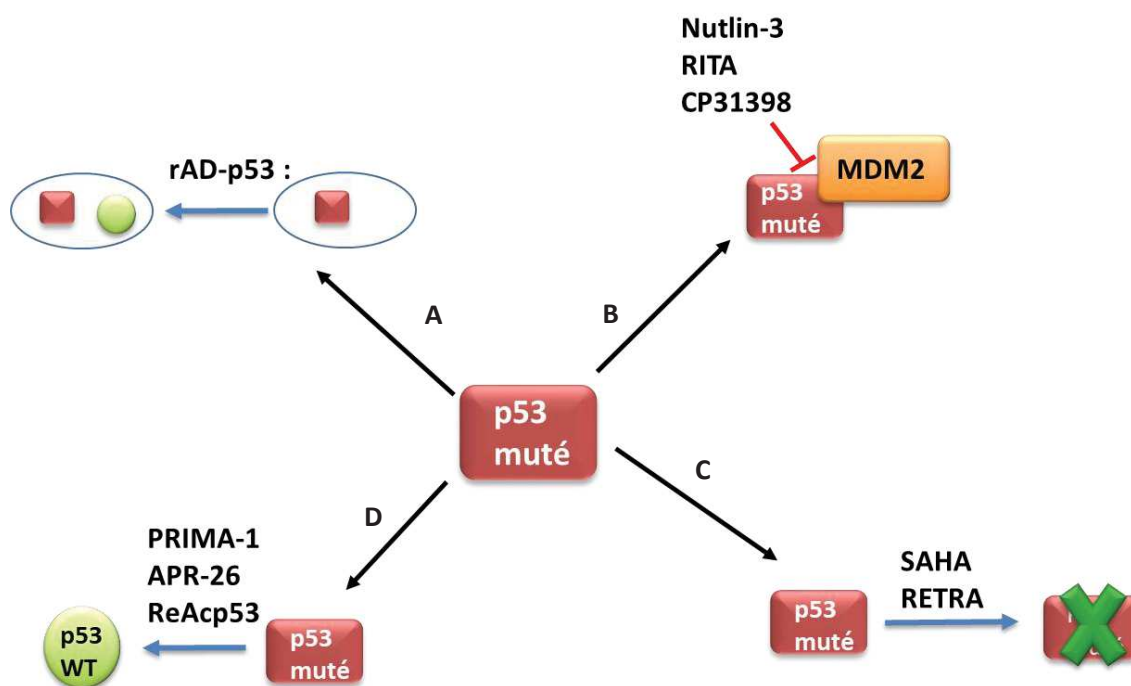


Figure 20 : Stratégies thérapeutiques afin de restaurer les fonctions de p53 : A : Thérapie génique ; B : Inhibition de l'interaction p53-MDM2 ; C : Inactivation de p53 muté ; D : Conversion de p53 muté en p53 WT.



### 3. Biocapteurs / Biosenseurs

#### 3.1. Définition d'un biocapteur / biosenseur

Les biocapteurs peuvent être définis comme des outils combinant un élément biologique ou biomimétique capable de reconnaître une cible spécifique, avec un transducteur physicochimique qui convertit l'événement de reconnaissance en un signal analytique détectable et mesurable (Turner et al., 1987). Ils permettent de détecter les protéines cibles de manière sensible, robuste, spécifique et reproductible, et répondent aux changements cibles de manière dynamique et réversible (Figure 21).

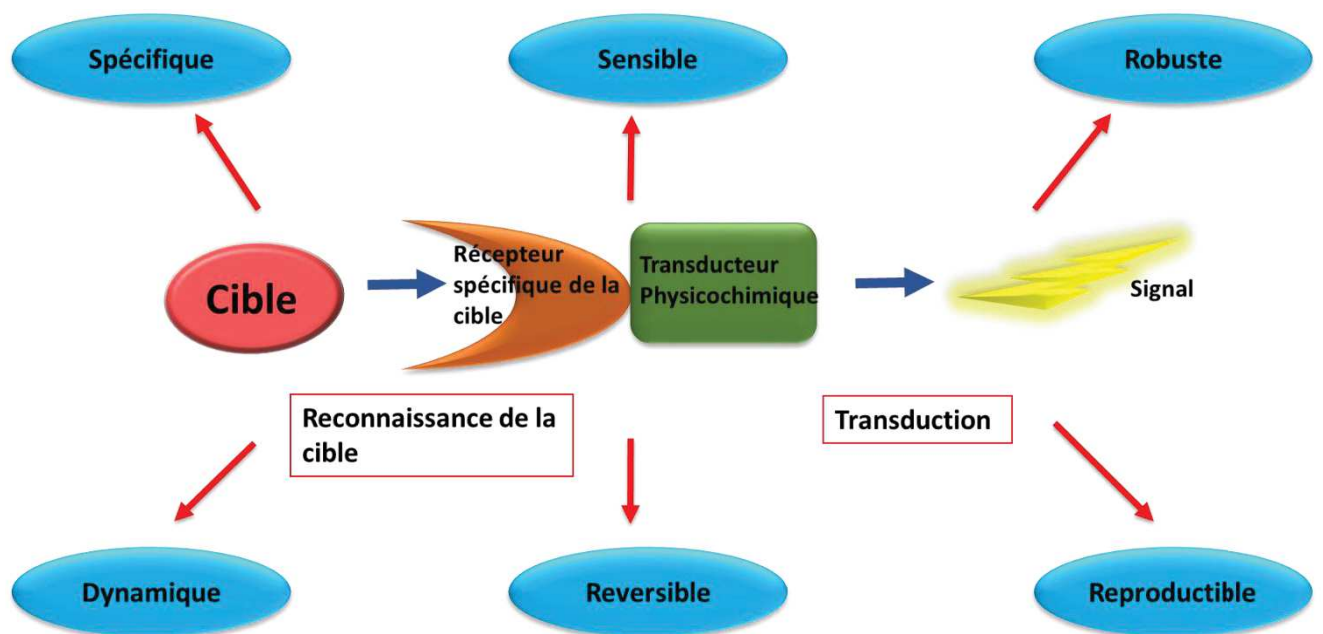


Figure 21: Schéma du concept de biosenseur (adapté à partir de Morris et al. 2009).

Le premier « biocapteur » fut décrit en 1953 par L.C Clark. Il s'agit d'un capteur électrochimique basé sur une électrode à oxygène pour enregistrer les variations de tensions

d'oxygène dans le sang (Clark et al., 1953). Il fut ensuite adapté afin de contrôler le glucose dans le sang des patients (Clark and Lyons, 1962). Depuis, le développement de biocapteurs électrochimiques, électroniques et microbiens a permis la détection d'ions, de petites molécules, de protéines ou d'ADN (Morris, 2009; Sokolov et al., 2009; Su et al., 2011; Tîlmaciu and Morris, 2015; Turner, 2013) (Figure 22). Depuis la fin des années 1990 et le développement des sondes fluorescents et des biorecepteurs conjugués à celles-ci, le terme anglais « biosenseur » a été largement adopté. Le terme « biosenseurs » fluorescents sera donc utilisé par la suite.

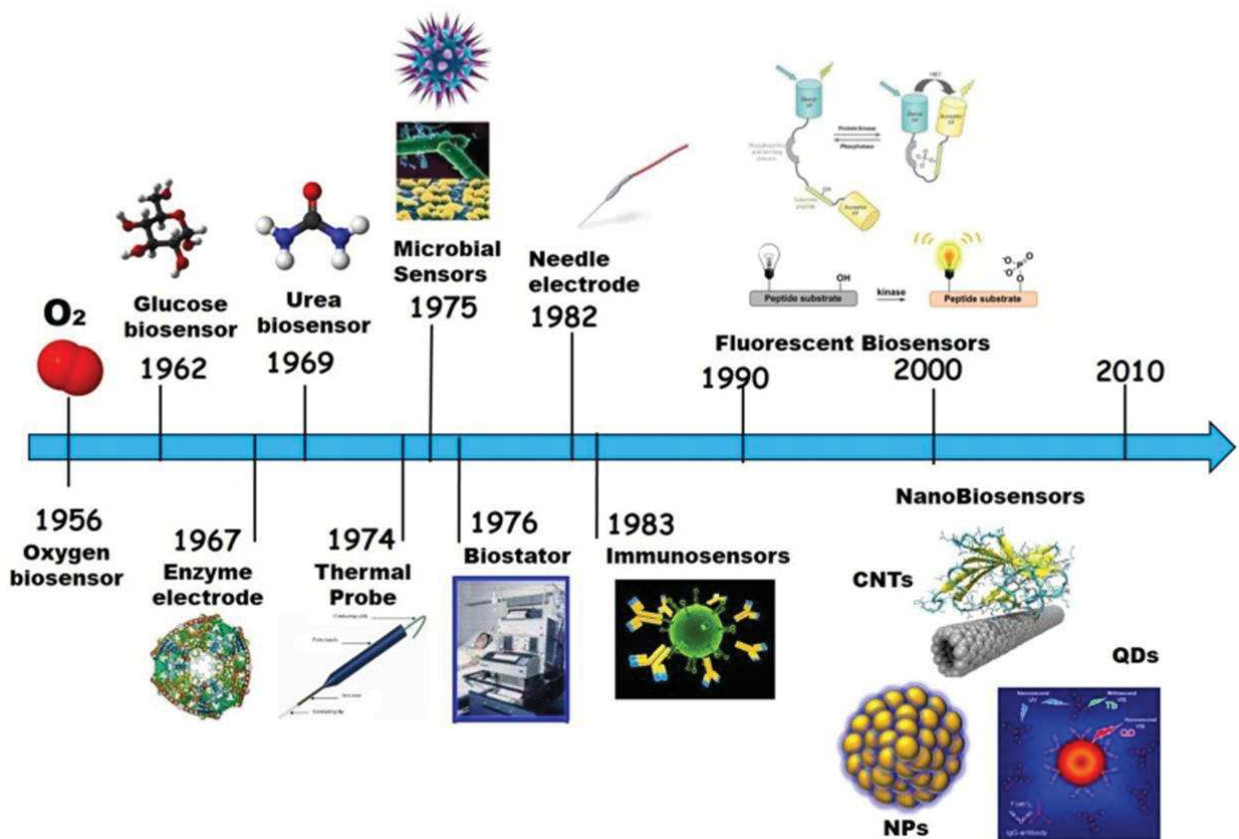
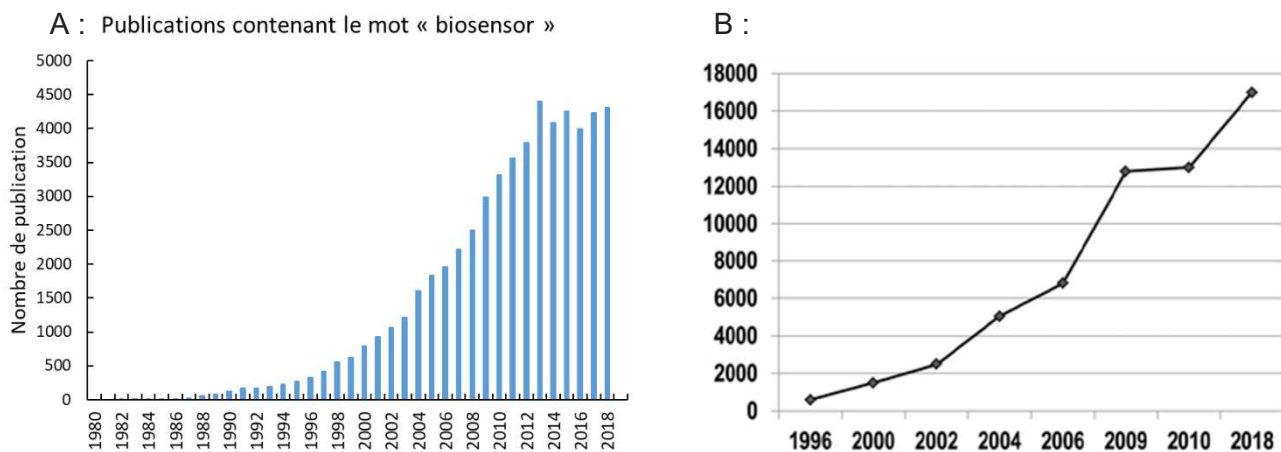


Figure 22 : Historique du développement de biocapteurs / biosenseurs (Tîlmaciu and Morris, 2015).

Les champs d'applications des biocapteurs / biosenseurs s'est développé au cours des deux dernières décennies. Ils sont maintenant utilisés dans les domaines de la sécurité des aliments, du contrôle des processus et de la surveillance de l'environnement, de la défense et de la sécurité, ainsi que dans le domaine médical (du diagnostic à la découverte de médicaments) (Turner, 2013) (Figure 23).



**Figure 23 : A : Graphique de l'évolution des recherches sur les « biosenseurs » entre 1980 et 2018 (Source Pubmed : Août 2019) ; B : estimation du marché mondial des biosenseurs à partir de diverses sources commerciales en US\$ millions (Turner et al. 2013b).**

Un biosenseur optique indique la reconnaissance de sa cible par des changements d'émission de la lumière (UV, visible et infrarouge). Le 1<sup>er</sup> biosenseur optique, appelé optode, a été décrit en 1975 pour mesurer le dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>) (Lübbbers and Opitz, 1975). Il existe différentes méthodes de détection de la cible, comme par exemple la résonance plasmonique de surface (SPR : Surface Plasmon Resonance), l'absorbance, la phosphorescence, la luminescence, l'anisotropie ou encore la fluorescence. Des développements plus récents de biocapteurs optiques basés sur les technologies de fluorescence ont joué un rôle central dans la recherche fondamentale et biomédicale moderne, notamment pour la détection d'activités

fonctionnelles enzymatiques par imagerie (Ibraheem and Campbell, 2010; Lemke and Schultz, 2011; Morris, 2009; Nhu Ngoc Van and Morris, 2013; Wang et al., 2010).

### 3.2. Biosenseurs fluorescents

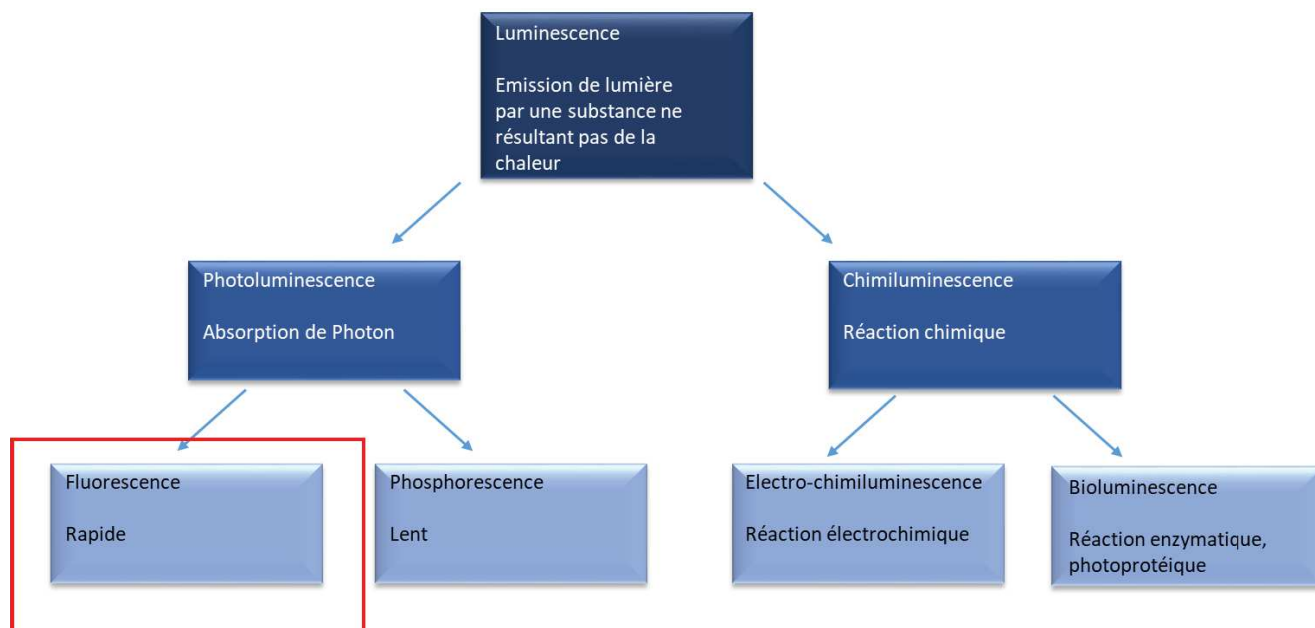
Pour le développement de notre biosenseur nous avons opté pour une stratégie de fluorescence, en effet les biosenseurs fluorescents présentent de nombreux avantages. Leur conception et production sont faciles (approche de biologie moléculaire, synthèse peptique, production bactérienne puis purification etc.) et ils peuvent être transfectés ou introduits à l'aide de peptides vecteurs dans des cellules (par exemple TAT (Damayanti et al., 2013) ou Pep1 et CADY2 couramment utilisés dans notre équipe (Kurzawa et al., 2010; Van et al., 2014)).

Il existe deux sortes de biosenseurs fluorescents : les biosenseurs génétiquement codés utilisant les protéines fluorescentes (FP : Fluorescent Proteins) et les biosenseurs peptidique/protéiques non génétiquement codés utilisant majoritairement des sondes fluorescentes synthétiques.

Afin de comprendre le fonctionnement des biosenseurs fluorescent il est important de connaître les principes de base de la fluorescence.

#### 3.2.1. Principes de la fluorescence

La photoluminescence est divisée en deux catégories, en fonction de la nature de l'état excité : La fluorescence et la photoluminescence (Lakowicz, 2006) (Figure 24).



**Figure 24 : Les différents types de luminescence : La fluorescence est une des 2 composantes de la photoluminescence qui diffère de la phosphorescence par une durée de vie plus courte (Nanoseconde vs milliseconde à plusieurs heures).**

Elle est définie comme l'émission de lumière provenant de toute substance et se produit à partir d'états excités électroniquement. Plus précisément, ce processus implique dans un 1<sup>er</sup> temps l'absorption de photons par un fluorophore générant un état excité et dans un 2<sup>ème</sup> temps, la relaxation de l'état excité par l'émission d'un autre photon (Figure 25A). Lorsqu'une molécule absorbe un photon, elle gagne de l'énergie et entre dans un état excité. Afin de revenir à un état stable, la molécule va alors perdre ce surplus d'énergie sous forme de photon. La cinétique d'émission lors de la phosphorescence peut durer de la milliseconde jusqu'à l'heure, résultant en la relaxation électronique triplet – singulet, alors que la cinétique de la fluorescence est de l'ordre de la nanoseconde, résultant d'une relaxation singulet - singulet. Les différents états de transitions électroniques sont décrits dans le diagramme de Jablonski, décrit en 1933 (Jablonski, 1933) (Figure 25A). En raison d'une perte partielle d'énergie, un photon émis transporte moins d'énergie et se caractérise par une longueur d'onde supérieure

à celle du photon d'excitation. La différence entre l'énergie photonique émise et l'énergie photonique excitée est appelée « déplacement de Stokes » (Stokes George Gabriel, 1852) et varie en fonction de la polarité du solvant (Figure 25B).

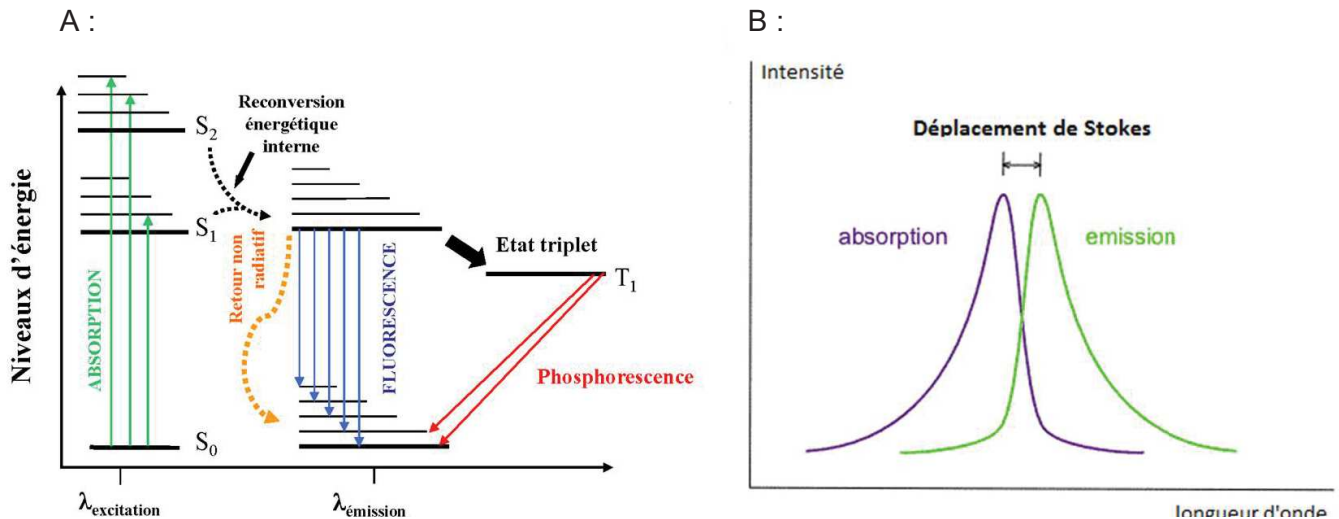


Figure 25 : A : diagramme de Jablonski ; B : Schéma du déplacement de Stokes.

Les molécules capables d'absorber et de réémettre de la lumière sont appelées fluorophores. Elles possèdent leur propre spectre d'absorption et d'émission. Les fluorophores contiennent généralement plusieurs groupes aromatiques combinés, ou molécules planes ou cycliques avec plusieurs liaisons  $\pi$  (Lakowicz, 2006). Certains fluorophores sont présent dans la vie quotidienne, comme la quinine dans le « Schweppes », ou encore la rhodamine dans l'antigel.

Leurs transitions d'état électronique sont associées à une longueur d'onde ( $\lambda$ ) et une énergie (E) particulières requises pour leur excitation. La longueur d'onde de la lumière est inversement proportionnelle à son énergie et peut être illustrée par une l'équation  $E = \frac{hc}{\lambda}$  où

« h » est la constante de Planck avec une valeur de  $6.626 \cdot 10^{-34}$  J.s et « c » la vitesse de la lumière avec une valeur constante de  $3 \cdot 10^8$  m.s<sup>-1</sup>. Chaque fluorophore est caractérisé par :

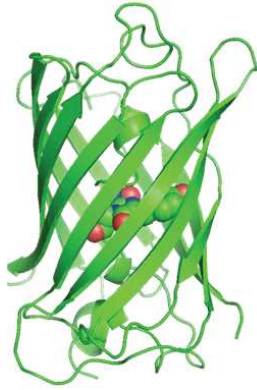
- ✓ **Sa longueur d'onde maximale d'excitation et d'émission ( $\lambda$ )** correspondant au pic dans les spectres correspondant, Elle est exprimée en nanomètre (nm)
- ✓ **Son coefficient d'extinction molaire ( $\epsilon$ )** qui est lié à sa capacité d'absorber la lumière à une longueur d'onde donnée. Il est exprimé en  $\text{Mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$
- ✓ **Son rendement quantique ( $\phi$ )**, correspondant à sa capacité à réémettre de l'énergie absorbée. Il est égal aux nombre de photons émis divisé par le nombre de photons absorbés. C'est donc un rapport compris entre 0 et 1.
- ✓ **Sa durée de vie ( $\tau$ )**, qui est définie comme le temps moyen pendant lequel le fluorophore reste dans son état excité avant d'émettre un photon, typiquement entre 0,1 et 100 ns.

Le cycle excitation-émission peut se répéter jusqu'à ce que le fluorophore soit endommagé dû à une illumination prolongée. Ce phénomène est appelé « photoblanchiment ».

### 3.2.2. Biosenseurs fluorescents génétiquement codés

Les biosenseurs fluorescents génétiquement codés dépendent des protéines autofluorescentes (FP : Fluorescent Protein). Les FPs peuvent être génétiquement fusionnées en N-ter ou en C-ter avec une séquence substrat (Frommer et al., 2009). Le biosenseur peut être exprimé ectopiquement au sein du système vivant étudié.

La GFP (Green fluorescent Protein) fut la 1ère protéine fluorescente découverte en 1962. Elle a été isolée chez la méduse bioluminescente *Aequorea Victoria* (Shimomura et al., 1962). Sa structure cristalline a permis de mettre en évidence un chromophore issu de la cyclisation autocatalytique de 3 acides aminés portés par une hélice centrale, à l'intérieur d'un « baril » de 11 feuillets  $\beta$  (Orm et al., 1996) (Figure 26).



**Figure 26 : Structure cristalline de la GFP (PDB : 1EMA) : le chromophore porté par l'hélice centrale à l'intérieur d'un « baril » formé de onze feuillets  $\beta$ .**

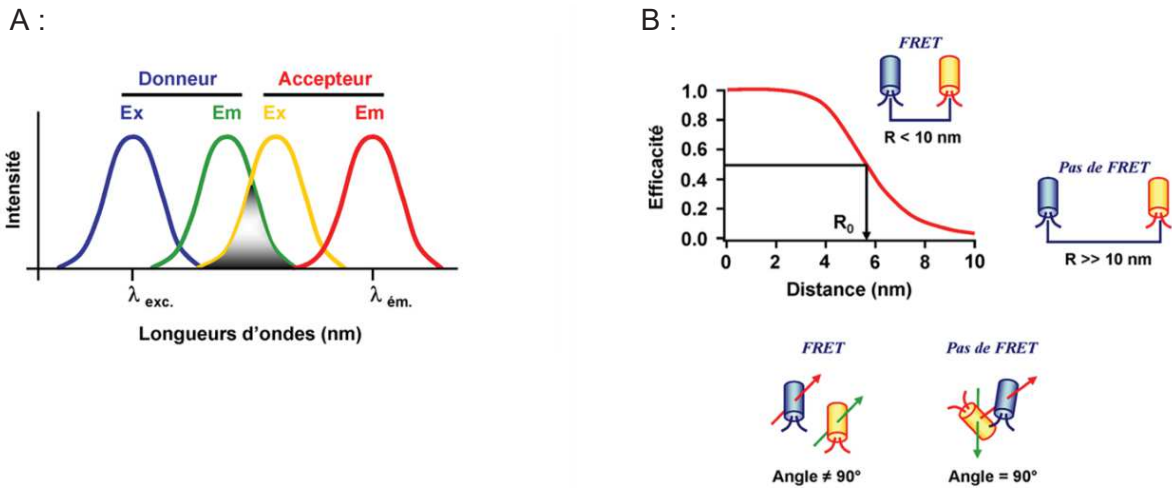
Dans les années 1990, la GFP fut clonée, exprimée et optimisée (Tsien, 1998), ce qui a permis le développement de nombreuses protéines fluorescentes telles que CFP (Cyan Fluorescent Protein) ou YFP (Yellow Fluorescent Protein) (Pakhomov and Martynov, 2008).

Dans le cas des biosenseurs génétiquement codés, la réponse à la cible est mesurée par transfert d'énergie de résonance Förster ou FRET (Förster Resonance Energy Transfer) (Förster, 1948), entre deux protéines fluorescentes génétiquement codées, l'une donneuse, l'autre acceptrice par couplage dipôle-dipôle non radiatif (Figure 27A). Trois conditions sont nécessaires pour que le FRET soit efficace entre le donneur et l'accepteur (Stryer and Haugland, 1967) (Figure 27B) :

- ✓ Le chevauchement du spectre d'émission du donneur et du spectre d'absorption de l'accepteur.
- ✓ L'orientation favorable des moments dipolaires de transition des fluorophores donneurs et accepteurs
- ✓ La distance entre les deux fluorophores : la distance est généralement comprise entre 1nm et 10nm

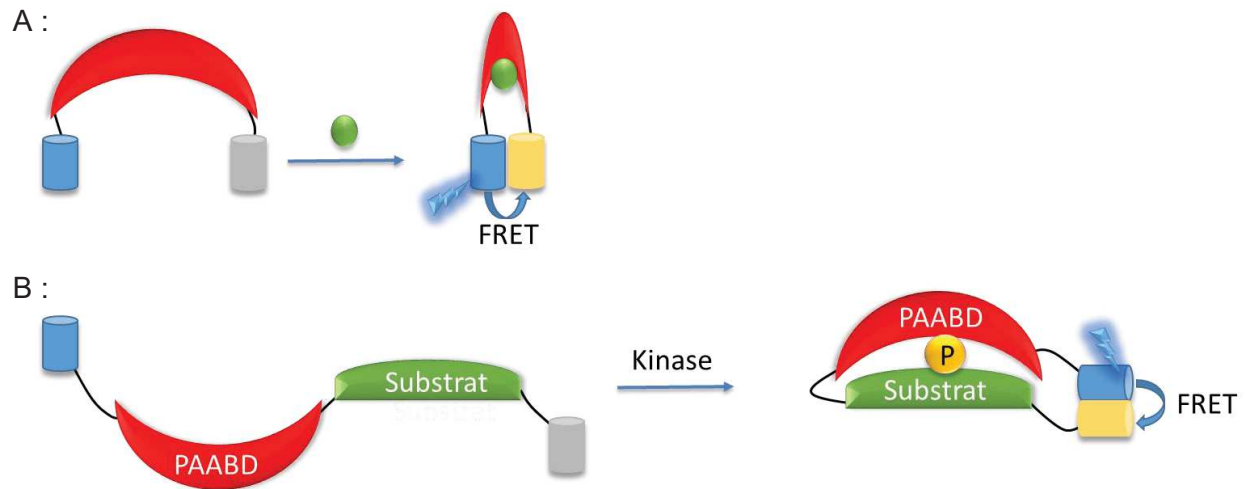


Le FRET conduit une augmentation de l'intensité de fluorescence de l'accepteur et une diminution de l'intensité de la fluorescence du donneur associée à une diminution de la durée de vie du donneur. C'est une technique couramment utilisée pour mesurer des interactions protéine-protéine ; un changement conformationnel, ou encore l'activité d'une protéine (Ibraheem and Campbell, 2010; Lemke and Schultz, 2011).



**Figure 27 : Principe du FRET : A : Spectre d'excitation et d'émission du couple donneur et accepteur ; B : Conditions nécessaires au fonctionnement du FRET.**

Un large panel de biosenseurs génétiquement codés a été alors développé permettant de visualiser de nombreux processus biologiques (Frommer et al., 2009; Nhu Ngoc Van and Morris, 2013). Par exemple, une interaction avec un partenaire protéique ou une molécule peut induire un changement conformationnel engendrant le rapprochement du donneur et de l'accepteur et le FRET (Figure 28A). L'activité des protéines kinases peut-être également suivie, suite à la phosphorylation de la partie substrat du biosenseur, le domaine de reconnaissance de la phosphorylation (PAABD : Phospho Amino Acid Binding Domain) va se replier sur le substrat phosphorylé rapprochant ainsi le donneur et l'accepteur (Figure 28B).



**Figure 28 : Exemple d'utilisation de biosenseurs génétiquement codés : A : Changement conformationnel ; C : Activité kinase (PAABD : Phospho Amino Acid Binding Domain).**

### 3.2.3. Biosenseurs peptidiques/protéiques fluorescents

Une autre famille de biosenseurs fluorescents est celle des biosenseurs non génétiques basés sur le couplage d'une sonde fluorescente synthétique sur un peptide, une protéine ou un polymère.

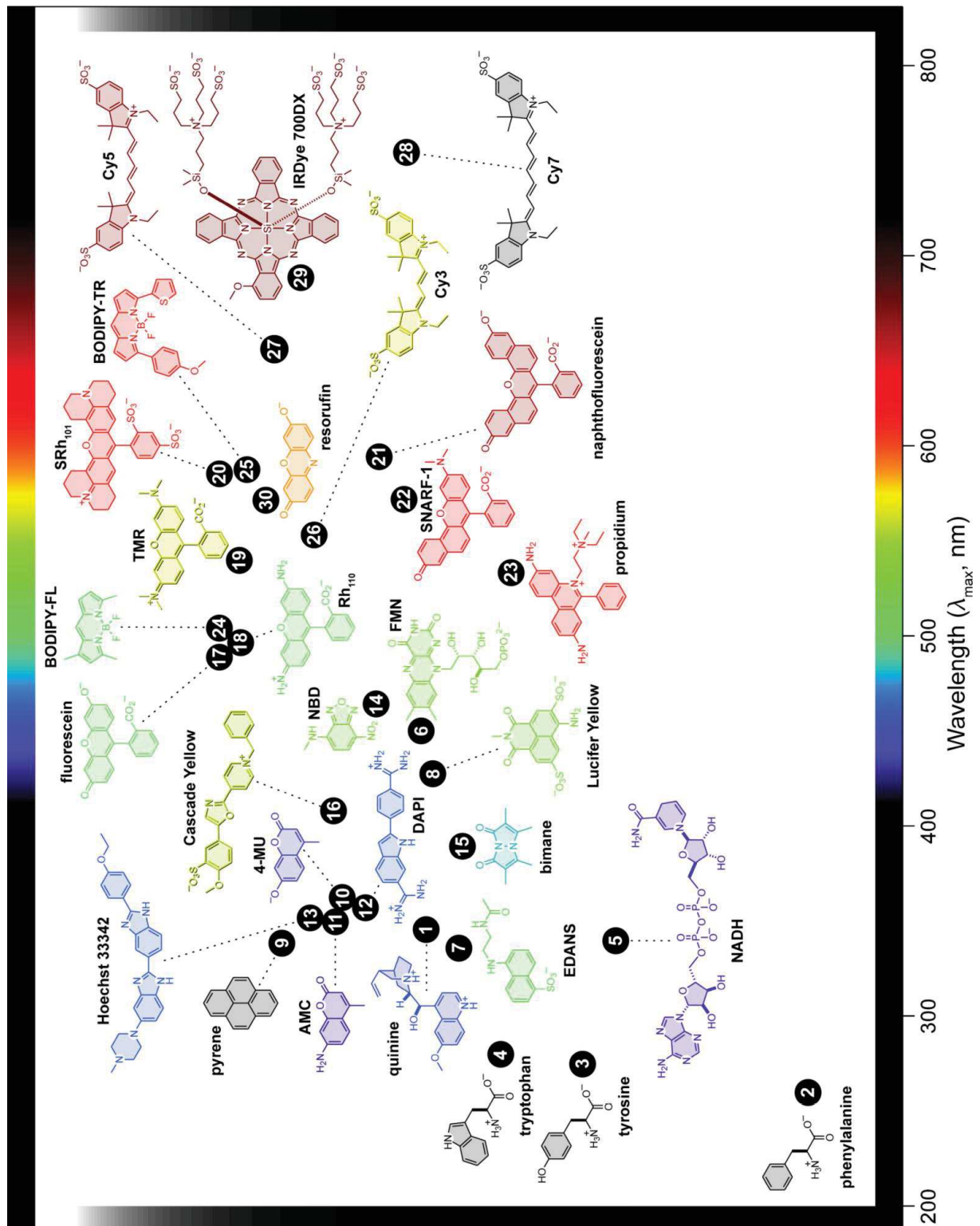
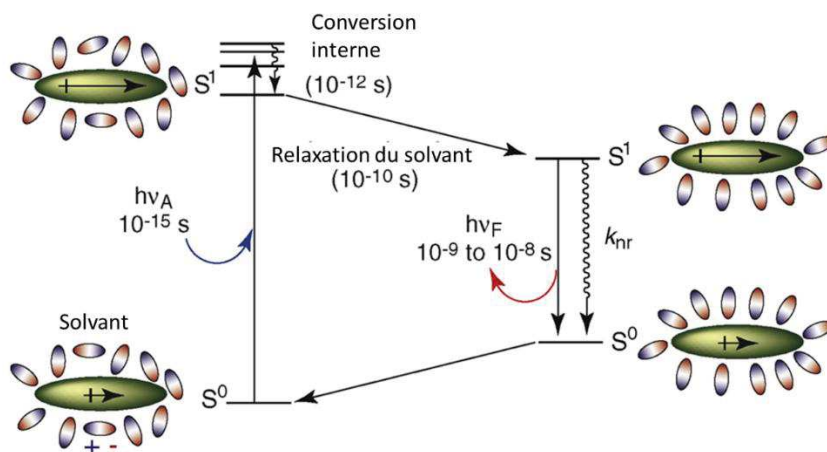


Figure 29 : Les différentes classes de sondes fluorescentes synthétiques classées en fonction de leur longueur d'onde d'absorption maximale (Lavis and Raines, 2008).

Cette approche repose sur des sondes sensibles aux modifications de leur environnement local. En effet certaines sondes fluorescentes sont sensibles à un changement local de leur environnement, tel que le pH, la viscosité ou encore la polarité du solvant. Ce dernier phénomène est appelé « solvatochromisme ». Il est défini comme la capacité d'une substance chimique à changer de couleur en raison d'un changement de polarité du solvant, ce qui conduit à la stabilisation de l'état fondamental ou excité du fluorophore, ce qui affecte par conséquent l'écart énergétique entre ces états (Loving et al., 2010; Reichardt, 1994).

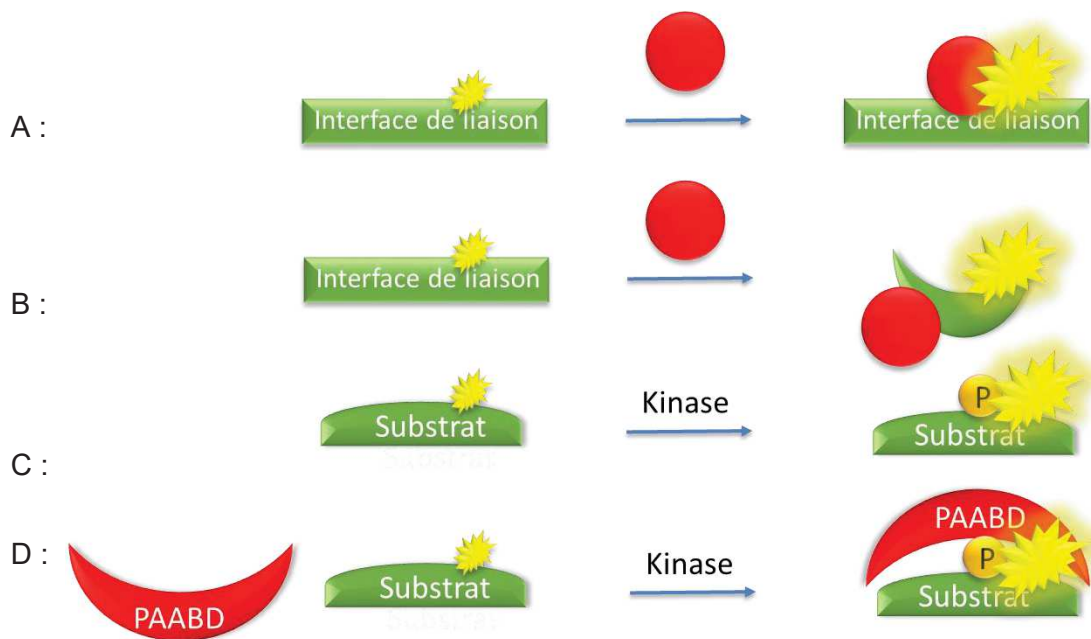
Lors de l'absorption d'un photon, le fluorophore passe à l'état singulet excité et adopte un moment dipolaire très différent de celui de l'état fondamental. Pour accueillir ce dipôle plus large, les molécules de solvant réorientent leurs dipôles, permettant un arrangement plus ordonné. Cette étape est appelée relaxation du solvant. Ceci entraîne une diminution de l'énergie de l'état singulet excité, et réduit l'écart énergétique entre l'état excité et l'état fondamental. Enfin, lorsque le fluorophore revient à l'état fondamental par l'émission d'un photon, celui-ci a une longueur d'onde plus longue, dû à une énergie inférieure, à celle absorbée lors de l'excitation (Figure 30) (Loving et al., 2010).



**Figure 30 : L'origine des effets solvatochromiques sur la fluorescence (Loving et al. 2010).**

Ces sondes solvatochromiques sont souvent utilisées pour étudier les interactions protéine-protéine, le changement de conformation et la transition entre les formes active/inactive des protéines. De nombreux fluorophores solvatochromiques ont été développés tels que le PRODAN, les dérivés coumarines, les dérivés du DANSYL, et les Mérocyanines (Loving et al., 2010) (Loving et al. 2010). La plupart de ces sondes émettent dans les longueurs d'onde bleu/jaune.

Un peptide ou un polypeptide dérivé d'un substrat protéique ou d'une interface de liaison à un partenaire protéique peut servir de récepteur spécifique facile à concevoir. Une sonde fluorescente sensible à l'environnement couplée sur un acide aminé bien déterminé, va voir ses propriétés spectrales affectées par les changements dans son environnement local, induits lors de la reconnaissance de la cible ; un changement de conformation induit par une enzyme ou une modification chimique, telle qu'une phosphorylation (Morris, 2009) (Figure 31).



**Figure 31 Biosenseurs peptidiques fluorescents non génétiquement codés générés par couplage d'une sonde sensible à l'environnement sur un séquence peptidique spécifique : A : interaction protéine-protéine ; B : Changement conformationnel ; C et D : Modification posttraductionnelle ex : Phosphorylation (PAABD : Phospho Amino Acid Binding Domain).**

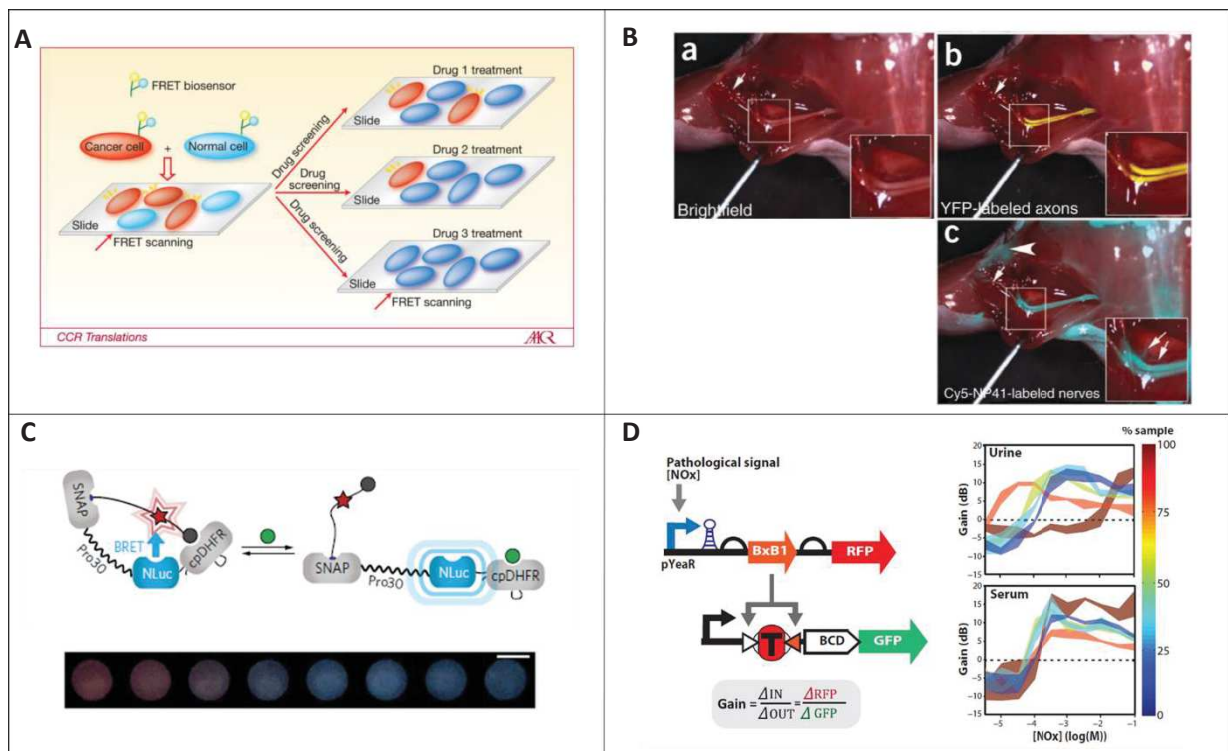
### 3.3. Biosenseurs fluorescents : outils pour le diagnostic et application biomédicale

À travers tous les exemples mentionnés précédemment, les biosenseurs fluorescents, génétiques ou non génétiques, ont prouvé leur utilité et leur efficacité *in vitro* et *in cellulo*. Au cours des dernières années, ils ont été utilisés pour des applications biomédicales, notamment les tests de diagnostic, dans le développement d'essais complémentaires ou pour remplacer les approches antigéniques et / ou génomiques plus traditionnelles (Morris, 2012). Par exemple, un biosenseur FRET génétiquement codé qui mesure l'activité de la kinase Bcr Abl a été utilisé pour identifier les cellules cancéreuses de patients atteints de LMC (leucémie myéloïde chronique) et pour suivre la réponse aux médicaments et la résistance (Lu and Wang, 2010; Mizutani et al., 2010; Tunceroglu et al., 2010) (Figure 32A). Deux autres biosenseurs fluorescents peptidiques ont également été développés pour visualiser simultanément les activités des tyrosines kinases Abl et Lyn dans les cellules de patients atteints de LMC (Wang et al., 2010). Ce dernier exemple montre que les biosenseurs fluorescents peuvent être appliqués au criblage multiplexé. Dans le même test, il est possible d'utiliser plusieurs biosenseurs couplés à différentes sondes fluorescentes. Dans les programmes de découverte de médicaments, cela permet de suivre plusieurs cibles et d'évaluer leur réponse simultanément afin d'obtenir des informations sur la spécificité des médicaments (Carlson and Campbell, 2009; Piljic and Schultz, 2008; Welch et al., 2011).

Un autre exemple d'application biomédicale complètement différent, un biosenseur peptidique fluorescent qui se lie préférentiellement à des récepteurs de surfaces des nerfs périphériques qui permet leur visualisation pendant la chirurgie chez la souris. Il offre un moyen prometteur de développer une chirurgie guidée par l'imagerie en aidant à prévenir les sections transversales accidentelles (Whitney et al., 2011) (Figure 32B).

En 2014, des biosenseurs semi-synthétiques bioluminescents ont été développés pour mesurer avec précision les concentrations de médicament (méthotrexate et cyclosporine A) dans des échantillons de sang humain, directement en déposant de faibles volumes sur papier et en enregistrant le signal à l'aide d'une simple caméra (Griss et al., 2014) (Figure 32C).

En 2015, des biosenseurs bactériens ont été mis au point afin de détecter des biomarqueurs pathologiques (oxydes d'azote et glucose) dans l'urine et le sérum humains via des commutateurs génétiques amplificateurs (Courbet et al., 2015) (Figure 32D). Ces derniers exemples montrent l'utilité importante que peuvent avoir les biosenseurs fluorescents dans le contrôle des médicaments et la détection de biomarqueur et plus généralement dans les tests de diagnostic.



**Figure 32 : Exemples de biosenseurs utilisés pour le diagnostic ou pour des applications médicales : A : Application d'un biocapteur FRET pour le dépistage de drogues (Lu and Wang, 2010) ; B : Biosenseur fluorescent permettant de visualiser in-vivo le nerf sciatique : (a) : sans biosenseur ; (b) : couplé avec YFP (c) : couplé avec Cy5 (Whitney et al., 2011) ; C : Conception et visualisation sur papier du biosenseur de méthotrexate (Griss et al., 2014) ; D : Plasmide pour mesurer l'amplification de oxydes d'azote et amplification de signal pathologique moléculaire in vivo dans des échantillons cliniques (Courbet et al., 2015).**



### 3.4. Biocapteurs / Biosenseurs de p53

Depuis quelques années de nombreux laboratoires ont développé des biosenseurs/biocapteurs (électrochimique ou optique) afin de détecter et/ou de mesurer la quantité de p53, sauvage ou muté, dans les fluides humains (sérum, sang, urine, plasma) ou dans des extraits cellulaires. Ces biosenseurs/biocapteurs sont majoritairement des immunocapteurs/senseurs comportant comme élément de reconnaissance un anticorps anti p53, ou un fragment d'ADN spécifique de p53 (Tableau 2).

biosenseur	Détecteur	Echantillons	Gamme d'utilisation	LOD	Références
Electrochimique	Anticorps	Lysat cellulaire	0,2 - 2pM	30 fM	(Afsharan et al., 2016)
Electrochimique	Anticorps	Lysat cellulaire	69nM - 2,1M	18nM	(Pedrero et al., 2016)
Electrochimique	Anticorps	Plasma humain	0,0369 - 50pM	48fM	(Hasanzadeh et al., 2017)
		Lysat cellulaire	0,018 - 2,5pM	18fM	
Electrochimique	Anticorps	Urine	20pM - 10nM	14pM	(Giannetto et al., 2017)
Electrochimique	Anticorps	Sang humain	$1.17 \times 10^{-9}$ - $2.93 \times 10^{-8}$ µg/mL	$3.37 \times 10^{-10}$ µg/mL	(Al-Ogaidi et al., 2017)
Electrochimique	Anticorps	Sérum humain	0,01 - 2 pg/ml	3 fg/ml	(Aydın et al., 2018)
Optique	Anticorps	Sérum humain	10 fg/ml - 10 ng/ml	4 fg/ml	(Liang et al., 2018)
Optique	ADN	Sang humain	1 pg/ml - 1ng/ml	0,5 pg/ml	(Wang et al., 2018)
Optique	ADN	Lysat cellulaire	50pM - 2nM	8pM	(Xu et al., 2018)
Optique	ADN	Lysat cellulaire	0,1 - 200nM	52pM	(Qiu et al., 2013)
Optique	ADN	ADN	0,4 – 4pM	-	(Marquette et al., 2005)

**Tableau 2 : Exemples de biocapteurs / Biosenseurs de p53.**



# **Objectif**

Les approches de diagnostic actuelles basées sur le séquençage génétique, ou les biosenseurs récemment développés, permettent d'identifier le statut mutationnel et ou la quantité présente de p53, mais ne renseignent pas sur son statut conformationnel.

**L'objectif de ma thèse est donc le développement d'un biosenseur peptidique fluorescent capable de reconnaître spécifiquement les mutants conformationnels de p53 et plus particulièrement le mutant R248Q exprimés dans les cancers humains, et de le valider sur protéines recombinantes, sur extraits cellulaires et sur cellules vivantes.**

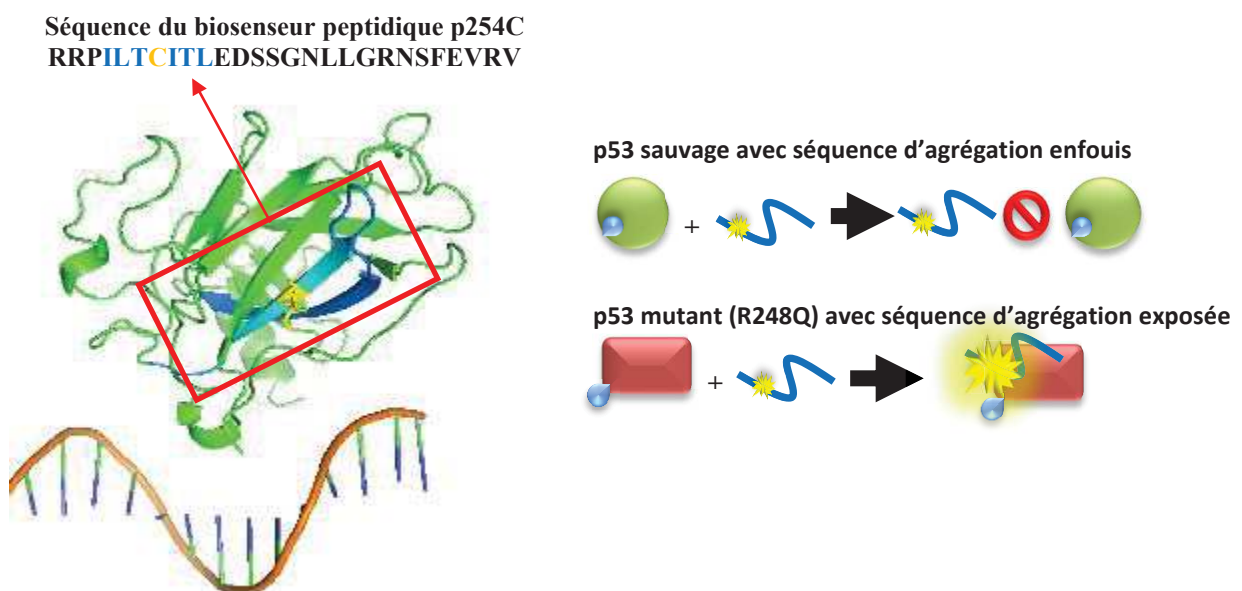
J'ai dans un 1<sup>er</sup> temps synthétisé ce peptide. J'ai ensuite caractérisé et optimisé la réponse du biosenseur par conjugaison à différentes sondes sensibles à l'environnement. J'ai également étudié sa capacité à reconnaître de manière sélective le mutant R248Q de p53 *in vitro* à l'aide de protéines recombinantes de p53 de type sauvage et mutantes, ainsi que de lysats de lignées cellulaires de cancer du poumon exprimant p53 de type sauvage (A549), le mutant R248Q (PC9) ou p53 - / - (H1299). Après avoir établi les conditions de travail optimales et les limites du biosenseur *in vitro*, j'ai utilisé celui-ci sur cellules vivantes. Après une internalisation cellulaire facilitée par un peptide vecteur, les analyses ont été effectuées par microscopie de fluorescence. Ceci afin d'établir son potentiel pour des approches thérapeutiques. De plus, j'ai surveillé la réponse du biosenseur à l'expression induite de mutants conformationnels de p53, ainsi que sa régulation négative, à la fois *in vitro* et dans des cellules vivantes.

# **Résultats**

# 1. Conception et synthèse du biosenseur

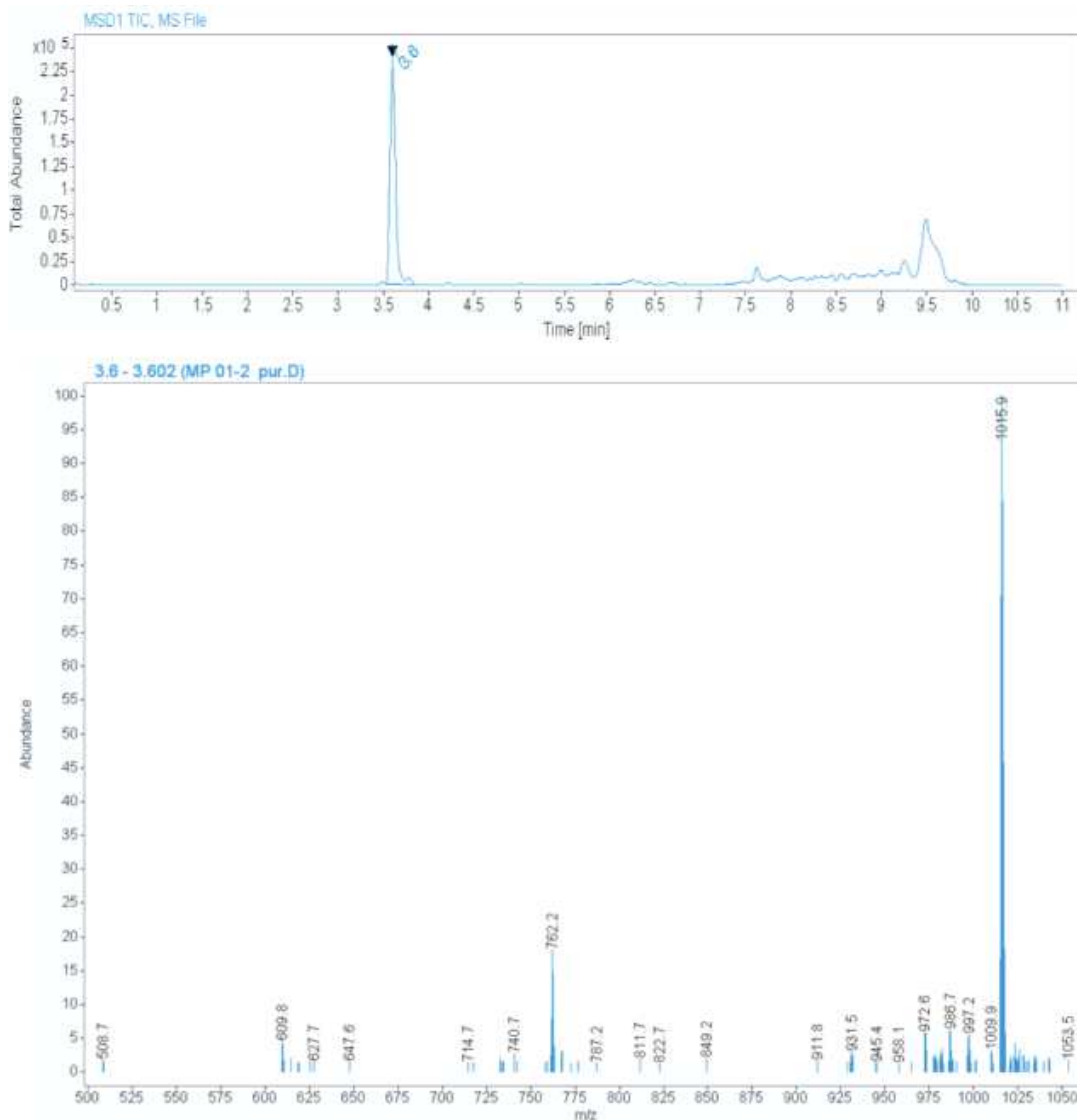
## 1.1. Conception

Le biosenseur reconnaissant les mutants de p53 susceptibles de former des agrégats que j'ai développé a été conçu à partir de la séquence d'acides aminés 251-257 : ILTIITL rapportée par Xu et al. présente dans le domaine de liaison à l'ADN de p53. Dans ces mutants le changement conformationnel de p53 favoriserait l'exposition de cette région (Xu et al., 2011). Nous avons émis l'hypothèse que cette séquence constituait un domaine de reconnaissance pour la détection des mutants conformationnels formant des agrégats ainsi que pour la conception d'un biosenseur fluorescent pour la détection du mutant R248Q. Dans ce but nous avons élaboré un peptide de 27 aa dérivé de cette séquence d'agrégation qui contient les résidus 248 à 274 (englobant les feuillets  $\beta$  S9 et S10). Nous y avons introduit une cystéine unique en remplacement de l'isoleucine en position 254, pour permettre la conjugaison d'une sonde fluorescente par le thiol. Nous avons appelé ce peptide « p254C » (Figure 33).



**Figure 33 : Conception et principe du biosenseur p254C : Le biosenseur p254C est dérivé des feuillets  $\beta$  S9 – S10 (résidus 248 à 274, cyan) du domaine de liaison à l'ADN p53 (vert), comprenant la séquence d'agrégation ILTIITL (251 à 257, cyan). L'I254 a été remplacé par une cystéine (bâton jaune) pour la conjugaison d'une sonde fluorescente sensible à l'environnement générant un biosenseur reconnaissant de préférence les mutants susceptible de s'agréger, dans lesquels ce domaine est exposé. (PDB : 1TUP).**

Le peptide a été synthétisé en utilisant la stratégie fluorenylmethyloxycarbonyl (Fmoc) à l'aide d'un robot « liberty blue » (CEM) (voir matériels et méthode pour la synthèse complète). Afin de vérifier que le peptide a été correctement synthétisé, une analyse LC-MS a été effectuée. Le peptide a ensuite été purifié par HPLC (détail dans le matériel et méthode) et les fractions pures ont été mélangées et lyophilisées. La pureté a été vérifiée par LC-MS, elle est de 95% (Figure 34).

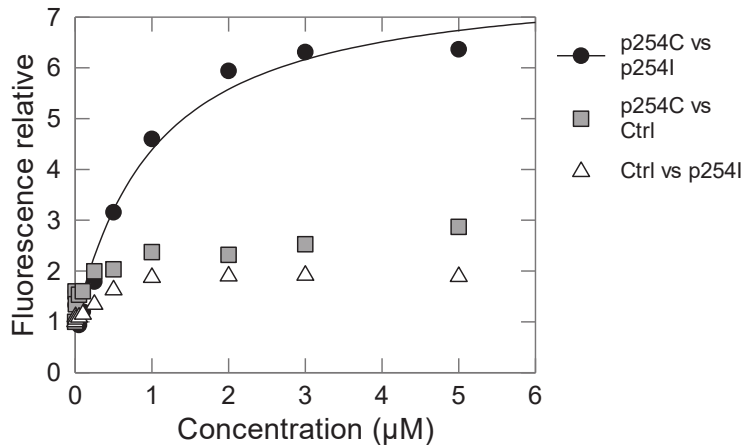


**Figure 34 : Analyse LC-MS du peptide p254C après purification : Absorbance du peptide à 214nm (haut) et « abondance » ou pureté (bas).**

## 2. Validation In Vitro

### 2.1. Reconnaissance de la séquence d'agrégation

Afin de vérifier si le peptide p254C pouvait reconnaître la séquence peptidique native dérivée du site d'agrégation de p53, qui est normalement enfouie dans p53 sauvage (p53 WT), mais exposée dans des mutants sujets à l'agrégation, tels que R248Q, p254C a été couplé avec la fluorescéine isothiocyanate (FITC) et titrée avec un peptide correspondant aux feuillets  $\beta$  S9 et S10 et portant une isoleucine en position 254 (p254I) : RRPILTITLEDSSGNLLGRNSFEVRV. Cela a conduit à une augmentation significative de la fluorescence et une courbe passant par les points a pu être tracée à l'aide du logiciel GraFit (Erithacus Software). L'utilisation d'une équation quadratique (voir matériels et méthodes), basée sur une interaction directe entre une protéine et son ligand a permis de déterminer une constante de dissociation de  $913 \text{ nM} \pm 242 \text{ nM}$  entre ces peptides. La titration de p254C-FITC avec un peptide contrôle non pertinent : VESSDTIDNVKSKIQDKEGC, ou inversement, le titrage du peptide contrôle couplé avec FITC, présentait des changements significativement plus faibles de l'émission de fluorescence et le logiciel n'a pu tracer une courbe passant par tous les points (Figure 35). Ces résultats montrent que p254C interagit avec le peptide p254I et reconnaît donc la séquence d'agrégation. L'augmentation basale de l'émission de fluorescence observée avec les expériences contrôles peut s'expliquer par une interaction non spécifique de la sonde hydrophobe avec les peptides.



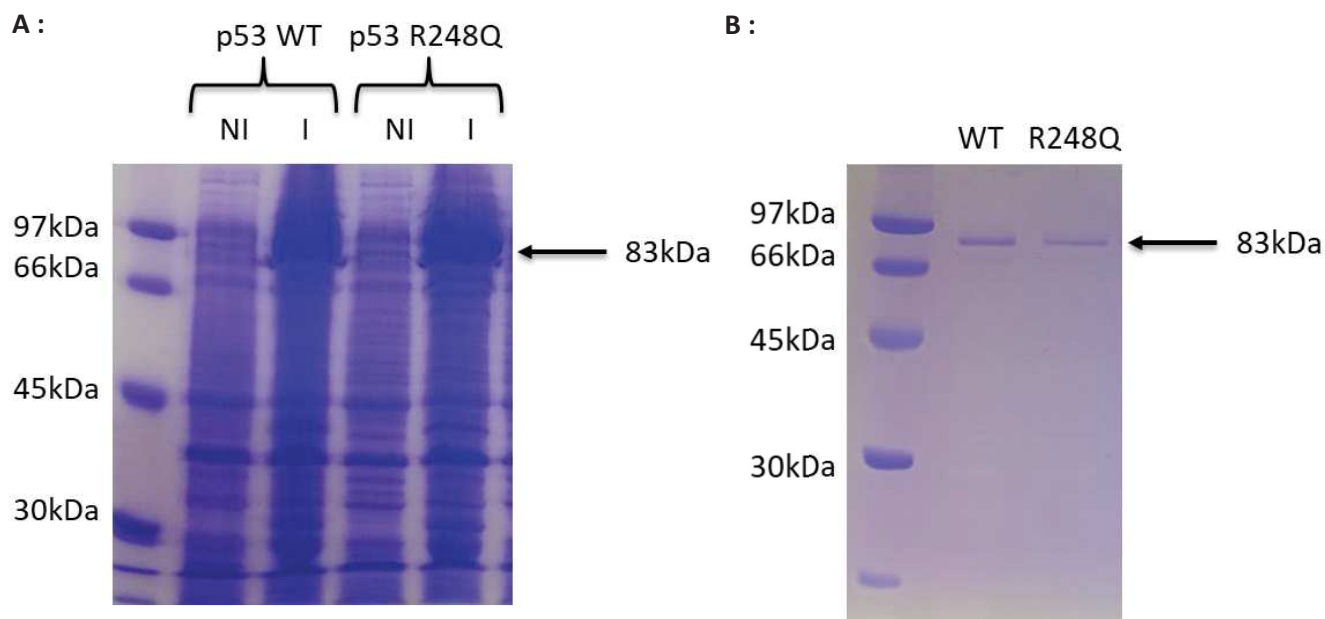
**Figure 35 : Titration de fluorescence : titration de p254C-FITC avec p254I (rond noir), de p254C-FITC avec le peptide contrôle (carré gris) et du peptide contrôle-FITC avec p254I (triangle blanc). Seul p254C-FITC titré avec p254C montre une augmentation significative de l'émission de fluorescence.**

## 2.2. Validation sur protéine recombinantes

Dans le but d'établir si le biosenseur pouvait potentiellement répondre différemment et donc discriminer la forme sauvage de p53 (p53 WT) et le mutant structural R248Q, des expériences ont été réalisées avec des protéines recombinantes fusionnées à la GST.

### 2.2.1. Purification des protéines recombinantes

p53 WT et la forme mutante R248Q ont été exprimées dans *E. coli* et l'expression a été vérifiée par SDS-PAGE (83 kDa) (Figure 36A). Elles ont été purifiées par chromatographie d'affinité FPLC (Fast Protein Liquid Chromatographie) sur colonne « glutathion Sepharose » puis par chromatographie d'exclusion par la taille. La pureté a été vérifiée sur gel SDS-PAGE (Figure 36B), puis l'absorbance a été mesurée par spectrophotométrie et la concentration calculée à l'aide de la loi de Beer-Lambert.



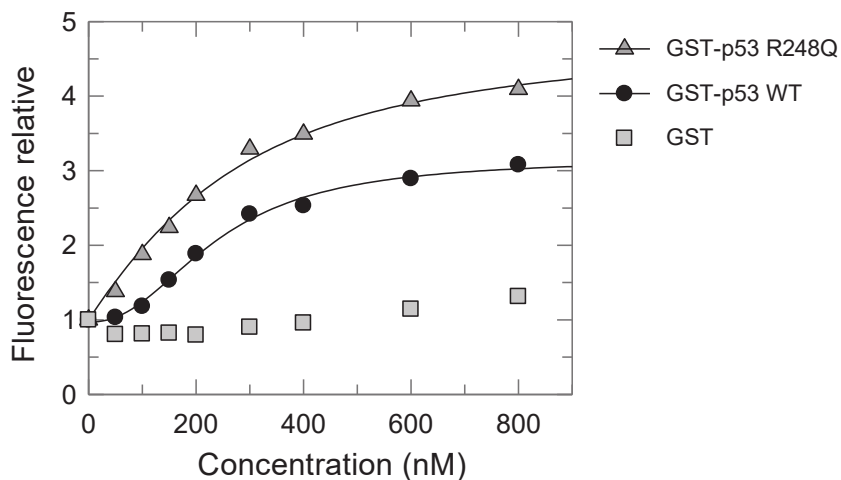
**Figure 36 : Expression et purification de GST-p53 sauvage (WT) et GST-p53 R248Q : A : Induction des protéines ; NI : avant induction I : Induction de la protéine ; B : Protéine après purification par FPLC.**

### 2.2.2. Titration de p254C avec les protéines recombinantes purifiées

Afin de vérifier si le biosenseur est capable de différencier la forme mutante R248Q de p53 de sa forme sauvage, celui-ci a été couplé au FITC puis titré avec les protéines recombinantes purifiées. Les calculs de la constante de dissociation se font à l'aide d'une équation coopérative (voir matériel et méthode) du logiciel GraFit (Erithacus Software). Les résultats montrent une affinité environ 15 fois plus importante du biosenseur pour la forme mutante R248Q que pour le sauvage soit un Kd de  $17 \mu\text{M} \pm 12 \mu\text{M}$  vs  $252 \mu\text{M} \pm 404 \mu\text{M}$  pour p53 R248Q vs p53 WT respectivement (Tableau 4 ; Figure 37). De plus le nombre de Hill (n) décrivant le degré de coopérativité est significativement différent suggérant un mécanisme d'action coopératif pour la forme GST-p53 WT ( $n = 2.18 \pm 0.22$ , supérieur à 1) et une interaction avec une stoechiométrie 1 : 1 donc directe pour la forme R248Q ( $n = 1.66 \pm 0.10$ , proche de 1). Cette hypothèse est confirmée en calculant la constante de dissociation avec



l'équation quadratique basée sur une interaction directe qui permet de définir un  $K_d$  de  $240 \text{ nM} \pm 70 \text{ nM}$  pour GST-p53 R248Q, alors que le logiciel n'arrive pas à définir un  $K_d$  pour la forme sauvage. Il est à remarquer que dès 50nM de protéine recombinante, une différence significative d'émission fluorescence est observable (selon le test de Student réalisé sur 5 expériences). Elle est 20% supérieure pour GST-p53 R248Q (Tableau 3). On observe également sur les courbes une saturation de l'émission de fluorescence à environs 3 fois le niveau basal avec GST-p53 WT vers 4 fois le niveau basal pour GST-p53 R248Q.



**Figure 37 : titration de p254C-FITC avec GST-p53 R248Q (Triangle gris), avec GST-p53 sauvage (Rond noir) et avec la GST seule en contrôle (Carré gris).**

	GST-p53 R248Q	GST-p53 WT
	1,38	1,03
	1,18	1,04
	1,25	1,05
	1,29	1,15
	1,20	1,01
<b>Moyenne</b>	<b>1,26 ± 0,07</b>	<b>1,06 ± 0,05</b>

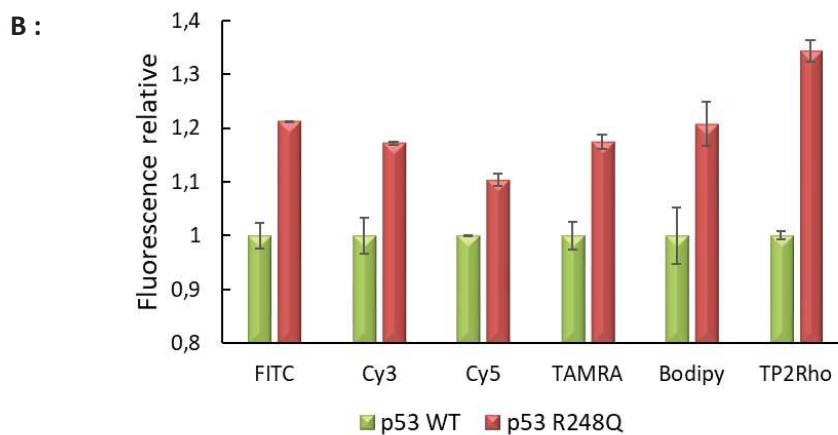
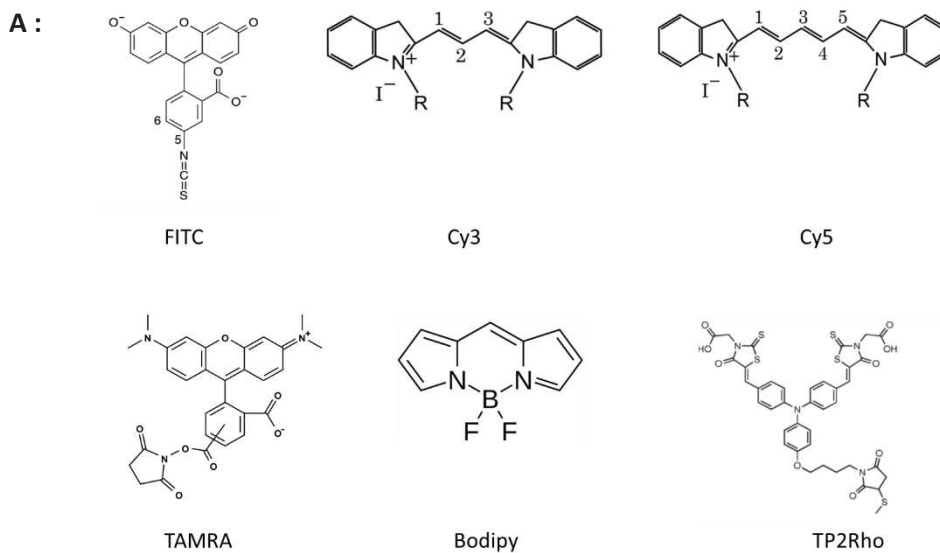
**Tableau 3 : Fluorescence relative de p254C-FITC en présence de 50nM GST-p53 R248Q ou WT.**

Protéines recombinantes	Kd ( $\mu\text{M}$ )	Capacité (site de fixation)	Degrès de coopérativité (n)
GST-p53 WT (Coopératif)	230 $\pm$ 382	2,19 $\pm$ 0,14	2,26 $\pm$ 0,31
	71 $\pm$ 73	1,34 $\pm$ 0,09	1,87 $\pm$ 0,19
	428 $\pm$ 375	1,71 $\pm$ 0,10	2,14 $\pm$ 0,17
	473 $\pm$ 722	1,17 $\pm$ 0,08	2,24 $\pm$ 0,29
	592 $\pm$ 61	1,62 $\pm$ 0,03	2,40 $\pm$ 0,04
<b>Moyenne</b>	<b>252 <math>\pm</math> 404</b>	<b>1,61 <math>\pm</math> 0,09</b>	<b>2,18 <math>\pm</math> 0,22</b>
GST-p53 R248Q (Coopératif)	2 $\pm$ 0.4	3.61 $\pm$ 0.09	1.44 $\pm$ 0.05
	13 $\pm$ 7	1.54 $\pm$ 0.08	1.79 $\pm$ 0.12
	46 $\pm$ 24	1.90 $\pm$ 0.13	1.87 $\pm$ 0.12
	5 $\pm$ 2	1.86 $\pm$ 0.12	1.46 $\pm$ 0.08
	20 $\pm$ 10	1. $\pm$ 0.14	1.72 $\pm$ 0.11
<b>Moyenne</b>	<b>17 <math>\pm</math> 12</b>	<b>2.17 <math>\pm</math> 0.11</b>	<b>1.66 <math>\pm</math> 0.10</b>
GST-p53 R248Q (Direct)	0.159 $\pm$ 0.029		
	0.073 $\pm$ 0.008		
	0.356 $\pm$ 0.092		
	0.232 $\pm$ 0.051		
	0.382 $\pm$ 0.112		
<b>Moyenne</b>	<b>0.240 <math>\pm</math> 0.070</b>		

**Tableau 4 : Titration du peptide p254C-FITC (200nM) avec GST-p53 sauvage et le mutant GST-R248Q. Détermination de la constante de dissociation avec une équation de liaison coopérative ou avec équation d'interaction stœchiométrique 1 : 1 standard.**

### 2.2.3. Optimisation de la réponse de p254C : Choix de la sonde

Afin de déterminer quelle sonde serait la plus appropriée, différentes sondes fluorescentes sensibles à l'environnement autres que la FITC, ont été testées : Cy3, Cy5, TAMRA ; Bodipy et TP2Rho, une sonde de la famille des vinyltriphénylamine soluble dans l'eau, très sensible développée par le Dr Mahuteau-Betzer de l'institut Curie, que nous avons utilisée pour caractériser les interactions peptides-peptides ; protéines-peptides et protéines-protéines *in vitro* et en particulier l'interaction CDK4/Cycline D (Figure 38A) (Dumat et al., 2012; Pellerano et al., 2016). Les résultats ont révélé que le meilleur candidat était TP2Rho (Figure 38B).



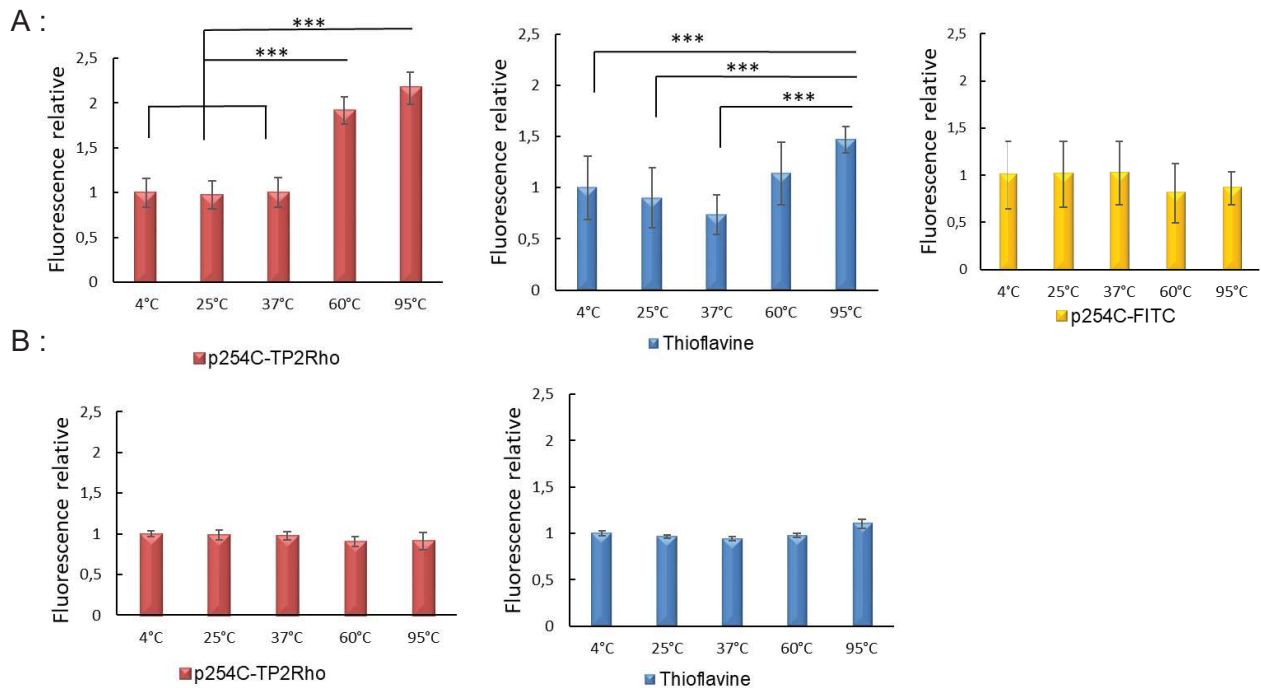
**Figure 38 : A : Structure des différentes sondes utilisées B : Comparaison de l'augmentation relative de l'émission de fluorescence de p254C couplées à différentes sondes avec p53 sauvage (vert) ou p53 R248Q (rouge).**

#### 2.2.4. Validation de la reconnaissance de la séquence d'agrégation sur protéines recombinantes

Afin de vérifier plus précisément la capacité du peptide p254C à interagir avec la séquence d'agrégation de p53, nous avons vérifié si la fluorescence émise par p254C augmenterait avec son exposition. Il existe plusieurs façons d'induire l'exposition d'un motif enfoui dans une poche, la dénaturation chimique avec par exemple le SDS ou l'urée mais ceci changerait le milieu dans lequel a été purifiée la protéine et pourrait induire un changement de fluorescence non spécifique. La thermo-dénaturation permet une dénaturation plus douce sans changement de milieu, cette méthode est adéquate pour les expériences de fluorescence. Le peptide p254C a donc été couplé au TP2Rho, puis incubé avec la protéine recombinante GST-p53 sauvage purifiée par FPLC et soumise à différentes températures : 4°C ; 25°C ; 37°C ; 60°C et 95°C pendant 15min. L'émission de fluorescence de p254C-TP2Rho était significativement accrue après l'incubation de la p53 recombinante à 60°C et 95°C. Ceci indique ainsi une plus grande reconnaissance de la séquence d'agrégation de p53, dont l'exposition a été induite par thermo-dénaturation (Figure 39A). En comparaison, les échantillons ont été incubés avec de la thioflavine T, une sonde fluorescente décrite et couramment utilisée pour l'identification d'agrégats de type amyloïde (Biancalana and Koide, 2010). Il a déjà été montré à l'aide de la thioflavine T que le mutant p53 R248Q formait des agrégats de type amyloïde (Ano Bom et al., 2012). L'incubation des échantillons avec la thioflavine T après traitement thermique a révélé peu ou pas d'agrégation dans les mêmes conditions et concentrations (Figure 39A). Ces résultats indiquent que le biosenseur p254C rend compte de l'exposition de la séquence d'agrégation associée au dépliement p53 induit par la chaleur, alors que la thioflavine ne répond qu'à l'agrégation de p53. Au contraire, le biosenseur p254C couplé au FITC n'a pas

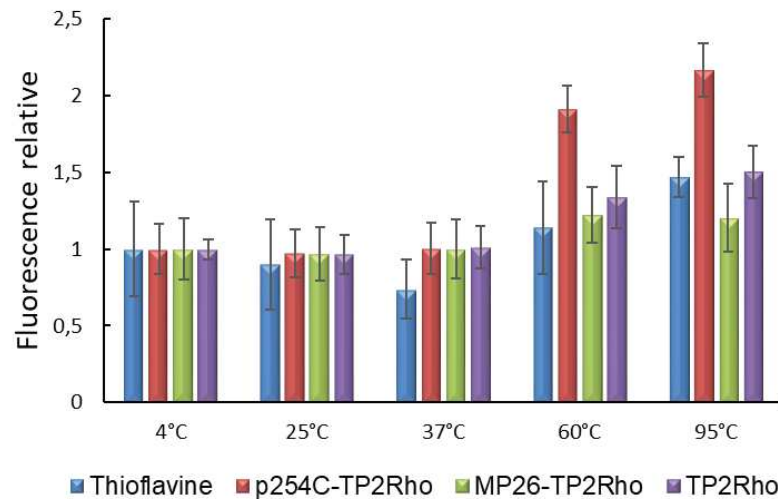
répondu à la dénaturation de GST-p53 sauvage (Figure 39A). p254C-FITC n'est donc pas approprié pour cette reconnaissance.

De plus, l'incubation de la protéine associée aux microtubules « Tau », qui est thermostable n'a aucun effet sur le biosenseur p254C ni sur la fluorescence de la thioflavine après traitement à des températures plus élevées, conformément à ce qui pouvait être attendu (Figure 39B).



**Figure 39 : Réponse préférentielle de p254C-TP2Rho à GST-p53 sauvage thermo-dénaturé. A : Augmentation de l'émission relative de fluorescence de 200nM p254C-Tp2Rho (rouge), de 25nM de thioflavine (bleu), et de 200nM p254C-FITC (jaune) après incubation avec 1µM de GST-p53 sauvage préincubée pendant 15 minutes à 4, 25, 37, 60 ou 95°C (n = 7 ; test de student : \*\*\* p ≤ 0.001). B : Augmentation de l'émission relative de fluorescence de 25nM de thioflavine (bleu) et de 200nM p254C-Tp2Rho (rouge), après incubation avec 1µM de His-TAU préincubée pendant 15 minutes à 4, 25, 37, 60 ou 95°C.**

D'autres contrôles ont été réalisés en incubant un peptide contrôle (MP26) couplé avec TP2Rho et avec TP2Rho seul dans les mêmes conditions avec la protéine recombinante GST-p53 sauvage soumise aux mêmes températures que précédemment citées (Figure 40)



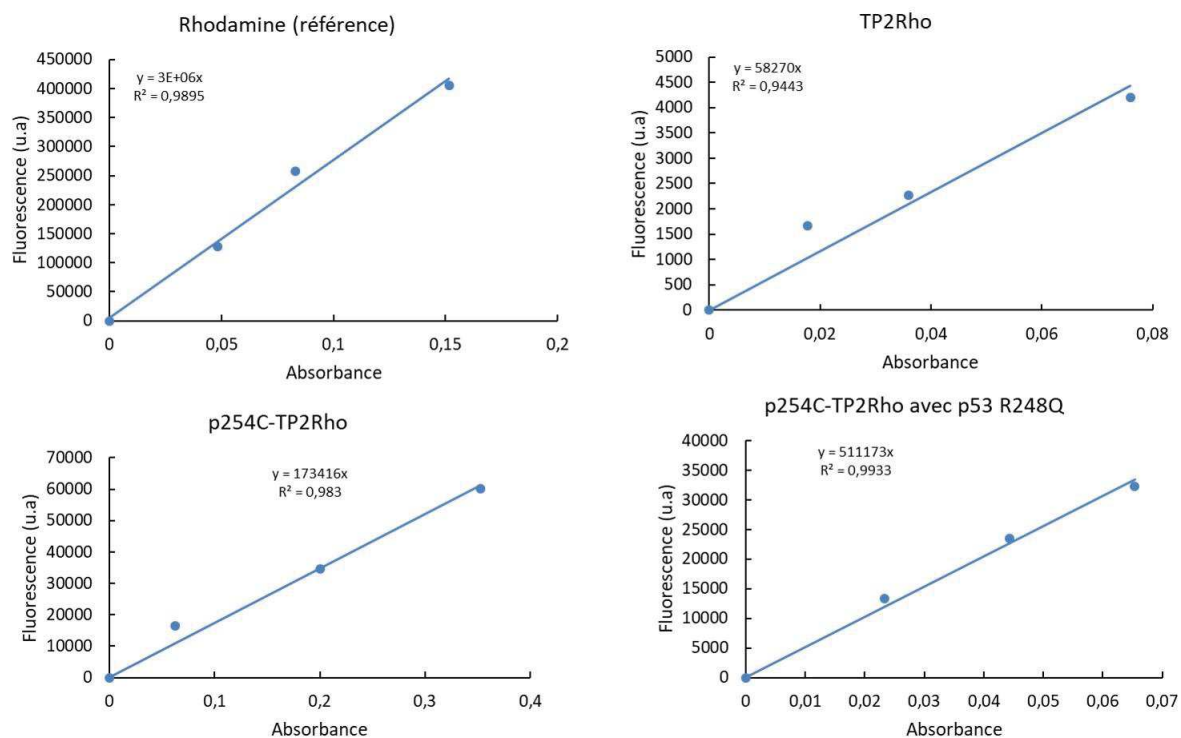
**Figure 40 : Augmentation de l'émission relative de fluorescence de 25nM de thioflavine T (bleu), de 200nM p254C-Tp2Rho (rouge), de 200nM MP26-Tp2Rho (vert) et de Tp2Rho (violet) après incubation avec 1µM de GST-p53 sauvage préincubée pendant 15 minutes à 4, 25, 37, 60 ou 95°C.**

### 2.3. Etude du comportement de p254C-TP2Rho en solution

#### 2.3.1. Calcul du rendement quantique $\phi$ de P254C-TP2Rho

Nous avons déterminé le rendement quantique de TP2Rho, P254C-TP2Rho et P254C-TP2Rho en présence du mutant R248Q, dans une solution PBS et par rapport à la rhodamine. Le rendement quantique permet de quantifier la brillance d'une sonde. Pour cela l'émission de fluorescence des différents échantillons en fonction de leur absorbance a été mesuré. Les résultats révèlent un rendement quantique très faible dans du PBS pour TP2Rho. Le rendement quantique de TP2Rho conjugué à p254C subit une augmentation significative par rapport au rendement quantique calculé pour TP2Rho dans du PBS :  $\phi$  TP2Rho  $\leq$  0,005 et  $\phi$  P254C-TP2Rho : 0,07. Ceci démontre une différence dans le comportement de la sonde quand celle-ci est couplée au peptide p254C. Le rendement quantique augmente davantage

si P254C-TP2Rho est incubé avec le mutant R248Q :  $\phi$  p254CTP2Rho / R248Q : 0,20 (Figure 41).



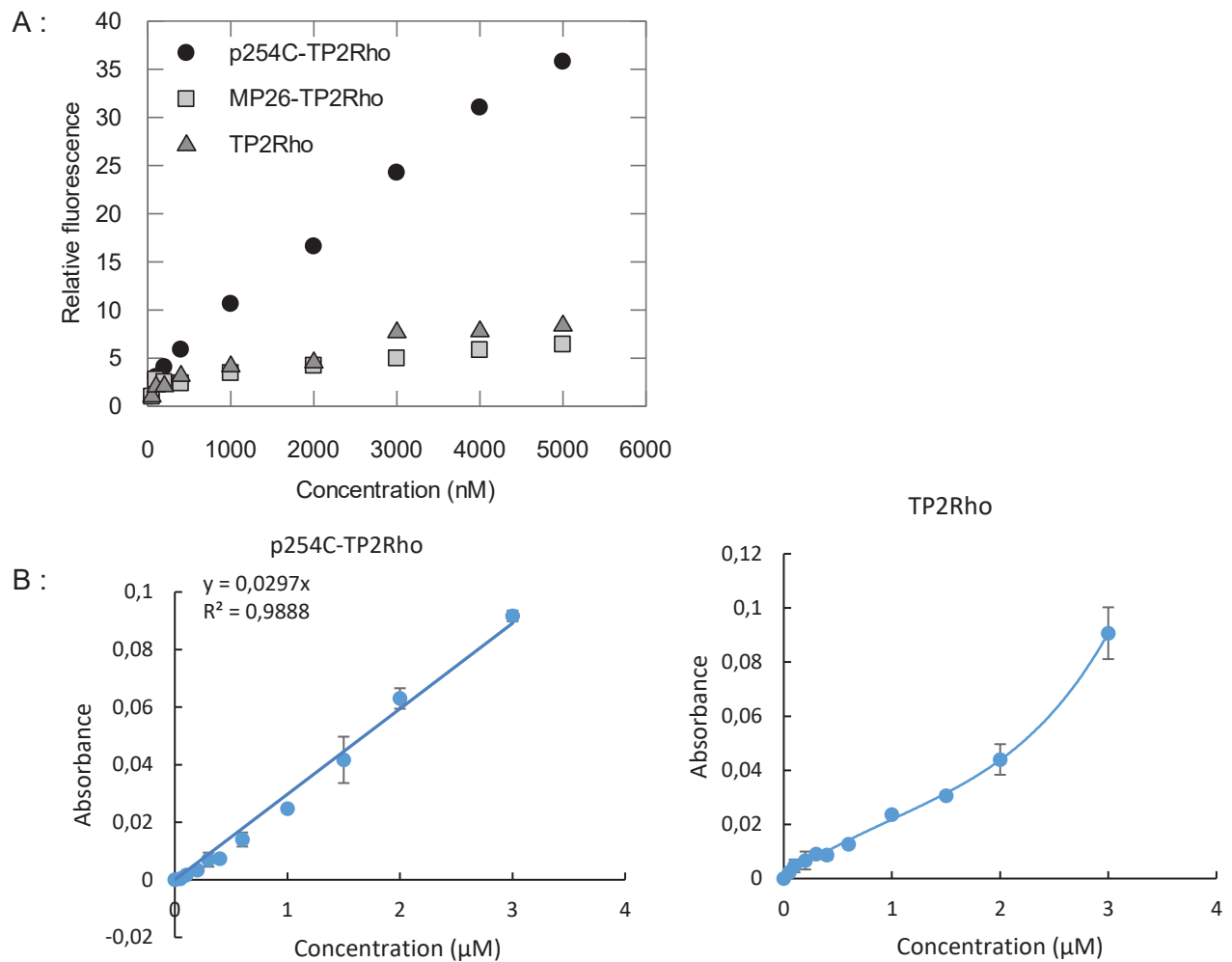
**Figure 41 : Détermination du rendement quantique de TP2Rho et de p254C-TP2Rho dans du PBS par rapport à la rhodamine.**

### 2.3.2. Etude de l'auto-agrégation possible de p254C-TP2Rho par spectrofluorimétrie

Pour mieux comprendre le comportement de P254C-TP2Rho, nous nous sommes demandés s'il pouvait potentiellement s'auto-agréger. Pour cela p254C couplé au TP2Rho a été titré avec des concentrations croissantes de P254C-TP2Rho. L'émission relative de fluorescence a alors été mesurée. Les résultats montrent une augmentation significative et linéaire pouvant signifier une absence d'auto-agrégation. En effet cette augmentation linéaire est due à une augmentation de la concentration de P254C-TP2Rho qui est corrélé avec l'augmentation de l'émission de fluorescence. La même expérience réalisée cette fois-ci avec la sonde TP2Rho ou avec le peptide contrôle MP26 couplé au TP2Rho montre une augmentation plus modérée et moins linéaire pouvant s'expliquer par une saturation de la fluorescence suggérant l'agrégation de la sonde (Figure 42A).

Des mesures de l'absorbance de P254C-TP2Rho en fonction de la concentration montrent également une augmentation linéaire ( $R^2 > 0.95$ ) indiquant que l'absorbance suit la loi de Beer-Lambert signifiant qu'il y a qu'une seule espèce dans la solution. Nous pouvons en conclure que P254C-TP2Rho ne s'auto-agrège pas. La même expérience a été réalisée avec le TP2Rho seul. Les résultats montrent une augmentation moins linéaire qui ne suit pas la loi de Beer-Lambert laissant présager qu'il y a deux espèces distinctes, la forme libre de TP2Rho et la forme agrégée (Figure 42B).



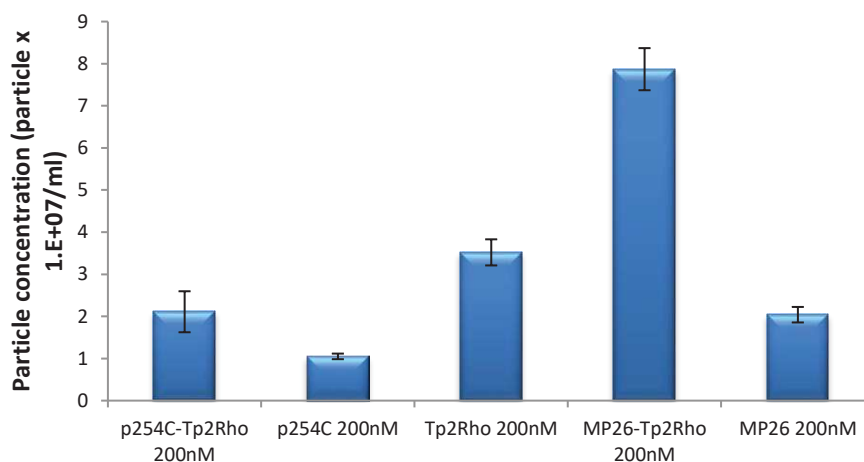


**Figure 42 : A : Émission relative de la fluorescence avec des concentrations croissantes : de p254C couplé avec TP2Rho, de peptide contrôle MP26 couplé avec TP2Rho (MP26) ou TP2Rho seul (excitation à 510 nm; émission à 614 nm). B : Absorbance de p254C-TP2Rho et de TP2Rho mesurée en fonction de la concentration. L'absorbance de p254C-TP2Rho est linéaire alors que TP2Rho seul ne répond pas à l'augmentation de la concentration de manière linéaire.**

### 2.3.3. Etude de la formation de Nanoparticules de P254C-TP2Rho

Une deuxième technique permet de déterminer et de visualiser si p254C-TP2Rho s'autoagrège, l'analyse de suivi des nanoparticules ou NTA (Nanoparticle Tracking Analysis). L'avantage de cette technique est de suivre individuellement chaque particule et d'obtenir une concentration en particule et non pas seulement une taille moyenne. Ceci permet de vérifier

la formation de nanoparticules susceptibles de former des agrégats (Yang et al., 2014). Différents contrôles ont été utilisés en comparaison : le peptide p254C non marqué, le TP2Rho seul, un peptide contrôle (MP26) couplé ou non au TP2Rho. Les résultats ont révélé une très faible proportion de particules en solution pour tous ces peptides, marqués ou non (de  $1.10^7$  à  $2.10^7$  particule par millilitre). Davantage de particules pour TP2Rho seul ou pour le peptide Contrôle marqué, sont visibles (de  $4.10^7$  à  $7.10^7$  particule par millilitre) (Figure 43). Ces résultats montrent bien la formation de nanostructures mais ils sont non représentatifs d'agrégats. En effet comparé à un peptide référence standard connu pour former des agrégats : le peptide  $\alpha\beta$ . L'analyse de ce peptide par NTA montre une concentration allant jusqu'à  $1.6.10^9$  particule par millilitre soit 100 fois plus de nanoparticule que pour P254C-TP2Rho (Yang et al., 2014). Cette expérience confirme les résultats obtenus par spectrofluorimétrie.



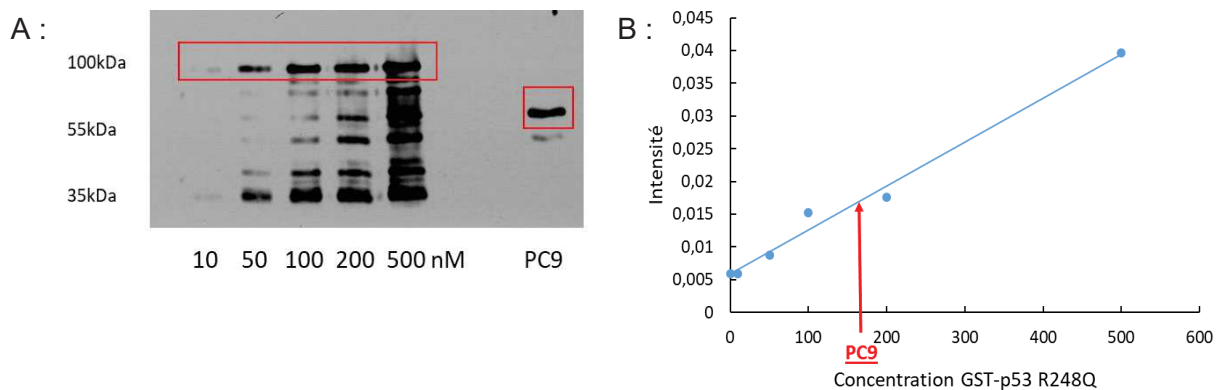
**Figure 43 : Analyse NTA de 200nM de : TP2Rho, p254C couplé ou non au TP2Rho et du peptide contrôle (MP26) couplé ou non au TP2Rho.**

### 3. Validation de p254C In Extracto

Pour caractériser le biosenseur p254C dans un environnement plus physiologique et complexe, nous avons choisi d'utiliser des extraits issus de la lignée cellulaire du cancer du poumon PC9, qui exprime le mutant R248Q.

#### 3.1. Calcul de la quantité de p53 R248Q dans les PC9

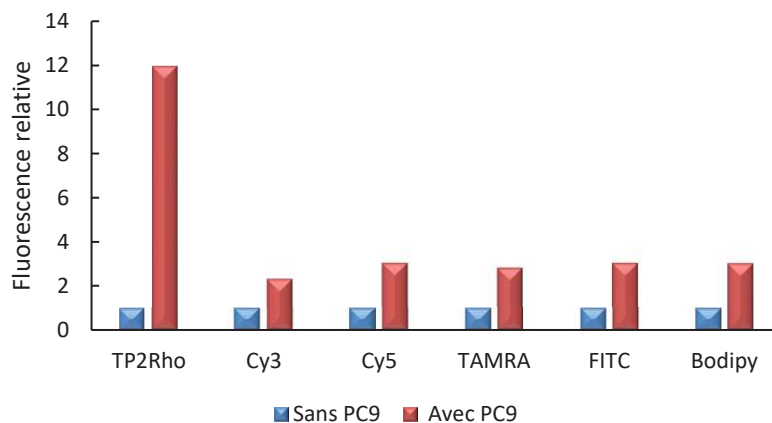
Pour évaluer l'abondance de ce mutant dans des extraits de cellules PC9, nous avons d'abord effectué un Western Blot de GST-p53 R248Q afin d'établir une courbe d'étalonnage (de 10nM à 500nM) (Figure 44A). Le signal correspondant à p53 R248Q dans 20 µg de PC9 dilué dans 20µl (soit 1µg/µl) a été comparé à la courbe d'étalonnage et une concentration moyenne de 170nM a pu être déterminée pour 1µg/µl d'extrait cellulaire (Figure 44B).



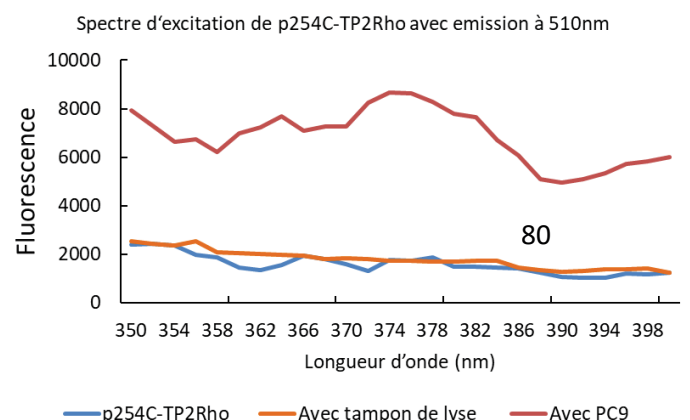
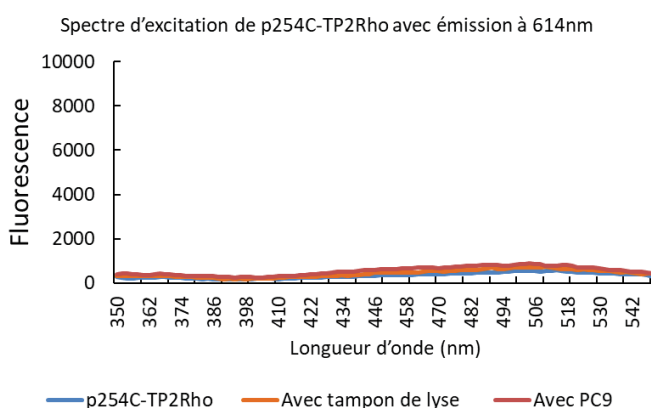
**Figure 44 : Détermination de la quantité de p53 R248Q dans les extraits cellulaires PC9 : A : Western-Blot de GST-p53 R248Q recombinant (de 10nM à 500nM) et de 20µg d'extrait cellulaire de PC9. Le Western-Blot a été effectué avec un anticorps anti p53 (DO-1). B : Courbe de calibration de l'intensité en fonction de la concentration de p53 R248Q permettant de calculer une concentration de 170nM de p53 R248Q dans les extraits cellulaires de PC9.**

Afin de choisir la sonde fluorescente la mieux adaptée pour les analyses avec les extraits cellulaires, le biosenseur p254C a été couplé à plusieurs sondes fluorescentes. Il a ensuite été incubé, à une concentration de 200nM, avec 40 µg d'extraits de cellules PC9. Les résultats ont montré que la sonde TP2Rho a fourni de loin la meilleure réponse, avec une augmentation de l'émission de relative de fluorescence 12 fois supérieure à l'émission relative de fluorescence du biosenseur en l'absence d'extraits cellulaires (Figure 45A). De plus, nous avons remarqué que l'émission de fluorescence du biosenseur marqué TP2Rho était un peu plus importante lors d'une excitation à  $\lambda = 392$  nm et d'une émission acquise entre  $\lambda = 510$  et 570 nm, par rapport à une excitation à  $\lambda = 510$  nm et une émission à  $\lambda = 614$  nm (Figure 45B). En effet, lors de la reconnaissance de la cible p254C-TP2Rho réagi comme une sonde AIE (Aggregation Induced Emission), avec une augmentation de son mission de fluorescence correspondant à une augmentation d'énergie se traduisant par un décalage de sa longueur d'onde d'excitation et d'émission vers le bleu (Mei et al., 2015). Ces conditions ont donc été conservées pour toutes les expériences ultérieures réalisées avec des extraits cellulaires.

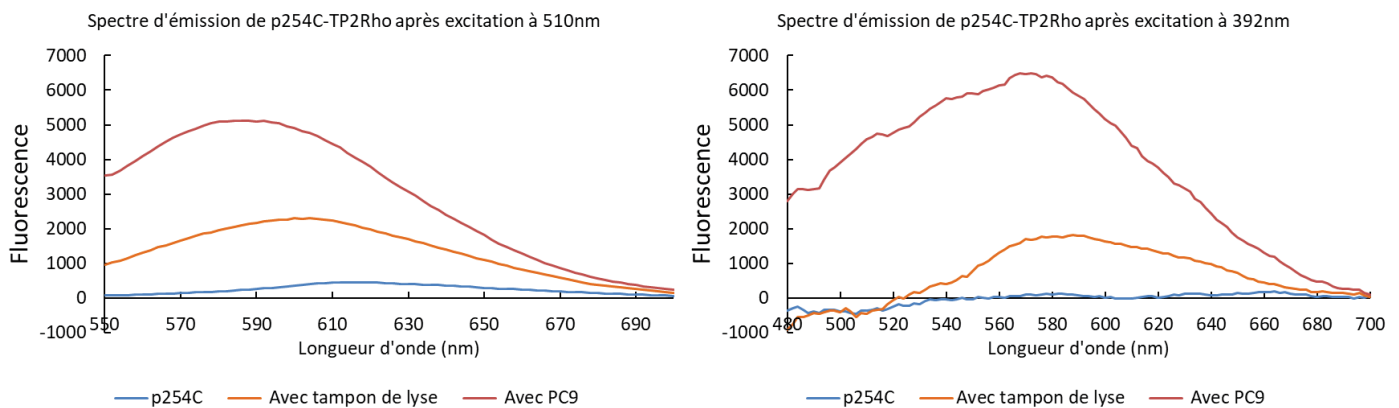
A :



B :



C :



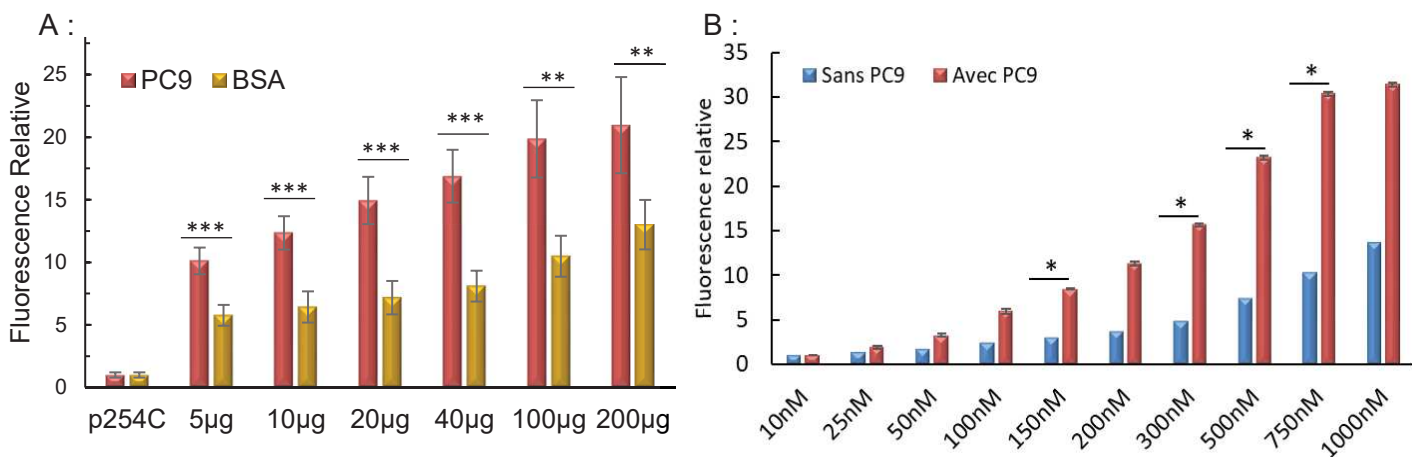
**Figure 45: A : Augmentation maximale de la fluorescence relative de 200nM de p254C couplé à TP2Rho ( $\lambda_{ex} = 392 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{em} = 510 \text{ nm}$ ), Cy3 ( $\lambda_{ex} = 530 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{em} = 580 \text{ nm}$ ), Cy5 ( $\lambda_{ex} = 610 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{em} = 675 \text{ nm}$ ), tétraméthylrhodamine (TAMRA;  $\lambda_{ex} = 535 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{em} = 585 \text{ nm}$ ) et FITC ( $\lambda_{ex} = 483 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{em} = 530 \text{ nm}$ ), incubé avec 40 mg d'extraits cellulaires PC9 (rouge) ou sans (bleu). B : Spectre d'excitation de fluorescence de p254C couplé à TP2Rho seul (bleu) ou incubé avec du tampon de lyse (40 $\mu$ l : orange) ou des extraits de cellules PC9 (40 $\mu$ g : rouge) avec émission à 614nm (gauche) ou 510nm (droite). C : Spectre d'émission de fluorescence de p254C couplé à TP2Rho seul (bleu) ou incubé avec du tampon de lyse (40 $\mu$ l : orange) ou des extraits de cellules PC9 (40 $\mu$ g : rouge) après excitation à 510nm (gauche) ou 392nm (droite).**

### 3.2. Optimisation des conditions d'utilisation de P254C-TP2Rho

Pour déterminer les concentrations optimales d'utilisation du biosenseur, des expériences de dose réponse ont été effectuées. Dans un premier temps des concentrations croissantes d'extraits cellulaires de PC9 (de 5 $\mu$ g à 200 $\mu$ g pour 200 $\mu$ l ; soit de 0.025 $\mu$ g/ $\mu$ l à 1 $\mu$ g/ $\mu$ l ou de 4.25nM à 170nM selon les expériences faites en Western-Blot) ont été incubées avec 200nM de P254C-TP2Rho afin de déterminer la quantité optimale à utiliser. Nous avons observé une augmentation dépendante de la concentration de l'émission de la fluorescence de P254C-TP2Rho, en réponse à des quantités croissantes d'extraits de PC9, correspondant, comme attendu, à une augmentation de la réponse du biosenseur à une augmentation du taux de p53 R248Q, avec une saturation de la réponse à partir de 100 $\mu$ g d'extraits. En comparaison, l'albumine de sérum bovin (BSA) a induit une augmentation beaucoup moins importante. La

différence entre l'émission de fluorescence des extraits et la BSA atteint son optimum à 20-40 $\mu$ g. A des quantités plus importantes, la différence est moins significative, indiquant une perte de spécificité de la réponse (Figure 46A). Dans un deuxième temps, des concentrations croissantes de P254C-TP2Rho (de 10nM à 1000nM) ont été incubées avec 40 $\mu$ g d'extraits PC9 dilué dans 200 $\mu$ l. (soit 34nM de p53 R248Q). Nous avons observé une réponse dépendante de la concentration de P254C-TP2Rho, avec un plateau autour de 750 à 1000nM (Figure 46B).

Ces résultats indiquent que le biosenseur p254C peut détecter de manière optimale entre 4.25nM et 170nM de p53 R248Q dans des extraits protéiques et que la fenêtre dynamique de réponse de la fluorescence va de 1.5 à 30 fois soit une augmentation de 20 fois. Sur la base de ces résultats, nous avons sélectionné des conditions intermédiaires (200nM de P254C-TP2Rho et 40 $\mu$ g d'extrait protéique) pour des expériences ultérieures, afin de limiter la réponse non spécifique de protéines non pertinentes, telles que la BSA.



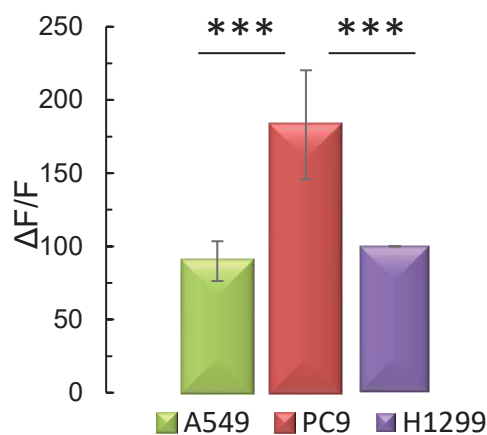
**Figure 46 : A : Réponse dose-dépendante de 200nM de p254C-TP2Rho ( $\lambda_{ex}$  = 392nm;  $\lambda_{em}$  = 510nm) à des quantités croissantes d'extraits de cellules PC9 (rouge; p53 R248Q) de 5 à 200 $\mu$ g ( $n$  = 5; test de Student : \*\*  $p \leq 0.01$  ; \*\*\*  $p \leq 0.001$ ). La BSA (orange) a été utilisé comme contrôle négatif. B : Réponse dose-dépendante de 40 $\mu$ g d'extrait de PC9 (rouge) à des concentrations croissantes de p254C-TP2Rho ( $\lambda_{ex}$  = 392 nm;  $\lambda_{em}$  = 510 nm) de 50 nm à 1 mm ( $n$  = 3; test de Student: \*  $p \leq 0,05$ ) comparé à p254C seul sans extraits cellulaires (bleu).**

### 3.3. Quantification sur extraits cellulaires

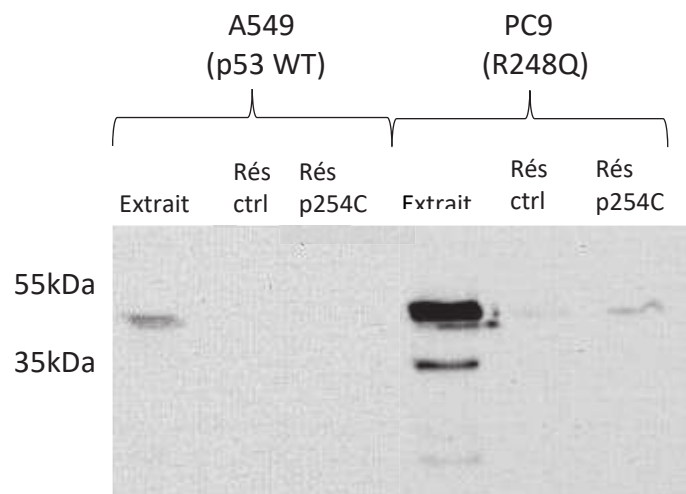
Pour valider davantage l'utilité du biosenseur pour détecter la présence du mutant R248Q, nous avons ensuite vérifié s'il pouvait rapporter les différences entre trois lignées cellulaires du cancer du poumon : A549 (p53 sauvage) PC9 (p53 R248Q) ou H1299 (p53 - / -).

Des extraits cellulaires normalisés préparés à partir de A549, exprimant p53 sauvage, PC9 exprimant le mutant p53 R248Q et H1229 dépourvu de p53 ont été incubés avec 200nM de P254C-TP2Rho. Ces expériences ont révélé que l'augmentation relative de l'émission de fluorescence de P254C-TP2Rho lors de l'incubation avec des extraits protéiques contenant du p53 R248Q était supérieure de 83% à celle des extraits exprimant p53 sauvage ou dépourvus de p53 (Figure 47A). Pour confirmer ces expériences basées sur la fluorescence, Des expériences de « Pull-Down » ont été réalisées en immobilisant le peptide p254C sur résine CNBr-Sepharose. Le Western-Blot des échantillons incubés avec les billes conjuguées avec p254C a révélé que, seul le mutant p53 R248Q exprimé dans des extraits de cellules PC9 était retenu par le biosenseur contrairement au p53 sauvage exprimé dans les A549 qui n'est pas retenu, indiquant la spécificité de reconnaissance pour la séquence cible indépendamment de la sonde (Figure 47B).

A :



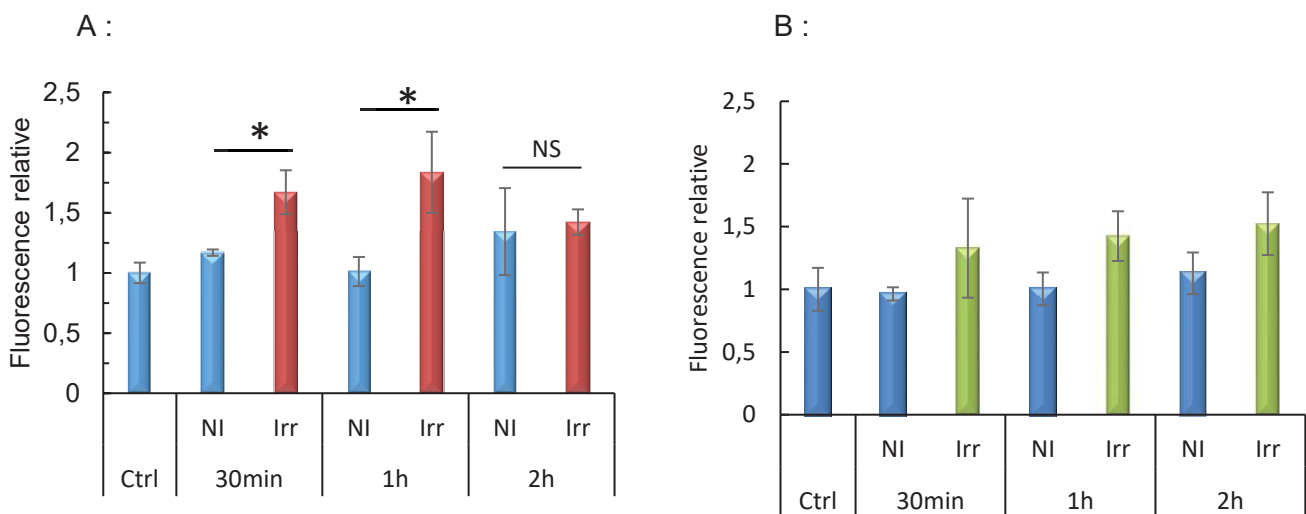
B :



**Figure 47 : A : Émission de fluorescence relative de 200 nm p254C-TP2Rho avec des extraits de cellules de cancer du poumon A549 (p53WT), PC9 (p53 R248Q) et H1299 (p53 - / -) (n = 17; test de Student : \*\*\* p ≤ 0,001). B : Western blot d'extraits protéiques totaux préparés à partir de lignées cellulaires A549 et PC9 (extrait, lignes 1 et 4) et de pulldowns sur résine CNBr sépharose sur lequel le peptide p254C a été immobilisé (Rés p254C, lignes 3 et 6) ou non (Rés ctrl, lignes 2 et 5).**

### 3.4. Application pour déterminer si p53 R248Q est induit

p53 WT étant induite par l'irradiation aux UV-B (G. Liu et al. J. Cell. Biochem. 2006), nous avons utilisé le biosenseur pour déterminer si le mutant R248Q était lui aussi induit après irradiation aux UV-B. Les cellules PC9 ont été irradiées aux UV-B ( $300 \text{ mJ.cm}^{-2}$ ) puis remises à l'incubateur pour permettre l'expression de p53, puis elles ont été grattées après 30min ; 1h ou 2h pour évaluer les niveaux relatifs d'expression de p53 mutant avec P254C-TP2Rho. Cette expérience a révélé que l'expression de R248Q était induite après 30 min et maximale après 1h mais de manière transitoire car après 2h le niveau redevient identique aux cellules non irradiées (Figure 48A). En revanche, le biosenseur n'a rapporté aucune différence significative dans la lignée cellulaire A549 exprimant p53 sauvage et traitées de la même manière, soulignant ainsi à nouveau sa réponse préférentielle au mutant R248Q (Figure 48B).



**Figure 48 : Réponse de p254C-TP2Rho à l'induction du mutant p53 R248Q dans les cellules A : PC9 (gauche en rouge) et B : A549 (droite en vert) après irradiation UV (IRR : Irradiées NI : Non d'irradiées; n = 4; test de Student: \* p, 0,05).**

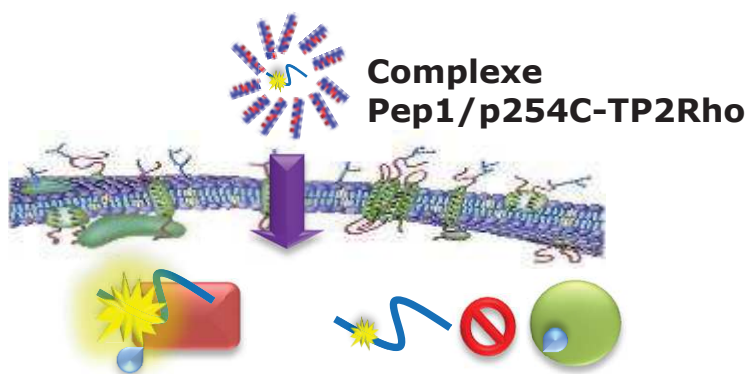


## 4. Application de P254C-TP2Rho sur cellules vivantes

Après avoir établi les conditions optimales et les limites d'utilisation du biosenseur *in vitro*, et sachant qu'une étude récente a montré qu'il était possible de réverser l'agrégation de p53 R248Q à l'aide d'un peptide ReAcp53 (Soragni et al., 2016), nous avons appliqué p254C-TP2Rho sur des cellules vivantes pour rapporter la présence du mutant R248Q par imagerie de fluorescence.

### 4.1. Internalisation cellulaire

Des expériences contrôle ont montré que P254C-TP2Rho à 1 $\mu$ M ne pouvait pas pénétrer dans les cellules tout seul. La stratégie de vectorisation à l'aide d'un peptide vecteur amphipatique a été utilisée pour internalisation. À cette fin, P254C-TP2Rho a été introduit le dans des cellules en culture grâce au peptide vecteur (ou CPP pour Cell Penetrating Peptide) Pep1 (Morris et al., 1999) (Figure 49).

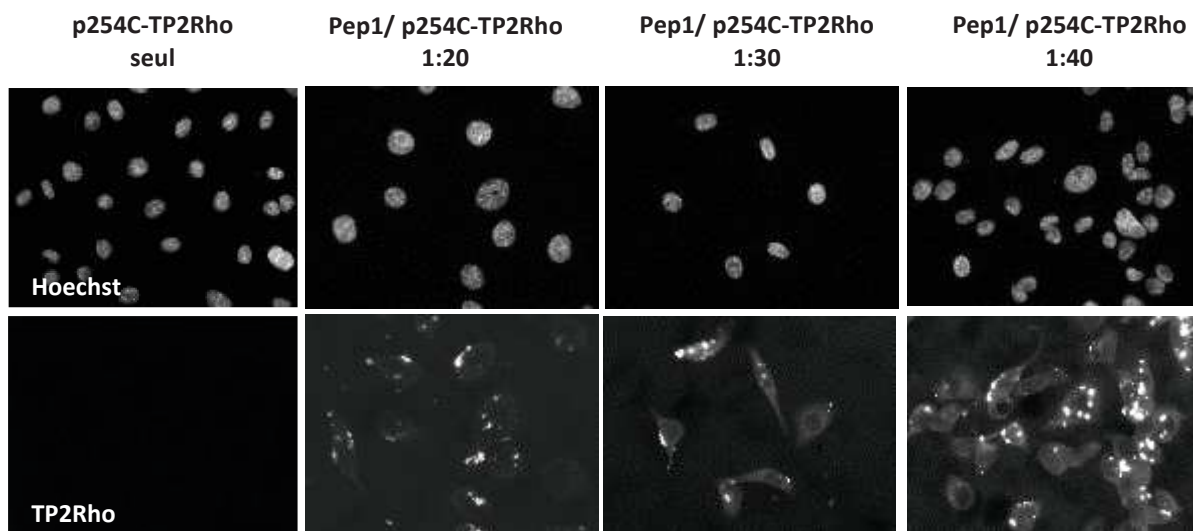


**Figure 49 : Représentation schématique de l'internalisation du peptide p254C-TP2Rho, complexé à Pep1, dans des cellules vivantes.**

#### 4.1.1. Optimisation des conditions d'internalisation

##### 4.1.1.1. Complexation avec Pep1

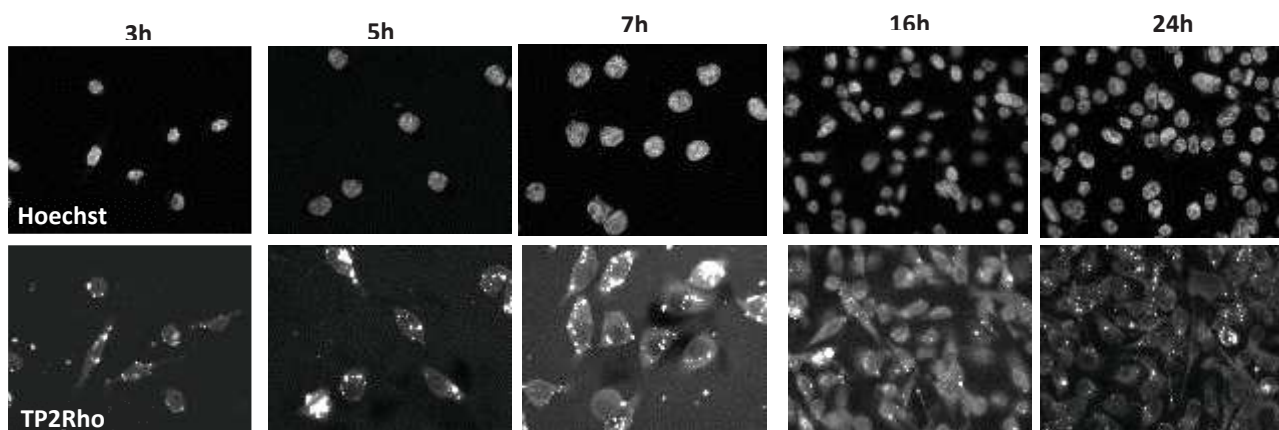
Dans un premier temps, différents rapports de P254C-TP2Rho complexé a Pep1 ont été testés : 1:20 ; 1:30 et 1:40 ; afin de déterminer le plus adéquat. La complexation de P254C-TP2Rho avec Pep1 avec un rapport molaire de 1:40 a permis d'avoir un signal plus important. De nombreux agrégats sont visibles, d'autres expériences ont été réalisées afin d'optimiser l'internalisation pour éliminer les agrégats (Figure 50).



**Figure 50 : Images illustrant l'internalisation de p254C-TP2Rho seul ou à différents ratios de complexe Pep1/P254C-Tp2Rho dans des cellules PC9. Le marquage nucléaire avec le Hoechst est indiqué dans les panneaux supérieurs ; La fluorescence du TP2Rho est indiquée dans les panneaux inférieurs (filtre Cy3 du microscope).**

#### 4.1.1.2. Temps de recouvrement

P254C-TP2Rho est efficacement internalisé dans les cellules quand il est complexé avec Pep1 (rapport 1 :40), mais des agrégats sont visibles. Afin de minimiser ceux-ci, différents temps de « recouvrement » ont été testés : (3h ; 5h ; 7h ; 16h et 24h) et ainsi obtenir une internalisation plus homogène. En effet le temps de recouvrement est important pour laisser le temps aux complexes de se désagréger et au biosenseur de trouver sa cible. Les résultats montrent une diminution significative des agrégats après un recouvrement de 16h. Après un recouvrement de 24h le signal est moins important suggérant qu'une partie du biosenseur a pu être dégradé ou relargué par la cellule ou que sa fluorescence a été atténuée (Figure 51).

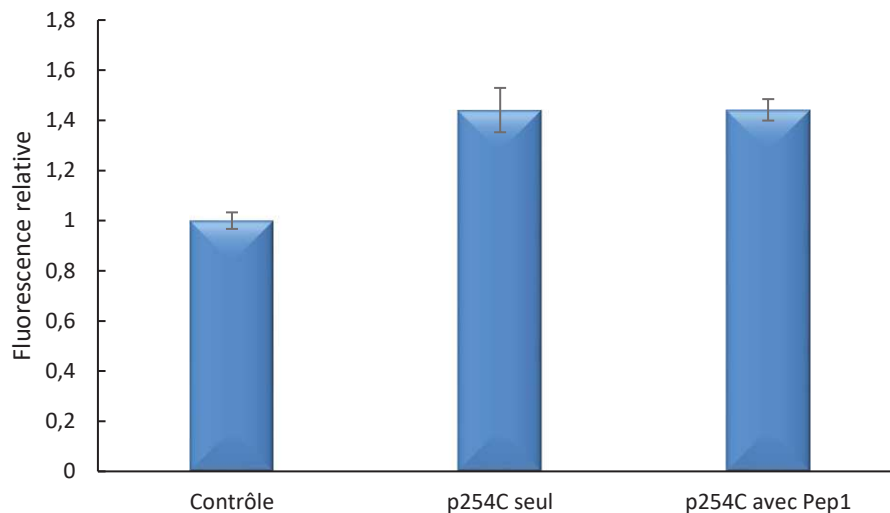


**Figure 51 : Graphique de fluorescence illustrant l'internalisation de p254C-TP2Rho complexé avec Pep1 (ratio 1 :40) après différent temps de recouvrement (3h ; 5h ; 7h ; 16h et 24h) des cellules PC9. La coloration nucléaire avec le colorant Hoechst est indiquée dans les panneaux supérieurs ; La fluorescence du TP2Rho est indiquée dans les panneaux inférieurs (filtre Cy3 du microscope).**

#### 4.2. Toxicité de P254C-TP2Rho

Enfin, nous avons vérifié si l'internalisation du biosenseur pouvait induire une toxicité. Pour cela le P254C-TP2Rho à 1 $\mu$ M ou complexé avec Pep1 (rapport 1:40) ont été incubés pendant

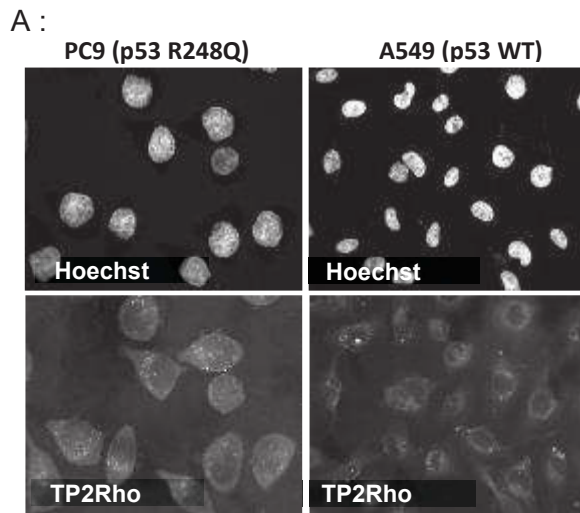
24h avec des cellules PC9. La viabilité cellulaire a été vérifiée grâce au cristal violet dans une expérience de prolifération cellulaire (voir matériel et méthode). Les résultats ont révélé que ni P254C-TP2Rho seul, ni complexé avec Pep1, n'a entraîné d'inhibition significative de la viabilité cellulaire (Figure 52).



**Figure 52 : Expérience de prolifération cellulaire : coloration au cristal violet de cellules PC9 incubées avec p254C-TP2Rho seul et complexées avec Pep1.**

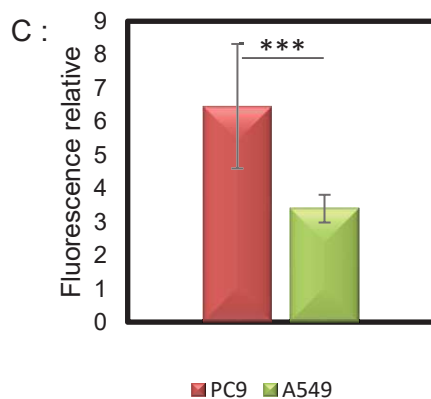
#### 4.3. Application de p254C-TP2Rho à la microscopie à fluorescence

Après avoir déterminé les conditions optimales d'internalisation de P254C-TP2Rho dans les cellules (complexation avec le CPP Pep1 à un rapport 1:40, temps de recouvrement 16h), P254C-TP2Rho a été introduit dans les cellules PC9 et A549 et leur émission de fluorescence relative a été acquise et quantifiée par rapport au signal du Hoechst. Ces expériences ont révélé un rapport de fluorescence significativement supérieur (deux fois supérieur) dans la lignée cellulaire PC9 exprimant le mutant R248Q par rapport à celui de la lignée cellulaire A549 (Figure 53). Cela indique donc que le biosenseur p254C est un outil utile pour quantifier l'expression du mutant R248Q dans des cellules vivantes.



B :

	PC9	A549
ROI1	6,82	3,41
ROI2	6,97	3,06
ROI3	5,25	3,81
ROI4	9,57	3,23
ROI5	8,61	2,82
ROI6	7,44	4,13
ROI7	4,58	3,02
ROI8	5,52	3,84
ROI9	3,35	3,23
Moyenne	6,46	3,39
Ecart-type	1,86	0,41



**Figure 53: Réponse de p254C-TP2Rho à p53 sauvage et au mutant R248Q dans des cellules cancéreuses du poumon. A : Graphique de cellules A549 et PC9 dans lesquelles p254C-TP2Rho a été introduit à la suite d'une complexation avec Pep1. La coloration nucléaire avec le colorant Hoechst est indiquée dans les panneaux supérieurs; La fluorescence du TP2Rho est indiquée dans les panneaux inférieurs (filtre Cy3 du microscope). B : Tableau de la quantification ratiométrique de la fluorescence p254C-TP2Rho / Hoechst pour n=9 région d'intérêt (ROI pour Region Of Interest) C : Analyse de quantification ratiométrique de n = 9 régions d'intérêt différentes (ROI) issues de l'acquisition des signaux de colorant TP2Rho et Hoechst dans les lignées cellulaires A549 et PC9 (n = 9: test de Student: \*\*\*  $p \leq 0,001$ ).**

## **Discussion et perspectives**

## **1. Stratégie de conception du biosenseur**

Les mutants conformationnels de p53 sont impliqués dans de nombreux cancers par la formation d'agrégats de type amyloïde. Les outils de diagnostic actuels ne permettent pas d'identifier le statut conformationnel de p53. Nous avons donc développé un biosenseur peptidique fluorescent, p254C capable de reconnaître les mutants conformationnels de p53 formant des agrégats, et en particulier le mutant R248Q.

Les biosenseurs peptidiques fluorescents présentent de nombreux avantages, tel que leur petite taille (moins de 10kDa), en comparaison des biosenseurs génétiquement codés basé sur des protéines autofluorescentes (plusieurs dizaines de kDa voire 100kDa), ils sont non invasifs, leur production est facile (biologie moléculaire, synthèse peptique). Bien que ne pouvant généralement pas traverser la membrane cellulaire, ils peuvent être introduits dans les cellules par vectorisation, par exemple avec les peptides vecteurs comme TAT (Damayanti et al., 2013) ou Pep1 et CADY2 couramment utilisés dans notre équipe (Kurzawa et al., 2010; Van et al., 2014).

Pour définir la séquence du peptide biosenseur, nous avons opté pour une stratégie rationnelle. En effet une séquence d'acide aminé décrite par Xu et al : ILTIITL, présente dans le domaine de liaison à l'ADN de p53 enfouie dans le cœur de p53 WT, mais qui serait exposée et favoriserait l'agrégation de type amyloïde chez les mutants conformationnels de p53. Cette séquence étant constituée d'acides aminés non chargés cela lui confère un caractère très hydrophobe et donc potentiellement insoluble. Afin de palier à cela nous avons choisi une séquence plus longue composée d'acides aminés chargés, comprenant cette séquence d'agrégation (où la deuxième isoleucine fut remplacée par une cystéine pour permettre un marquage spécifique) et englobant les feuillets  $\beta$  S9 et S10 de p53.

J'ai vérifié que le biosenseur reconnaissait bien la séquence d'agrégation décrite par Xu et al dans des expériences de titration avec le peptide p254I basé sur la séquence d'agrégation mais aussi après thermodénaturation de GST-p53 WT induisant l'exposition de la séquence.

Les expériences que j'ai réalisées ont montré que p254C distingue la forme mutante R248Q de la forme sauvage de p53 :

Sur protéines recombinantes avec lesquelles deux mécanismes d'interaction ont été mis en évidence (interaction directe avec p53 R248Q et interaction coopérative moins affine avec p53 WT). P53WT formant des tétramères et sa structure étant flexible (Joerger and Fersht, 2008), il est possible que p254C soit capable de reconnaître la séquence d'agrégation sur un des tétramères de la forme sauvage (même si celle-ci est enfouie) ayant pour effet d'influencer la liaison de p254C sur les autres tétramères. Pour la forme mutante R248Q la séquence étant déjà exposée, l'influence de la 1<sup>ère</sup> fixation est moins importante sur la liaison des autres, comme suggéré par les coefficients de Hill mesurés ( $n = 2.18 \pm 0.22$  pour p53WT et  $n = 1.66 \pm 0.10$  pour p53 R218Q).

Dans des extraits protéiques où la différence d'émission de fluorescence en réponse à la détection de p53 entre des extraits contenant la forme mutante et les extraits contenant la forme sauvage ou n'exprimant pas de p53 est de 83%.

Ces résultats montrent que p254C est capable de discriminer la forme mutante de la forme sauvage dans un environnement physiologique complexe.



## **2. Spécificité de p254C : Biosenseur de mutants de p53 sujets à l'agrégation**

Nous avons démontré que p254C été capable de différencier la forme mutante R248Q de la forme sauvage de p53. Il a aussi été montré que les mutants conformationnels R175H et R282W formaient aussi des agrégats de type amyloïde (Xu et al., 2011). Le biosenseur p254C étant basé sur une séquence d'agrégation, notre hypothèse est qu'il est capable de reconnaître tous les mutants conformationnels formant des agrégats. Pour valider cette hypothèse les expériences *in vitro* faites sur la protéine recombinante mutante GST-p53 R248Q devront être reproduites avec GST-p53 R175H, GST-p53 R282W en les comparant à la forme recombinante sauvage mais aussi à la forme recombinante d'un mutant de contact tel que GST-273H. De la même manière des expériences *in extracto* et sur cellules vivantes exprimant le mutant R175H pourront être comparées aux cellules exprimant le mutant R248Q d'une part, afin de vérifier si les résultats sont similaires, et d'autres part aux cellules exprimant le mutant de contact R273H et la forme sauvage. Sur le site de l'IARC (<http://p53.iarc.fr/CellLines.aspx>) on retrouve différentes lignées qui pourraient être utilisées pour ces expériences (Tableau 5).

Lignées cellulaires	Topologie	Mutation	Type de mutant
GLC35	Poumon	R175H	Conformationnel
Ma-2	Poumon	R175H	Conformationnel
NCI-H196	Poumon	R175H	Conformationnel
PC9	Poumon	R248Q	Conformationnel
NCI-H1155	Poumon	R273H	Contact
NCI-H1793	Poumon	R273H	Contact
NCI-H1975	Poumon	R273H	Contact
A549	Poumon	Sauvage	-

**Tableau 5 : Exemples de lignées cellulaires de cancer du poumon exprimant les mutants conformationnels R175H ou R248Q, le mutant de contact R273H, ou la forme sauvage de p53 (source : <http://p53.iarc.fr/CellLines.aspx>).**

Au-delà de la spécificité vis-à-vis des différents mutants de p53, se pose la question de la spécificité vis-à-vis d'autres protéines. Il est possible que cette séquence : ILTIITL soit présente dans d'autres protéines humaines. Après recherche BLAST, il est apparu que cette séquence n'est présente dans aucune autre protéine humaine (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Il est donc probable que p254C ne reconnaisse que les agrégats de p53. L'expérience faite avec His-TAU, décrite comme formant des agrégats, et ne montrant aucune réponse de p254C, renforce un peu plus cette hypothèse.

p53 fait partie d'une famille comprenant aussi les facteurs de transcription p63 et p73. Il a été montré que les mutations L514F, G530V, R598L et D601V de p63, impliqués non pas dans le cancer mais dans le Syndrome d'ankyloblépharon-anomalies ectodermiques-fente labiopalatine (ou AEC) formaient des agrégats (Russo et al., 2018). L'alignement entre les séquences de p53 et p63 montre une homologie de 49%, mais la séquence d'agrégation y est quasi identique : p53 : ILTIITL et p63 : ILTIIVTL (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Il serait pertinent de vérifier si p254C est capable de reconnaître les agrégats formés par ces mutants de p63.

Bien que les mutations de p73 soient plus rares, il a été démontré qu'elles existaient dans différentes lignées cellulaires de cancer du poumon (Yoshikawa et al., 1999). Mais à ce jour aucune étude ne démontre qu'il forme des agrégats. L'homologie avec p53 est de 47% et, comme pour p63, la séquence d'agrégation y est quasi identique : p53 : ILTIITL et p63 : ILTIITL (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). p254C permettrait de déterminer, pour la

première fois, si ces mutants de p73 présent dans des cellules de cancer du poumon forment des agrégats.

p254C pourrait constituer un outil intéressant pour la détection spécifique des mutants conformationnels de p53, mais aussi pour la détection d'agrégats de ses paralogues p63 et p73.

### **3. Réponse et sensibilité du biosenseur**

La sensibilité de p254C dépend de la sonde utilisée pour transduire la biodétection du mutant R248Q. L'avantage de notre biosenseur peptidique est que l'on peut coupler à façon n'importe quelle sonde fluorescente selon les expériences à réaliser. Le choix de la sonde s'avère donc primordial lorsqu'on développe un biosenseur fluorescent. Dans le cas de biosenseurs peptidiques, l'utilisation d'une sonde synthétique est nécessaire. En effet les protéines fluorescentes sont de grande taille et les coupler à un biosenseur peptidique de petite taille pourrait empêcher le biosenseur de reconnaître sa cible spécifiquement.

La taille, la structure et les propriétés spectrales de la sonde choisie vont être déterminants pour avoir une réponse sensible.

Lors des expériences de thermodénaturation p254C couplé à TP2Rho répond de manière significative au traitement thermique subi par GST-p53 WT alors que lorsqu'il est couplé à FITC, aucune réponse significative n'est observable. FITC réagissant à une modification du pH, le changement de conformation induit par la thermodénaturation de GST-p53 permettant à p254C d'interagir n'est peut-être pas suffisant pour modifier le pH local de p254C-FITC. Alors

que TP2Rho est une sonde sensible à la polarité et l'interaction de p254C-TP2Rho avec GST-p53 WT thermodénaturée est suffisant pour induire un changement de polarité locale.

Pour les expériences réalisées *in extracto* l'augmentation de la fluorescence du biosenseur en présence d'extraits protéiques varie de 2 ou 3 fois (Cy3, Cy5, TAMRA, FITC, Bodipy) à 12 fois (TP2Rho) selon la sonde choisie. En effet, le rendement quantique augmente significativement quand la sonde est couplée à p254C et incubé avec GST-p53 R248Q ( $\phi$  TP2Rho < 0.005 ;  $\phi$  p254C-TP2Rho : 0.07 ;  $\phi$  P254C-TP2Rho avec p53 R248Q : 0.20). TP2Rho a donc une émission basale de fluorescence très faible qui en présence de la cible augmente de manière significative, constituant un avantage pour l'étude d'interactions protéine-protéine.

p254C-TP2Rho est capable de reconnaître dans des extraits protéiques de 4.25nM à 170nM de p53 R254Q. Ces résultats montrent une sensibilité moins importante que les biosenseurs de p53 développés récemment (allant de 18fM à 18nM selon les biosenseurs, (Afsharan et al., 2016; Al-Ogaidi et al., 2017; Aydın et al., 2018; Giannetto et al., 2017; Hasanzadeh et al., 2017; Liang et al., 2018; Pedrero et al., 2016; Qiu et al., 2013; Wang et al., 2018; Xu et al., 2018) ). Cependant cette sensibilité est suffisante car dans les cellules PC9 j'ai montré que la concentration de p53 R248Q est de 170nM, une concentration détectable facilement par p254C-TP2Rho. Les biosenseurs électrochimiques de p53 développés utilisent un anticorps et ne permettent de rapporter que la quantité de p53 sans pouvoir discriminer la forme sauvage d'une forme mutante, et ne peuvent en aucun cas prévoir l'état conformationnel de p53. Les biosenseurs optiques utilisent une séquence d'ADN spécifique (séquence de p53 WT ou d'un mutant), et eux aussi ne peuvent prévoir l'état conformationnel de p53. L'avantage de p254C est de pouvoir suivre sur la durée l'efficacité d'une drogue capable d'agir sur les mutants conformationnel sur extraits protéiques et donc potentiellement sur différents fluides, mais aussi de visualiser les effets sur cellules vivantes.

L'utilisation de la sonde solvatochromique TP2Rho couplée au biosenseur permet d'avoir une différence d'émission de fluorescence relative entre le biosenseur seul et avec extraits protéiques variant de 1.5 à 30 fois selon la concentration de biosenseur utilisée. L'émission de fluorescence atteint un plateau aux alentours de 750-1000nM. Des expériences menées sur d'autres biosenseurs développés par notre laboratoire ont déjà montré qu'il y avait un seuil de concentration, spécifique à chaque biosenseur, où l'émission de fluorescence atteignait un plateau et au-delà duquel l'émission de fluorescence diminuait, suggérant qu'à haute concentration le biosenseur s'agrège.

Afin d'obtenir un rapport signal sur bruit élevé dans les cellules vivantes et de limiter l'autofluorescence des échantillons biologiques, il est important d'utiliser des fluorophores dotés de propriétés spectrales d'émission et d'excitation à ondes longues et avec un rendement quantique le plus élevé possible. Au cours des dernières années, de nouvelles générations de sondes fluorescentes présentant une photostabilité et des propriétés photophysiques améliorées, adaptées à l'imagerie sur cellules vivantes ont été développées, en particulier des sondes ayant des propriétés spectrales dans le proche infrarouge ou l'infrarouge (Frangioni, 2003, 2008; Oliinyk et al., 2019; Pierce et al., 2008). Travailler avec ces sondes présenterait de nombreux avantages, tels que des dommages limités des échantillons biologiques dus à l'excitation lumineuse, une pénétration profonde dans les tissus, peu d'autofluorescence et faible bruit de fond, permettant ainsi d'avoir un important contraste entre la sonde et le bruit de fond issus des tissus. Ces sondes possèdent tout de même quelques limitations pour l'imagerie biologique, comme une faible stabilité en milieu aqueux, mais certaines ont été développées et utilisées *in vitro* et sur cellule vivantes (Ho et al., 2006; Saikiran et al., 2017; Zhang et al., 2017).

De nouvelles sondes dérivées de sondes existantes ont été développées, par exemple les **mérocyanines**, les **Silicon-Rhodamines** (Lukinavičius et al., 2013; MacNevin et al., 2013),

et une nouvelle famille de sondes solvatochromiques a été développée, des dérivés Vinyl-triphenylamine, dont est issu le **TP2Rho** utilisé dans nos expériences (Dumat et al., 2012).

#### **4. Applications Biologiques**

Afin de visualiser la présence du mutant R248Q dans les cellules et plus particulièrement dans le cytoplasme, j'ai internalisé le biosenseur grâce à un peptide vecteur PEP-1. J'ai montré que cela n'avait aucun effet sur la croissance cellulaire. J'ai enfin mesuré une émission de fluorescence de p254C-TP2Rho, par quantification ratiométrique de l'intensité de fluorescence, 2 fois supérieure dans les cellules exprimant le mutant R248Q (PC9) comparé à celle émise dans les cellules exprimant la forme sauvage (A549).

La visualisation par imagerie de fluorescence permet une mesure en « temps réel » et sur un temps long (pouvant s'étaler sur plusieurs jours) de la présence de mutant conformationnel R248Q dans le cytoplasme. A l'aide d'un double marquage : p254C-TP2Rho pour marquer le mutant R248Q et une immunofluorescence de p53 sauvage, il serait possible de visualiser et de mesurer par ratiométrie quantitative de fluorescence, l'effet d'une drogue capable de reverser cette conformation mutante et de recouvrer les fonctions transcriptionnelles sauvages du mutant et sa relocalisation nucléaire (par exemple ReAcp53 développé par Soragni et al).

Il est à remarquer qu'il y a aussi un signal dans les A549, pouvant suggérer une présence de p53 WT dans le cytoplasme que le biosenseur reconnaît. En effet p53 a une structure flexible et dynamique et il est possible que la séquence d'agrégation soit potentiellement accessible pour p254C. De plus Il a été montré que la forme sauvage pouvait aussi former des agrégats (Ano Bom et al., 2012), que p254C pourrait reconnaître.

Une autre hypothèse serait dû au signal basal de fluorescence de p254C-TP2Rho avant d'être éliminé ou dégradé par la cellule. Afin de limiter voire d'éliminer cette fluorescence basale, des

stratégies ont été conçues pour « atténuer » et / ou « mettre en cage » le fluorophore. Des stratégies d'atténuation intramoléculaire des fluorophores se sont révélées efficaces pour réduire la fluorescence basale avant la liaison de la cible, dans des cellules vivantes (Blum et al., 2005; Ogawa et al., 2009a, 2009b). La « mise en cage » permet la conversion d'une biomolécule en une forme inerte par une modification chimique avec un groupe protecteur sensible à la lumière. La photoactivation sélective de la molécule en cage permet sa libération sous une forme facilement accessible pour sa fonction biologique, son activité enzymatique ou sa capacité à se lier à un partenaire.

La deuxième application que j'ai effectuée avec p254C a consisté à déterminer si le mutant R248Q pouvait être induit dans les cellules lors d'un stress. Il a été montré que la forme sauvage de p53 est induite après une exposition aux UV-B (Liu and Chen, 2006), mais aucune expérience ne montre que les formes mutantes sont elles aussi induites. J'ai donc appliqué mon biosenseur sur des cellules PC9 exprimant le mutant R248Q et montré que celui-ci était induit aussi, de manière transitoire avec un maximum 1h après l'exposition aux UV-B. Cette expérience montre que la demi-vie du mutant R248Q est supérieure à 1h ce qui est supérieur à la demi-vie de p53 WT (de 6 à 20min) et en corrélation avec les données de la littérature décrivant la demi-vie des mutants pouvant aller de 1h à 24h (Strano et al., 2007).

Ces deux applications montrent que le biosenseur p254C peut-être utile pour visualiser les effets d'une drogue sur des cinétiques longues, mais qu'il est aussi applicable sur des cinétiques plus courtes pour visualiser une induction rapide de p53 R248Q.

## **5. Futures applications : Diagnostiques et thérapeutiques**

Le biosenseur p254C est un outil unique pour la détection du mutant conformationnel R248Q et donc de l'état conformationnel de p53. Il est complémentaire des approches basées sur le séquençage génétique qui renseignent sur l'état mutationnel de p53 mais pas sur son état conformationnel. Des études ont montré qu'il était possible de reverser la conformation anormale du mutant R248Q avec un peptide nommé ReAcp53 (Soragni et al., 2016), il serait donc pertinent de comparer des extraits protéiques issus de cellules traitées ou non avec ce peptide et de vérifier l'émission de fluorescence de p254C-TP2Rho. PRIMA-1 et son analogue APR-246 ont été découvertes comme réactivant les fonctions transcriptionnelles de p53 malgré une mutation. Enfin des dérivés de quinazoline ont permis la réactivation des fonctions de p53 (Sutherland et al., 2012).

En utilisant p254C-TP2Rho sur des cellules traitées avec le peptide ReAcp53, que je peux synthétiser, et/ou le dérivé de quinazoline décrit dans la littérature (Sutherland et al., 2012) comme capable de réverser le mutant R248Q, que le Dr Masurier de l'IBMM (Montpellier) a synthétisé, je pourrais visualiser l'effet de ces « drogues » sur des extraits protéiques mais aussi par imagerie de fluorescence sur des cellules vivantes où l'émission de fluorescence des cellules traitées devrait être plus faible.

Plus généralement, p254C pourrait s'avérer être un outil de diagnostic puissant pour le criblage et la détection de petites molécules capables de reverser l'agrégation, voire de restructurer les mutants qui ont une conformation sujette à l'agrégation. Il serait aussi un outil important pour contrôler l'effet de ces molécules en vérifiant l'état conformationnel de p53 au cours du temps.

Enfin p254C permet une détection du mutant conformationnel R248Q avant que l'agrégation ne se produise et donc une détection précoce. Il pourrait permettre un suivi de la réversion de



la conformation sujette à l'agregation de p53 et donc de vérifier l'efficacité d'un traitement. Il permettrait une détection et un traitement précoce du risque de cancer lié à l'agrégation de p53.

# **Matériels et Méthodes**

## **1. Conception, synthèse et marquage du biosenseur peptidique**

Le biosenseur peptidique p254C est dérivé de la séquence des feuillets S9-S10b, abritant le domaine d'agrégation de p53 (résidus 248 à 274), dans laquelle Ile254 a été remplacée par une cystéine pour permettre le couplage spécifique de sondes fluorescentes.

Le peptide p254C : RRPILTCITLEDSSGNLLGRNSFEVRV et le peptide natif p254I RRPILTIITLEDSSGNLLGRNSFEVRV ont été synthétisés en utilisant la stratégie fluorenylmethyloxycarbonyl (Fmoc) avec le robot Liberty Blue de chez CEM sur une résine Amphisphere 40 RAM (voir annexe pour les détails), puis clivé de la résine et lyophilisé. Il a ensuite été dissout dans un mélange H<sub>2</sub>O/acétonitrile et purifié par HPLC (PLC 2050-GILSON) à l'aide d'une colonne : Waters DeltaPak C18 Radial-Pak Cartridge, 100 Å, 40 x 100. Les fractions pures ont été mélangées et lyophilisées. Les peptides ont ensuite été conservés à -20°C.

Le peptide Ctrl: VESSDTIDNVKSKIQDKEGC a été synthétisé par GLS Biochem (Tempé et al Biochemistry 2007).

Les peptides ont été couplés avec les sondes fluorescentes à l'aide de sondes « maléimides » ou « isothiocyanates » sur le groupe thiol des résidus cystéines, à pH 7,0, comme décrit par Molecular Probes™.

Les stocks de fluorophores ont été préparés à une concentration de  $2 \times 10^{-3}$  M dans du DMSO et conservés à -20 ° C. Les peptides ont été préparés à une concentration de  $10^{-3}$  M (dans H<sub>2</sub>O, 1% de DMSO), puis dilués à  $10^{-4}$  M dans du PBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, référence : D8537, Sigma) avant couplage.

La sonde fluorescente a été ajoutée à une concentration molaire 2 à 10 fois supérieure au peptide. Le couplage a été effectué pendant une nuit à 4 ° C. Les peptides ont ensuite été

purifiés sur des colonnes NAP5 (GE Healthcare) dans du PBS pour éliminer l'excès de fluorophore libre.

L'absorbance du peptide marqué a été mesurée sur Nanodrop™ (Thermo Scientific) à des longueurs d'onde appropriées (voir tableau), suivie par un calcul de la concentration molaire en utilisant la loi de Beer-Lambert définie par  $A = \epsilon \times l \times C$ , où A correspond à l'absorbance,  $\epsilon$  est le coefficient d'extinction molaire, l correspond à la longueur du trajet du faisceau de lumière à travers l'échantillon de matériau, tandis que C est la concentration.

	Coefficient d'extinction molaire $\epsilon$ ( $M^{-1}.cm^{-1}$ )	$\lambda_{abs}$ (nm)	$\lambda_{em}$ (nm)	Fournisseur
TP2Rho	58900	510	614	Florence Mahuteau-Betzer, Institut Curie, Paris
Cy3	150000	544	570	GE Healthcare
Cy5	250000	649	670	GE Healthcare
FITC	70000	495	520	FluoProbes
TAMRA	61000	540	565	FluoProbes
Bodipy	80000	503	509	

**Tableau 6 : Propriétés spectrales des sondes fluorescentes utilisées.**

## **2. Production et purification de protéines recombinantes**

### **2.1. Préparation de *E. coli* BL21 DEA 3 compétentes**

Les bactéries *E.coli* BL21 DEA3 codon pLysS + de *E.* ont été cultivées dans 100 ml de milieu LB (Lysogeny Broth) jusqu'à ce que la Densité optique (DO) à 600nm atteigne 0,6. Les cellules ont été récoltées par centrifugation à 4000 tr / min (soit 3739 g), à 4 ° C pendant 15 min (rotor TX-1000, Thermo Scientific). Le culot cellulaire a été remis en suspension dans 5 ml de tampon TSS (Transformation & Storage Solution) froid (10 ml de LB ; 10% de PEG 3000-8000 ; 50 mM de MgCl<sub>2</sub> ; 5% de DMSO ; filtrer sur 0,2 µm), divisé en aliquots de 200 µL et congelé rapidement dans de l'azote liquide. Les cellules compétentes ont ensuite été stockées à -80°C.

### **2.2. Transformation bactérienne**

Les cellules compétentes ont été décongelées sur de la glace (*E.coli* BL21 préparées comme décrit ci-dessus ; *E.coli* DH5α achetées chez Invitrogen). 3 µL de plasmide contenant au moins 100 ng d'ADN ont été mélangés à 50 µL de bactéries compétentes. Le mélange a été incubé sur de la glace pendant 20 minutes avant un choc thermique à 42 ° C pendant 45 secondes. Ensuite 300 µl de milieu LB ont été ajoutés et la culture a été incubé à 37 ° C pendant 1 heure avant de l'étaler sur des boîtes de LB (50 µg / ml d'ampicilline).

### **2.3. Induction des protéines recombinantes GST-p53 WT et GST-p53 R248Q**

Des colonies uniques de *E.coli* BL21 transformées par le plasmide pGex6P1-GSTp53WT ou pGex6P1-GSTp53R248Q ont été cultivées dans 50 ml de LB + Amp (50 µg / ml) à 37 ° C sous

agitation pendant une nuit. La culture a été diluée dans 1 L de milieu LB + Amp (50 µg / ml) et incubée dans les mêmes conditions jusqu'à ce que la DO (600) atteigne 0,6 (environ 2-3 h), où 0,5 mM d'IPTG a été ajouté pour induire l'expression de la GST-p53WT ou GST-p53 R248Q recombinante soluble pendant 3h à 37°C. Les bactéries ont ensuite été récoltées par centrifugation à 4000 tr / min (soit 3739 g) pendant 20 min (rotor TX-1000, Thermo Scientific). Le culot bactérien a été remis en suspension dans 25 ml de tampon de lyse PBS et conservé à -80 ° C jusqu'à la prochaine manipulation. L'expression des protéines a été vérifiée en comparant une fraction de cultures non induites et induites par SDS-PAGE avant purification.

#### 2.4. Purification des protéines recombinantes GST-p53 WT et GST-p53 R248Q

Les culots de cellules bactériennes ont été décongelés et lysés par sonication. Le surnageant a été récupéré par centrifugation à 14 000 tr / min (soit 22789 g) pendant 30 min (rotor F15-8x50cy, Thermo Scientific), puis filtré à travers des membranes de 0,45 µm et 0,2 µm (ClearLine) avant purification par chromatographie.

Le surnageant a été purifié sur colonne GSTrap High Performance (GE Healthcare) dans du tampon PBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, référence : D8537, Sigma ; utilisé pour le reste des expériences sauf indication) et élué avec du glutathion réduit (Euromedex) à 50 mM diluée dans du PBS. Afin d'éliminer le glutathion, la fraction choisie est passée sur colonne de dessalage HiTrap Desalting (GE healthcare). La pureté de la protéine est vérifiée sur Gel SDS-PAGE.

## 2.5. Induction de la protéine recombinante His-TAU

Une unique colonie de *E.coli* BL21 transformée a été prélevée et cultivée dans 50 ml de LB + Amp (50 µg / ml) à 37 ° C sous agitation pendant une nuit.

Le reste de l'induction se déroule comme décrit plus haut.

## 2.6. Purification de la protéine recombinante His-TAU

Les culots bactériens ont été décongelés et lysés par sonication. Le surnageant a été récupéré par centrifugation à 14 000 tr / min (soit 22789 g) pendant 30 min (rotor F15-8x50cy, Thermo Scientific). La fraction de protéines solubles a été incubée pendant 15 min à 75 ° C, puis centrifugée pour éliminer le précipité. Après centrifugation, le surnageant a été incubé avec du sulfate d'ammonium à 60% pendant une nuit pour précipiter His-TAU.

Après centrifugation, le culot a été remis en suspension dans du tampon TRIS-HCl (TRIS 50 mm, pH 7,4, NaCl 150 mm) et purifié par FPLC sur une colonne HiLoad 16/600 Superdex 75 (GE Healthcare) équilibrée dans le tampon TRIS-HCl.

# **3. Biochimie**

## 3.1. Gels SDS-PAGE (SDS-polyacrylamide Gel Electrophoresis)

### Préparation des échantillons

Pour vérifier l'induction de GST-p53WT, GST-p53R248Q et His-TAU, 1 mL de culture bactérienne ont été prélevés avant et après l'induction par IPTG. Après centrifugation pendant 5 min à 10000 tr / min (soit 9615 g) (rotor 75003424, Thermo Scientific), le culot bactérien a

été remis en suspension dans 50 µL de H<sub>2</sub>O + 50 µL de tampon Laemmli, puis soniqué pendant 20 s. Les échantillons ont ensuite été chauffés à 95 ° C pendant 5 minutes et chargés sur SDS-PAGE.

### SDS-PAGE

Des gels de concentration à 4% d'acryl / bisacryl et de séparation à 15% ont été préparés. Les échantillons de protéines dénaturés et un marqueur de protéine (« Low Molecular Weight Calibration Kit », Amersham,) ont été chargés dans les puits du gel et mis à migrer à 250 V pendant 1 h en utilisant l'équipement « Mini PROTEAN Tetra Cell » (Bio-Rad).

Les gels ont été colorés au bleu de Coomassie (« Blue Brilliant » Sigma) pendant 2 min, puis décolorés à l'eau avant d'observer les bandes de protéines.

## 3.2. Western-Blot

### Préparation des échantillons

Voir le paragraphe « 5.2.Préparation des extraits cellulaires » pour la préparation des extraits cellulaires. La concentration en protéines totale a été déterminée par mesure de l'absorbance à 280 nm à l'aide d'un spectrophotomètre « Nanodrop™ ND-1000 (Thermo Scientific) et d'une courbe d'étalonnage faite avec de la BSA (de 0.01 à 10mg/ml). La normalisation pour obtenir 1mg/ml de protéines a été réalisée par dilution dans du tampon de lyse à base de PBS.

### SDS-PAGE

Des gels de concentration à 4% d'acryl / bisacryl et de séparation à 15% ont été préparés. Les échantillons de protéines dénaturés et un marqueur de protéine (« Low Molecular Weight



Calibration Kit », Amersham,) ont été chargés dans le gel et mis à migrer à 250 V pendant 1 h en utilisant l'équipement « Mini PROTEAN Tetra Cell » (Bio-Rad).

#### Transfert des protéines sur membrane et saturation de la membrane

Les protéines migrées dans le SDS-PAGE ont ensuite été transférées sur une membrane de PVDF (membrane Immobilon-P, PVDF; Merck Millipore) pendant 30min à 40mA en utilisant un tampon de transfert conservé à 4°C et un système de transfert semi-sec (membrane imprégnée de tampon de transfert) (« Trans-Blot SD Semi-dry transfert cell » de chez Biorad).

#### Saturation de la membrane

Du lait écrémé à 5% (Régilait) a été préparé dans du PBS avec 0,1% de Tween et les membranes ont été bloquées par incubation pendant 1 heure à température ambiante.

#### Anticorps primaire

L'anticorps primaire dirigé contre p53 (Clone DO-1 ref GTX70214 chez GeneTex) à été dilué au 1/ 1000 dans du PBS tween 5% Régilait. La membrane a été incubée avec l'anticorps primaire pendant une nuit suivie de 3 lavages pendant 10 min avec PBS 0.1% Tween.

#### Anticorps secondaire

L'anticorps anti-souris (Amersham, NXA931) conjugués à la peroxydase de raifort (HRP) ont été dilués à 1/10000 dans du régilait 5% PBS Tween 0.1%. La membrane a été incubée pendant 60 minutes à température ambiante, puis 3 lavages de 5 minutes dans du PBS Tween 0.1% ont été fait.

## Détection

ECL (ECL™ Prime Western blotting detection reagent ; GE Healthcare) a été ajouté sur la membrane et incubé pendant 2 min. La Peroxydase de raifort présente sur l'anticorps secondaire va oxyder le luminol, présent dans l'ECL, qui va émettre de la lumière. La chimiluminescence a été détectée à l'aide d'une caméra d'imagerie à chimiluminescence (Chemi-Smart 5000; Vilber Lourmat).

## **4. Expériences de titrations fluorescentes**

### **4.1. Interaction Peptide / peptide ou protéine / peptide**

#### Intéraction directe

Les titrations de fluorescence ont été réalisées dans des plaques 96 puits noires (Greiner Bio-one) en utilisant un spectrofluorimètre Clariostar™ (BMG) thermostaté à 30°C pendant 40 minutes dans 200 µL de PBS (Sigma). La fluorescence du peptide p254C marqué au FITC ou Cy3 ou TP2Rho à 200 nM avec les protéines recombinantes GST-p53WT et GST-p53 R248Q a été acquise à 520 nm après excitation à 495 nm (FITC) ; à 580nm après excitation à 530nm (Cy3) ; à 614nm après excitation à 510nm (TP2Rho). L'analyse des données a été réalisée à l'aide du logiciel GraFit (Erathicus Ltd). L'ajustement de la courbe et le calcul de la constante de dissociation, pour l'interaction peptide / peptide et GST-p53 R248Q / Biosenseur a été réalisé à l'aide d'une équation quadratique:

$$F = F_{min} + (F_{max} - F_{min}) * \frac{Kd + L + p - \sqrt{(\sqrt{(Kd + L + p)^2 - 4 * p})}}{2 * p}$$

où F correspond à la fluorescence, Fmax la fluorescence maximale, Fmin la fluorescence minimale, Kd la constante de dissociation, p la concentration en peptide fluorescent et L la concentration en ligand.

Explication de l'équation quadratique :

Sachant que :  $Kd = \frac{[E]*[S]}{[ES]}$  et

$[E] = [E_0] - [ES]$  où [E] est la concentration en enzyme et [E<sub>0</sub>] la concentration initiale d'enzyme et [ES] la concentration en complexe enzyme/substrat

$[S] = [S_0] - [ES]$  où [S] est la concentration en substrat et [S<sub>0</sub>] la concentration initiale de substrat et [ES] la concentration en complexe enzyme/substrat

Donc

$$Kd = \frac{([E_0] - [ES]) * ([S_0] - [ES])}{[ES]} \text{ soit } Kd = \frac{[E_0] * [S_0] - [E_0] * [ES] - [ES] * [S_0] + [ES]^2}{[ES]}$$

Ou :

$$Kd * [ES] = [E_0] * [S_0] - [E_0] * [ES] - [ES] * [S_0] + [ES]^2$$

Nous avons fait ici des expériences de titration de fluorescence :

[E<sub>0</sub>] la concentration initiale du titrant ou ligand que l'on va appeler L

[S<sub>0</sub>] la concentration initiale du substrat ou peptide fluorescent soit [Fmin] que l'on va appeler p.

A chaque titration, l'ajout de titrant va entraîner un incrément de fluorescence : ΔF soit (F - Fmin).

La concentration en complexe enzyme/substrat est donc le rapport entre, la différence d'émission de fluorescence, sur l'amplitude de l'émission de fluorescence, soit :

$$[ES] = \frac{[E]*[S]}{Kd} = \frac{(F-F_{min})*L}{F_{max}-F_{min}}$$

On peut donc écrire :

$$Kd * \frac{(F - F_{min}) * L}{F_{max} - F_{min}} = L * p - L * \frac{(F - F_{min}) * L}{F_{max} - F_{min}} - \frac{(F - F_{min}) * L}{F_{max} - F_{min}} * p + \left(\frac{(F - F_{min}) * L}{F_{max} - F_{min}}\right)^2$$

Qui peut aussi s'écrire de la manière suivante :

$$0 = \underbrace{\left(\frac{(F - F_{min}) * L}{F_{max} - F_{min}}\right)^2}_{ax^2} - \underbrace{\left(\frac{(F - F_{min}) * L}{F_{max} - F_{min}}\right) * (Kd + L + p)}_{bx} + \underbrace{L * p}_c$$

Il s'agit bien d'une équation quadratique de type  $ax^2 + bx + c = 0$  avec :

$$a = 1$$

$$b = (Kd+L+p)$$

$$c = L * p$$

Qui se résoud de la manière suivante  $x = \frac{-b \pm \sqrt{b^2 - 4ac}}{2a}$

On peut donc noter :

$$\frac{(F-F_{min})*p}{F_{max}-F_{min}} = \frac{Kd+p+L - \sqrt{(Kd+p+L)^2 - 4*p*L}}{2*p}$$

soit

$$F = F_{min} + (F_{max} - F_{min}) * \frac{Kd + L + p - \sqrt{(\sqrt{(Kd + L + p)^2 - 4 * p})}}{2 * p}$$

où F correspond à la fluorescence, Fmax la fluorescence maximale, Fmin la fluorescence minimale, Kd la constante de dissociation, p la concentration en peptide fluorescent et L la concentration en ligand.

## Interaction coopérative

Lors d'un mécanisme coopératif, la fixation d'un premier ligand va influencer la fixation des ligands suivants. L'interaction GST-p53 WT / p254C ayant un mécanisme coopératif, l'ajustement de la courbe et le calcul de la constante de dissociation, a été réalisé à l'aide de l'équation suivante, à l'aide du logiciel GraFit version 7.0 (Erithacus Software) :

$$y = \frac{L^n * Cap}{(Kd+L)^n}$$

où Kd correspond à la constante de dissociation, L la concentration en ligand, Cap le nombre de site disponible pour la fixation du ligand, et n constante de Hill qui définit le degrés de coopérativité : si n = 1, l'interaction du ligand sur les différents sites se fait de manière indépendante ; si n > 1, l'interaction est coopérative ; si n < 1, l'interaction est anti-coopérative.

### 4.2. Thermo-dénaturation de protéines recombinantes

La protéine recombinante GST-p53 à une concentration de 1 µM préparée, comme décrit plus haut, dans du PBS a été incubée pendant 15 min à 4, 25, 37, 60 et 95°C. Les titrations de fluorescence ont été réalisés dans des plaques 96 puits (Greiner bio-one) avec un spectrofluorimètre Clariostar (BMG) thermostatés à 30°C pendant 40 minutes dans 200 µL de PBS (Sigma). La fluorescence du peptide p254C marqué au FITC ou TP2Rho à 200 nM a été acquise à 520 nm après excitation à 495 nm (FITC) ; à 614nm après excitation à 510nm (TP2Rho).

#### 4.3. Réponse fluorescente dans les extraits cellulaires

La concentration en protéines totales dans les extraits cellulaires a été déterminée par mesure de l'absorbance à 280 nm à l'aide d'un spectrophotomètre « Nanodrop™ ND-1000 (Thermo Scientific) et d'une courbe d'étalonnage faite avec de la BSA. La normalisation pour obtenir 1µg/µl de protéines a été réalisée par dilution dans du tampon de lyse à base de PBS (voir annexe).

Les titrations de fluorescence ont été réalisées dans des plaques 96 puits (Greiner bio-one) avec un spectrofluorimètre Clariostar (BMG) thermostaté à 30°C pendant 40 minutes dans 200 µL de PBS (Sigma). La fluorescence du peptide p254C marqué au a été acquise à 520 nm après excitation à 495 nm (FITC) ; à 580nm après excitation à 530 nm (Cy3) ; à 675nm après excitation à 610 nm (Cy5) ; à 585 nm après excitation à 535 nm (TAMRA) ; à 525 nm après excitation à 477 nm (Bodipy) ; à 510 nm après excitation à 392 nm (TP2Rho).

### **5. Biologie cellulaire**

#### 5.1. Lignée cellulaire et milieu de culture

Le milieu de culture cellulaire (RPMI 1640 W/GLUTAMAX-I) a été acheté chez Life Technologies, le sérum de veau foetal (SVF : sérum de Veau Fœtal ou Fetal Bovine Serum : F7524) et les antibiotiques (Penicilin/streptomycin ref : P4333) chez Sigma-Aldrich. Les lignées cellulaires A549 ; PC9 et H1299 ont été obtenues auprès de l'ATCC (American Type Culture Collection). Les lignées cellulaires ont été cultivées dans du milieu RPMI (Roswell Park Memorial Institute) + Glutamax supplémenté avec 10% de, 100 unités / ml de pénicilline (sel de sodium) et 100 µg / ml de streptomycine à 37 ° C dans une atmosphère contenant 5% de

CO<sub>2</sub>. Pour les expériences de microscopie, du milieu RPMI sans rouge de phénol a été utilisé (RPMI 1640 (1X) without phénol red, Life Technologies).

Lignées cellulaires dérivées de cancer du poumon utilisées :

	Phénotype de p53
A549	p53 sauvage
PC9	muté (R248Q), agrégation et perte de fonction
H1299	-/-

**Tableau 7 : Lignées cellulaires de cancer du poumon utilisées et le phénotype de p53 associé.**

## 5.2. Préparation des extraits cellulaires

Les cellules ont été cultivées jusqu'à une confluence de 90%, lavées avec du PBS, puis récoltées par grattage dans du PBS, suivies d'une centrifugation de 10 min à 13 000 tr / min (soit 17008 g) (rotor 75003424, Thermo Scientific) à 4 ° C. Les cellules présentes dans les culots cellulaires ont ensuite été lysées dans du tampon de lyse à base de PBS (voir annexe) avec des seringues 21G puis 26G (Terumo). Après centrifugation des extraits cellulaires pendant 10 min à 13 000 tr / min (soit 17008 g) (rotor 75003424, Thermo Scientific) à 4 ° C, le surnageant a été recueilli. La concentration en protéines solubles a été déterminée en mesurant l'absorbance à 280 nm à l'aide d'un spectrophotomètre Nanodrop™ (Thermo Scientific) et d'une courbe d'étalonnage faite avec de la BSA (de 0.01 à 10mg/ml). La normalisation a été réalisée par dilution dans du tampon de lyse à base de PBS (voir annexe).

### 5.3. Traitement des cellules

Les cellules non synchronisées ont été cultivées jusqu'à la sous-confluence (60-70%). Des peptides à  $10^{-4}M$  ;  $10^{-5}M$  ;  $10^{-6}M$  et  $10^{-7}M$  ont été ajoutés et les cellules ont été incubées pendant 24 ou 48 heures, puis lavées avec du PBS.

Peptides utilisés :

ReAcp53 : RRRRRRRRRRPILTRITLE

Pep-p53-254Rshort : KETWWETWWTEKKRPILTRITLE

Des extraits cellulaires ont ensuite été préparés comme décrit précédemment (5.2.Préparation des extraits cellulaires).

### 5.4. Test de prolifération cellulaire (toxicité)

Les tests de prolifération ont été réalisés dans des plaques à 12 puits. Le jour précédent l'addition des peptides, les cellules ont étéensemencées à une densité de 10 000 à 15 000 cellules / puits. Ensuite, le biosenseur p254C couplé à TP2Rho, seul ou complexés au peptide Pep-1 avec un rapport molaire 1 : 40 a été ajouté aux cellules. Les cellules ont ensuite été incubées pendant 24 heures et ensuite lavées deux fois avec du PBS. La fixation a été effectuée par incubation dans du PFA (paraformaldéhyde) à 4% (dilué dans du PBS) pendant 10 min à température ambiante, puis incubé avec du « cristal violet » (Sigma) pendant 30 min (Gillies et al., 1986). Les cellules ont ensuite été lavées trois fois avec H<sub>2</sub>O avant l'ajout d'acide acétique à 10%. La croissance relative des cellules est obtenue pour chaque puits par mesure de la densité optique à 595nm à l'aide d'un spectrofluorimètre Clariostar™ (BMG).



### 5.5. Irradiation au UV-B (induction de p53)

Les cellules ont été irradiées aux UV-B à  $300 \text{ mJcm}^{-2}$  à l'aide d'une lampe à UV : Waldmann 800 K, puis remises dans l'incubateur et grattées au bout de 30 min, 1 h ou 2 h pour préparer des extraits cellulaires comme décrit plus haut.

Des expériences de fluorescence avec ces extraits cellulaires ont été réalisées dans des plaques 96 puits avec un spectrofluorimètre Clariostar (BMG) thermostaté à  $30^{\circ}\text{C}$ . Les échantillons (200  $\mu\text{l}$ ) ont été préparés dans du PBS (50 mM Phosphate, pH 7,4, NaCl 150 mM). Les peptides marqués TP2Rho (200 nM) ont été excités à une longueur d'onde ( $\lambda$ ) = 392 nm et les signaux d'émission ont été acquis à  $\lambda = 510 \text{ nm}$ .

### 5.6. Internalisation cellulaire

Le peptide p254C marqué a été préparé dans du PBS à une concentration de 1  $\mu\text{M}$  seul ou complexé avec Pep-1 selon différents rapports. Les cellules PC9 et A549 ont été cultivées sur des lamelles dans des plaques 12 puits jusqu'à une confluence de 80%. Les cellules ont ensuite été lavées deux fois avec du PBS. 500  $\mu\text{l}$  de peptides ont été doucement ajoutés sur des cellules et incubés pendant 45 min à  $37^{\circ}\text{C}$  dans une atmosphère contenant 5% de  $\text{CO}_2$ . Du milieu RPMI a ensuite été ajouté, suivi d'une incubation supplémentaire dans les mêmes conditions pendant 1h ; 3h ; 5h ; 7h ; 16h ; 24h. Les cellules ont été lavées abondamment avant la fixation des cellules (lamelles couvre-objets).

## 5.7. Fixation cellulaire et coloration de Hoechst

La fixation des cellules a été effectuée par incubation dans du PFA à 4% (dilué dans du PBS) pendant 5 min à température ambiante, suivie de 3 lavages dans du PBS. Hoechst 33342 (Sigma) dilué au 1/10000 dans H<sub>2</sub>O MilliQ (1 µg / mL) a été ajouté, pour marquer les noyaux, à température ambiante pendant 5 min, suivis de 2 lavages dans du PBS. Les lamelles ont ensuite été fixées sur des lames de microscope (Superfrost™; Thermo Scientific) avec du Mowiol™ (Poly(vinyl alcohol)) pour les acquisitions en microscopie à fluorescence.

## 6. Microscopie

### 6.1. Acquisition sur cellules fixées

Des expériences d'internalisation de p254C (complexé ou non avec Pep-1) ont été effectuées dans des cellules A549 ; PC9 et H1299 qui ont été fixées par la suite. Les images ont été acquises avec un microscope Leica DM6000 équipé d'une caméra Coolsnap HQ2 et d'objectifs 40X et piloté par le logiciel Metamorph.

### 6.2. Analyse d'image et quantification ratiométrique

L'analyse des images a été réalisée à l'aide du logiciel ImageJ. Le signal fluorescent du biosenseur couplé au TP2Rho a été quantifié et comparé par détermination du rapport TAMRA / Hoechst. Une région d'intérêt (ROI : Region Of Interest) comprenant trois ou quatre cellules a été créée pour chaque image (Hoechst et TP2Rho) afin de déterminer l'intensité de fluorescence. Ensuite, la fluorescence de base a été soustraite dans toutes les images. Le

rapport «TP2Rho » / « Hoechst » a ensuite été calculé. Les histogrammes finaux présentés correspondent au rapport de fluorescence moyen du biosenseur couplé au TP2Rho sur l'intensité de fluorescence du Hoechst marquant les noyaux cellulaires dans trois champs différents.

## **7. Caractérisation du biosenseur**

### **7.1. NTA (Nanoparticle Tracking Analysis) ou analyse de suivi des nanoparticules**

Les mesures NTA ont été effectuées avec un instrument NanoSight NS 300 (Malvern Panalytical, Royaume-Uni) équipé d'un laser à  $\lambda = 405$  nm et d'une chambre d'échantillonnage à température contrôlée. Après une étape de sonication de 5 minutes, les peptides en suspension (peptide ou sonde à 200 nM) ont été injectées dans la chambre en utilisant une pompe à seringue à 40 UA (unité arbitraire). La température a été réglée à 25°C et trois vidéos de 60 secondes ont été enregistrées. Les vidéos ont ensuite été analysées à l'aide du logiciel NanoSight NTA 3.2 avec un seuil de détection de l'intensité lumineuse, pour la détection d'une nanoparticule, fixé à 5 pour toutes les mesures (sur une échelle allant de 0, pour tout détecter, à 50 pour ne rien détecter).

### **7.2. Détermination du rendement quantique ( $\phi$ )**

Les rendements quantiques de fluorescence de TP2Rho, P254C-TP2Rho ou P254C-TP2Rho en présence de p53 R248Q ont été calculés en utilisant la rhodamine R (dans l'éthanol) comme étalon ( $f = 0,95$ ). Les spectres d'émission de fluorescence ont été enregistrés entre les longueurs d'onde ( $\lambda$ ) = 570 et 670 nm après excitation à  $\lambda = 560$  nm pour le standard et entre

$\lambda = 550$  et  $720$  nm après l'excitation à  $\lambda = 510$  nm pour les échantillons. L'absorbance a été enregistrée à  $\lambda = 560$  nm pour l'étalon et à  $\lambda = 510$  nm pour les échantillons. Les rendements quantiques ont été calculés selon l'équation décrite par (Galvani et al., 2017) :

$$\varphi_{éch} = \varphi_{réf} * \frac{A_{éch}}{A_{réf}} * \frac{DO_{réf}}{DO_{éch}} * \left( \frac{n_{réf}}{n_{éch}} \right)^2$$

dans laquelle  $\varphi_{réf}$  est le rendement quantique de la référence ;  $A_{éch}$  et  $A_{réf}$  sont les aires situées sous les spectres d'émission de l'échantillon et de la référence, respectivement ;  $DO_{éch}$  et  $DO_{réf}$  sont les absorbances de l'échantillon et de la référence, respectivement, mesurées à la longueur d'onde d'excitation ; et  $n_{éch}$  et  $n_{réf}$  sont les indices de réfraction de l'échantillon (PBS: 1,33) et de la référence (éthanol: 1,47), respectivement.

# **Annexe A**

Séquence nucléotidique de p53 WT (source UniprotKB : P04637) :

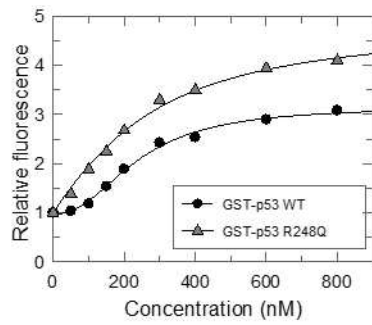
ATGGAGGAGCCGCGAGTCAGATCCTAGCGTCGAGCCCCCTCTGAGTCAGGAAACATTTTCAGACCTATGGAAACTC  
TTCCTGAAAACAACGTTCTGTCCCCCTTGCCGTCCCAAGCAATGGATGATTTGATGCTGTCCCCGGACGATATTG  
AACAATGGTTCACTGAAGACCCAGGTCCAGATGAAGCTCCCAGAATGCCAGAGGCTGCTCCCCCGTGGCCCCCTG  
CACCAGCAGTCTTACACCCGGCGCCCCCTGCACCAGCCCCCTCCTGGCCCCCTGTCATCTTCTGTCCCTTCCCAGA  
AAACCTACCAGGGCAGCTACGGTTTTCCGTCTGGGCTTCTTGCATTCTGGGACAGCCAAGTCTGTGACTTGCACGT  
ACTCCCCTGCCCTCAACAAGATGTTTTGCCAACTGGCCAAGACCTGCCCTGTGCAGCTGTGGGTGATTCCACAC  
CCCCGGCGGCACCCGCGTCCGCGCCATGGCCATCTACAAGCAGTCACAGCACATGACGGAGGTGTGAGGCGCT  
GCCCCACCATGAGCGCTGCTCAGATAGCGATGGTCTGGCCCCCTCCTCAGCATCTTATCCGAGTGGAAGGAAATT  
TGCCTGTGGAGTATTTGGATGACAGAAACACTTTTCGACATAGTGTGGTGGTGCCCTATGAGCCGCTGAGGTTG  
GCTCTGACTGTACCACCATCCACTACAACACTACATGTGTAACAGTTTCTGCATGGGCGGCATGAACCGGAGGCCCA  
TCCTCACCATCATCACACTGGAAGACTCCAGTGGTAATCTACTGGGACGGAACAGCTTTGAGGTGCGTGTGTTGTG  
CCTGTCTGGGAGAGACCCGGCGCACAGAGGAAGAGAATCTCCGCAAGAAAGGGGAGCCTCACCACGAGCTGCCCC  
CAGGGAGCACTAAGCGAGCACTGCCCAACAACACCAGCTCCTCTCCCCAGCCAAAGAAGAAACCCTGGATGGAG  
AATATTTACCCCTTCAGATCCGTGGGCGTGAGCGCTTCGAGATGTTCCGAGAGCTGAATGAGGCCTTGGAACTCA  
AGGATGCCCAGGCTGGGAAGGAGCCAGGGGGGAGCAGGGCTCACTCCAGCCACCTGAAGTCCAAAAAGGGTCAGT  
CTACCTCCCGCCATAAAAAACTCATGTTCAAGACAGAAGGGCCTGACTCAGACTGA

Séquence d'acide aminé de p53 WT (source UniprotKB : P04637) :

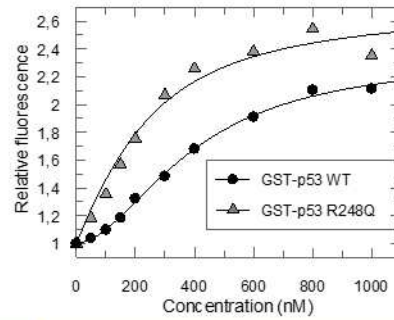
MEEPQSDPSVEPPLSQETFSDLWKLLPENNVLSPLPSQAMDDLMLSPDDIEQWFTEDEPGPDEAPRMPEAAPPVAP  
APAAPTPAAPAPAPSWPLSSSVPSQKTYQGSYGFRLGFLHSGTAKSVTCTYSPALNKMFQQLAKTQVQLWVDS  
PPPGTRVRAMAIYKQSQHMTVEVRRCPHHERCSDSDGLAPPQHLIRVEGNLRVEYLDDRNTFRHSVVPYEPPEV  
GSDCTTIHYNMNCSSCMGMNRRPILTIITLEDSSGNLLGRNSFEVRVCAAPGRDRRTEENLRKKGEPHHELP  
PGSTKRALPNNTSSSPQPKKPLDGEYFTLQIRGRERFEMFRELNEALELKDQAGKEPGGSRHSSHLKSKKGQ  
STSRHKLMFKTEGPDSD

# **Annexe B**

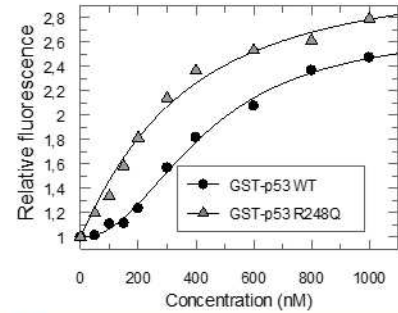
200nM de p254C-FITC titré avec des concentrations croissantes de GST-p53 WT ou R248Q purifié. L'ajustement des courbes et le calcul des constantes de dissociation ont été effectués avec une équation quadratique pour une interaction stœchiométrique entre le mutant GST R248Q et le biosenseur et une équation de liaison coopérative pour GST-p53 WT.



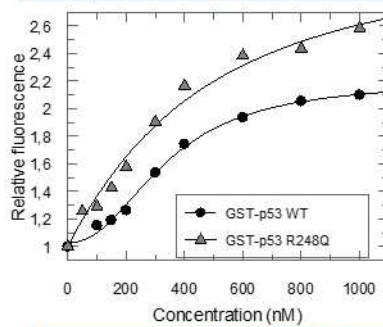
	Kd [nM]
GST-p53 WT	229931 ± 382419
GST-p53 R248Q	159 ± 29



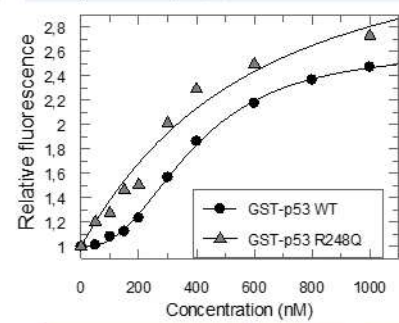
	Kd [µM]
GST-p53 WT	71469 ± 72831
GST-p53 R248Q	73 ± 8



	Kd [µM]
GST-p53 WT (µM)	427889 ± 375419
GST-p53 R248Q (nM)	232 ± 51



	Kd
GST-p53 WT (µM)	472934 ± 721411
GST-p53 R248Q (nM)	356 ± 92

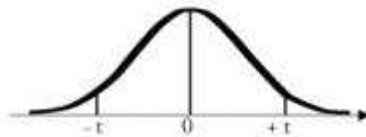


	Kd [µM]
GST-p53 WT (µM)	59198 ± 61216
GST-p53 R248Q (nM)	382 ± 112



# **Annexe C**

Table de Student :



$\alpha$ d.d.l.	0,90	0,50	0,30	0,20	0,10	0,05	0,02	0,01	0,001
1	0,158	1,000	1,963	3,078	6,314	12,706	31,821	63,657	636,619
2	0,142	0,816	1,386	1,886	2,920	4,303	6,965	9,925	31,598
3	0,137	0,765	1,250	1,638	2,353	3,182	4,541	5,841	12,924
4	0,134	0,741	1,190	1,533	2,132	2,776	3,747	4,604	8,610
5	0,132	0,727	1,156	1,476	2,015	2,571	3,365	4,032	6,869
6	0,131	0,718	1,134	1,440	1,943	2,447	3,143	3,707	5,959
7	0,130	0,711	1,119	1,415	1,895	2,365	2,998	3,499	5,408
8	0,130	0,706	1,108	1,397	1,860	2,306	2,896	3,355	5,041
9	0,129	0,703	1,100	1,383	1,833	2,262	2,821	3,250	4,781
10	0,129	0,700	1,093	1,372	1,812	2,228	2,764	3,169	4,587
11	0,129	0,697	1,088	1,363	1,796	2,201	2,718	3,106	4,437
12	0,128	0,695	1,083	1,356	1,782	2,179	2,681	3,055	4,318
13	0,128	0,694	1,079	1,350	1,771	2,160	2,650	3,012	4,221
14	0,128	0,692	1,076	1,345	1,761	2,145	2,624	2,977	4,140
15	0,128	0,691	1,074	1,341	1,753	2,131	2,602	2,947	4,073
16	0,128	0,690	1,071	1,337	1,746	2,120	2,583	2,921	4,015
17	0,128	0,689	1,069	1,333	1,740	2,110	2,567	2,898	3,965
18	0,127	0,688	1,067	1,330	1,734	2,101	2,552	2,878	3,922
19	0,127	0,688	1,066	1,328	1,729	2,093	2,539	2,861	3,883
20	0,127	0,687	1,064	1,325	1,725	2,086	2,528	2,845	3,850
21	0,127	0,686	1,063	1,323	1,721	2,080	2,518	2,831	3,819
22	0,127	0,686	1,061	1,321	1,717	2,074	2,508	2,819	3,792
23	0,127	0,685	1,060	1,319	1,714	2,069	2,500	2,807	3,767
24	0,127	0,685	1,059	1,318	1,711	2,064	2,492	2,797	3,745
25	0,127	0,684	1,058	1,316	1,708	2,060	2,485	2,787	3,725
26	0,127	0,684	1,058	1,315	1,706	2,056	2,479	2,779	3,707
27	0,127	0,684	1,057	1,314	1,703	2,052	2,473	2,771	3,690
28	0,127	0,683	1,056	1,313	1,701	2,048	2,467	2,763	3,674
29	0,127	0,683	1,055	1,311	1,699	2,045	2,462	2,756	3,659
30	0,127	0,683	1,055	1,310	1,697	2,042	2,457	2,750	3,646
$\infty$	0,126	0,674	1,036	1,282	1,645	1,960	2,326	2,576	3,291

## Tests de Students sur les données de thermo-dénaturation avec P254C-TP2Rho

### Comparaison 4°C et 60°C

Groupe	4°C	60°C	moyenne	4,639035	8,87689		
	4,904685	10,00403	SCE1	4,459601			
	3,636695	7,671348	SCE2	14,67215			
	5,117635	8,164315					
	4,911245	10,02322					
	5,592969	7,30157	<b>test student</b>				
	5,091267	10,3294	<b>tobs</b>	<b>8,221196</b>		partie 1 dénominateur	1,594313
	3,236765	7,101091	ddl	12		partie 2 dénominateur	0,166667
	4,621018	10,42016	<b>risque 0,1%</b>	<b>4,318</b>		<b>tobs&gt;t0,001</b>	<b>différent</b>

### Comparaison 4°C et 95°C

Groupe	4°C	95°C	moyenne	4,639035	10,04296		
	4,904685	11,5867	SCE1	4,459601			
	3,636695	8,625935	SCE2	24,678			
	5,117635	8,557676					
	4,911245	10,85248					
	5,592969	9,001327	<b>test student</b>				
	5,091267	12,77693	<b>tobs</b>	<b>8,494706</b>		partie 1 dénominateur	2,428133
	3,236765	7,444932	ddl	12		partie 2 dénominateur	0,166667
	4,621018	11,49767	<b>risque 0,1%</b>	<b>4,318</b>		<b>tobs&gt;t0,001</b>	<b>différent</b>

Comparaison 25°C et 60°C

Groupe	25°C	60°C	moyenne	4,5072	8,87689		
	4,906456	10,00403	SCE1	4,005489			
	3,662229	7,671348	SCE2	14,67215			
	5,029046	8,164315					
	4,50399	10,02322					
	5,42096	7,30157	<b>test student</b>				
	4,961547	10,3294	<b>tobs</b>	<b>8,57938</b>		partie 1 dénominateur	1,55647
	3,162144	7,101091	ddl	12		partie 2 dénominateur	0,166667
	4,411228	10,42016	<b>risque 0,1%</b>	<b>4,318</b>		<b>tobs&gt;t0,001</b>	<b>différent</b>

Comparaison 25°C et 95°C

Groupe	25°C	95°C	moyenne	4,5072	10,04296		
	4,906456	11,5867	SCE1	4,005489			
	3,662229	8,625935	SCE2	24,678			
	5,029046	8,557676					
	4,50399	10,85248					
	5,42096	9,001327	<b>test student</b>				
	4,961547	12,77693	<b>tobs</b>	<b>8,770558</b>		partie 1 dénominateur	2,39029
	3,162144	7,444932	ddl	12		partie 2 dénominateur	0,166667
	4,411228	11,49767	<b>risque 0,1%</b>	<b>4,318</b>		<b>tobs&gt;t0,001</b>	<b>différent</b>

Comparaison 37°C et 60°C

Groupe	37°C	60°C	moyenne	4,656862	8,87689		
	4,735469	10,00403	SCE1	4,767839			
	4,013131	7,671348	SCE2	14,67215			
	5,358091	8,164315					
	4,948489	10,02322					
	5,568207	7,30157	<b>test student</b>				
	5,181376	10,3294	<b>tobs</b>	<b>8,12145</b>		partie 1 dénominateur	1,619999
	3,043762	7,101091	ddl	12		partie 2 dénominateur	0,166667
	4,406371	10,42016	<b>risque 0,1%</b>	<b>4,318</b>		<b>tobs&gt;t0,001</b>	<b>différent</b>

Comparaison 37°C et 95°C

Groupe	37°C	95°C	moyenne	4,656862	10,04296		
	4,735469	11,5867	SCE1	4,767839			
	4,013131	8,625935	SCE2	24,678			
	5,358091	8,557676					
	4,948489	10,85248					
	5,568207	9,001327	<b>test student</b>				
	5,181376	12,77693	<b>tobs</b>	<b>8,422252</b>		partie 1 dénominateur	2,45382
	3,043762	7,444932	ddl	12		partie 2 dénominateur	0,166667
	4,406371	11,49767	<b>risque 0,1%</b>	<b>4,318</b>		<b>tobs&gt;t0,001</b>	<b>différent</b>

## Tests de Students sur les données de thermo-dénaturation avec la thioflavine T

### Comparaison 4°C et 95°C

Groupe	4°C	95°C	moyenne	3,365909	4,940599		
	2,399337	4,231914	SCE1	7,514015			
	3,289063	4,207352	SCE2	2,86598			
	2,224612	4,812868					
	2,264162	4,805255					
	4,865029	4,865029	<b>test student</b>				
	4,585761	6,14753	<b>tobs</b>	<b>3,456062</b>		partie 1 dénominateur	1,038
	3,933398	5,514244	ddl	10		partie 2 dénominateur	0,2
			<b>risque 1%</b>	<b>3,169</b>		<b>tobs&gt;t0,01</b>	<b>différent</b>
			<b>risque 0,1%</b>	<b>4,587</b>		<b>tobs&lt;t0,001</b>	<b>non différent</b>

### Comparaison 25°C et 95°C

Groupe	25°C	95°C	moyenne	3,033355	4,940599		
	2,231376	4,231914	SCE1	5,56262			
	2,878674	4,207352	SCE2	2,86598			
	2,070605	4,812868					
	2,048809	4,805255					
	4,255982	4,865029	<b>test student</b>				
	4,087395	6,14753	<b>tobs</b>	<b>4,645298</b>		partie 1 dénominateur	0,84286
	3,66064	5,514244	ddl	10		<b>partie 2 dénominateur</b>	<b>0,2</b>
			<b>risque 0,1%</b>	<b>4,587</b>		<b>tobs&gt;t0,001</b>	<b>différent</b>

Comparaison 37°C et 95°C

Groupe	37°C	95°C	moyenne	2,479235	4,940599		
	2,012595	4,231914	SCE1	1,614116			
	2,467945	4,207352	SCE2	2,86598			
	1,963806	4,812868					
	1,981049	4,805255					
	3,167575	4,865029	<b>test student</b>				
	3,0882	6,14753	<b>tobs</b>	<b>8,222752</b>		partie 1 dénominateur	0,44801
	2,673472	5,514244	ddl	10		partie 2 dénominateur	0,2
			<b>risque 0,1%</b>	<b>4,587</b>		<b>tobs&gt;t0,001</b>	<b>différent</b>

Tests de Students sur les données de dose réponse de : 5µg PC9 ; 5µg BSA

Groupe	PC9	BSA	moyenne	39037,4	22262,8		
	35300	19227	SCE1	84870785			
	33055	17679	SCE2	51741697			
	43777	25899					
	41880	23831					
	41175	24678	<b>test student</b>				
			<b>tobs</b>	<b>6,0889616</b>		partie 1 dénominateur	22768747
			ddl	6		partie 2 dénominateur	0,333333
			<b>risque 0,1%</b>	<b>5,959</b>		<b>tobs&gt;t0,001</b>	<b>différent</b>

Tests de Students sur les données de dose réponse de :10µg PC9 ; 10µg BSA

Groupe	PC9	BSA	moyenne	47673,8	24833,8		
	42448	19288	SCE1	132361105			
	40468	18668	SCE2	115823277			
	51142	29259					
	52837	27798					
	51474	29156	<b>test student</b>				
			<b>tobs</b>	<b>6,1509915</b>		partie 1 dénominateur	41364064
			ddl	6		partie 2 dénominateur	0,333333
			<b>risque 0,1%</b>	<b>5,959</b>		<b>tobs&gt;t0,001</b>	<b>différent</b>

Tests de Students sur les données de dose réponse de :20µg PC9 ; 20µg BSA

Groupe	PC9	BSA	moyenne	57678	27701,8		
	49981	22752	SCE1	266052862			
	47712	20179	SCE2	132982939			
	64561	31792					
	62066	32011					
	64070	31775	<b>test student</b>				
			<b>tobs</b>	<b>6,3665902</b>		partie 1 dénominateur	66505967
			ddl	6		partie 2 dénominateur	0,333333
			<b>risque 0,1%</b>	<b>5,959</b>		<b>tobs&gt;t0,001</b>	<b>différent</b>



Tests de Students sur les données de dose réponse de :40µg PC9 ; 40µg BSA

Groupe	PC9	BSA	moyenne	65167,4	31262,4		
	57647	26224	SCE1	331692445			
	53821	24746	SCE2	113288669			
	75559	34511					
	70522	34974					
	68288	35857	<b>test student</b>				
			<b>tobs</b>	<b>6,8191338</b>		partie dénominateur 1	74163519
			ddl	6		partie dénominateur 2	0,333333
			<b>risque 0,1%</b>	<b>5,959</b>		<b>tobs&gt;t0,001</b>	<b>différent</b>

Tests de Students sur les données de dose réponse de :100µg PC9 ; 100µg BSA

Groupe	PC9	BSA	moyenne	76678,8	40478,8		
	64568	34723	SCE1	710302437			
	59958	31091	SCE2	199612165			
	87038	45424					
	87664	44605					
	84166	46551	<b>test student</b>				
			<b>tobs</b>	<b>5,0914854</b>		partie dénominateur 1	1,52E+08
			ddl	6		partie dénominateur 2	0,333333
			<b>risque 0,1%</b>	<b>3,707</b>		<b>tobs&gt;t0,01</b>	<b>différent</b>
			<b>risque 0,01%</b>	<b>5,959</b>		<b>tobs&lt;t0,001</b>	<b>non différent</b>

Tests de Students sur les données de dose réponse de :200µg PC9 ; 200µg BSA

Groupe	PC9	BSA					
			moyenne	80915	50216,8		
	65655	43863	SCE1	1,099E+09			
	60585	38400	SCE2	291213519			
	96437	56665					
	93272	56756					
	88626	55400	<b>test student</b>				
			<b>tobs</b>	<b>3,4927475</b>		partie 1 dénominateur	2,32E+08
			ddl	6		partie 2 dénominateur	0,333333
			<b>risque 0,2%</b>	<b>3,143</b>		<b>tobs&gt;t0,02</b>	<b>différent</b>
			<b>risque 0,1%</b>	<b>3,707</b>		<b>tobs&lt;t0,01</b>	<b>non différent</b>

Tests de Students sur les données de dose réponse de : 150nM p254C-TP2Tho

Groupe	Sans PC9	Avec PC9					
			moyenne	2832,5	37092,33		
	3807	37416	SCE1	1899301			
	1858	36729	SCE2	238344,7			
		37132					
			<b>test student</b>				
			<b>tobs</b>	<b>16,56923</b>		partie 1 dénominateur	2137645
			ddl	1		partie 2 dénominateur	2
			<b>risque 5%</b>	<b>12,706</b>		<b>tobs&gt;t0,05</b>	<b>différent</b>
			<b>risque 1%</b>	<b>31,821</b>		<b>tobs&lt;t0,01</b>	<b>non différent</b>

Tests de Students sur les données de dose réponse de : 300nM p254C-TP2Tho

Groupe	Sans PC9	Avec PC9					
			moyenne	4475,5	68824,33		
	6195	69698	SCE1	5913361			
	2756	68858	SCE2	1587681			
		67917					
			test student				
			tobs	16,61364		partie dénominateur <sup>1</sup>	7501041
			ddl	1		partie dénominateur <sup>2</sup>	2
			risque 5%	12,706		tobs>t0,05	différent
			risque 1%	31,821		tobs<t0,01	non différent

Tests de Students sur les données de dose réponse de : 500nM p254C-TP2Tho

Groupe	Sans PC9	Avec PC9					
			moyenne	6128	101910,7		
	9381	102388	SCE1	21164018			
	2875	102909	SCE2	3402109			
		100435					
			test student				
			tobs	13,66481		partie dénominateur <sup>1</sup>	24566127
			ddl	1		partie dénominateur <sup>2</sup>	2
			risque 5%	12,706		tobs>t0,05	différent
			risque 1%	31,821		tobs<t0,01	non différent

Tests de Students sur les données de dose réponse de : 750nM p254C-TP2Tho

Groupe	Sans PC9	Avec PC9					
			moyenne	8500,5	133211		
	13082	134403	SCE1	41980285			
	3919	133152	SCE2	2708034			
		132078					
			<b>test student</b>				
			<b>tobs</b>	<b>13,1914</b>		partie dénominateur <sup>1</sup>	44688319
			ddl	1		partie dénominateur <sup>2</sup>	2
			<b>risque 5%</b>	<b>12,706</b>		<b>tobs&gt;t0,05</b>	<b>différent</b>
			<b>risque 1%</b>	<b>31,821</b>		<b>tobs&lt;t0,01</b>	<b>non différent</b>

Tests de Students sur les données d'extraits cellulaires : PC9 vs A549

Groupe	A549	PC9	moyenne	68889,88235	140314		
	103049	223296	SCE1	8535046252			
	106847	260000	SCE2	46358112744			
	86631	191983					
	81859	199211					
	84746	149639	<b>test student</b>				
	84789	155037	<b>tobs</b>	<b>6,466838701</b>		partie dénominateur 1	1,83E+09
	89094	138430	ddl	30		partie dénominateur 2	0,066667
	83576	139134	<b>risque 0,1%</b>	<b>3,646</b>		<b>tobs&gt;t0,001</b>	<b>différent</b>
	62608	117894					
	60222	120850					
	61261	117660					
	64496	160865					
	39317	83476					
	38492	78986					
	39175	82927					
	37578	86339					
	47388	79611					

Tests de Students sur les données d'extraits cellulaires : PC9 vs H1299

Groupe	H1299	PC9	moyenne	79096,82353	140314		
	136475	223296	SCE1	16116020326			
	130829	260000	SCE2	46358112744			
	94178	191983					
	94507	199211					
	95715	149639	<b>test student</b>				
	107466	155037	<b>tobs</b>	<b>5,195524922</b>		partie 1 dénominateur	2,08E+09
	108004	138430	ddl	30		partie 2 dénominateur	0,066667
	49475	139134	<b>risque 0,1%</b>	<b>3,646</b>		<b>tobs&gt;t0,001</b>	<b>différent</b>
	52053	117894					
	49187	120850					
	65920	117660					
	48459	160865					
	47886	83476					
	48335	78986					
	47643	82927					
	59892	86339					
	108622	79611					

Tests de Students sur les données d'irradiation aux UV-B : PC9 ; 30min

Groupe	NI	Irr	moyenne	71705,5	102525		
	73095	89244	SCE1	10720723			
	71133	93759	SCE2	502259006			
	73313	115280					
	69281	111817					
			<b>test student</b>				
			<b>tobs</b>	<b>3,8487569</b>		partie 1 dénominateur	1,28E+08
			ddl	4		partie 2 dénominateur	0,5
			<b>risque 2%</b>	<b>3,747</b>		<b>tobs&gt;t0,02</b>	<b>différent</b>
			<b>risque 1%</b>	<b>4,604</b>		<b>tobs&lt;t0,01</b>	<b>non différent</b>

Tests de Students sur les données d'irradiation aux UV-B : PC9 ; 1h

Groupe	NI	Irr	moyenne	71705,5	102525		
	73095	89244	SCE1	10720723			
	71133	93759	SCE2	502259006			
	73313	115280					
	69281	111817					
			<b>test student</b>				
			<b>tobs</b>	<b>3,8487569</b>		partie 1 dénominateur	1,28E+08
			ddl	4		partie 2 dénominateur	0,5
			<b>risque 2%</b>	<b>3,747</b>		<b>tobs&gt;t0,02</b>	<b>différent</b>
			<b>risque 1%</b>	<b>4,604</b>		<b>tobs&lt;t0,01</b>	<b>non différent</b>

Tests de Students sur les données d'internalisation cellulaire

Groupe	PC9	A549	moyenne	6,456667	3,394444		
	6,82	3,41	SCE1	31,1988			
	6,97	3,06	SCE2	1,548622			
	5,25	3,81					
	9,57	3,23					
	8,61	2,82	<b>test student</b>				
	7,44	4,13	<b>tobs</b>	<b>5,297381</b>		partie 1 dénominateur	2,339102
	4,58	3,02	ddl	14		partie 2 dénominateur	0,142857
	5,52	3,84	<b>risque 0,1%</b>	<b>4,14</b>		<b>tobs&gt;t0,001</b>	<b>différent</b>
	3,35	3,23					



# **Annexe D**

### **Tampon TBS**

50 mM Tris-HCl, pH 7.4

150 mM NaCl

### **Tampon de lyse PBS/TBS**

Tampon PBS/TBS

+ 0.1 % NP40

+ 3.3 mM PMSF

+ 0.33 mg/mL lysozyme

### **Bouillon LB**

10 g/L Tryptone

10 g/L NaCl

5 g/L yeast extract

### **Tampon TSS**

10 mL LB

10 % Polyethylene glycol 3000 - 8000

50 mM MgCl<sub>2</sub>

5 % DMSO

### **Bouillon LB/ampicilline**

Bouillon LB

+ 50 mg/L ampicilline

### **Boîte de pétri LB/ampicilline**

Bouillon LB + 15 g/L Agar

Autoclave pendant 20min

Laisser refroidir jusqu'à 50°C, ajouter 100 mg/L d'ampicilline et verser 25 mL de LB agar par boîte de pétri de 10 cm.

Lorsque le LB Agar est solidifié, inverser les plaques, fermer avec du parafilm et conserver à 4 ° C

**Tampon Laemmli 2.5X**

1 mL Bleu de Bromophenol 2 % (dilué dans de l'éthanol 96%)

15 mL glycerol 100 % 1.54 g DTT

10 mL SDS 20 %

8 mL Tris 1M pH=6.8 46 mL H<sub>2</sub>O

**Tampon de séparation SDS-PAGE 15% (200mL)**

75 mL Acrylamide/Bis-Acrylamide (37,5/1) mix

50 mL Tris 1.5 M pH=8.8

73 mL H<sub>2</sub>O 2 mL SDS 10 %

**Tampon de concentration SDS-PAGE 4% (200mL)**

22 mL Acrylamide

13 mL Bis-Acrylamide

25 mL Tris 1 M pH=6.8

2 mL SDS 10 % 138 mL H<sub>2</sub>O

**Bleu de Coomassie**

6 g Brilliant Blue R (Sigma Aldrich)

Ajouter 100 mL acide acétique pour solubiliser la poudre

Ajouter 300 mL éthanol 96%

Ajouter 600 mL H<sub>2</sub>O

**Tampon de transfert**

144 g glycine

30.2 g Tris-Base

900mL H<sub>2</sub>O

**Tampon de saturation**

PBS

5 % Régilait

0.1 % tween 20

**Tampon de lyse PBS**

PBS pH 7.4 (Sigma)

0.2 % NP40

2 mM PMSF

1 mM EDTA

Complete™ protease inhibitors (Roche)

# **Références**

Afsharan, H., Khalilzadeh, B., Tajalli, H., Mollabashi, M., Navaeipour, F., and Rashidi, M.-R. (2016). A sandwich type immunosensor for ultrasensitive electrochemical quantification of p53 protein based on gold nanoparticles/graphene oxide. *Electrochimica Acta* *188*, 153–164.

Aguzzi, A., and Rajendran, L. (2009). The Transcellular Spread of Cytosolic Amyloids, Prions, and Prionoids. *Neuron* *64*, 783–790.

Al-Ogaidi, A.J.M., Staden, R.-I.S., Gugoășă, L.A., Staden, J.F. van, Hülya, Yanik, Göksel, M., and Durmuş, M. (2017). A NEW POTENTIOMETRIC SENSOR FOR THE ASSAY OF P 53 IN BLOOD SAMPLES. p.

Ang, H.C., Joerger, A.C., Mayer, S., and Fersht, A.R. (2006). Effects of Common Cancer Mutations on Stability and DNA Binding of Full-length p53 Compared with Isolated Core Domains. *J. Biol. Chem.* *281*, 21934–21941.

Ano Bom, A.P.D., Rangel, L.P., Costa, D.C.F., de Oliveira, G.A.P., Sanches, D., Braga, C.A., Gava, L.M., Ramos, C.H.I., Cepeda, A.O.T., Stumbo, A.C., et al. (2012). Mutant p53 aggregates into prion-like amyloid oligomers and fibrils: implications for cancer. *J. Biol. Chem.* *287*, 28152–28162.

Arsic, N., Ho-Pun-Cheung, A., Evelyne, C., Assenat, E., Jarlier, M., Anguille, C., Colard, M., Pezet, M., Roux, P., and Gadea, G. (2017). The p53 isoform delta133p53 $\beta$  regulates cancer cell apoptosis in a RhoB-dependent manner. *PLoS One* *12*.

Attallah, A.M., Abdel-Aziz, M.M., El-Sayed, A.M., and Tabll, A.A. (2003). Detection of serum p53 protein in patients with different gastrointestinal cancers. *Cancer Detection and Prevention* *27*, 127–131.

Avery-Kiejda, K.A., Zhang, X.D., Adams, L.J., Scott, R.J., Vojtesek, B., Lane, D.P., and Hersey, P. (2008). Small Molecular Weight Variants of p53 Are Expressed in Human Melanoma Cells and Are Induced by the DNA-Damaging Agent Cisplatin. *Clin Cancer Res* *14*, 1659–1668.

Avery-Kiejda, K.A., Morten, B., Wong-Brown, M.W., Mathe, A., and Scott, R.J. (2014). The relative mRNA expression of p53 isoforms in breast cancer is associated with clinical features and outcome. *Carcinogenesis* *35*, 586–596.

Aydin, E.B., Aydin, M., and Sezgintürk, M.K. (2018). Electrochemical immunosensor based on chitosan/conductive carbon black composite modified disposable ITO electrode: An analytical platform for p53 detection. *Biosensors and Bioelectronics* *121*, 80–89.

Balagurumoorthy, P., Sakamoto, H., Lewis, M.S., Zambrano, N., Clore, G.M., Gronenborn, A.M., Appella, E., and Harrington, R.E. (1995). Four p53 DNA-binding domain peptides bind natural p53-response elements and bend the DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* *92*, 8591–8595.

Bensaad, K., Tsuruta, A., Selak, M.A., Vidal, M.N.C., Nakano, K., Bartrons, R., Gottlieb, E., and Vousden, K.H. (2006). TIGAR, a p53-Inducible Regulator of Glycolysis and Apoptosis. *Cell* *126*, 107–120.

Biancalana, M., and Koide, S. (2010). Molecular Mechanism of Thioflavin-T Binding to Amyloid Fibrils. *Biochim Biophys Acta* *1804*, 1405–1412.

- Blum, G., Mullins, S.R., Keren, K., Fonovič, M., Jedeszko, C., Rice, M.J., Sloane, B.F., and Bogyo, M. (2005). Dynamic imaging of protease activity with fluorescently quenched activity-based probes. *Nat Chem Biol* *1*, 203–209.
- Bourdon, J.-C., Fernandes, K., Murray-Zmijewski, F., Liu, G., Diot, A., Xirodimas, D.P., Saville, M.K., and Lane, D.P. (2005). p53 isoforms can regulate p53 transcriptional activity. *Genes Dev* *19*, 2122–2137.
- Bullock, A.N., Henckel, J., and Fersht, A.R. (2000). Quantitative analysis of residual folding and DNA binding in mutant p53 core domain: definition of mutant states for rescue in cancer therapy. *Oncogene* *19*, 1245.
- Burgess, A., Chia, K.M., Haupt, S., Thomas, D., Haupt, Y., and Lim, E. (2016). Clinical Overview of MDM2/X-Targeted Therapies. *Frontiers in Oncology* *6*.
- Butler, J.S., and Loh, S.N. (2003). Structure, Function, and Aggregation of the Zinc-Free Form of the p53 DNA Binding Domain. *Biochemistry* *42*, 2396–2403.
- Bykov, V.J.N., Issaeva, N., Shilov, A., Hultcrantz, M., Pugacheva, E., Chumakov, P., Bergman, J., Wiman, K.G., and Selivanova, G. (2002). Restoration of the tumor suppressor function to mutant p53 by a low-molecular-weight compound. *Nature Medicine* *8*, 282–288.
- Campbell, H., Fleming, N., Roth, I., Mehta, S., Wiles, A., Williams, G., Vennin, C., Arsic, N., Parkin, A., Pajic, M., et al. (2018).  $\Delta 133$ p53 isoform promotes tumour invasion and metastasis via interleukin-6 activation of JAK-STAT and RhoA-ROCK signalling. *Nat Commun* *9*.
- Cañadillas, J.M.P., Tidow, H., Freund, S.M.V., Rutherford, T.J., Ang, H.C., and Fersht, A.R. (2006). Solution structure of p53 core domain: Structural basis for its instability. *Proc Natl Acad Sci U S A* *103*, 2109–2114.
- Carlson, H.J., and Campbell, R.E. (2009). Genetically encoded FRET-based biosensors for multiparameter fluorescence imaging. *Current Opinion in Biotechnology* *20*, 19–27.
- Chang, C., Simmons, D.T., Martin, M.A., and Mora, P.T. (1979). Identification and partial characterization of new antigens from simian virus 40-transformed mouse cells. *J. Virol.* *31*, 463–471.
- Chipuk, J.E., Bouchier-Hayes, L., Kuwana, T., Newmeyer, D.D., and Green, D.R. (2005). PUMA Couples the Nuclear and Cytoplasmic Proapoptotic Function of p53. *Science* *309*, 1732–1735.
- Chiti, F., and Dobson, C.M. (2006). Protein misfolding, functional amyloid, and human disease. *Annu. Rev. Biochem.* *75*, 333–366.
- Cho, Y., Gorina, S., Jeffrey, P.D., and Pavletich, N.P. (1994). Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: understanding tumorigenic mutations. *Science* *265*, 346–355.
- Clark, L.C., and Lyons, C. (1962). Electrode Systems for Continuous Monitoring in Cardiovascular Surgery. *Annals of the New York Academy of Sciences* *102*, 29–45.
- Clark, L.C., Wolf, R., Granger, D., and Taylor, Z. (1953). Continuous Recording of Blood Oxygen Tensions by Polarography. *Journal of Applied Physiology* *6*, 189–193.

- Courbet, A., Endy, D., Renard, E., Molina, F., and Bonnet, J. (2015). Detection of pathological biomarkers in human clinical samples via amplifying genetic switches and logic gates. *Science Translational Medicine* 7, 289ra83-289ra83.
- Damayanti, N.P., Parker, L.L., and Irudayaraj, J.M.K. (2013). Fluorescence Lifetime Imaging of Biosensor Peptide Phosphorylation in Single Live Cells. *Angewandte Chemie International Edition* 52, 3931–3934.
- Duan, J., and Nilsson, L. (2006). Effect of Zn<sup>2+</sup> on DNA Recognition and Stability of the p53 DNA-Binding Domain. *Biochemistry* 45, 7483–7492.
- Duffy, M.J., Synnott, N.C., and Crown, J. (2017). Mutant p53 as a target for cancer treatment. *European Journal of Cancer* 83, 258–265.
- Dumat, B., Bordeau, G., Aranda, A.I., Mahuteau-Betzer, F., El Harfouch, Y., Metgé, G., Charra, F., Fiorini-Debuisschert, C., and Teulade-Fichou, M.-P. (2012). Vinyl-triphenylamine dyes, a new family of switchable fluorescent probes for targeted two-photon cellular imaging: from DNA to protein labeling. *Org. Biomol. Chem.* 10, 6054–6061.
- El-Deiry, W.S., Kern, S.E., Pietenpol, J.A., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (1992). Definition of a consensus binding site for p53. *Nature Genetics* 1, 45.
- Eliyahu, D., Raz, A., Gruss, P., Givol, D., and Oren, M. (1984). Participation of p53 cellular tumour antigen in transformation of normal embryonic cells. *Nature* 312, 646.
- Eliyahu, D., Michalovitz, D., Eliyahu, S., Pinhasi-Kimhi, O., and Oren, M. (1989). Wild-type p53 can inhibit oncogene-mediated focus formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 8763–8767.
- Finlay, C.A., Hinds, P.W., and Levine, A.J. (1989). The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation. *Cell* 57, 1083–1093.
- Förster, T. (1948). Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Annalen der Physik* 437, 55–75.
- Fragou, A., Tzimagiorgis, G., Karageorgopoulos, C., Barbetakis, N., Lazopoulos, A., Papaioannou, M., Haitoglou, C., and Kouidou, S. (2017). Increased  $\Delta 133p53$  mRNA in lung carcinoma corresponds with reduction of p21 expression. *Mol Med Rep* 15, 1455–1460.
- Freed-Pastor, W.A., and Prives, C. (2012). Mutant p53: one name, many proteins. *Genes Dev.* 26, 1268–1286.
- Friedler, A., Veprintsev, D.B., Freund, S.M.V., von Glos, K.I., and Fersht, A.R. (2005). Modulation of Binding of DNA to the C-Terminal Domain of p53 by Acetylation. *Structure* 13, 629–636.
- Frommer, W.B., Davidson, M.W., and Campbell, R.E. (2009). Genetically encoded biosensors based on engineered fluorescent proteins. *Chem Soc Rev* 38, 2833–2841.

Fujita, K., Mondal, A.M., Horikawa, I., Nguyen, G.H., Kumamoto, K., Sohn, J.J., Bowman, E.D., Mathe, E.A., Schetter, A.J., Pine, S.R., et al. (2009). p53 isoforms,  $\Delta 133$ p53 and p53 $\beta$ , are endogenous regulators of replicative cellular senescence. *Nat Cell Biol* *11*, 1135–1142.

Galvani, G., Vardhan Reddy, K.H., Beauvineau, C., Ghermani, N., Mahuteau-Betzer, F., Alami, M., and Messaoudi, S. (2017). Conversion of 3-Bromo-2H-coumarins to 3-(Benzofuran-2-yl)-2H-coumarins under Palladium Catalysis: Synthesis and Photophysical Properties Study. *Org. Lett.* *19*, 910–913.

Ghosh, S., Ghosh, D., Ranganathan, S., Anoop, A., P, S.K., Jha, N.N., Padinhateeri, R., and Maji, S.K. (2014). Investigating the intrinsic aggregation potential of evolutionarily conserved segments in p53. *Biochemistry* *53*, 5995–6010.

Giannetto, M., Bianchi, M.V., Mattarozzi, M., and Careri, M. (2017). Competitive amperometric immunosensor for determination of p53 protein in urine with carbon nanotubes/gold nanoparticles screen-printed electrodes: A potential rapid and noninvasive screening tool for early diagnosis of urinary tract carcinoma. *Analytica Chimica Acta* *991*, 133–141.

Gillies, R.J., Didier, N., and Denton, M. (1986). Determination of cell number in monolayer cultures. *Analytical Biochemistry* *159*, 109–113.

Gorina, S., and Pavletich, N.P. (1996). Structure of the p53 Tumor Suppressor Bound to the Ankyrin and SH3 Domains of 53BP2. *Science* *274*, 1001–1005.

Griss, R., Schena, A., Reymond, L., Patiny, L., Werner, D., Tinberg, C.E., Baker, D., and Johnsson, K. (2014). Bioluminescent sensor proteins for point-of-care therapeutic drug monitoring. *Nature Chemical Biology* *10*, 598–603.

Harms, K., Nozell, S., and Chen, X. (2004). The common and distinct target genes of the p53 family transcription factors. *Cell. Mol. Life Sci.* *61*, 822–842.

Hasanzadeh, M., baghban, H.N., Mokhtarzadeh, A., Shadjou, N., and Mahboob, S. (2017). An innovative immunosensor for detection of tumor suppressor protein p53 in unprocessed human plasma and cancer cell lysates. *International Journal of Biological Macromolecules* *105*, 1337–1348.

Higashimoto, Y., Asanomi, Y., Takakusagi, S., Lewis, M.S., Uosaki, K., Durell, S.R., Anderson, C.W., Appella, E., and Sakaguchi, K. (2006). Unfolding, aggregation, and amyloid formation by the tetramerization domain from mutant p53 associated with lung cancer. *Biochemistry* *45*, 1608–1619.

Ibraheem, A., and Campbell, R.E. (2010). Designs and applications of fluorescent protein-based biosensors. *Current Opinion in Chemical Biology* *14*, 30–36.

Ishimaru, D., Andrade, L.R., Teixeira, L.S.P., Quesado, P.A., Maiolino, L.M., Lopez, P.M., Cordeiro, Y., Costa, L.T., Heckl, W.M., Weissmüller, G., et al. (2003). Fibrillar aggregates of the tumor suppressor p53 core domain. *Biochemistry* *42*, 9022–9027.

Issaeva, N., Bozko, P., Enge, M., Protopopova, M., Verhoef, L.G.G.C., Masucci, M., Pramanik, A., and Selivanova, G. (2004). Small molecule RITA binds to p53, blocks p53–HDM-2 interaction and activates p53 function in tumors. *Nature Medicine* *10*, 1321–1328.



- Jablonski, A. (1933). Efficiency of Anti-Stokes Fluorescence in Dyes. *Nature* 131, 839–840.
- Joerger, A.C., and Fersht, A.R. (2008). Structural biology of the tumor suppressor p53. *Annu. Rev. Biochem.* 77, 557–582.
- Joerger, A.C., Ang, H.C., Veprintsev, D.B., Blair, C.M., and Fersht, A.R. (2005). Structures of p53 Cancer Mutants and Mechanism of Rescue by Second-site Suppressor Mutations. *J. Biol. Chem.* 280, 16030–16037.
- Joerger, A.C., Ang, H.C., and Fersht, A.R. (2006). Structural basis for understanding oncogenic p53 mutations and designing rescue drugs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 15056–15061.
- Johnson, W.D., Muzzio, M., Detrisac, C.J., Kapetanovic, I.M., Kopelovich, L., and McCormick, D.L. (2011). Subchronic oral toxicity and metabolite profiling of the p53 stabilizing agent, CP-31398, in rats and dogs. *Toxicology* 289, 141–150.
- Jones, R.G., Plas, D.R., Kubek, S., Buzzai, M., Mu, J., Xu, Y., Birnbaum, M.J., and Thompson, C.B. (2005). AMP-Activated Protein Kinase Induces a p53-Dependent Metabolic Checkpoint. *Molecular Cell* 18, 283–293.
- Khoury, M.P., and Bourdon, J.-C. (2010). The Isoforms of the p53 Protein. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2.
- Kim, S., and An, S.S.A. (2016). Role of p53 isoforms and aggregations in cancer. *Medicine (Baltimore)* 95.
- Kitayner, M., Rozenberg, H., Kessler, N., Rabinovich, D., Shaulov, L., Haran, T.E., and Shakked, Z. (2006). Structural Basis of DNA Recognition by p53 Tetramers. *Molecular Cell* 22, 741–753.
- Kraiss, S., Spiess, S., Reihhaus, E., and Montenarh, M. (1991). Correlation of metabolic stability and altered quaternary structure of oncoprotein p53 with cell transformation. *Experimental Cell Research* 192, 157–164.
- Kravchenko, J.E., Ilyinskaya, G.V., Komarov, P.G., Agapova, L.S., Kochetkov, D.V., Strom, E., Frolova, E.I., Kovriga, I., Gudkov, A.V., Feinstein, E., et al. (2008). Small-molecule RETRA suppresses mutant p53-bearing cancer cells through a p73-dependent salvage pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105, 6302–6307.
- Kress, M., May, E., Cassingena, R., and May, P. (1979). Simian virus 40-transformed cells express new species of proteins precipitable by anti-simian virus 40 tumor serum. *J Virol* 31, 472–483.
- Kurzawa, L., Pellerano, M., and Morris, M.C. (2010). PEP and CADY-mediated delivery of fluorescent peptides and proteins into living cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1798, 2274–2285.
- Kussie, P.H., Gorina, S., Marechal, V., Elenbaas, B., Moreau, J., Levine, A.J., and Pavletich, N.P. (1996). Structure of the MDM2 Oncoprotein Bound to the p53 Tumor Suppressor Transactivation Domain. *Science* 274, 948–953.

- Lane, D.P. (1992). Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* 358, 15–16.
- Lane, D.P., and Crawford, L.V. (1979). T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature* 278, 261.
- Lavin, M.F., and Gueven, N. (2006). The complexity of p53 stabilization and activation. *Cell Death Differ.* 13, 941–950.
- Lee, H., Larson, D.R., and Lawrence, D.S. (2009). Illuminating the Chemistry of Life: Design, Synthesis, and Applications of “Caged” and Related Photoresponsive Compounds. *ACS Chem Biol* 4, 409–427.
- Lemke, E.A., and Schultz, C. (2011). Principles for designing fluorescent sensors and reporters. *Nature Chemical Biology* 7, 480–483.
- Levine, A.J., and Oren, M. (2009). The first 30 years of p53: growing ever more complex. *Nat. Rev. Cancer* 9, 749–758.
- Levy, C.B., Stumbo, A.C., Ano Bom, A.P.D., Portari, E.A., Cordeiro, Y., Carneiro, Y., Silva, J.L., and De Moura-Gallo, C.V. (2011). Co-localization of mutant p53 and amyloid-like protein aggregates in breast tumors. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 43, 60–64.
- Li, D., Marchenko, N.D., Schulz, R., Fischer, V., Velasco-Hernandez, T., Talos, F., and Moll, U.M. (2011a). Functional Inactivation of Endogenous MDM2 and CHIP by HSP90 Causes Aberrant Stabilization of Mutant p53 in Human Cancer Cells. *Molecular Cancer Research* 9, 577–588.
- Li, D., Marchenko, N.D., and Moll, U.M. (2011b). SAHA shows preferential cytotoxicity in mutant p53 cancer cells by destabilizing mutant p53 through inhibition of the HDAC6-Hsp90 chaperone axis. *Cell Death & Differentiation* 18, 1904–1913.
- Liang, S.-H., and Clarke, M.F. (1999). A Bipartite Nuclear Localization Signal Is Required for p53 Nuclear Import Regulated by a Carboxyl-terminal Domain. *J. Biol. Chem.* 274, 32699–32703.
- Liang, L., Jin, L., Ran, Y., Sun, L.-P., and Guan, B.-O. (2018). Fiber Light-Coupled Optofluidic Waveguide (FLOW) Immunosensor for Highly Sensitive Detection of p53 Protein. *Anal. Chem.* 90, 10851–10857.
- Linzer, D.I., and Levine, A.J. (1979). Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell* 17, 43–52.
- Liu, G., and Chen, X. (2006). Regulation of the p53 transcriptional activity. *J. Cell. Biochem.* 97, 448–458.
- Loving, G.S., Sainlos, M., and Imperiali, B. (2010). Monitoring protein interactions and dynamics with solvatochromic fluorophores. *Trends in Biotechnology* 28, 73–83.
- Lu, S., and Wang, Y. (2010). FRET Biosensors for Cancer Detection and Evaluation of Drug Efficacy. *Clin Cancer Res* 16, 3822–3824.
- Lübbbers, D.W., and Opitz, N. (1975). [The pCO<sub>2</sub>-pO<sub>2</sub>-optode: a new probe for measurement of pCO<sub>2</sub> or pO in fluids and gases (authors transl)]. *Z. Naturforsch., C, Biosci.* 30, 532–533.

Lukinavičius, G., Umezawa, K., Olivier, N., Honigmann, A., Yang, G., Plass, T., Mueller, V., Reymond, L., Corrêa Jr, I.R., Luo, Z.-G., et al. (2013). A near-infrared fluorophore for live-cell super-resolution microscopy of cellular proteins. *Nature Chemistry* 5, 132–139.

Luo, J., Li, M., Tang, Y., Laszkowska, M., Roeder, R.G., and Gu, W. (2004). Acetylation of p53 augments its site-specific DNA binding both in vitro and in vivo. *PNAS* 101, 2259–2264.

MacNevin, C.J., Gremyachinskiy, D., Hsu, C.-W., Li, L., Rougie, M., Davis, T.T., and Hahn, K.M. (2013). Environment-Sensing Merocyanine Dyes for Live Cell Imaging Applications. *Bioconjugate Chem.* 24, 215–223.

Marcel, V., Perrier, S., Aoubala, M., Ageorges, S., Groves, M.J., Diot, A., Fernandes, K., Tauro, S., and Bourdon, J.-C. (2010).  $\Delta 160$ p53 is a novel N-terminal p53 isoform encoded by  $\Delta 133$ p53 transcript. *FEBS Letters* 584, 4463–4468.

Marquette, C.A., Degiuli, A., Imbert-Laurenceau, E., Mallet, F., Chaix, C., Mandrand, B., and Blum, L.J. (2005). Latex bead immobilisation in PDMS matrix for the detection of p53 gene point mutation and anti-HIV-1 capsid protein antibodies. *Anal Bioanal Chem* 381, 1019–1024.

Matoba, S., Kang, J.-G., Patino, W.D., Wragg, A., Boehm, M., Gavrilova, O., Hurley, P.J., Bunz, F., and Hwang, P.M. (2006). p53 Regulates Mitochondrial Respiration. *Science* 312, 1650–1653.

Mei, J., Leung, N.L.C., Kwok, R.T.K., Lam, J.W.Y., and Tang, B.Z. (2015). Aggregation-Induced Emission: Together We Shine, United We Soar! *Chem. Rev.* 115, 11718–11940.

Mizutani, T., Kondo, T., Darmanin, S., Tsuda, M., Tanaka, S., Tobiume, M., Asaka, M., and Ohba, Y. (2010). A novel FRET-based biosensor for the measurement of BCR-ABL activity and its response to drugs in living cells. *Clin. Cancer Res.* 16, 3964–3975.

Morris, M. (2012). Fluorescent Biosensors for Cancer Cell Imaging and Diagnostics. In *Biosensors and Cancer*, pp. 101–124.

Morris, M.C. (2009). Fluorescent Biosensors of Intracellular Targets from Genetically Encoded Reporters to Modular Polypeptide Probes. *Cell Biochem Biophys* 56, 19.

Morris, M.C., Robert-Hebmann, V., Chaloin, L., Mery, J., Heitz, F., Devaux, C., Goody, R.S., and Divita, G. (1999). A new potent HIV-1 reverse transcriptase inhibitor. A synthetic peptide derived from the interface subunit domains. *J. Biol. Chem.* 274, 24941–24946.

Muller, P.A.J., and Vousden, K.H. (2013). p53 mutations in cancer. *Nat. Cell Biol.* 15, 2–8.

Muller, P.A.J., and Vousden, K.H. (2014). Mutant p53 in cancer: new functions and therapeutic opportunities. *Cancer Cell* 25, 304–317.

Nagaich, A.K., Zhurkin, V.B., Durell, S.R., Jernigan, R.L., Appella, E., and Harrington, R.E. (1999). p53-induced DNA bending and twisting: p53 tetramer binds on the outer side of a DNA loop and increases DNA twisting. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 1875–1880.

Ng, J.W.K., Lama, D., Lukman, S., Lane, D.P., Verma, C.S., and Sim, A.Y.L. (2015). R248Q mutation--Beyond p53-DNA binding. *Proteins* 83, 2240–2250.

Nhu Ngoc Van, T., and Morris, M.C. (2013). Chapter Six - Fluorescent Sensors of Protein Kinases: From Basics to Biomedical Applications. In *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, M.C. Morris, ed. (Academic Press), pp. 217–274.

Nikolova, P.V., Henckel, J., Lane, D.P., and Fersht, A.R. (1998). Semirational design of active tumor suppressor p53 DNA binding domain with enhanced stability. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 14675–14680.

Ogawa, M., Kosaka, N., Longmire, M., Urano, Y., Choyke, P.L., and Kobayashi, H. (2009a). Fluorophore-quencher based activatable targeted optical probes for detecting in vivo cancer metastases. *Mol Pharm* 6, 386–395.

Ogawa, M., Kosaka, N., Choyke, P.L., and Kobayashi, H. (2009b). H-type Dimer Formation of Fluorophores: A Mechanism for Activatable, in vivo Optical Molecular Imaging. *ACS Chem Biol* 4, 535–546.

Okorokov, A.L., Sherman, M.B., Plisson, C., Grinkevich, V., Sigmundsson, K., Selivanova, G., Milner, J., and Orlova, E.V. (2006). The structure of p53 tumour suppressor protein reveals the basis for its functional plasticity. *EMBO J.* 25, 5191–5200.

Parada, L.F., Land, H., Weinberg, R.A., Wolf, D., and Rotter, V. (1984). Cooperation between gene encoding p53 tumour antigen and ras in cellular transformation. *Nature* 312, 649.

Pedrero, M., Manuel de Villena, F.J., Muñoz-San Martín, C., Campuzano, S., Garranzo-Asensio, M., Barderas, R., and Pingarrón, J.M. (2016). Disposable Amperometric Immunosensor for the Determination of Human P53 Protein in Cell Lysates Using Magnetic Micro-Carriers. *Biosensors (Basel)* 6.

Pellerano, M., Naud-Martin, D., Peyressatre, M., Prével, C., Teulade-Fichou, M.-P., Morris, M., and Mahuteau-Betzer, F. (2016). TP-2Rho Is a Sensitive Solvatochromic Red-Shifted Probe for Monitoring the Interactions between CDK4 and Cyclin D. *Chembiochem* 17, 737–744.

Piljic, A., and Schultz, C. (2008). Simultaneous Recording of Multiple Cellular Events by FRET. *ACS Chem. Biol.* 3, 156–160.

Popowicz, G.M., Czarna, A., Rothweiler, U., Szwagierczak, A., Krajewski, M., Weber, L., and Holak, T.A. (2007). Molecular Basis for the Inhibition of p53 by Mdmx. *Cell Cycle* 6, 2386–2392.

Prusiner, S.B. (1982). Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* 216, 136–144.

Qiu, S., Li, X., Xiong, W., Xie, L., Guo, L., Lin, Z., Qiu, B., and Chen, G. (2013). A novel fluorescent sensor for mutational p53 DNA sequence detection based on click chemistry. *Biosensors and Bioelectronics* 41, 403–408.

Reichardt, C. (1994). Solvatochromic Dyes as Solvent Polarity Indicators. *Chem. Rev.* 94, 2319–2358.

- Roth, J.A., Nguyen, D., Lawrence, D.D., Kemp, B.L., Carrasco, C.H., Ferson, D.Z., Hong, W.K., Komaki, R., Lee, J.J., Nesbitt, J.C., et al. (1996). Retrovirus-mediated wild-type P53 gene transfer to tumors of patients with lung cancer. *Nature Medicine* 2, 985–991.
- Rotter, V. (1983). p53, a transformation-related cellular-encoded protein, can be used as a biochemical marker for the detection of primary mouse tumor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80, 2613–2617.
- Russo, C., Osterburg, C., Sirico, A., Antonini, D., Ambrosio, R., Würz, J.M., Rinnenthal, J., Ferniani, M., Kehrlöesser, S., Schäfer, B., et al. (2018). Protein aggregation of the p63 transcription factor underlies severe skin fragility in AEC syndrome. *PNAS* 115, E906–E915.
- Rust, R.R., Baldissari, D.M., and Weber, D.J. (2000). Structure of the negative regulatory domain of p53 bound to S100B( $\beta\beta$ ). *Nature Structural Biology* 7, 570.
- Sarnow, P., Ho, Y.S., Williams, J., and Levine, A.J. (1982). Adenovirus E1b-58kd tumor antigen and SV40 large tumor antigen are physically associated with the same 54 kd cellular protein in transformed cells. *Cell* 28, 387–394.
- Silva, J.L., Vieira, T.C.R.G., Gomes, M.P.B., Bom, A.P.A., Lima, L.M.T.R., Freitas, M.S., Ishimaru, D., Cordeiro, Y., and Foguel, D. (2010). Ligand binding and hydration in protein misfolding: insights from studies of prion and p53 tumor suppressor proteins. *Acc. Chem. Res.* 43, 271–279.
- Smith, A.E., Smith, R., and Paucha, E. (1979). Characterization of different tumor antigens present in cells transformed by simian virus 40. *Cell* 18, 335–346.
- Sokolov, A.N., Roberts, M.E., and Bao, Z. (2009). Fabrication of low-cost electronic biosensors. *Materials Today* 12, 12–20.
- Song, W., Huo, S., Lü, J., Liu, Z., Fang, X., Jin, X., and Yuan, M. (2009). Expression of p53 isoforms in renal cell carcinoma. *Chinese Medical Journal* 122, 921–926.
- Soragni, A., Janzen, D.M., Johnson, L.M., Lindgren, A.G., Thai-Quynh Nguyen, A., Tiourin, E., Soriaga, A.B., Lu, J., Jiang, L., Faull, K.F., et al. (2016). A Designed Inhibitor of p53 Aggregation Rescues p53 Tumor Suppression in Ovarian Carcinomas. *Cancer Cell* 29, 90–103.
- Stambolsky, P., Weisz, L., Shats, I., Klein, Y., Goldfinger, N., Oren, M., and Rotter, V. (2006). Regulation of AIF expression by p53. *Cell Death & Differentiation* 13, 2140.
- Stokes George Gabriel (1852). XXX. On the change of refrangibility of light. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* 142, 463–562.
- Stommel, J.M., Marchenko, N.D., Jimenez, G.S., Moll, U.M., Hope, T.J., and Wahl, G.M. (1999). A leucine-rich nuclear export signal in the p53 tetramerization domain: regulation of subcellular localization and p53 activity by NES masking. *EMBO J* 18, 1660–1672.
- Strano, S., Dell’Orso, S., Agostino, S.D., Fontemaggi, G., Sacchi, A., and Blandino, G. (2007). Mutant p53: an oncogenic transcription factor. *Oncogene* 26, 2212.

- Stryer, L., and Haugland, R.P. (1967). Energy transfer: a spectroscopic ruler. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 58, 719–726.
- Su, L., Jia, W., Hou, C., and Lei, Y. (2011). Microbial biosensors: A review. *Biosensors and Bioelectronics* 26, 1788–1799.
- Sutherland, H.S., Hwang, I.Y., Marshall, E.S., Lindsay, B.S., Denny, W.A., Gilchrist, C., Joseph, W.R., Greenhalgh, D., Richardson, E., Kestell, P., et al. (2012). Therapeutic reactivation of mutant p53 protein by quinazoline derivatives. *Invest New Drugs* 30, 2035–2045.
- Tazawa, H., Kagawa, S., and Fujiwara, T. (2013). Advances in adenovirus-mediated p53 cancer gene therapy. *Expert Opinion on Biological Therapy* 13, 1569–1583.
- Teufel, D.P., Freund, S.M., Bycroft, M., and Fersht, A.R. (2007). Four domains of p300 each bind tightly to a sequence spanning both transactivation subdomains of p53. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 7009–7014.
- Tidow, H., Veprintsev, D.B., Freund, S.M.V., and Fersht, A.R. (2006). Effects of oncogenic mutations and DNA response elements on the binding of p53 to p53-binding protein 2 (53BP2). *J. Biol. Chem.* 281, 32526–32533.
- Tidow, H., Melero, R., Mylonas, E., Freund, S.M.V., Grossmann, J.G., Carazo, J.M., Svergun, D.I., Valle, M., and Fersht, A.R. (2007). Quaternary structures of tumor suppressor p53 and a specific p53–DNA complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 12324–12329.
- Tilmaiciu, C.-M., and Morris, M.C. (2015). Carbon nanotube biosensors. *Front Chem* 3.
- Toledo, F., and Wahl, G.M. (2006). Regulating the p53 pathway: in vitro hypotheses, in vivo veritas. *Nature Reviews Cancer* 6, 909.
- Tomita, Y., Marchenko, N., Erster, S., Nemajerova, A., Dehner, A., Klein, C., Pan, H., Kessler, H., Pancoska, P., and Moll, U.M. (2006). WT p53, but Not Tumor-derived Mutants, Bind to Bcl2 via the DNA Binding Domain and Induce Mitochondrial Permeabilization. *J. Biol. Chem.* 281, 8600–8606.
- Tunceroglu, A., Matsuda, M., and Birge, R.B. (2010). Real-time FRET analysis to monitor drug resistance in Chronic Myelogenous Leukemia. *Mol Cancer Ther* 9, 3065–3073.
- Turner, A. (2013). Biosensors: then and now. *Trends in Biotechnology* 31, 119–120.
- Turner, A., Karube, I., and Wilson, G.S. (1987). *Biosensors : Fundamentals and Applications* (Oxford University Press).
- Van, T.N.N., Pellerano, M., Lykaso, S., and Morris, M.C. (2014). Fluorescent Protein Biosensor for Probing CDK/Cyclin Activity in vitro and in Living Cells. *ChemBioChem* 15, 2298–2305.
- Vassilev, L.T. (2004). In Vivo Activation of the p53 Pathway by Small-Molecule Antagonists of MDM2. *Science* 303, 844–848.

- Ventura, A., Kirsch, D.G., McLaughlin, M.E., Tuveson, D.A., Grimm, J., Lintault, L., Newman, J., Reczek, E.E., Weissleder, R., and Jacks, T. (2007). Restoration of p53 function leads to tumour regression in vivo. *Nature* *445*, 661–665.
- Vogelstein, B., and Kinzler, K.W. (1992). p53 function and dysfunction. *Cell* *70*, 523–526.
- Vousden, K.H. (2000). p53: Death Star. *Cell* *103*, 691–694.
- Vousden, K.H. (2002). Activation of the p53 tumor suppressor protein. *Biochim. Biophys. Acta* *1602*, 47–59.
- Vousden, K.H., and Lane, D.P. (2007). p53 in health and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *8*, 275–283.
- Vousden, K.H., and Prives, C. (2009). Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53. *Cell* *137*, 413–431.
- Walker, K.K., and Levine, A.J. (1996). Identification of a novel p53 functional domain that is necessary for efficient growth suppression. *Proc Natl Acad Sci U S A* *93*, 15335–15340.
- Wang, Q., Zimmerman, E.I., Toutchkine, A., Martin, T.D., Graves, L.M., and Lawrence, D.S. (2010). MULTICOLOR MONITORING OF DYSREGULATED PROTEIN KINASES IN CHRONIC MYELOGENOUS LEUKEMIA. *ACS Chem Biol* *5*, 887–895.
- Wang, X., Wang, Y., Jiang, M., Shan, Y., Jin, X., Gong, M., and Wang, X. (2018). Functional electrospun nanofibers-based electrochemiluminescence immunosensor for detection of the TSP53 using RuAg/SiO<sub>2</sub>NPs as signal enhancers. *Analytical Biochemistry* *548*, 15–22.
- Wang, Y., Suh, Y.-A., Fuller, M.Y., Jackson, J.G., Xiong, S., Terzian, T., Quintás-Cardama, A., Bankson, J.A., El-Naggar, A.K., and Lozano, G. (2011). Restoring expression of wild-type p53 suppresses tumor growth but does not cause tumor regression in mice with a p53 missense mutation. *Journal of Clinical Investigation* *121*, 893–904.
- Wassman, C.D., Baronio, R., Demir, Ö., Wallentine, B.D., Chen, C.-K., Hall, L.V., Salehi, F., Lin, D.-W., Chung, B.P., Wesley Hatfield, G., et al. (2013). Computational identification of a transiently open L1/S3 pocket for reactivation of mutant p53. *Nat Commun* *4*, 1407.
- Weinberg, R.L., Veprintsev, D.B., and Fersht, A.R. (2004). Cooperative Binding of Tetrameric p53 to DNA. *Journal of Molecular Biology* *341*, 1145–1159.
- Welch, C.M., Elliott, H., Danuser, G., and Hahn, K.M. (2011). Imaging the coordination of multiple signaling activities in living cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* *12*, 749–756.
- Whitney, M.A., Crisp, J.L., Nguyen, L.T., Friedman, B., Gross, L.A., Steinbach, P., Tsien, R.Y., and Nguyen, Q.T. (2011). Fluorescent peptides highlight peripheral nerves during surgery in mice. *Nat Biotechnol* *29*, 352–356.
- Wong, K.-B., DeDecker, B.S., Freund, S.M.V., Proctor, M.R., Bycroft, M., and Fersht, A.R. (1999). Hot-spot mutants of p53 core domain evince characteristic local structural changes. *PNAS* *96*, 8438–8442.



Xu, J., Reumers, J., Couceiro, J.R., De Smet, F., Gallardo, R., Rudyak, S., Cornelis, A., Rozenski, J., Zwolinska, A., Marine, J.-C., et al. (2011). Gain of function of mutant p53 by coaggregation with multiple tumor suppressors. *Nat. Chem. Biol.* 7, 285–295.

Xu, Q., Liang, K., Liu, R.-Y., Deng, L., Zhang, M., Shen, L., and Liu, Y.-N. (2018). Highly sensitive fluorescent detection of p53 protein based on DNA functionalized Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles. *Talanta* 187, 142–147.

Xue, W., Zender, L., Miething, C., Dickins, R.A., Hernando, E., Krizhanovskiy, V., Cordon-Cardo, C., and Lowe, S.W. (2007). Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas. *Nature* 445, 656–660.

Yang, D.T., Lu, X., Fan, Y., and Murphy, R.M. (2014). Evaluation of Nanoparticle Tracking for Characterization of Fibrillar Protein Aggregates. *AIChE J* 60, 1236–1244.

Yoshikawa, H., Nagashima, M., Khan, M.A., McMenamin, M.G., Hagiwara, K., and Harris, C.C. (1999). Mutational analysis of p73 and p53 in human cancer cell lines. *Oncogene* 18, 3415–3421.

Zhang, Y., and Xiong, Y. (2001). A p53 Amino-Terminal Nuclear Export Signal Inhibited by DNA Damage-Induced Phosphorylation. *Science* 292, 1910–1915.

(2006). Instrumentation for Fluorescence Spectroscopy. In *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, J.R. Lakowicz, ed. (Boston, MA: Springer US), pp. 27–61.



# **Article**



## Fluorescent Biosensor for Detection of the R248Q Aggregation-Prone Mutant of p53

Morgan Pellerano,<sup>[a]</sup> Delphine Naud-Martin,<sup>[b]</sup> Florence Mahuteau-Betzer,<sup>[b]</sup> Marie Morille,<sup>[c]</sup> and May C. Morris<sup>\*[a]</sup>

The p53 tumour suppressor and guardian of the genome undergoes missense mutations that lead to functional inactivation in 50% of human cancers. These mutations occur mostly in the DNA-binding domain of the protein, and several of these result in conformational changes that lead to amyloid-like protein aggregation. Herein, we describe a fluorescent biosensor that reports on the R248Q mutant of p53 in vitro and in living cells, engineered through conjugation of an environmen-

tally sensitive probe onto a peptide derived from the primary aggregation segment of p53. This biosensor was characterised both in vitro and by means of fluorescence microscopy following facilitated delivery into cultured cells. It is shown that this biosensor preferentially reports on the p53 R248Q mutant in the PC9 lung cancer cell line compared with other lung cancer cell lines harbouring either wild-type or no p53.

### Introduction

The p53 protein was first identified in 1979 as a cellular protein physically associated with the simian virus SV40 large tumour antigen.<sup>[1–3]</sup> The subsequent finding that it was abundantly expressed in many tumours, compared with normal tissue, suggested that p53 might be a cellular oncogene.<sup>[3–5]</sup> Further studies revealed that p53 was a transcription factor induced by stress that played an important role in regulating expression of genes required for DNA repair to preserve DNA integrity, resulting in cell cycle arrest, apoptosis or senescence.<sup>[6–9]</sup> In unstressed cells, p53 levels are very low, but are rapidly induced and stabilised in response to various intra- and extracellular stresses, including DNA damage, hypoxia, oxidant metabolism, aging and oncogenic signalling, thereby promoting transcription of a wide variety of genes that modulate cellular functions (such as G1 arrest through induction of p21 or G2 arrest through induction of 14-3-3s, Gadd45 and p21), and consequently, playing a key role in maintaining genomic integrity and preventing tumour formation.<sup>[10–12]</sup> Today, p53 is recog-

nised as one of the most functionally important proteins for cell cycle and transcriptional regulation and a major tumour suppressor.

p53 is a nuclear protein that tetramerises to bind DNA and regulate gene transactivation, and its transcriptional activity is critical for its tumour-suppressive functions because p53 mutation in human cancers abrogates its transcriptional activity.<sup>[13]</sup> Unfortunately, it is also the most frequently mutated protein in human cancers, with mutations or alternative splicing that invalidate its normal function occurring in approximately 50% of tumours.<sup>[8,9,14]</sup> Although most tumour-suppressor genes are deleted or truncated in human cancers, the TP53 gene frequently undergoes missense mutations, resulting in single amino acid substitutions, which cause loss of wild-type (WT) function, but may also exert a dominant negative effect through binding and inhibition of WT p53.<sup>[15]</sup> Moreover, several mutations result in gain of function, which endows p53 mutants with activities that contribute to hyperproliferation; increased tumourigenicity; anchorage-independent cell growth, metastasis and invasiveness; decreased sensitivity to chemotherapeutic drugs; disruption of the spindle checkpoint; activated topoisomerase I activity and induction of gene amplification.<sup>[15,15–17]</sup> For instance, the R175H gain-of-function mutation promotes activation of the multidrug resistance gene MDR1.<sup>[18]</sup> Gain of function R248Q and R273C mutants induce HER2 over-expression in cancer cells.<sup>[19]</sup> Moreover, p53 R248Q, but not R248W, has been shown to enhance in vitro invasiveness of human lung cancer NCI-H1299 cells.<sup>[20]</sup>

The WT p53 protein comprises an acidic and unstructured N-terminal domain that bears two transcriptional activation domains, TAD1 and TAD2, and a proline-rich domain (residues 1–100), a core DNA-binding domain (DBD; residues 102–292), a C-terminal region that contains a nuclear localisation signalling domain, an oligomerisation domain and a negative regulation

[a] M. Pellerano, Dr. M. C. Morris  
Institut des Biomolécules Max Mousseron-IBMM-UMR 5247  
Université de Montpellier, Faculté de Pharmacie  
15, Av. Charles Flahault, 34093 Montpellier (France)  
E-mail: may.morris@umontpellier.fr

[b] D. Naud-Martin, Dr. F. Mahuteau-Betzer  
Institut Curie, PSL Research University  
CNRS, INSERM, UMR9187-U1196  
91405 Orsay (France)

[c] Dr. M. Morille  
Institut Charles Gerhardt-UMR 5253 CNRS-UM-ENSCM  
Université de Montpellier, Faculté de Pharmacie  
15, Av. Charles Flahault, 34093 Montpellier (France)

Supporting information and the ORCID identification numbers for the authors of this article can be found under <https://doi.org/10.1002/cbic.201800531>.

This article is part of a Special Issue on Biosensing and Bioimaging.

domain (residues 293–393.<sup>[16,21–24]</sup> Beyond its ability to interact with gene transactivation sequences, the structural flexibility of p53 endows it with functional plasticity, which enables it to interact with protein partners involved in biological functions beyond transcription.<sup>[22,24,25]</sup> About 80% of the single-point missense mutations are located within the DBD, and about a third of these occur at six mutational hotspots: R175, G245, R248, R249, R273 and R282.<sup>[26–30]</sup> p53 mutants are commonly distinguished as “contact” and “structural” or “conformational” mutants, the former, including R273H or R248W, directly disrupting sequence-specific interactions between p53 and DNA, the latter, exemplified by R175H, G245S and R282W, inducing conformational changes that affect the thermodynamic stability of the protein, and consequently, the structural integrity of protein/DNA and protein/protein interaction interfaces.<sup>[21,22]</sup>

Both the N-terminal and core domains of p53 have been shown to form  $\beta$ -sheet-rich fibrillar aggregates in either mild denaturing or low-pH conditions.<sup>[31,32]</sup> Recent studies have suggested that the formation of p53 aggregates is associated with loss-of-function, dominant-negative and gain-of-function mutations and can be explained by a prion-like behaviour of mutant proteins.<sup>[33]</sup> Mutant p53 was shown to co-localise with amyloid-like protein aggregates in cancer biopsies.<sup>[34]</sup> Recent studies have shown that several structural mutants, in particular, R248Q, promote exposure of a domain that is naturally buried in WT p53 (251–257), leading to formation of amyloid-type aggregates of dysfunctional p53 in the cytoplasm.<sup>[35,36]</sup> Segment 251–257 has been reported as necessary and sufficient to drive p53 aggregation *in vitro* and in cell lines, although secondary structure prediction studies of the aggregation propensity of the p53 DBD reveal that several other regions are also prone to aggregation.<sup>[35–38]</sup> The R248Q mutant exhibits a particularly high tendency to partially unfold and has been inferred to display an increased aggregation propensity.<sup>[40]</sup> Moreover, NMR spectroscopy studies reveal that it induces conformational changes in the DBD far from the mutation site and beyond the site of interaction with DNA, associated with an aggressive gain of function, which induces early onset of cancer in Li–Fraumeni patients.<sup>[40,41]</sup> Finally, aggregated mutant p53 induces co-aggregation of WT p53 and its paralogs p63 and p73.<sup>[35]</sup>

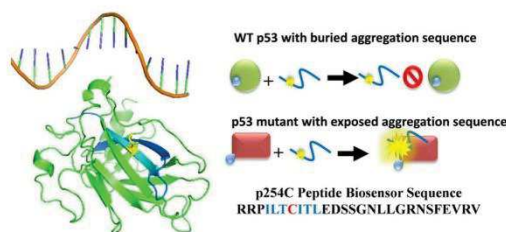
Misfolded, aggregated p53 mutants constitute attractive targets for therapeutics that can restore WT structure and function. In this respect, a recent study by Soragni et al. demonstrated that a peptide derived from the aggregation domain could reverse mutant p53 aggregation and restore its nuclear localisation and function as a transcription factor *in vivo*.<sup>[36]</sup> Nevertheless, there are currently no tools that report on the conformational status of p53. To address this challenge, we have developed and characterised a fluorescent peptide biosensor that recognises the R248Q aggregation-prone mutant of p53. The biosensor was engineered through conjugation of an environmentally sensitive probe onto a peptide derived from the primary aggregation segment of p53 and characterised both *in vitro* and by means of fluorescence microscopy following facilitated delivery into cultured cells. This fluorescent peptide biosensor preferentially reports on the p53

mutant R248Q over that of WT p53 both in cell extracts and in cultured lung cancer cells.

## Results and Discussion

### Design and *in vitro* characterisation of a fluorescent peptide biosensor for detection of the R248Q mutant of p53

To probe mutants of p53, which have a tendency to aggregate, we took advantage of the aggregation-nucleating sequence (residues 251–257: ILTIITL) reported by Xu et al. within the DBD of p53, which induces aggregation of p53 mutants due to conformational changes promoting its exposure.<sup>[35]</sup> Because this motif self-aggregated if exposed, we hypothesised it constituted a good target for detection of the aggregation-prone mutant, and could also be used to engineer a biosensor for detection of R248Q. To this aim, we designed a 27 aa peptide derived from the aggregation sequence that spanned residues 248 to 274 (encompassing beta sheets S9 and S10) and in which we introduced a cysteine to replace isoleucine at position 254 (p254C peptide), to enable site-specific, thiol-mediated conjugation of a fluorescent probe (Scheme 1).

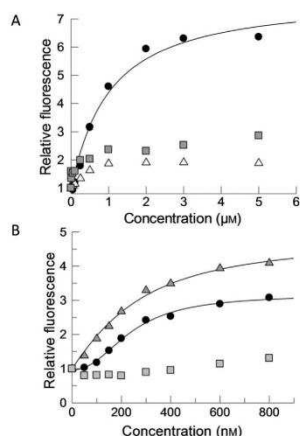


**Scheme 1.** The p254C peptide biosensor was derived from the S9–S10  $\beta$ -sheets (residues 248–274, cyan) within the core DBD of p53 (green), harbouring the aggregation-nucleating sequence ILTIITL (251–257, cyan). I254 was replaced by a cysteine (yellow stick) for conjugation of an environmentally sensitive probe to generate a biosensor that preferentially recognises aggregation-prone mutants, in which this domain is exposed. PDB ID: 1TUP.

We first verified whether the p254C peptide could recognise the native peptide sequence derived from the p53 aggregation site, which is normally buried in WT p53, but exposed in aggregation-prone mutants, such as R248Q. To this aim, p254C was labelled with fluorescein isothiocyanate (FITC) and titrated with a peptide spanning beta sheets S9 and S10 and bearing an isoleucine at position 254 (p254I). This led to significant fluorescence enhancement, and curve fitting allowed us to determine a dissociation constant value of  $913 \text{ nM} \pm 242$  between these peptides, whereas titration of p254C-FITC with an irrelevant control (Ctrl) peptide,<sup>[42]</sup> or conversely titration of FITC-labelled Ctrl peptide with the p254I peptide, exhibited significantly lower changes in fluorescence emission (Figure 1A).

We further asked whether the biosensor would potentially discriminate between WT p53 and the R248Q mutant. Experiments performed with GST-tagged recombinant proteins revealed preferential recognition of the R248Q mutant by



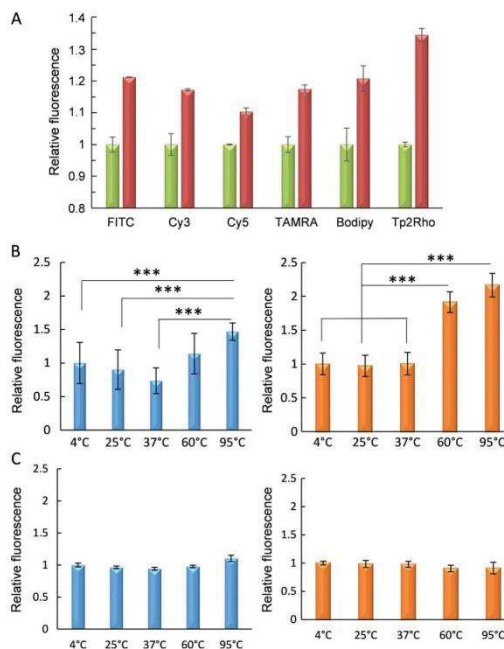


**Figure 1.** p254C-FITC binds the aggregation-nucleating sequence of p53. A) Fluorescence emission of 200 nM p254C-FITC following titration with the p254I peptide (●) or an irrelevant Ctrl peptide (■), or fluorescence emission of 200 nM irrelevant peptide labelled with FITC following titration with the p254I peptide (△). B) Fluorescence emission of 200 nM p254C-FITC following titration with recombinant glutathione S-transferase (GST)-tagged p53 (●), GST-tagged R248Q mutant (▲) or GST (■).

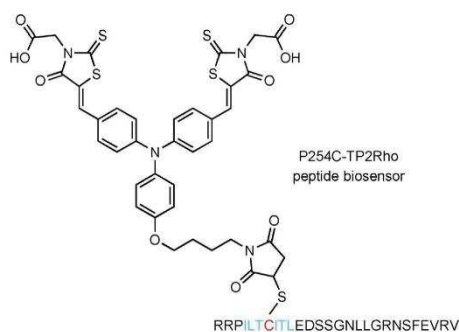
p254C-FITC, with a dissociation constant value of  $240 \text{ nM} \pm 70$ , whereas GST WT p53 binding was much poorer, in the micromolar affinity, with a dissociation constant value of  $252 \text{ } \mu\text{M} \pm 404$  (Figure 1B and Table S1 in the Supporting Information), which was reminiscent of thioflavin T titration experiments previously reported by Bom et al., who showed that the R248Q mutant had a greater propensity to form amyloid-like aggregates under physiological conditions than that of WT p53 and could also seed aggregation of WT p53.<sup>[38]</sup>

To further explore the ability of the p254C peptide to probe the aggregation-nucleating sequence of p53, we asked whether it could report on its induced exposure if recombinant p53 was subject to thermo-denaturation. To this aim, we first asked whether other fluorescent probes than FITC might enable a greater response to R248Q, relative to WT p53 (Figure 2A). Results revealed TP2Rho, a highly sensitive water-soluble solvatochromic vinyltriphenylamine dye, which we previously used to probe peptide and protein interactions in vitro,<sup>[43,44]</sup> as the best candidate. We therefore prepared the p254C-TP2Rho conjugate (Scheme 2), for incubation with recombinant GST-tagged p53 expressed in *Escherichia coli*, purified by means of fast protein liquid chromatography (FPLC) and subjected to thermo-denaturation at different temperatures for 15 min. The fluorescence emission of p254C-TP2Rho was significantly enhanced following incubation of recombinant p53 at 60 and 95 °C; thus indicating greater recognition of the p254I motif, exposure of which was induced by thermo-denaturation (Figure 2B). In contrast, incubation of samples with thioflavin following thermal treatment revealed little if any aggregation under the conditions and concentrations used in our assay. These findings indicate that the p254C biosensor reports on heat-induced un-

folding and exposure of the aggregation sequence, whereas thioflavin only responds to p53 aggregation. In contrast, the



**Figure 2.** The p254C-TP2Rho biosensor responds preferentially to thermo-denatured p53. A) Relative fluorescence enhancement of the p254C-TP2Rho biosensor to WT (green) and R248Q (red) p53. B) Relative fluorescence enhancement of 25  $\mu\text{M}$  thioflavin (blue) or 200 nM TP2Rho-labelled p254C (orange) following incubation with 1  $\mu\text{M}$  recombinant GST-tagged p53 pre-incubated for 15 min at 4, 25, 37, 60 or 95 °C ( $n=7$ ; student test: \*\*\* $p \leq 0.001$ ). C) Relative fluorescence enhancement of 25  $\mu\text{M}$  thioflavin (blue) or 200 nM TP2Rho-labelled p254C (orange) following incubation with 1  $\mu\text{M}$  recombinant Tau pre-incubated for 15 min at 4, 25, 37, 60 or 95 °C ( $n=4$ ; student test reveals no statistically significant differences between values).



**Scheme 2.** The p254C-TP2Rho peptide biosensor derived from residues 248–274 of p53, which harbours the aggregation-nucleating sequence ILTITL (251–257), in which I254 has been replaced by a cysteine for conjugation of the TP2Rho fluorophore.

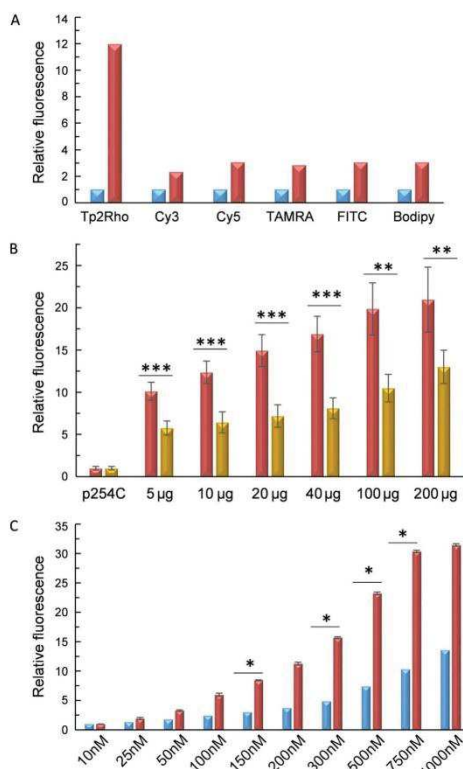
FITC-labelled p254C biosensor did not respond to p53 denaturation (Figure S2A). Moreover, incubation of the thermostable microtubule-associated protein Tau had no effect on either the p254C biosensor or thioflavin fluorescence following treatment at higher temperatures, in line with the well-known lack of Tau denaturation (Figure 2C). Likewise, incubation of TP2Rho alone, or of the TP2Rho-labelled Ctrl peptide, with thermo-denatured p53 did not promote any significant fluorescence enhancement; thus indicating that TP2Rho probe did not respond non-specifically (Figure S2B).

To gain further insight into the behaviour of TP2Rho-p254C, we asked whether it might potentially self-aggregate. However, this appears unlikely because increasing concentrations of the p254C-TP2Rho biosensor exhibit a significant and linear increase in both absorbance and fluorescence emission, whereas the response of TP2Rho alone is less linear (Figure S2C and D). p254C-TP2Rho was further investigated by means of nanoparticle tracking analysis (NTA) relative to the p254C peptide, TP2Rho alone, Ctrl peptide alone and TP2Rho-labelled Ctrl peptide (Figure S2E). Results revealed a very small proportion of particulate entities in solution for all of these peptides, whether labelled or not, and more so for TP2Rho alone or for the labelled Ctrl peptide, but not representative of aggregates, compared with a standard reference (A $\beta$  peptide<sup>45</sup>). Finally, we determined the quantum yield of TP2Rho, p254C-TP2Rho and p254C-TP2Rho in the presence of the R248Q mutant, in phosphate-buffered saline (PBS) and relative to rhodamine (Figure S3). Calculated values reveal that the quantum yield of TP2Rho conjugated onto p254C undergoes a significant increase relative to that of TP2Rho in PBS:  $\phi$  TP2Rho  $\leq$  0.005 and  $\phi$  p254C-TP2Rho: 0.07. The quantum yield increases further if p254C-TP2Rho is incubated with the R248Q mutant:  $\phi$  p254C-TP2Rho/ R248Q: 0.20.

#### The p254C peptide biosensor discriminates between the R248Q mutant and WT p53 in lung cancer cell extracts

To characterise the p254C biosensor in a more physiological environment, we chose to use cell extracts from the PC9 lung cancer cell line, which expressed the R248Q mutant. To assess the abundance of this mutant in PC9 cell extracts, we performed western blotting of recombinant GST-p53 R248Q to establish a calibration curve and compared the signal corresponding to R248Q in 20  $\mu$ g PC9, thereby determining an average concentration of 170 nM p53 R248Q (Figure S4A).

To choose the most suitable probe for the p254C biosensor, we conjugated the p254C peptide to several fluorescent probes and assayed their response following incubation with 40  $\mu$ g PC9 cell extracts (Figure 3A). The TP2Rho probe yielded by far the greatest response, with a 12-fold fluorescence enhancement of basal biosensor fluorescence emission in the absence of cell extracts, and was therefore selected for further experiments. Moreover, we noticed that the fluorescence emission of TP2Rho-labelled biosensor was somewhat greater upon excitation at  $\lambda = 392$  nm and emission acquired between  $\lambda = 510$  and 570 nm, compared with excitation at  $\lambda = 510$  nm followed by fluorescence emission at  $\lambda = 614$  nm (Figure S5).



**Figure 3.** Characterisation and optimisation of the p53 response to R248Q in PC9 lung cancer cell extracts. A) Maximal fluorescence enhancement of 200 nm p53 biosensor labelled with TP2Rho ( $\lambda_{\text{ex}} = 392$  nm;  $\lambda_{\text{em}} = 510$  nm), Cy3 ( $\lambda_{\text{ex}} = 530$  nm;  $\lambda_{\text{em}} = 580$  nm), Cy5 ( $\lambda_{\text{ex}} = 610$  nm;  $\lambda_{\text{em}} = 675$  nm), tetramethylrhodamine (TAMRA;  $\lambda_{\text{ex}} = 535$  nm;  $\lambda_{\text{em}} = 585$  nm) and FITC ( $\lambda_{\text{ex}} = 483$  nm;  $\lambda_{\text{em}} = 530$  nm), incubated with (red) or without (blue) 40  $\mu$ g PC9 cell extracts (p53 R248Q). B) Dose-dependent response of 200 nm TP2Rho-biosensor ( $\lambda_{\text{ex}} = 392$  nm;  $\lambda_{\text{em}} = 510$  nm) to increasing amounts of PC9 (red; p53 R248Q) cell extracts from 5 to 200  $\mu$ g ( $n = 5$ ; student test: \*\*  $p \leq 0.01$ ; \*\*\*  $p \leq 0.001$ ); BSA (orange) was used as a negative control. C) Dose-dependent response of 40  $\mu$ g PC9 (red) extract to increasing concentrations of TP2Rho-biosensor ( $\lambda_{\text{ex}} = 392$  nm;  $\lambda_{\text{em}} = 510$  nm) from 50 nM to 1  $\mu$ M ( $n = 3$ ; student test: \*  $p \leq 0.05$ ) compared to the biosensor alone without any cell extracts (blue).

These conditions were therefore retained for all further experiments performed with cell extracts. To determine the optimal concentrations of cell extracts, on the one hand, and the most suitable concentration of TP2Rho-labelled biosensor on the other, to achieve the most significant and sensitive response, we performed dose-dependent experiments with 5 to 200  $\mu$ g cell extracts and 50 nM to 1  $\mu$ M biosensor (Figure 3B and C). With 200 nm p254C-TP2Rho biosensor, we observed a dose-dependent increase in fluorescence enhancement of TP2Rho, in response to increasing concentrations of PC9 cell extracts, in line with an expected increase in biosensor response to increased p53 levels, with a saturating response at 100–200  $\mu$ g



extract. In comparison, bovine serum albumin (BSA) induced much less fluorescence enhancement, with an optimum for 20–40  $\mu\text{g}$  extracts, which become more important at higher concentrations of BSA, indicating loss of specific response. Conversely, we observed a dose-dependent response of increasing biosensor concentrations to 40  $\mu\text{g}$  PC9 extracts, with a plateau at around 750–1000 nm biosensor. Taken together, these results indicate that the p254C biosensor can detect nanomolar concentrations of p53 mutant in cell extracts, and that the dynamic range of response varies up to 20-fold fluorescence enhancement.

Based on these results, we selected intermediate conditions (200 nm biosensor–TP2Rho and 40  $\mu\text{g}$  protein extracts) for further experiments, to limit the non-specific response of irrelevant proteins, such as BSA.

To further validate the utility of this biosensor to detect the R248Q mutant, we next asked whether it could report on differences between three lung cancer cell lines: A549 (p53WT) PC9 (p53 R248Q) or H1299 (p53–/–). Normalised cell extracts prepared from A549, expressing p53 WT, PC9 expressing the mutant p53 R248Q and H1299 lacking p53 were incubated with 200 nm p254C-TP2Rho biosensor. These experiments revealed that the relative increase in p254C-TP2Rho fluorescence emission upon incubation with protein extracts containing p53 R248Q was 83% greater than that with extracts expressing WT p53 or lacking p53 (Figure 4A and Table S2).

To confirm these fluorescence-based experiments, we performed pull-down experiments by immobilising the p254C peptide on CNBr-Sepharose. Western blotting of the samples incubated with the biosensor-conjugated beads revealed that only the p53 R248Q mutant was expressed in PC9 cell extracts,

but no WT p53 expressed in A549 cells was retained by the biosensor (Figure S4B).

Because p53 is induced by UV-B irradiation,<sup>[11]</sup> we asked whether the p254C biosensor was sufficiently sensitive to monitor differences in R248Q protein expression following irradiation of PC9 cells with UV-B (300  $\text{mJ cm}^{-2}$ ), which were then returned to the incubator to allow for protein expression, and harvested after 30 min; 1 h or 2 h to assess the relative levels of p53 mutant expression with the p254C-TP2Rho biosensor. This experiment revealed that R248Q expression was induced after 30 min and maximal after 1 h (Figure 4B). In contrast, the biosensor did not report on any significant difference in the A549 cell line, which expressed WT p53; thus again underscoring its preferential response to the R248Q mutant (Figure S6).

#### The p53 biosensor reports on the R248Q mutant in living cells

Having established the optimal working conditions and limitations of the biosensor in vitro, we asked whether we could apply it to report on the R248Q mutant in living cells by fluorescence imaging. To this aim, we first introduced the biosensor into cultured cells thanks to the amphipathic cell-penetrating peptide Pep1 (Figure 5).<sup>[46]</sup> Control experiments showed that the TP2Rho-labelled p254C peptide could not enter cells alone. In contrast, complexation of p254C-TP2Rho with Pep1 at a 1:40 molar ratio enabled efficient and homogeneous delivery into PC9 cells (Figure S7 and S8A).

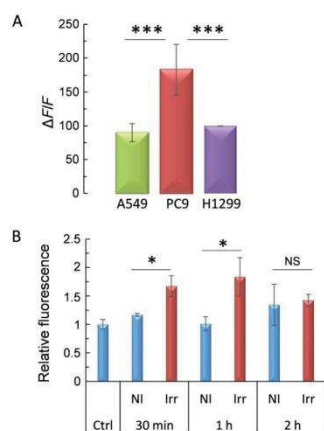
We therefore introduced p254C-TP2Rho into PC9 and A549 cells and acquired their relative fluorescence emission, which we quantified relative to the nuclear DNA staining signal with Hoechst dye (Figure 6 and Table S3). These experiments revealed a significantly greater fluorescence ratio (twofold) in the PC9 cell line that expressed the R248Q mutant compared with that in the A549 cell line (Table S3); thus indicating that the p254C biosensor is a useful tool to monitor the expression of the R248Q mutant in living cells.

Finally, we asked whether biosensor internalisation might induce any toxicity. Crystal violet assays revealed that neither p254C-TP2Rho alone, nor complexed with Pep1, led to any significant inhibition of cell viability (Figure S8B).

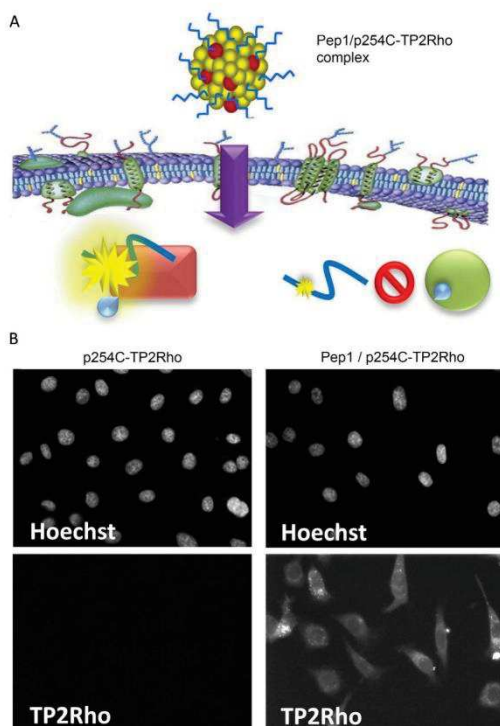
#### Conclusion

Several therapeutic strategies have been proposed to target mutant p53 in cancer, including gene therapy, restoring WT p53 function thanks to small molecules, promoting mutant p53 degradation and/or targeting mutant p53 regulated pathways.<sup>[8,39]</sup> The more recent discovery of the prion-like properties of p53 aggregates has provided further insight into the molecular basis of p53 regulation and opened up new avenues to explore therapeutic strategies. Indeed, targeting the amyloid-like aggregation of p53 mutants in ovarian cancer has recently been demonstrated to constitute an effective therapeutic strategy for rescuing p53 tumour suppression.<sup>[36,39]</sup>

50% of human cancers harbour p53 mutations, most of which are missense mutations within the DBD, and several of



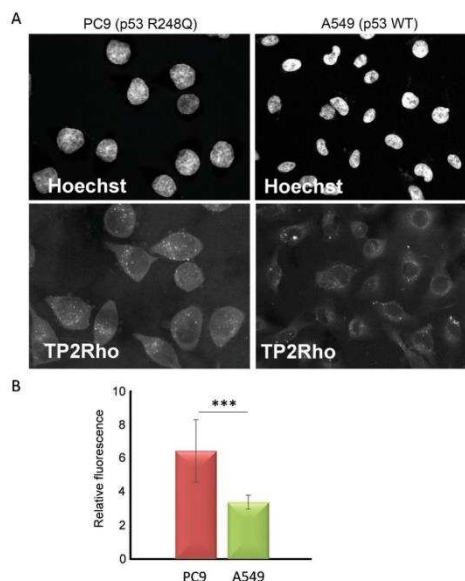
**Figure 4.** Quantification of the p53 biosensor response to WT p53 and R248Q mutant in different lung cancer cell extracts. A) Relative fluorescence emission of 200 nm TP2Rho–biosensor to 40  $\mu\text{g}$  A549 (p53WT), PC9 (p53 R248Q) and H1299 (p53–/–) lung cancer cell extracts ( $n=17$ ; student test:  $***p \leq 0.001$ ). B) Response of p254C-TP2Rho to induction of the p53 R248Q mutant in PC9 cells following UV irradiation (IRR; NI: no irradiation;  $n=4$ ; student test:  $*p \leq 0.05$ ).



**Figure 5.** Internalisation of the p254C-TP2Rho biosensor in living cells. A) Schematic representation of complexation and facilitated delivery of Pep1/ p254C-TP2Rho peptide into living cells. B) Fluorescence micrographs illustrating internalisation of p254C-TP2Rho in PC9 cells following overlay of the Pep1/biosensor complexes, but not of the biosensor alone. Nuclear staining with Hoechst dye is shown in the upper panels; TP2Rho fluorescence is shown in the lower panels (Cy3 filter of the microscope).

these mutants have been shown to be prone to aggregation, due to structural destabilisation, although the actual fraction of aggregated p53 mutant remains unknown. Current diagnostic approaches based on genetic sequencing allow the identification of specific mutations in p53, but they do not inform on its conformational status. Tools enabling probing and reporting on differential structural organisations, such as misfolding and exposure of aggregation-nucleating epitopes, would be of major benefit to complete molecular profiling studies.

In this study, we reported on the design and characterisation of a fluorescent peptide biosensor derived from the main aggregation-nucleating motif of p53, for detection of the R248Q mutant. This biosensor was engineered through conjugation of a highly sensitive solvatochromic dye, TP2Rho, that we previously implemented to monitor protein–protein and protein–peptide interactions *in vitro*.<sup>[44]</sup> We have shown that this biosensor interacts with the self-aggregation motif of p53 itself *in vitro* and that it preferentially interacts with recombinant R248Q mutant over WT p53. This biosensor further reports on



**Figure 6.** Response of the p254C-TP2Rho biosensor to the WT and R248Q mutant in lung cancer cells. A) Micrographs of A549 and PC9 cells into which the p254C-TP2Rho biosensor was delivered following complexation with Pep1. Nuclear staining with Hoechst dye is shown in the upper panels; TP2Rho fluorescence is shown in the lower panels (Cy3 filter of the microscope). B) Ratiometric quantification analysis of  $n=9$  different regions of interest (ROIs) from acquisitions of TP2Rho and Hoechst dye signals in A549 and PC9 cell lines ( $n=9$ ; student test: \*\*\*  $p < 0.001$ ).

exposure of the self-aggregation domain of p53 upon thermodenaturation, in a sensitive fashion, prior to detection of protein aggregates by thioflavin. We have also shown that this biosensor can detect nanomolar concentrations and discriminate between R248Q and WT p53 in lung cancer cell extracts in both fluorescence-based and pull-down experiments. The relative increase in p254C-TP2Rho fluorescence emission upon incubation with protein extracts containing p53 R248Q was 83% greater than that with extracts expressing p53WT or lacking of p53. Finally, we have shown that delivery of this biosensor into living cells enables quantification of relative differences between cell lines expressing R248Q and WT p53 by means of fluorescence imaging.

Because the R248Q mutant has been identified as a gain-of-function aggressive mutant that enhances *in vitro* invasiveness of human lung cancer cells,<sup>[20]</sup> the biosensor we have developed could constitute a useful tool to quantify this conformationally destabilised mutant in lung cancer biopsies and guide towards appropriate treatments. The most straightforward application of this new tool is its implementation for *ex vivo* diagnostics through measurement of fluorescence emission upon incubation with protein samples. Moreover, the peptide nature of this biosensor enables simultaneous acquisition and comparison of several samples in a plate reader. Beyond the diagnostic potential of this biosensor, it has a clear and natu-



ral purpose for drug discovery because it could enable screening of compounds that could reverse mutant aggregation-prone conformation to restore WT function. A second application of interest would involve intracellular internalisation of the biosensor and fluorescence imaging to identify the presence of misfolded p53 and potentially investigate the heterogeneity of cells. Because it cannot be excluded that the efficiency of internalisation of the cell-penetrating peptide/biosensor complexes may differ between cell lines, it would be wise to normalise biosensor response to its intracellular levels if different cell lines are being studied. This tool could also allow the appearance of misfolded p53 mutants to be followed over time, and upon exposure to mutation-inducing environments or reagents that might affect p53 folding. Ultimately, the biosensor could serve to develop companion assays to monitor the therapeutic efficacy of drugs capable of reversing p53 aggregation.

## Experimental Section

**Design, synthesis and labelling of the peptide biosensor:** The p53 peptide biosensor was derived from the sequence of the S9-S10  $\beta$  sheets, harbouring the aggregation domain of p53 (residues 248–274), in which Ile254 was replaced by a cysteine to enable site-specific labelling with fluorescent probes. RRPILTCTLEDSSGNLLGRNSFEVRV p254C peptide and the native p254I peptide RRPILTCTLEDSSGNLLGRNSFEVRV were synthesised by using the fluorenylmethyloxycarbonyl (Fmoc) strategy with the liberty blue robot from CEM. Peptides were purified by HPLC and the purity was analysed by LCMS (see the Supporting Information). p254C was then labelled on the single cysteine residue with FITC, TP2Rho, or other maleimide dye derivatives, in the presence of a five- to tenfold excess of dye overnight, and then purified from free dye on NAP-5 columns (GE Healthcare). Ctrl peptide: VESSD-TIDNVKSKIQDKEGC was synthesised by GLS Biochem.<sup>[42]</sup>

**Protein expression and purification:** Recombinant WT GST-p53 and GST-p53 R248Q mutant were expressed in *E. coli* (BL21 DEA3) following induction with 1 mM isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) for 3 h at 37 °C and purified by FPLC on a GSTrap HP 5 mL column (GE Healthcare) equilibrated in buffer A (50 mM phosphate, pH 7.4, 150 mM NaCl). GST-tagged proteins were eluted with buffer A containing glutathione (50 mM; Euromedex), and then further injected onto a desalting column (GE Healthcare) equilibrated in buffer A to eliminate free glutathione. Recombinant Tau was expressed in *E. coli* following induction with 1 mM IPTG for 3 h at 37 °C. The soluble-protein fraction was incubated for 15 min at 75 °C. After centrifugation, the supernatant was incubated with 60% ammonium sulfate overnight. After centrifugation, the pellet was resuspended in buffer B (50 mM TRIS, pH 7.4, 150 mM NaCl) and purified by FPLC on a HiLoad 16/600 Superdex 75 prep-grade column (GE Healthcare) equilibrated in buffer B.

**Recombinant protein thermo-denaturation and fluorescence experiments:** For thermo-denaturation experiments, 1  $\mu$ M recombinant GST-p53 was incubated for 15 min at 4, 25, 37, 60 and 95 °C. Fluorescence titration assays were performed in 96-well plates thermostatted at 30 °C with a Clariostar spectrofluorimeter (BMG). Samples (200  $\mu$ L) were prepared in potassium phosphate buffer (50 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{PO}_4$ , pH 7.4, 150 mM NaCl, 200 nM). FITC-labelled peptides were excited at  $\lambda=483$  nm, and emission signals were acquired at  $\lambda=530$  nm. TP2Rho-labelled peptides were excited at  $\lambda=510$  nm and fluorescence emission was acquired at  $\lambda=614$  nm.

Thioflavin fluorescence emission was monitored at  $\lambda=492$  nm following excitation at  $\lambda=450$  nm. Experiments were performed in triplicate, and error bars indicate standard deviations from averages.

Curve fitting and determination of dissociation constants for peptide/peptide and GST-R248Q p53/biosensor binding were performed with the GraFit software (Erithacus, Ltd., Horley, UK) by using quadratic Equation (1):

$$F = F_{\max} + (F_{\max} - F_{\min}) \times \frac{K_d + L + p - \sqrt{(\sqrt{(K_d + L + p)^2 - 4p})}}{2p} \quad (1)$$

in which  $L$  is the concentration of ligand and  $p$  is the concentration of fluorescent peptide biosensor.

Curve fitting and determination of dissociation constants for GST-WT p53/ biosensor interactions was performed by using a cooperative fitting of Equation (2) (+ background):

$$y = \frac{[L]^n \times \text{Cap}}{(K_d + [L])^n} + \text{background} \quad (2)$$

In which  $L$  is the concentration of ligand, Cap is the capacity and  $n$  is the cooperativity.

**Determination of quantum yield ( $\phi$ ):** Fluorescence quantum yields of TP2Rho, p254C-TP2Rho or p254C-TP2Rho with p53 R248Q were calculated by using rhodamine R (in ethanol) as a standard ( $\phi=0.95$ ). Fluorescence emission spectra were recorded between  $\lambda=570$  and 670 nm following excitation at  $\lambda=560$  nm for the standard, and between  $\lambda=550$  and 720 nm following excitation at  $\lambda=510$  nm for samples. Absorbance was recorded at  $\lambda=560$  nm for the standard and at  $\lambda=510$  nm for the samples. Quantum yields were calculated according to Equation (3), in which  $\phi_{\text{ref}}$  is the quantum yield of the reference;  $A_{\text{sample}}$  and  $A_{\text{ref}}$  are the areas under the emission spectra of the sample and reference, respectively;  $\text{OD}_{\text{sample}}$  and  $\text{OD}_{\text{ref}}$  are the absorbances of the sample and reference, respectively, measured at the excitation wavelength; and  $n_{\text{sample}}$  and  $n_{\text{ref}}$  are the refractive indices of the sample (PBS: 1.33) and reference (ethanol: 1.47), respectively.

$$\phi_{\text{sample}} = \phi_{\text{ref}} \times \frac{A_{\text{sample}}}{A_{\text{ref}}} \times \frac{\text{OD}_{\text{ref}}}{\text{OD}_{\text{sample}}} \times \left( \frac{n_{\text{ref}}}{n_{\text{sample}}} \right)^2 \quad (3)$$

**NTA:** NTA measurements were performed with a NanoSight NS 300 instrument (Malvern Panalytical, UK) equipped with a  $\lambda=405$  nm laser and a temperature-controlled sample chamber. After a 5 min sonication step, peptide suspensions (200 nM peptide or probe) were injected into the chamber by using a syringe pump at 40 AU (arbitrary unit). The temperature was set at 25 °C and three videos of 60 s were recorded. Videos were then analysed by using the NanoSight NTA 3.2 software (the threshold was fixed at 5 for all measurements).

**Cell culture, UV irradiation and cell-extract preparation:** Cell culture media were purchased from Life Technology. Serum and antibiotics were purchased from Sigma. All cell lines were cultured in RPMI + Glutamax supplemented with 10% foetal calf serum (FCS), 100 units  $\text{mL}^{-1}$  penicillin (G sodium salt) and 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  streptomycin at 37 °C in an atmosphere containing 5%  $\text{CO}_2$ . Lung cancer cell lines used in this study: A549: p53 WT; PC9: p53 R248Q mutant; H1299: p53  $-/-$ . Cell extracts were prepared in PBS lysis



buffer containing PBS (Sigma), pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.2% NP40, 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 2 mM phenylmethane sulfonyl fluoride (PMSF) and complete protease inhibitors (Roche), and normalised following spectrophotometric dosage at  $\lambda=280$  nm. Cells were irradiated with UV-B at  $300 \text{ mJ cm}^{-2}$  (Waldmann 800 K), then returned to the incubator and scraped after 30 min, 1 h or 2 h to prepare cell extracts. Fluorescence experiments with cell extracts were performed in 96-well plates thermostatted at  $30^\circ\text{C}$  with a Clariostar spectrofluorimeter (BMG). Samples (200  $\mu\text{L}$ ) were prepared in potassium phosphate buffer (50 mM, pH 7.4, 150 mM NaCl). Tp2Rho-labelled peptides (200 nM) were excited at  $\lambda=392$  nm, and emission signals were acquired at  $\lambda=510$  nm.

**Pull-down assays and western blotting:** The p254C peptide was coupled onto CNBr Sepharose resin ( $10^{-3}$  M peptide per g resin; GE Healthcare) and incubated with 200  $\mu\text{g}$  cell extracts from A549 (p53 WT), PC9 (p53 R248Q) or H1299 (p53 $^{-/-}$ ) for 1 h at  $4^\circ\text{C}$ , washed twice in PBS, and the resin was boiled in Laemmli and loaded onto SDS-PAGE. Western blotting was performed following transfer of proteins onto polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane, pre-blocked with 5% milk/TRIS-buffered saline (TBS), with the anti-p53 antibody DO-1 in TBS/Tween.

**Cell culture, internalisation and microscopy:** For introduction into living cells, p254C-TP2Rho was complexed with the cell-penetrating peptide Pep1<sup>[66]</sup> (1:40, molar ratio unless otherwise stated) and overlaid onto cultured cells grown to sub-confluency for 1 h at  $37^\circ\text{C}$ , then for 16 h in the presence of RPMI+Glutamax complemented with 10% serum. Cells were then fixed with 4% paraformaldehyde in PBS for 10 min, washed with PBS and nuclei stained with Hoechst, washed with water and mounted on glass slides in Mowiol. Fluorescent cells were observed with a Zeiss microscope equipped with a CoolSnap camera and images were acquired by using MetaMorph software. Excitation band/dichroic/emission band filters for imaging fluorescent signals were as follows: Hoechst:  $\lambda=340\text{--}380/400/450\text{--}490$  nm; TP2Rho fluorescence was imaged by using Cy3 filters:  $\lambda=525\text{--}565/565/572\text{--}647$  nm. For quantification of biosensor fluorescence emission, images were analysed by using ImageJ software and average pixel intensity determined in ROIs corresponding to groups of three to four cells ( $n=9$ ). TP2Rho fluorescence was normalised to that of Hoechst dye in the ROIs.

**Cell viability assays:** PC9 cells were grown to sub-confluency for 24 h and overlaid with p254C-TP2Rho or p254C-TP2Rho/Pep1 complexes prepared as described above. After 24 h, cell proliferation was determined by means of crystal violet staining. Cells were washed with PBS, fixed with 3.7% formaldehyde for 10 min and then incubated with 0.1% crystal violet dye for 30 min. After rinsing, crystals were dissolved in 10% acetic acid and viability was determined by absorbance at  $\lambda=595$  nm with a microplate reader.

**Statistics:** Statistical significance was calculated through the student's test: \* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$ , \*\*\* $p \leq 0.001$

## Acknowledgements

This work was supported by the CNRS (Centre National de la Recherche Scientifique). We thank Dr. Pierre Roux, CRBM, Montpellier for critical advice. This study benefited from the facilities and expertise of the Montpellier RIO Imaging Facility ([www.mri.cnrs.fr](http://www.mri.cnrs.fr)) at the Centre de Recherches en Biochimie Macromoléculaire, Montpellier, and of the SynBio3 Peptide Synthesis and Purification

Facility supported by IBISA and ITMO Cancer of the Department of Amino Acids Peptides and Proteins (DAPP) at the Institut des Biomolécules Max Mousseron in Montpellier.

## Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

**Keywords:** aggregation · biosensors · cancer · fluorescence · peptides

- [1] D. P. Lane, L. V. Crawford, *Nature* **1979**, *278*, 261–263.
- [2] C. Chang, D. T. Simmons, M. A. Martin, P. T. Mora, *J. Virol.* **1979**, *31*, 463–471.
- [3] D. I. Linzer, A. J. Levine, *Cell* **1979**, *17*, 43–52.
- [4] A. B. DeLeo, G. Jay, E. Appella, G. C. Dubois, L. W. Law, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1979**, *76*, 2420–2424.
- [5] R. Brosh, V. Rotter, *Nat. Rev. Cancer* **2009**, *9*, 701–713.
- [6] D. P. Lane, *Nature* **1992**, *358*, 15–16.
- [7] K. Harms, S. Nozell, X. Chen, *Cell. Mol. Life Sci.* **2004**, *61*, 822–842.
- [8] A. J. Levine, M. Oren, *Nat. Rev. Cancer* **2009**, *9*, 749.
- [9] K. H. Vousden, D. P. Lane, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2007**, *8*, 275–283.
- [10] K. H. Vousden, *Biochim. Biophys. Acta Rev. Cancer* **2002**, *1602*, 47–59.
- [11] G. Liu, X. Chen, *J. Cell. Biochem.* **2006**, *97*, 448–458.
- [12] K. H. Vousden, C. Prives, *Cell* **2009**, *137*, 413–431.
- [13] B. Vogelstein, K. W. Kinzler, *Cell* **1992**, *70*, 523–526.
- [14] P. A. J. Muller, K. H. Vousden, *Nat. Cell Biol.* **2013**, *15*, 2–8.
- [15] J. Liu, C. Zhang, Z. Feng, *Acta Biochim. Biophys. Sin.* **2014**, *46*, 170–179.
- [16] W. A. Freed-Pastor, C. Prives, *Genes Dev.* **2012**, *26*, 1268–1286.
- [17] S. Liu, J. K. Bolger, L. O. Kirkland, P. N. Premnath, C. McInnes, *ACS Chem. Biol.* **2010**, *5*, 1169–1182.
- [18] K. V. Chin, K. Ueda, I. Pastan, M. M. Gottesman, *Science* **1992**, *255*, 459–462.
- [19] A. A. Román-Rosales, E. García-Villa, L. A. Herrera, P. Gariglio, J. Díaz-Chávez, *BMC Cancer* **2018**, *18*, 709.
- [20] K. Yoshikawa, J. Hamada, M. Tada, T. Kameyama, K. Nakagawa, Y. Suzuki, M. Ikawa, N. M. M. Hassan, Y. Kitagawa, T. Moriuchi, *Biomed. Res.* **2010**, *31*, 401–411.
- [21] Y. Cho, S. Gorina, P. D. Jeffrey, N. P. Pavletich, *Science* **1994**, *265*, 346–355.
- [22] A. C. Joerger, A. R. Fersht, *Annu. Rev. Biochem.* **2008**, *77*, 557–582.
- [23] S. Surget, M. P. Khoury, J.-C. Bourdon, *OncoTargets Ther.* **2013**, *7*, 57–68.
- [24] A. L. Okorokov, M. B. Sherman, C. Plisson, V. Grinkevich, K. Sigmundsson, G. Selivanova, J. Milner, E. V. Orlova, *EMBO J.* **2006**, *25*, 5191–5200.
- [25] M. F. Lavin, N. Gueven, *Cell Death Differ.* **2006**, *13*, 941–950.
- [26] P. Hainaut, T. Hernandez, A. Robinson, P. Rodriguez-Tome, T. Flores, M. Hollstein, C. C. Harris, R. Montesano, *Nucleic Acids Res.* **1998**, *26*, 205–213.
- [27] S. A. Forbes, N. Bindal, S. Bamford, C. Cole, C. Y. Kok, D. Beare, M. Jia, R. Shepherd, K. Leung, A. Menzies, J. W. Teague, P. J. Campbell, M. R. Stratton, P. A. Futreal, *Nucleic Acids Res.* **2011**, *39*, D945.
- [28] D. Walerlych, M. Napoli, L. Collavin, G. Del Sal, *Carcinogenesis* **2012**, *33*, 2007–2017.
- [29] C. Kandoth, M. D. McLellan, F. Vandin, K. Ye, B. Niu, C. Lu, M. Xie, Q. Zhang, J. F. McMichael, M. A. Wyczalkowski, M. D. M. Leiserson, C. A. Miller, J. S. Welch, M. J. Walter, M. C. Wendt, T. J. Ley, R. K. Wilson, B. J. Raphael, L. Ding, *Nature* **2013**, *502*, 333.
- [30] M. Olivier, S. P. Hussain, C. Caron de Fromental, P. Hainaut, C. C. Harris, *IARC Sci. Publ.* **2004**, 247–270.
- [31] D. Ishimaru, L. R. Andrade, L. S. P. Teixeira, P. A. Quesado, L. M. Maiolino, P. M. Lopez, Y. Cordeiro, L. T. Costa, W. M. Heckl, G. Weissmüller, D. Foguel, J. L. Silva, *Biochemistry* **2003**, *42*, 9022.
- [32] J. L. Silva, T. C. R. G. Vieira, M. P. B. Gomes, A. P. A. Bom, L. M. T. R. Lima, M. S. Freitas, D. Ishimaru, Y. Cordeiro, D. Foguel, *Acc. Chem. Res.* **2010**, *43*, 271–279.
- [33] J. L. Silva, C. V. De Moura Gallo, D. C. F. Costa, L. P. Rangel, *Trends Biochem. Sci.* **2014**, *39*, 260–267.

- [34] C. B. Levy, A. C. Stumbo, A. P. D. Ano Bom, E. A. Portari, Y. Cordeiro, Y. Carneiro, J. L. Silva, C. V. De Moura-Gallo, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2011**, *43*, 60–64.
- [35] J. Xu, J. Reumers, J. R. Couceiro, F. De Smet, R. Gallardo, S. Rudyak, A. Cornelis, J. Rozenski, A. Zwolinska, J.-C. Marine, D. Lambrechts, Y.-A. Suh, F. Rousseau, J. Schymkowitz, *Nat. Chem. Biol.* **2011**, *7*, 285.
- [36] A. Soragni, D. M. Janzen, L. M. Johnson, A. G. Lindgren, A. Thai-Quynh Nguyen, E. Tiourin, A. B. Soriaga, J. Lu, L. Jiang, K. F. Faull, M. Pellegrini, S. Memarzadeh, D. S. Eisenberg, *Cancer Cell* **2016**, *29*, 90–103.
- [37] S. Ghosh, D. Ghosh, S. Ranganathan, A. Anoop, P. S. Kumar P., N. N. Jha, R. Padinhateeri, S. K. Maji, *Biochemistry* **2014**, *53*, 5995–6010.
- [38] A. P. D. Ano Bom, L. P. Rangel, D. C. F. Costa, G. A. P. de Oliveira, D. Sanches, C. A. Braga, L. M. Gava, C. H. I. Ramos, A. O. T. Cepeda, A. C. Stumbo, C. V. De Moura Gallo, Y. Cordeiro, J. L. Silva, *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 28152–28162.
- [39] P. A. J. Muller, K. H. Vousden, *Cancer Cell* **2014**, *25*, 304–317.
- [40] J. W. K. Ng, D. Lama, S. Lukman, D. P. Lane, C. S. Verma, A. Y. L. Sim, *Proteins Struct. Funct. Bioinf.* **2015**, *83*, 2240–2250.
- [41] W. Hanel, N. Marchenko, S. Xu, S. X. Yu, W. Weng, U. Moll, *Cell Death Differ.* **2013**, *20*, 898–909.
- [42] D. Tempé, M. Brengues, P. Mayonove, H. Bensaad, C. Lacrouets, M. C. Morris, *Biochemistry* **2007**, *46*, 45–54.
- [43] B. Dumat, G. Bordeau, A. I. Aranda, F. Mahuteau-Betzer, Y. El Harfouch, G. Metge, F. Charra, C. Fiorini-Debuisschert, M. P. Teulade-Fichou, *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 6054–6061.
- [44] M. Pellerano, *ChemBioChem* **2016**, *17*, 737–744.
- [45] D. T. Yang, X. Lu, Y. Fan, R. M. J. Murphy, *AIChE J.* **2014**, *60*, 1236–1244.
- [46] M. C. Morris, J. Depollier, J. Mery, F. Heitz, G. Divita, *Nat. Biotechnol.* **2001**, *19*, 1173–1176.

---

Manuscript received: September 7, 2018

Revised manuscript received: December 10, 2018

Accepted manuscript online: December 13, 2018

Version of record online: January 24, 2019

