

Université de Sherbrooke

Les agrégats de la protéine p53 comportent certaines propriétés des prions

Par Karolyn Forget
Département de biochimie

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé
en vue de l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M.Sc.) en biochimie

Sherbrooke, Québec, Canada
12 avril 2013

Membres du jury d'évaluation

Dr. Xavier Roucou,
Département de biochimie
Faculté de médecine et des sciences de la santé

Dr. Martin Bisaillon,
Département de biochimie
Faculté de médecine et des sciences de la santé

Dr. François-Michel Boisvert,
Département d'anatomie et biologie cellulaire
Faculté de médecine et des sciences de la santé



Library and Archives
Canada

Published Heritage
Branch

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Bibliothèque et
Archives Canada

Direction du
Patrimoine de l'édition

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence

ISBN: 978-0-494-95161-3

Our file Notre référence

ISBN: 978-0-494-95161-3

NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.

Canada

RÉSUMÉ

Les agrégats de la protéine p53 comportent certaines propriétés des prions

Par Karolyn Forget
Département de biochimie

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé
en vue de l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M.Sc.) en biochimie

Faculté de médecine et des sciences de la santé, Université de Sherbrooke,
Sherbrooke, Québec, Canada, J1H 5N4

Les maladies à prion sont un cas unique de pathologie où l'agent infectieux, le prion, est une protéine. La protéine prion possède plusieurs caractéristiques qui la rendent particulière vis-à-vis d'autres protéines cellulaires, telles que sa capacité à agréger et à transmettre sa conformation agrégée à la protéine soluble ainsi que la transmission des agrégats de la protéine d'une cellule à l'autre et d'un organisme à un autre. De plus en plus, on associe l'agrégation de protéines à différentes maladies humaines, comme les maladies d'Alzheimer, de Parkinson et le diabète de type 2. Certaines protéines impliquées dans ces pathologies font partie des prionoïdes, une catégorie réservée aux protéines aux propriétés agrégatives qui démontrent certaines des caractéristiques associées aux prions. Récemment, la protéine p53, un facteur de transcription fortement impliqué dans le cancer, a été montrée comme étant capable d'agréger *in vitro*. Une accumulation de la protéine a également été observée dans des cellules tumorales, laissant croire que l'agrégation de p53 se produit également *in vivo*, et pourrait avoir un rôle dans le développement du cancer. Ces observations portent à croire que la protéine p53 pourrait elle aussi faire partie des prionoïdes. L'objectif de cette étude est donc de montrer que la protéine p53 possède certaines des caractéristiques des prions. Pour ce faire, la protéine p53 recombinante a été produite pour former des agrégats de p53 et ces agrégats ont été utilisés pour déterminer si la protéine démontre des caractères prionoïdes. Les résultats obtenus montrent une agrégation *in vitro* de p53WT pleine longueur ainsi que de sa forme tronquée, p53C. De plus, des cellules en culture sont capables d'internaliser ces agrégats, qui co-agrègent ensuite avec la protéine p53 endogène de ces cellules. Enfin, nos résultats montrent clairement que l'internalisation des agrégats par les cellules se fait par la macropinocytose. Nous avons donc réussi à prouver que la protéine p53 agit comme un prion puisqu'elle s'agrège spontanément, ses agrégats sont internalisés par des cellules en culture et sont capables de co-agréger avec la protéine soluble.

Mots clés: prions, p53, agrégation protéique

ABSTRACT

Les agrégats de la protéine p53 comportent certaines propriétés des prions

Par Karolyn Forget
Département de biochimie

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé
en vue de l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M.Sc.) en biochimie

Faculté de médecine et des sciences de la santé, Université de Sherbrooke,
Sherbrooke, Québec, Canada, J1H 5N4

Prion diseases are unique pathologies in which the infectious particles are prions, a protein aggregate. The prion protein has many particular features, such as spontaneous aggregation, conformation transmission to other native PrP proteins and transmission from an individual to another. Protein aggregation is now frequently associated to many human diseases, for example Alzheimer's disease, Parkinson's disease or type 2 diabetes. A few proteins associated to these conformational diseases are part of a new category of proteins, called prionoids. Prionoids are proteins that share some, but not all, of the characteristics associated with prions. p53 protein, a transcription factor with a major role in cancer, has recently been suggested to be a possible prionoid. The protein has been shown to accumulate in multiple cancer cell types, and its aggregation has also been reproduced *in vitro* by many independent groups. These observations suggest a role for p53 aggregates in cancer development. This study aims to show the «prion-like» features of p53. Our results show *in vitro* aggregation of the full length and N-terminally truncated protein (p53C), and that these aggregates can penetrate cells. According to our findings, the aggregates enter cells using macropinocytosis, a non-specific method of entry. Lastly, we also show that once internalized by the cell, p53C aggregates can co-aggregate with endogenous p53 protein. Together, these findings suggest prion-like characteristics for p53 protein, based on the fact that p53 can spontaneously aggregate, these aggregates can penetrate cells and co-aggregate with cellular p53.

Keywords: prion, p53, protein aggregation

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES TABLEAUX	VI
LISTE DES FIGURES	VII
LISTE DES SIGLES, ABRÉVIATIONS ET SYMBOLES.....	VIII
INTRODUCTION.....	1
L'agrégation des protéines et son implication dans des pathologies humaines	1
Le repliement protéique	1
Défenses de la cellule contre l'agrégation des protéines	2
Les pathologies associées au mauvais repliement de protéines	3
Cas particulier : La protéine prion	7
Les encéphalopathies spongiformes transmissibles et l'implication de la protéine prion	7
Les encéphalopathies spongiformes transmissibles	7
La protéine prion cellulaire	9
Les propriétés des prions.....	10
Les prionoïdes.....	13
Que sont les prionoïdes?	13
Prionoïdes connus	14
Protéine d'intérêt : p53.....	20
Structure et fonction de la protéine p53.....	20
Structure de la protéine p53.....	20
Les diverses fonctions de p53.....	23
Les mutations de p53 dans le cancer	25
Le lien entre p53 et les prionoïdes	28
Évidences moléculaires de ressemblance entre la protéine p53 et PrP	28
Gain et perte de fonction reliés à l'agrégation.....	31
Problématique et hypothèses de recherche.....	34
Problématique.....	34
Objectifs.....	35

AVANT-PROPOS.....	36
RÉSUMÉ DE L'ARTICLE	38
ARTICLE	39
DISCUSSION ET CONCLUSIONS	62
Les agrégats de p53 et p53C formés par la chaleur sont amorphes	62
Les agrégats de p53 sont internalisés par des cellules en culture via la macropinocytose	64
Les agrégats de p53 recombinant co-agrègent avec p53 endogène.....	69
La formation des agrégats de p53 et leur transmission d'une cellule à l'autre sont-elles envisageables physiologiquement?	71
Conclusions.....	76
REMERCIEMENTS.....	77
LISTE DES RÉFÉRENCES.....	78
ANNEXE.....	91

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Caractéristiques physico-chimiques des fibres amyloïdes	5
Tableau 2 : Les prionoïdes possibles et leurs caractéristiques	15

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Les différents niveaux de transmission des prions	11
Figure 2 : Recrutement de la protéine cellulaire TDP-43 par des agrégats exogènes de TDP-43 recombinant fluorescents	17
Figure 3 : Transmission de cellule en cellule des agrégats de tau-YFP	18
Figure 4 : Principales mutations oncogéniques de la protéine p53.....	25
Figure 5 : L'aspect dominant-négatif d'un mutant de p53.....	27
Figure 6 : Un modèle de recrutement de p53WT par p53 mutant.....	33
Figure 7 : p53 forms amorphous aggregates at 42 °C.....	48
Figure 8 : p53 aggregates are internalized by HeLa and NIH3T3 cells	50
Figure 9 : p53 aggregates are internalized via macropinocytosis.....	52
Figure 10 : De novo aggregation of soluble p53 with recombinant p53 aggregates	54
Figure 11 : Effet des différents inhibiteurs d'endocytose sur les molécules contrôles	66

LISTE DES SIGLES, ABRÉVIATIONS ET SYMBOLES

ADN	Acide désoxyribonucléique
ANS	8-Anilino-naphtalène-1-sulfonate
ARN	Acide ribonucléique
ATM	Protéine <i>Ataxia telangiectasia mutated</i>
A β	Amyloïde bêta
ALS	Sclérose amyotrophique latérale
APP	Protéine précurseuse de l'amyloïde
CFTR	Protéine <i>cystic fibrosis transmembrane conductance regulator</i>
CHIP	Carboxy-terminus of Hsp70-interacting protein
Cu ²⁺	Ion de cuivre divalent
Cys	Cystéine
EIPA	5-(N-éthyl-N-isopropyl) amiloride
ESB	Encéphalopathie spongiforme bovine
EST	Encéphalopathie spongiforme transmissible
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
His	Histidine
iCJD	Maladie de Creutzfeldt-Jakob iatrogénique
kDa	KiloDaltons
MDM2	Protéine mouse double-minute 2
MRN	Complexe protéique composé des protéines Mre11, Rad50 et Nbs1
p53	Protéine p53
p53C	Protéine p53 tronquée (résidus 93-393)
p53FL	Protéine p53 pleine longueur (résidus 1-393)
p53WT	Protéine p53 de forme sauvage
p63	Protéine p63
p73	Protéine p73
PRNP	Gène codant pour la protéine prion
PrP	Protéine prion
PrP ^C	Protéine prion cellulaire
PrP ^{Sc}	Protéine prion <i>scrapie</i>
SOD1	Protéine superoxyde dismutase 1
TDP-43	Protéine <i>transactivation response element (TAR) DNA-binding protein-43</i>
T _m	Point de fusion
TP53	Gène codant pour la <i>transactivation protein 53</i>
vCJD	Maladie variante de Creutzfeldt-Jakob
Zn ²⁺	Ion de zinc divalent

INTRODUCTION

L'agrégation des protéines et son implication dans des pathologies humaines

Le repliement protéique

Dans une cellule, les protéines sont synthétisées par les ribosomes en une chaîne d'acides aminés. Par la suite, la chaîne polypeptidique nouvellement formée se replie généralement pour adopter la conformation qui minimise le plus possible son énergie libre. Cette conformation est retenue en place par des interactions non covalentes entre les chaînes latérales des acides aminés comme les forces de Van der Waals, des interactions électrostatiques et des ponts hydrogène (ALBERTS, 2008). Le repliement peut être facilité par la présence de chaperones moléculaires, qui lient le polypeptide et le relâchent uniquement lorsque celui-ci a atteint la bonne conformation. Cependant, même dans des conditions optimales, il arrive que certaines protéines ne se replient pas correctement. De façon générale, une protéine adopte la structure qui lui permet le plus possible d'enfouir les acides aminés aux chaînes latérales hydrophobes au cœur de la molécule. Une mauvaise conformation protéique peut mener à l'exposition de telles chaînes latérales hydrophobes dans le milieu cellulaire et favoriser les interactions hydrophobes entre deux monomères protéiques mal repliés, menant à l'agrégation de cette protéine. De plus, l'agrégation permet souvent à la protéine d'atteindre un très bas niveau d'énergie libre, stabilisant davantage la molécule (SILVA *et al.*, 2010).

Afin de maintenir ses fonctions physiologiques, la cellule possède plusieurs moyens d'éliminer les protéines aberrantes. Normalement, la macroautophagie et le système de dégradation par le protéasome, qui reçoit les protéines ciblées par

les chaperones moléculaires, sont des mécanismes capables de garder le nombre de protéines mal repliées à un niveau très bas dans la cellule (NAEEM et FAZILI, 2011). Mais, si ces mécanismes sont déficients ou si la quantité de protéines à dégrader devient trop importante, celles-ci peuvent s'accumuler et causer des dommages importants à la cellule ainsi qu'à l'organisme en entier.

Défenses de la cellule contre l'agrégation des protéines

Au moment où les protéines sont synthétisées par les ribosomes, elles se replient souvent avec l'aide des chaperones moléculaires comme celles de la famille des *heat shock proteins*. Dans le cytosol, ces chaperones interagissent normalement avec les acides aminés hydrophobes exposés des protéines. Ce contact a plusieurs fonctions : d'abord, il facilite le repliement des protéines en une conformation tridimensionnelle favorable où les résidus hydrophobes sont protégés à l'intérieur de la structure protéique. Ensuite, il empêche l'auto-association des monomères protéiques entre eux, pour éviter leur agrégation. Enfin, si une protéine ne réussit pas à se replier correctement malgré la présence des chaperones, elle sera ciblée pour la dégradation par un marquage de polyubiquitine. La dégradation de telles protéines aberrantes est assurée par le protéasome 26S, une machinerie protéolytique présente en plusieurs copies dans le cytosol (ALBERTS, 2008). Les protéines qui échappent à ce premier contrôle de qualité peuvent être dégradées via un processus appelé macroautophagie, au cours duquel une vésicule composée de deux bicouches lipidiques, l'autophagosome, englobe les protéines aberrantes et fusionne avec un lysosome. La vésicule ainsi formée, appelée autolysosome, comporte des hydrolases lysosomales et un pH acide qui permettent la dégradation des protéines mal repliées (BRUNDIN *et al.*, 2010). Au niveau du réticulum endoplasmique, un processus similaire de repliement médié par des chaperones s'effectue et les protéines aberrantes sont aussi ciblées vers le protéasome pour leur dégradation par leur rétrotranslocation dans le cytosol. L'accumulation de

protéines mal repliées dans le cytosol ou dans le réticulum endoplasmique entraîne une réponse au choc thermique ou une réponse aux protéines mal repliées, respectivement. Dans les deux cas, la réponse consiste en un événement qui stimule la transcription de gènes codant pour des chaperones cytosoliques ou propres au réticulum endoplasmique (ALBERTS, 2008). Ces chaperones tenteront alors de diminuer la quantité de protéines mal repliées dans la cellule en se liant à celles-ci pour favoriser l'adoption de leur conformation native.

Les pathologies associées au mauvais repliement de protéines

Le mauvais repliement et l'agrégation protéique sont impliqués dans plus de 30 pathologies humaines, dont plusieurs sont fréquentes dans la population (SILVA *et al.*, 2010; STEFANI, 2004). Dans certains cas, l'accumulation de protéines mal repliées impliquées dans ces pathologies pourrait être facilitée par le vieillissement, période de la vie où les cellules présentent parfois des déficiences au niveau des voies de dégradation protéiques (PUOTI *et al.*, 2012). Notamment, un tel phénomène pourrait être en partie responsable des maladies d'Alzheimer et de Parkinson, deux pathologies neurodégénératives très fréquentes dans la population âgée de 65 ans et plus.

Certaines des pathologies associées au mauvais repliement protéique font partie de la catégorie des amyloïdoses, des maladies où l'agrégation protéique prend la forme de fibres amyloïdes. Un exemple classique d'amyloïdose est celui de la maladie d'Alzheimer (BARROW *et al.*, 1992). Dans cette pathologie, le peptide amyloïde β ($A\beta$) est produit suite au clivage amyloïdogénique de la protéine précurseur de l'amyloïde (APP). Une fois produit, il s'agrège pour former des plaques extracellulaires qui s'accumulent autour des neurones du cerveau. La présence de fibres amyloïdes, détectée par leur liaison à certains colorants

comme la Thioflavine T et le rouge de Congo (DOBSON, 2001), sert de signature histopathologique pour plusieurs amyloïdoses. En effet, la liaison des colorants aux fibres amyloïdes est un bon outil de détection puisque la structure des fibres est extrêmement similaire malgré les différences des protéines et peptides qui peuvent entrer dans leur composition. À la base de toutes les fibres amyloïdes se trouve un cœur de feuillets β anti-parallèles qui serait responsable de la liaison des différents colorants aux fibres. En effet, la biréfringence verte observée à l'aide de lumière polarisée suite à la liaison des fibres amyloïdes au rouge de Congo est considérée comme leur caractéristique principale (SIPE *et al.*, 2012; STEFANI, 2004). Ce type de fibre protéique est non ramifié et est formé de protofilaments enroulés les uns autour des autres (NAEEM et FAZILI, 2011). Des observations par diffraction aux rayons X révèlent une structure appelée *cross- β* au cœur de la molécule: les protofilaments sont formés de monomères protéiques dont les feuillets β sont placés perpendiculairement à l'axe de la fibrille mais reliés par des ponts hydrogène parallèles à l'axe de la fibrille (NAEEM et FAZILI, 2011; STEFANI, 2004). Les maladies à prion, la maladie de Huntington, la sclérose latérale amyotrophique et les ataxies spinocérébelleuses sont toutes des exemples d'amyloïdose.

Dimensions	Longueur : 0,1-10 μm Largeur : 6-12 nm Diamètre des protofilaments : 1,5-2,0 nm
Structure	- Fibre non ramifiée, composée de protofilaments enroulés - Protofilaments formés de feuillets β anti-parallèles
Coloration	- Biréfringence verte observable à l'aide de lumière polarisée suite à la coloration avec le Rouge de Congo - Fibres colorées par la Thioflavine T

Tableau 1 : Caractéristiques physico-chimiques des fibres amyloïdes

Les fibres amyloïdes sont des agrégats protéiques ayant des particularités qui les distinguent des autres agrégats. Parmi celles-ci, la caractéristique la plus importante des fibres amyloïdes est la biréfringence observable lors de la liaison du colorant Rouge de Congo. Informations tirées de (NAEEM et FAZILI, 2011; SIPE *et al.*, 2012; STEFANI, 2004).

Les fibres amyloïdes sont un exemple d'agrégat protéique, mais d'autres types d'agrégats existent : des oligomères, des agrégats annulaires ou encore des agrégats amorphes. Les oligomères sont une espèce soluble composée d'au minimum deux monomères protéiques. Ils sont souvent les précurseurs d'autres agrégats plus complexes, comme les fibres amyloïdes. Les oligomères sont soupçonnés comme étant l'espèce protéique toxique dans plusieurs amyloïdoses. En effet, de la cytotoxicité neuronale a été montrée pour les oligomères de la protéine prion (PrP) dans les maladies à prion (HUANG *et al.*, 2010; NOVITSKAYA *et al.*, 2006) ainsi que du peptide A β et de la protéine tau dans la maladie d'Alzheimer (LAMBERT *et al.*, 1998) (FLACH *et al.*, 2012). Un autre type d'agrégat, des agrégats annulaires (en forme d'anneau ou de beigne) peut être formé, entre autres, par la protéine α -synucléine durant le développement de l'atrophie multisystématisée (POUNTNEY *et al.*, 2004), *in vitro* par la protéine *islet amyloid polypeptide* (IAPP) humaine (CHEN *et al.*, 2012) et par le peptide A β (FINDER et GLOCKSHUBER, 2007). Les agrégats annulaires

sont aussi soupçonnés pour être toxiques, par leur capacité d'agir en tant que pore ou canal à la surface cellulaire et d'induire un déséquilibre ionique, en plus d'endommager la membrane plasmique (FINDER et GLOCKSHUBER, 2007; VOLLES et LANSBURY, 2002). Enfin, il existe aussi un type d'agrégat amorphe, qui caractérise un agrégat protéique dont la morphologie ne correspond ni à des oligomères, ni à des agrégats annulaires et qui ne possède pas les caractéristiques des fibres amyloïdes. Des agrégats amorphes peuvent être formés à partir de diverses protéines (impliquées dans des maladies ou non), pourvu que celles-ci soient placées dans les bonnes conditions (KERMAN *et al.*, 2010; VETRI *et al.*, 2011).

Il existe plusieurs pathologies associées au mauvais repliement protéique qui ne sont pas considérées comme des amyloïdoses. Elles sont toutes aussi dignes d'intérêt de par leur diversité, leur nombre et la possibilité que plusieurs d'entre elles ne soient pas encore identifiées. Cette catégorie de pathologies inclut entre autres la pancréatite chronique, les cataractes, la fibrose kystique et le cancer en général (NAEEM et FAZILI, 2011). Dans le cas de la fibrose kystique, la maladie est causée par la présence d'une mutation dans la protéine *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* (CFTR). La mutation la plus fréquente dans la protéine CFTR est $\Delta F508$, qui supprime un acide aminé et change la séquence polypeptidique de la protéine, empêchant son repliement normal (NAEEM et FAZILI, 2011). La machinerie de contrôle de qualité des protéines reconnaît alors une protéine mal repliée et la cible vers le protéasome pour sa dégradation (STEFANI, 2004). Un individu qui possède une telle mutation développera la fibrose kystique puisqu'il ne produit pas de protéine CFTR fonctionnelle.

Cas particulier : La protéine prion

Les maladies à prion sont des pathologies neurodégénératives associées au mauvais repliement protéique très largement documentées et dont l'agent responsable, PrP, est étudié par de très nombreuses équipes de recherche dans le monde. Ces pathologies sont caractérisées par des dysfonctions cognitive et motrice et les individus atteints présentent des plaques amyloïdes au cerveau qui consistent en une forme agrégée et infectieuse de la protéine prion, PrP^{sc} (AGUZZI *et al.*, 2008). Ces plaques extracellulaires sont le résultat d'une agrégation et accumulation de PrP^{sc} et la présence des plaques, détectable par immunohistochimie, est couramment utilisée pour confirmer une maladie à prion suspectée chez un individu à l'aide d'une biopsie du cerveau (PUOTI *et al.*, 2012).

Les encéphalopathies spongiformes transmissibles et l'implication de la protéine prion

Les encéphalopathies spongiformes transmissibles

Les encéphalopathies spongiformes transmissibles (EST), ou maladies à prion, sont un groupe de pathologies neurodégénératives infectieuses et toujours fatales. Elles affectent plusieurs espèces animales incluant les cervidés, ovins, félins et bovins. Une forme très connue de maladie à prion est l'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB), appelée communément maladie de la vache folle. Cette dernière s'est fait connaître surtout lors de la crise alimentaire durant les années 1980-1990 au Royaume-Uni, où plusieurs centaines de milliers de bovins ayant contracté la maladie ou ayant pu être en contact avec des animaux malades ont été abattus (AGUZZI *et al.*, 2008).

Cependant, les maladies à prion peuvent aussi affecter les humains sous diverses formes. Entre autres, les maladies à prion incluent le syndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker, l'insomnie fatale familiale et la maladie de Creutzfeldt-Jakob (CJD), cette dernière étant de loin la plus fréquente. Dans le cas du CJD, la maladie peut survenir de trois différentes façons : sporadique (85% des cas), familiale (5-15% des cas) ou acquise (< 5% des cas) (World Health Organisation, 2012). Les formes sporadiques sont sans origine connue et affectent de manière égale tous les groupes ethniques. Les formes familiales, quant à elles, sont causées par la présence de mutations dans le gène *PRNP*, codant pour la protéine PrP. Ces mutations, qui se transmettent de génération en génération de manière autosomale dominante, sont la cause du changement de structure de la protéine qui précède son agrégation (TOMPA *et al.*, 2002). Enfin, les formes acquises des maladies à prion comprennent les maladies de Creutzfeldt-Jakob variant (vCJD) et iatrogénique (iCJD), ainsi que le Kuru. Dans le cas du vCJD, une série d'études suggèrent fortement que la maladie aurait comme origine la transmission d'ESB aux humains, fort probablement via l'ingestion de viande provenant d'animaux contaminés. En effet, le vCJD a fait son apparition en 1996 suite à la crise d'ESB survenue au Royaume-Uni entre 1986 et 2000 (AGUZZI *et al.*, 2008). Actuellement, 225 cas de vCJD sont répertoriés au monde (IRONSIDE, 2012). Finalement, pour ce qui est du iCJD, sa transmission se fait plutôt suite à une intervention médicale, comme une greffe, une transfusion sanguine ou via l'utilisation d'instruments chirurgicaux mal stérilisés (IMRAN et MAHMOOD, 2011). Toutes ces pathologies sont reliées à la présence de la protéine prion, sans laquelle le développement d'EST est impossible.

La protéine prion cellulaire

La protéine prion cellulaire (PrP^c) est synthétisée sous la forme d'un précurseur de 253 acides aminés, puis sa forme mature est produite lorsque le peptide signal N-terminal est clivé et qu'une ancre glycosylphosphatidylinositol (GPI) est rajoutée durant son passage dans le réticulum endoplasmique. La protéine est ensuite sécrétée dans le milieu extracellulaire et se fixe à la membrane plasmique via son ancre GPI (ABID et SOTO, 2006; ERMONVAL *et al.*, 2003). La protéine peut aussi subir jusqu'à deux glycosylations, donc peut générer trois formes : non-glycosylée, monoglycosylée ou diglycosylée (PUOTI *et al.*, 2012). Toute une panoplie de fonctions sont attribuées à PrP^c, incluant la possibilité que la protéine soit un récepteur liant le peptide A β , qu'elle serve à la régulation synaptique ou encore qu'elle ait un rôle dans la survie et croissance neuronale (PUOTI *et al.*, 2012). Dû à l'expression prédominante de PrP dans le système nerveux central (SNC), les efforts pour définir la fonction physiologique de PrP sont principalement dirigés au niveau des neurones. Cependant, la protéine est ubiquitaire et pourrait aussi avoir une fonction dans des cellules non-neuronales. Actuellement, les fonctions les plus étudiées de PrP sont son effet neuroprotecteur et son rôle dans la liaison et le métabolisme du cuivre (ABID et SOTO, 2006).

Le changement de conformation de PrP^c en PrP^{sc}, à l'origine des maladies à prion, s'effectue spontanément selon un mécanisme dont les détails sont encore inconnus, mais qui inclut l'apparition de feuillets β au lieu d'hélices α dans la structure secondaire de la protéine. Cette modification structurale facilite l'agrégation de PrP^{sc}. Une fois sous forme agrégée, la protéine résiste partiellement à la digestion par certaines protéases, notamment la protéinase K, et devient insoluble dans certains détergents (ABID et SOTO, 2006; PUOTI *et al.*, 2012). De plus, PrP^{sc} est connue pour recruter la protéine PrP^c native et lui transmettre sa mauvaise conformation. Il en résulte donc une amplification auto-

catalytique de l'agrégation de PrP^{Sc} et une accumulation des agrégats sous forme de plaques amyloïdes au cerveau.

Les propriétés des prions

Étant donné le caractère atypique de la transmission des maladies à prion, certaines caractéristiques, vérifiées expérimentalement, ont été attribuées à la protéine prion afin de mieux définir le phénomène. Premièrement, les agrégats de la protéine prion comportent des interactions intermoléculaires fortes à un point tel que l'agrégation est irréversible. Deuxièmement, les agrégats résistent à la machinerie de dégradation cellulaire. Troisièmement, ces agrégats sont capables de recruter des monomères de la même protéine afin de les faire agréger (IMRAN et MAHMOOD, 2011). Ils se propagent aussi d'une cellule à l'autre, dans lesquelles ils sont toujours capables de recruter des monomères protéiques de PrP^C (BRUNDIN *et al.*, 2010). Quatrièmement, la transmission des prions entre organismes a été confirmée comme étant possible d'un humain à l'autre ainsi que d'un animal à un autre de la même espèce, mais la transmission naturelle d'une espèce à l'autre a uniquement été observée des bovins vers les humains jusqu'à maintenant. Artificiellement, par exemple à l'aide d'inoculation intracérébrale, il est cependant possible de transmettre des souches de prions provenant de bovins, ovins ou cervidés, à d'autres espèces animales tels les rongeurs et les primates (IMRAN et MAHMOOD, 2011). Enfin, la transmission d'un organisme à l'autre d'une pathologie médiée par des agrégats protéiques n'a jamais été observée dans des pathologies associées au mauvais repliement protéique autres que celles dans lesquelles PrP est impliqué, sauf pour l'amyloïdose secondaire causée par le peptide amyloïde A. Cette dernière particularité définit donc le caractère unique du prion en tant qu'agent infectieux (GUEST *et al.*, 2011).

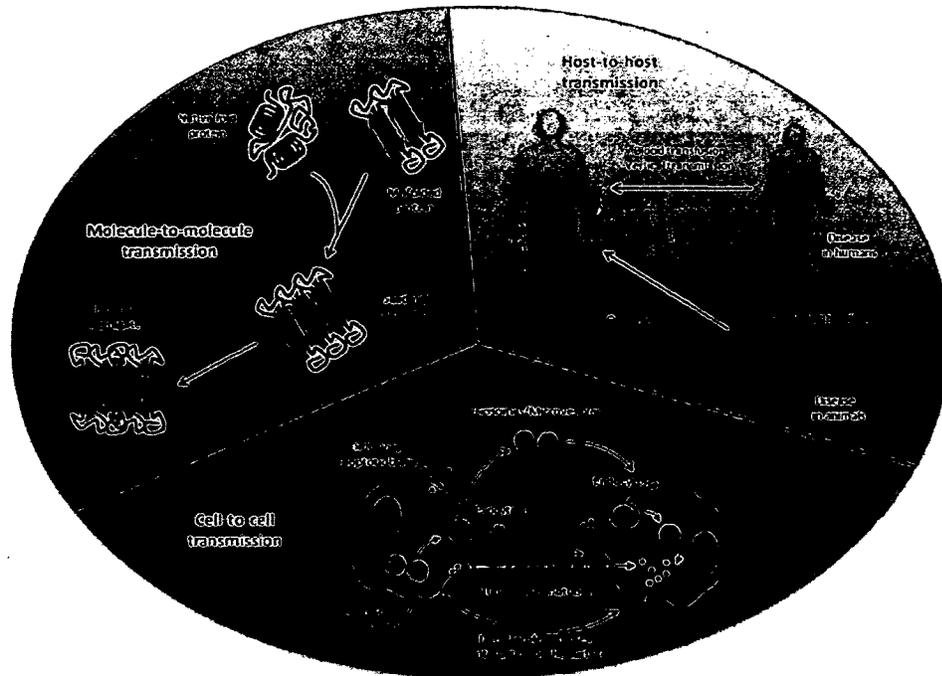


Figure 1 : Les différents niveaux de transmission des prions

La transmission des prions s'effectue à plusieurs niveaux : le mauvais repliement de PrP se transmet d'une molécule à une autre, les agrégats de la protéine se transmettent d'une cellule à l'autre ainsi que d'un organisme à l'autre. Tiré de (MORENO-GONZALEZ et SOTO, 2011).

À la lumière de ces caractéristiques, l'hypothèse d'un agent infectieux protéique seul a été proposée il y a plusieurs décennies pour expliquer la transmission des maladies à prion (GRIFFITH, 1967). L'hypothèse de la protéine seule suggère que l'agent causal des EST ne comprend aucun acide nucléique et est composé uniquement de la protéine PrP (AGUZZI *et al.*, 2008; SOTO *et al.*, 2006). La théorie, bien que controversée, a été soutenue plus tard par des publications de Stanley Prusiner, gagnant d'un prix Nobel en physiologie ou médecine en 1997 pour sa découverte des prions et chercheur actif dans le domaine (BONN et AULT, 1997; PRUSINER, 1998; SAFAR *et al.*, 2005). Les évidences pour soutenir cette hypothèse sont nombreuses. Elles incluent le fait que la protéine PrP^{Sc} purifiée, lorsqu'injectée seule dans des animaux sains exprimant le gène *PRNP*, cause l'apparition de maladies à prion (ABID et SOTO, 2006). De plus,

des souris inactivées pour le gène *PRNP* ne développent jamais d'EST, ce qui démontre une nécessité de PrP^c pour le développement de la maladie. Enfin, des mutations dans *PRNP* ont été identifiées dans tous les cas d'EST familiales (AGUZZI *et al.*, 2008). L'hypothèse d'une protéine seule est actuellement le modèle le plus largement accepté pour décrire l'agent infectieux des maladies à prion.

Les autres hypothèses considérées concernant la nature de l'agent infectieux des EST sont : l'hypothèse du virino et l'hypothèse selon laquelle des molécules d'ARN spécifiques seraient nécessaires à la transformation de PrP^c en PrP^{sc}. L'hypothèse du virino, initialement proposée par Dickinson, A.G. et G.W. Outram en 1988, affirme que l'agent infectieux des maladies à prion est un acide nucléique spécifique associé à ou protégé par une protéine encodée par l'hôte, plus précisément PrP^c. La provenance de l'hôte de la protéine protectrice pourrait expliquer les faibles réponses immunitaire et inflammatoire observées chez des animaux ou individus atteints de maladies à prion (ROZEMULLER *et al.*, 2012). Malgré plusieurs études à ce sujet, la présence d'un acide nucléique dans les particules infectieuses des maladies à prion n'a jamais été prouvée (PRUSINER et DEARMOND, 1991; SAFAR *et al.*, 2005). Enfin, la dernière hypothèse suggère un rôle pour des molécules d'ARN spécifiques dans la conversion *in vitro* de PrP^c en PrP^{sc} (DELEAULT *et al.*, 2003). Une étude à ce sujet a montré que l'amplification de PrP^{sc} est stimulée par une préparation d'ARN de mammifères, mais pas par de l'ARN provenant d'invertébrés, qui ne développent pas d'EST (DELEAULT *et al.*, 2003). Toutefois, le même groupe de recherche a montré plus récemment qu'en absence d'ARN, la propagation de la conformation de PrP^{sc} pouvait être effectuée (du moins pour PrP^{sc} murin) et que la présence de phosphatidyléthanolamine facilite cette propagation pour PrP^{sc} de souris, hamster, campagnol et cervidé (DELEAULT *et al.*, 2012). La présence de lipides a souvent été associée à la propagation de PrP^{sc} *in vitro* et *in vivo*, comme le démontre l'étude de Wang, F. et al, 2010, où la protéine PrP recombinante a été utilisée pour infecter des souris par injection intracérébrale (WANG *et al.*, 2010).

Les prionoïdes

Que sont les prionoïdes?

La transformation d'une protéine native en une forme mal repliée et toxique à la base d'une pathologie n'est pas un phénomène propre à la protéine prion (SOTO, 2012). En effet, ce phénomène est présent dans diverses pathologies humaines neurodégénératives (Alzheimer, Parkinson, Huntington, Sclérose latérale amyotrophique et tauopathies) et non neurodégénératives (diabète de type 2) dans lesquelles sont impliquées une ou plusieurs protéines. On classe ces protéines dans la catégorie des prionoïdes.

Les prionoïdes sont des protéines ayant certaines propriétés propres aux prions, sans toutefois posséder toutes leurs caractéristiques. Ainsi, ce sont des protéines ayant généralement tendance à agréger qui présentent, dans la plupart des cas, la capacité de transmettre leur conformation agrégée à la protéine native. Dans certains cas, leurs agrégats sont aussi capables de se transmettre d'une cellule à l'autre. La différence principale entre les prions et les prionoïdes repose sur le fait que les prions sont des agents infectieux transmissibles d'un individu à l'autre et capables de se propager dans la population au point de causer des épidémies à grande échelle comme le Kuru ou l'encéphalopathie spongiforme transmissible (AGUZZI et RAJENDRAN, 2009). En effet, l'infectiosité des agrégats de PrP^{sc} a été démontrée expérimentalement à plusieurs reprises par différentes équipes de recherche (CHANDLER, 1961; CHANDLER, 1961; LASMEZAS *et al.*, 1996; LEGNAME *et al.*, 2004; WANG *et al.*, 2010). Dans le cas des prionoïdes, la transmission d'agrégats protéiques (autres que PrP^{sc}) d'un organisme à l'autre a déjà été observée, mais uniquement en présence de conditions expérimentales très précises et, jusqu'à très récemment, seulement à l'aide d'animaux transgéniques (GUEST *et al.*, 2011). Les agrégats du peptide A β , impliqués dans la maladie d'Alzheimer, ont été très étudiés à ce sujet. En 2006, l'injection

d'homogénats de cerveau d'humains atteints d'Alzheimer dans le cerveau de souris transgéniques qui surexpriment la protéine précurseur de l'amyloïde (APP) a résulté en des dépôts importants d'A β dans l'hippocampe des animaux. En revanche, l'injection d'homogénats de cerveau d'humains âgés mais non affectés par la maladie d'Alzheimer a produit seulement des dépôts minimes d'A β chez les souris (MEYER-LUEHMANN *et al.*, 2006). D'autres travaux ont plus tard confirmé ces résultats expérimentaux en montrant que même des agrégats injectés dans la cavité intra-péritonéale des souris pouvaient initier une β -amyloïdose au cerveau (EISELE *et al.*, 2010; MORALES *et al.*, 2011). Plus récemment, l'injection d'agrégats purifiés de la protéine tau dans le cerveau de souris C57BL/6 de type sauvage a causé l'apparition de filaments et oligomères pathologiques de tau chez ces souris (LASAGNA-REEVES *et al.*, 2012). De plus, les animaux ainsi affectés présentaient aussi des déficits de mémoire, indiquant une propagation de la tauopathie chez les souris infectées. Étant donné ces résultats, il est présentement impossible d'exclure la possibilité que ces pathologies se transmettent d'un individu à un autre, mais les études actuelles n'en montrent pas la preuve chez les humains.

Prionoïdes connus

Les prionoïdes incluent des protéines bien connues dans le domaine des pathologies neurodégénératives, comme le peptide A β , impliqué dans la maladie d'Alzheimer et les protéines α -synucléine et Huntingtin dans les maladies de Parkinson et de Huntington, respectivement (SOTO, 2012). Pour chacune de ces protéines, la transmission de la mauvaise conformation de l'agrégat à la protéine native a été confirmée et le transfert d'agrégats de cellule en cellule a aussi été montré *in cellulo* de façon convaincante.

Protéine	Recrutement de la protéine native	Transmission cellule-cellule	Transmission entre organismes	Protéine seule suffisante pour l'infection
PrP ^{sc}	Oui	Oui	Oui	Oui
Amyloïde A	Oui	N/A	Oui	Oui
Amyloïde β	Oui	N/A	Oui	Oui
Tau	Oui	Oui	Oui	?
SOD1	Oui	Oui	?	?
TDP-43	Oui	?	?	?
Huntingtin	Oui	Oui	Non	Non
α -synucléine	Oui	Oui	?	?
IAPP	Oui	N/A	?	?

Tableau 2 : Les prionoïdes possibles et leurs caractéristiques

Plusieurs protéines impliquées dans des maladies neurodégénératives sont actuellement considérées comme des prionoïdes puisqu'elles possèdent certaines des caractéristiques des prions. À cette liste se rajoute la protéine IAPP, impliquée dans le diabète de type 2. La mention «Oui» indique que la caractéristique a été confirmée pour cette protéine; la mention «Non» indique que la caractéristique n'est pas retrouvée chez cette protéines; N/A indique que la caractéristique ne s'applique pas dans ce cas et «?» signifie qu'aucune étude n'a montré la caractéristique jusqu'à maintenant. Modifié de (AGUZZI, 2009; FURUKAWA *et al.*, 2011; GUEST *et al.*, 2011; LASAGNA-REEVES *et al.*, 2012; STOHR *et al.*, 2012).

Le tableau 2 résume les différentes protéines considérées comme des prionoïdes possibles ainsi que les propriétés qui leur sont attribuées. Cependant, ce ne sont pas toutes les caractéristiques des prions que l'on peut appliquer directement à tous les prionoïdes. Par exemple, les agrégats formés par les peptides amyloïde A et β ont une localisation extracellulaire. Puisque ces peptides sont sécrétés à l'extérieur des cellules, ils sont directement accessibles et les agrégats n'ont aucun besoin d'entrer dans les cellules pour propager leur mauvais repliement au sein d'un tissu. Toutefois, l'absence de transmission cellule-cellule n'empêche pas nécessairement ces agrégats d'être transmissibles à plus grande échelle, soit d'un organisme à un autre.

Le recrutement de la protéine native par des agrégats protéiques pour induire son mauvais repliement est une caractéristique qui a été montrée pour tous les prionoïdes connus. De façon générale, la démonstration d'un tel phénomène se fait en montrant la co-agrégation de la protéine agrégée avec la protéine native, soit par microscopie confocale ou détection des deux formes de la protéine par immunobuvardage dans des cellules. Les deux méthodes ont été utilisées pour montrer la formation d'agrégats insolubles dans le détergent sarkosyl de la protéine *transactivation response element (TAR) DNA-binding protein-43* (TDP-43) (FURUKAWA *et al.*, 2011). TDP-43 est une protéine impliquée dans la régulation génique et l'épissage d'ARN messenger et connue pour agréger dans la sclérose latérale amyotrophique (ALS) (NEUMANN *et al.*, 2006). Dans l'étude de Furukawa, Y. *et al.*, 2011, des agrégats de la protéine TDP-43 recombinante marqués à l'aide d'une sonde fluorescente sont transduits dans des cellules exprimant la protéine TDP-43 fusionnée à une étiquette hémagglutinine (HA). Les auteurs visualisent clairement la co-agrégation des deux protéines dans ces cellules et peuvent différencier la protéine TDP-43 cellulaire des agrégats transduits grâce à un marquage spécifique ciblant l'étiquette HA. Ensuite, les cellules transduites ou non avec les agrégats ont été lysées dans le sarkosyl. Par immunobuvardage Western, les auteurs indiquent un enrichissement de TDP-43 étiquetée HA dans la fraction insoluble dans le sarkosyl et ce, uniquement pour les cellules qui ont été transduites avec les agrégats recombinants. Ces résultats démontrent donc que la protéine TDP-43 cellulaire forme des agrégats insolubles dans le sarkosyl lorsque mis en présence d'agrégats de TDP-43. La co-agrégation observée par microscopie a également été utilisée pour montrer le recrutement de la protéine native par des agrégats extracellulaires de Huntingtin (KOPITO, 2000); SOD1 (MÜNCH *et al.*, 2011) et α -synucléine (LUK *et al.*, 2009).

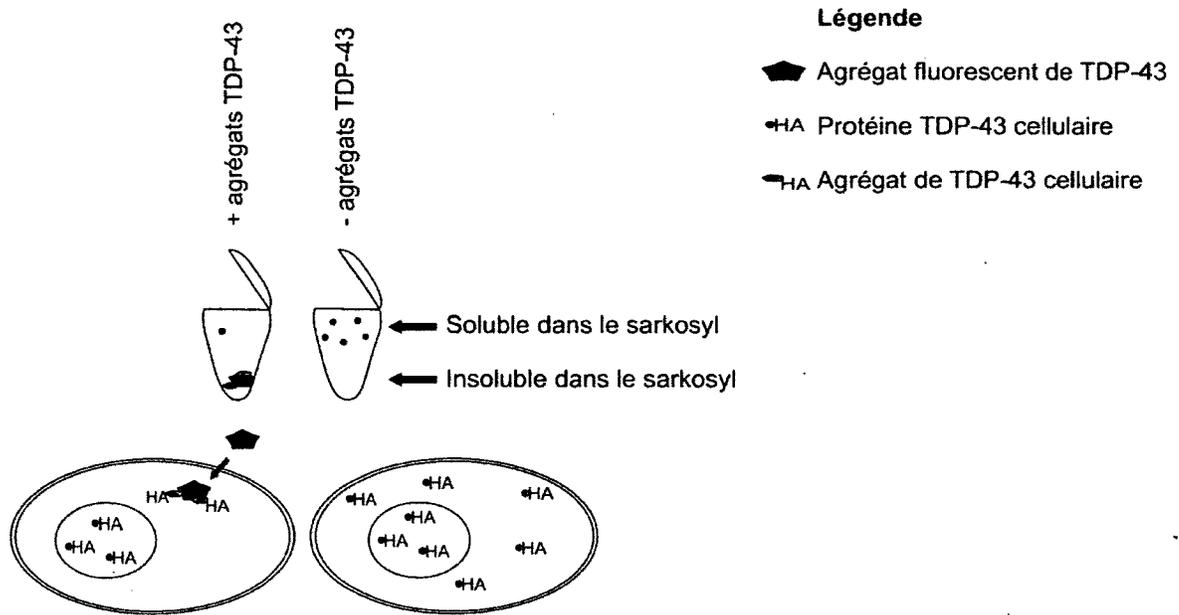


Figure 2 : Recrutement de la protéine cellulaire TDP-43 par des agrégats exogènes de TDP-43 recombinant fluorescents

Les agrégats fluorescents de TDP-43 transduits dans des cellules en culture causent l'agrégation de la protéine TDP-43 cellulaire (étiquetée HA). Les agrégats ainsi formés sont insolubles dans le détergent sarkosyl utilisé pour lyser les cellules. Basé sur les résultats de (FURUKAWA *et al.*, 2011).

La protéine α -synucléine a quant à elle été un des premiers prionoïdes pour lesquelles la transmission de cellule en cellule a été observée. Cette protéine, dont la fonction précise est encore inconnue, agrège dans les neurones de patients atteints de la maladie de Parkinson, de démence à corps de Lewy et d'atrophie multisystématisée (AULUCK *et al.*, 2010). La transmission des agrégats d' α -synucléine a été constatée lorsque des cellules neuronales embryonnaires greffées dans des patients souffrant de la maladie de Parkinson ont acquis des agrégats de la protéine α -synucléine (LI *et al.*, 2008). Cette observation suggère que les agrégats d' α -synucléine peuvent être transmis d'une cellule à une autre. Par la suite, la transmission cellule-cellule a été montrée expérimentalement pour α -synucléine (DESPLATS *et al.*, 2009) ainsi que d'autres protéines par co-culture couplée à la microscopie ou cytométrie de flux. Par exemple, en 2009, Frost, B. *et al.*, ont montré la propagation d'une cellule à

une autre des agrégats de tau par des expériences de co-culture. Une co-culture entre des cellules transfectées avec tau-YFP (incubées en présence d'agrégats de la protéine tau recombinante) et des cellules transfectées simplement avec mCherry leur a permis d'observer, par microscopie, le transfert des agrégats nouvellement formés de tau-YFP vers les cellules exprimant mCherry. Les auteurs ont également quantifié la fréquence du phénomène par cytométrie de flux; ils ont déterminé que le transfert de tau-YFP vers les cellules mCherry se produit dans environ 1% des cellules, comparativement à 0,3% des cellules lorsque la co-culture n'est pas mise en contact avec des agrégats de tau exogènes (FROST *et al.*, 2009).

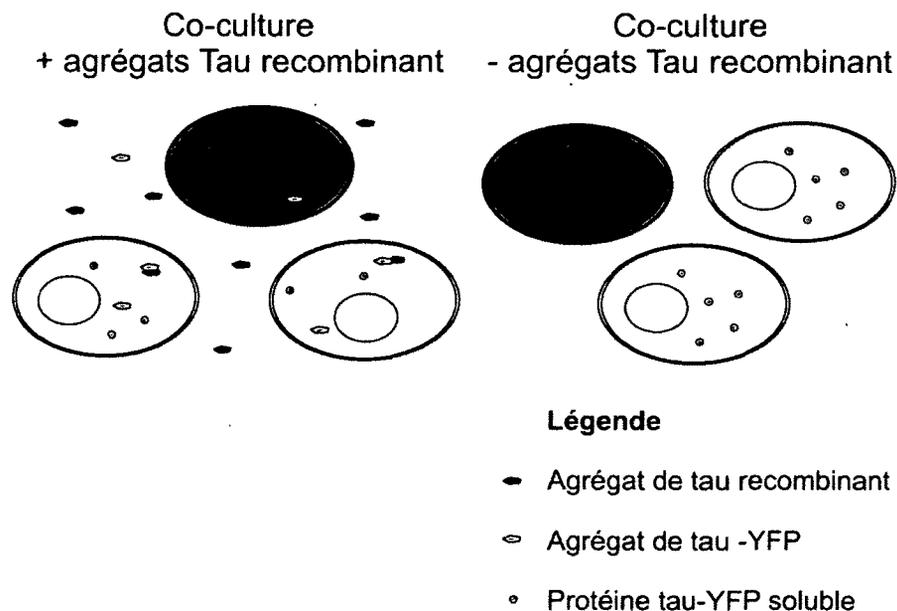


Figure 3 : Transmission de cellule en cellule des agrégats de tau-YFP

La présence d'agrégats de tau recombinant exogènes cause l'agrégation de tau-YFP cellulaire. Les agrégats de tau-YFP sont ensuite capables d'être transférés d'une cellule à un autre, comme le montre la cellule rouge (qui exprime mCherry) dans laquelle on retrouve un agrégat de tau-YFP. Basé sur les résultats de (FROST *et al.*, 2009).

Enfin, la transmission d'un organisme à un autre des pathologies associées aux prionoïdes n'a été montrée que pour un seul candidat, le peptide sérique amyloïde A. Cependant, la transmission ne s'est jusqu'à maintenant uniquement effectuée entre des guépards captifs, à travers la présence d'agrégats du peptide dans les fèces des animaux qui sont transmis à d'autres animaux par la voie orale (ZHANG *et al.*, 2008). Même si la transmission intercellulaire n'est pas nécessairement une caractéristique pour cet agrégat puisque le peptide est sécrété, l'ensemble des caractéristiques associées à ce peptide sont celles qui répondent le mieux aux critères établis pour un prionoïde. En effet, il se produit un recrutement du peptide natif par les agrégats, une transmission à travers les tissus de la rate et du foie (ZHANG *et al.*, 2008) et une transmission entre organismes des agrégats du peptide sérique amyloïde A (GUEST *et al.*, 2011).

Récemment, de nouvelles études ont permis d'inclure plusieurs autres protéines dans la catégorie des prionoïdes, basé sur leurs ressemblances avec les prions. Chacune des protéines mentionnées possède une ou plusieurs des propriétés des prions, sans que toutes les caractéristiques ne soient montrées expérimentalement pour un même candidat. Donc, aucune de ces protéines ne peut être considérée comme un prion, mais elles font toutes partie de la catégorie des prionoïdes. Plusieurs autres protéines associées à des pathologies sont à l'étude afin de démontrer leurs propriétés prionoïdes, s'il y a lieu. Ce domaine d'étude gagne en ampleur et cible maintenant des protéines impliquées dans des maladies non neurodégénératives comme le diabète de type 2 (ZRAIKA *et al.*, 2010) et le cancer (SILVA *et al.*, 2010). Éventuellement, un grand nombre de pathologies pourront peut-être s'expliquer de cette façon.

Protéine d'intérêt : p53

La protéine p53 est un facteur de transcription dont le rôle principal est d'empêcher le développement de cellules cancéreuses. En effet, p53 est une protéine suppresseuse de tumeurs qui active la transcription de protéines impliquées dans l'arrêt du cycle cellulaire, la réparation de l'ADN et l'apoptose. Cette protéine apparaît comme bon candidat prionoïde pour plusieurs raisons. En premier lieu, l'agrégation de la protéine p53 recombinante a été montrée *in vitro* par plusieurs équipes de recherche à l'aide de différentes conditions expérimentales, comme des traitements à une haute pression, la chaleur ou un pH acide (ISHIMARU *et al.*, 2003; LEE *et al.*, 2003; RIGACCI *et al.*, 2008). De plus, l'agrégation de p53 a aussi été observée *in vivo* dans des cellules tumorales (MOLL *et al.*, 1996; OSTERMEYER *et al.*, 1996). Enfin, la co-agrégation d'un mutant pathologique de p53 avec la forme sauvage de la protéine (p53 WT) a été confirmée dans des tissus cancéreux mammaires et colorectaux (ANO BOM *et al.*, 2012; XU *et al.*, 2011). Mises ensemble, ces observations suggèrent un rôle pour l'agrégation de p53 dans certains cancers. Tout comme la protéine prion, p53 serait donc une protéine aux propriétés agrégatives associée au développement d'une pathologie, le cancer.

Structure et fonction de la protéine p53

Structure de la protéine p53

La protéine p53, encodée par le gène TP53, est un facteur de transcription qui régule un grand nombre de gènes impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire et l'apoptose (BUTLER et LOH, 2003). La protéine est composée de trois domaines : un domaine de transactivation à l'extrémité amino-terminale, un domaine central de liaison à l'ADN et un domaine de tétramérisation à l'extrémité

carboxy-terminale, qui permet à la protéine d'atteindre sa forme active, le tétramère.

Le domaine N-terminal de p53, composé des acides aminés 1-93, peut être divisé en deux sous-domaines : un sous-domaine de transactivation (résidus 1-62) et une région riche en proline (résidus 63-93). Une particularité importante du sous-domaine de transactivation est son caractère non-structuré (BELL *et al.*, 2002). Cette portion de la protéine sert à la liaison de plusieurs différents régulateurs négatifs, co-activateurs transcriptionnels et la machinerie de transcription (NATAN *et al.*, 2011). La portion riche en proline, quant à elle, permet de former une région de liaison rigide entre le domaine N-terminal et le domaine central de la protéine et forme une structure en hélice polyproline II (NATAN *et al.*, 2011). C'est également cette région qui est responsable du poids apparent de 53 kDa de p53 sur gel de polyacrylamide dénaturant. En effet, le grand nombre de résidus proline dans cette région ralentit sa migration dans le gel même si théoriquement, la protéine a un poids moléculaire de 43,7 kDa (ZIEMER *et al.*, 1982). Le domaine N-terminal de p53 comporte aussi un site de liaison extrêmement important, celui de son régulateur négatif, la protéine mouse double-minute 2 (MDM2) (RIGACCI *et al.*, 2008). MDM2, une E3 ubiquitine-ligase, facilite l'ajout de l'ubiquitine à p53 de façon à promouvoir sa dégradation par le protéasome. Il est aussi intéressant de noter que MDM2 est le produit d'un gène inductible par p53 (SASAKI *et al.*, 2007).

Le domaine central de p53 (résidus 94-312) est responsable de la liaison de la protéine avec l'ADN. Ce domaine possède une très faible stabilité thermique et chimique (BELL *et al.*, 2002). Au niveau de sa structure, on note la formation d'un β -sandwich anti-parallèle et de deux boucles, L2 et L3, qui déterminent la stabilité globale de la protéine. Deux ions de Zn^{2+} , essentiels à la liaison de p53 avec l'ADN, sont coordonnés aux résidus Cys176, His179, Cys238 et Cys242 et permettent à la boucle L3 de se lier au sillon mineur de la double hélice d'ADN

(BUTLER et LOH, 2003; XU *et al.*, 2012). Chez les cellules cancéreuses, ce domaine est la cible de multiples mutations ponctuelles, qui déstabilisent davantage le domaine, soit en empêchant la liaison d'un des ions Zn^{2+} (BUTLER et LOH, 2003), en réduisant la thermostabilité de la protéine, qui adopte alors une forme majoritairement non structurée (BULLOCK *et al.*, 1997; BUTLER et LOH, 2003) ou encore en inhibant sa liaison à l'ADN s'il s'agit d'un acide aminé en contact direct avec l'ADN (BUTLER et LOH, 2005). Le domaine central de p53 est celui où se retrouvent plus de 95% des mutations répertoriées dans les cancers.

Le domaine C-terminal de p53, aussi nommé domaine de tétramérisation, comprend les acides aminés 313-393 de la protéine et lui permet d'adopter la bonne structure quaternaire pour pouvoir se lier à l'ADN. La structure de ce domaine a été bien caractérisée par résonance magnétique nucléaire et cristallographie par rayons X : un brin β (résidus 326-333) et une hélice α (résidus 335-355) sont séparés par un coude formé de la glycine en position 334 (KAMADA *et al.*, 2011). L'oligomérisation du domaine en un tétramère est effectuée d'abord par un rapprochement de deux brins β de manière anti-parallèle pour former un feuillet β , puis par dimérisation anti-parallèle des deux hélices α . Deux dimères forment ensuite un tétramère en plaçant leurs quatre hélices α au cœur de la molécule. Le tétramère est stabilisé par des interactions hydrophobes, des ponts hydrogène et un pont intermonomérique formé entre les résidus arginine en positions 337 et 352 (GALEA *et al.*, 2005; HIGASHIMOTO *et al.*, 2006). De multiples mutations dans ce domaine sont aussi retrouvées en lien avec le cancer, montrant le caractère essentiel de la formation du tétramère de p53 pour son activité en tant que facteur de transcription. En effet, la tétramérisation de la protéine p53 est essentielle pour une bonne liaison de la protéine à l'ADN (HIGASHIMOTO *et al.*, 2006).

Des séquences de localisation nucléaire, au nombre de trois, sont présentes dans la portion C-terminale de p53, ce qui permet à la protéine d'être importée au

noyau afin d'effectuer sa fonction. p53 comporte aussi deux séquences d'exclusion nucléaire, une en N-terminal et une en C-terminal. Cette dernière est masquée lors de l'oligomérisation de la protéine, ce qui prévient l'export nucléaire une fois sous forme de tétramère (LOHRUM *et al.*, 2001).

Les diverses fonctions de p53

Toute une gamme de fonctions ont été attribuées à la protéine p53, incluant des rôles dans la réparation des dommages à l'ADN, la modification de la chromatine, l'arrêt du cycle cellulaire, la sénescence et l'apoptose. Cependant, la protéine est majoritairement connue pour son rôle dans l'inhibition de la prolifération cellulaire et s'est même mérité le surnom de «gardien du génome». Pour inhiber le développement de cancers, p53 agit surtout en stoppant le cycle cellulaire afin de permettre la réparation adéquate de l'ADN ou en promouvant l'apoptose, empêchant ainsi la prolifération de cellules aberrantes (VOUSDEN et PRIVES, 2009). En effet, p53 peut activer la transcription de p21, une protéine inhibitrice des kinases cycline-dépendantes capable de stopper le cycle cellulaire en phase G1. L'arrêt du cycle cellulaire permet alors à la cellule de soit réparer l'ADN endommagé à l'aide des protéines XPC et GADD45, dont l'expression est aussi régulée par p53, ou de causer l'apoptose, une voie utilisée lorsque les dommages à l'ADN sont trop importants (WEINBERG, 2007). Les principaux signaux reconnus pour activer p53 sont les dommages à l'ADN, ce qui inclut l'activation de certains oncogènes, le raccourcissement des télomères et les effets des rayons ultraviolets ou des inhibiteurs de topoisomérase (BALINT et VOUSDEN, 2001; BORRAS *et al.*, 2011). Néanmoins, l'activation complète de la protéine nécessite d'autres facteurs, comme des modifications post-traductionnelles et l'inactivation de MDM2, une E3-ubiquitine ligase connue pour promouvoir la dégradation de p53.

Les modifications post-traductionnelles impliquées dans l'activation de p53 sont principalement effectuées au niveau de son domaine C-terminal et régulent la liaison de la protéine à l'ADN. Ces modifications peuvent être diverses (sumoylation, phosphorylation, déphosphorylation, acétylation, glycosylation et ribosylation) et diffèrent selon le stress auquel la cellule a été exposée (SMEENK et LOHRUM, 2010). Toutefois, la phosphorylation des sérines 15 et 20 de p53 est généralement considérée comme l'étape initiale pour la stabilisation de la protéine, puisque ces phosphorylations diminuent l'interaction de celle-ci avec son régulateur négatif, MDM2 (BORRAS *et al.*, 2011). Ensuite, la protéine activée peut jouer son rôle via l'activation ou la répression de la transcription de ses gènes cibles, impliqués dans le cycle cellulaire, l'apoptose, l'angiogénèse, la différenciation cellulaire et la réponse immunitaire (BORRAS *et al.*, 2011).

Même si la plupart des rôles de p53 s'effectuent par des mécanismes dépendants de l'activation ou la répression transcriptionnelle, la protéine possède aussi d'autres activités biologiques indépendantes de la transcription et plusieurs fonctions cytoplasmiques ont même été attribuées à p53 (GREEN et KROEMER, 2009). Entre autres, p53 peut déclencher l'apoptose même en l'absence de son domaine central de liaison à l'ADN; la protéine peut se localiser à la membrane externe mitochondriale afin de permettre le relâchement de facteurs pro-apoptotiques de l'espace intermembranaire mitochondrial par perméabilisation de la membrane externe. L'inhibition de l'autophagie par p53 cytoplasmique est également bien documentée (GREEN et KROEMER, 2009). Enfin, p53 peut aussi se situer au noyau et jouer un rôle direct dans la réparation de l'ADN en participant à sa réparation par excision de bases (BALINT et VOUSDEN, 2001).

Les mutations de p53 dans le cancer

Il est actuellement largement reconnu que plus de la moitié des cancers humains comportent une mutation dans le gène TP53 qui résulte en la perte de fonction de la protéine p53 (BULLOCK et FERSHT, 2001). Plus du trois quarts de ces mutations sont des mutations faux-sens, qui remplacent un seul acide aminé par un autre dans la protéine, et 95% de ces mutations se produisent dans le domaine de liaison à l'ADN de la protéine (BULLOCK et FERSHT, 2001; MENENDEZ *et al.*, 2009; VOUSDEN et LU, 2002).

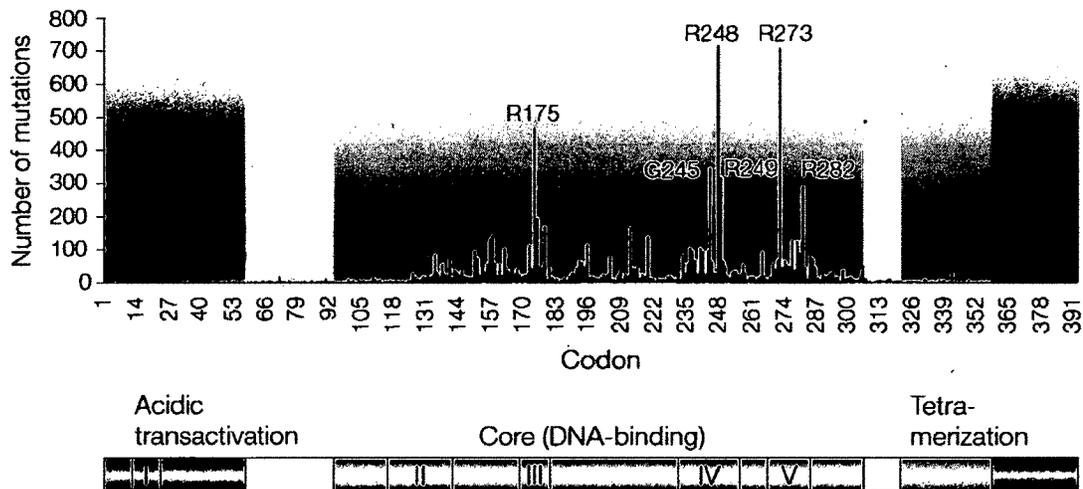


Figure 4 : Principales mutations oncogéniques de la protéine p53

La protéine p53 comporte un domaine de transactivation en N-terminal (résidus 1-93), un domaine central de liaison à l'ADN (résidus 94-312) et un domaine de tétramérisation en C-terminal (résidus 313-393). Plus de 95% des mutations ponctuelles retrouvées dans le cancer sont situées dans le domaine central, les 6 principales étant inscrites dans l'histogramme. Adaptée de (BULLOCK et FERSHT, 2001).

Deux classes prédominantes de mutations sont fréquemment retrouvées dans p53 dans les cancers humains : les mutations de contact et les mutations structurales. Les mutations de contact sont celles qui changent la nature d'un

acide aminé qui se trouve directement en contact avec l'ADN. La liaison de la protéine à l'ADN est donc compromise dans une telle situation et l'activité de la protéine peut être soit réduite ou complètement abolie. Les mutations les plus fréquentes de ce type affectent les résidus 248 et 273 de p53 (LIU *et al.*, 2010). Les mutations structurales, quant à elles, incluent toutes les mutations qui déstabilisent la conformation tridimensionnelle de p53. Elles peuvent soit perturber localement la structure de la protéine ou même, dans certains cas, causer une dénaturation complète (BULLOCK et FERSHT, 2001; LIU *et al.*, 2010). Dans tous les cas, ces mutations empêchent la protéine d'effectuer sa fonction première en tant que facteur de transcription, ce qui facilite l'apparition de cellules cancéreuses (MULLER *et al.*, 2011).

En présence d'une mutation, l'expression de la protéine p53 n'est généralement pas affectée dans les cellules cancéreuses; elle est même très souvent augmentée. De récentes études suggèrent que les mutations dans la protéine p53 pourraient non seulement abolir la fonction de p53^{WT}, mais aussi permettre un gain de fonction à la protéine mutante afin de promouvoir le cancer (LIU *et al.*, 2010). En effet, dans un contexte où seul p53 mutant est exprimé, des expériences ont montré de nouvelles fonctions associées à la protéine, entre autres au niveau de la prolifération, l'instabilité génomique et la résistance à l'apoptose (MULLER *et al.*, 2011). Certains auteurs vont jusqu'à proposer un tout nouveau transcriptome ciblé par la version mutante de la protéine (MENENDEZ *et al.*, 2009; MULLER *et al.*, 2011). De plus, p53 mutant est connu pour interférer avec la fonction d'autres protéines, comme p63 et p73, des membres de la même famille que p53 (LI et PRIVES, 2007), ou d'autres protéines impliquées dans la réparation de l'ADN ou le processus métastatique (MENENDEZ *et al.*, 2009; MULLER *et al.*, 2011). Le gain de fonction engendré par l'expression des mutants de la protéine p53 pourrait donc avoir des effets bénéfiques pour les cellules cancéreuses. De plus, la cellule cancéreuse n'a pas avantage à avoir deux copies mutantes de p53, puisque l'allèle muté de la protéine possède une activité dominant-négative. En effet, l'allèle codant pour la protéine mutée est connu pour

interférer et faire obstacle à la forme sauvage de la protéine à la manière d'un allèle dominant-négatif (WEINBERG, 2007). Donc, la présence d'un seul allèle mutant suffit à la cellule pour éliminer l'activité de la protéine p53WT. Ce phénomène est particulièrement bien illustré lors de la formation de tétramères de p53 dans une cellule comportant un allèle mutant pour p53. Considérant que la mutation n'empêche pas l'oligomérisation de la protéine, 15 des 16 possibilités de tétramères formés comportent au moins un monomère de la protéine mutée (Figure 5), entraînant une diminution ou abolition complète de la fonction de ces tétramères. Donc, même si 50% des protéines p53 dans la cellule sont intactes, seulement un tétramère sur 16 est entièrement actif. Une mutation dans un seul allèle de p53 est donc avantageuse pour la cellule cancéreuse, comparativement à une mutation qui entraînerait l'abolition complète d'une copie du gène (WEINBERG, 2007).

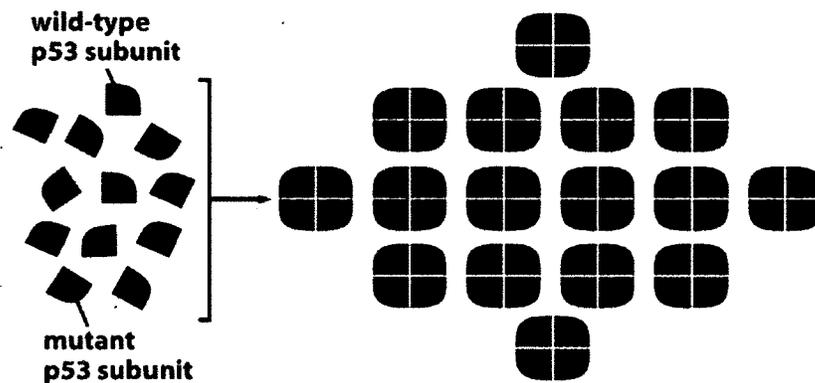


Figure 5 : L'aspect dominant-négatif d'un mutant de p53

Dans des cellules comportant un seul allèle mutant du gène TP53, les tétramères de la protéine p53 formés sont en grande majorité partiellement ou totalement inactifs. L'aspect dominant-négatif des mutants de p53 s'illustre par le changement de conformation de la protéine p53WT par la protéine mutée. Tous les tétramères qui comportent au moins une copie de la protéine mutante sont donc affectés. Tirée de (WEINBERG, 2007).

Néanmoins, 50% des cancers retiennent la protéine p53WT et plus particulièrement dans les cancers du sein, seulement 30% comportent une mutation dans p53. L'équipe de Moll, U.M. *et al.* a investigué le phénomène davantage et a déterminé que les cancers du sein utilisaient une toute autre méthode que les mutations pour inactiver la protéine p53. En effet, la fonction de régulation négative de la prolifération cellulaire normalement induite par p53 est inhibée dans les cellules de cancer du sein via un mécanisme d'exclusion nucléaire. Dans cette étude, les auteurs ont observé que dans 37% des tissus de cancer du sein étudiés, la protéine p53WT était accumulée au cytoplasme des cellules (MOLL *et al.*, 1992). Étant donné que la fonction principale d'arrêt de la prolifération de p53 s'effectue au noyau, l'exclusion de la protéine du noyau l'empêche d'effectuer sa fonction.

Le lien entre p53 et les prionoïdes

Évidences moléculaires de ressemblance entre la protéine p53 et PrP

Les protéines p53 et PrP sont toutes deux impliquées dans des maladies où le repliement protéique peut faire ou est déjà connu pour faire partie du mécanisme de pathogénèse. Outre ce fait, plusieurs autres caractéristiques permettent d'associer l'implication de PrP dans les maladies à prion au rôle de p53 dans le développement du cancer. Des liens entre p53 et PrP peuvent être établis tant au niveau fonctionnel que structural.

D'abord, p53 est une protéine dont l'agrégation peut être induite en présence de différentes conditions expérimentales, tout comme PrP. En effet, plusieurs équipes de recherche ont indépendamment démontré la capacité d'agrégation de la protéine p53. Dans la plupart des cas, seul un domaine de p53 était utilisé pour former des agrégats *in vitro*. En 2003, l'équipe d'Ishimaru *et al.* a produit

plusieurs types d'agrégats à partir du domaine central de p53 en utilisant diverses techniques d'agrégation. Des agrégats en forme de granules ont été formés par la chaleur et la formation d'agrégats annulaires ou en forme de fibres a été induite par une forte pression. Les agrégats en forme de fibre liaient fortement la Thioflavine T, un marqueur de fibres amyloïdes. Dans une étude plus récente, la même équipe de recherche caractérise plus en détail les fibres formées à partir du domaine central de p53 avec la mutation R248Q. En conditions physiologiques, c'est-à-dire lors de l'incubation de la protéine à 37 °C pendant 2 h, la protéine forme des agrégats capables de lier fortement la Thioflavine T (ANO BOM *et al.*, 2012). Lorsqu'observés au microscope électronique, les agrégats formés sont hétérogènes : ils sont composés de fibres, d'oligomères et d'agrégats amorphes. Cependant, la biréfringence de ces agrégats observée suite à la liaison du colorant Congo Red confirme leur caractère amyloïde. En ce sens, les agrégats de p53 ainsi formés démontrent des similarités avec ceux de PrP ou d'autres protéines reliées à des maladies amyloïdogéniques, de par leur morphologie et liaison à des colorants spécifiques aux fibres amyloïdes (ANO BOM *et al.*, 2012; ISHIMARU *et al.*, 2003). Puisque le domaine central de liaison à l'ADN de p53 est celui où se trouvent 95% des mutations retrouvées dans les cancers, c'est également le domaine le plus étudié de la protéine. Néanmoins, les autres domaines de la protéine sont aussi très importants pour sa fonction, et des groupes de recherche se sont tout de même penchés sur leur capacité d'agrégation. Des agrégats de type «ruban moléculaire» de p53 ont été formés à partir du domaine C-terminal en conditions acides et en présence d'une haute température (LEE *et al.*, 2003). Enfin, des agrégats en forme de fibres du domaine N-terminal de la protéine ont été créés en incubant la protéine recombinante dans un tampon acide (RIGACCI *et al.*, 2008). Peu d'études ont été effectuées au sujet d'agrégats de la protéine entière, bien que la moitié des cancers comportent la protéine p53WT et pleine longueur (p53FL).

Comme discuté précédemment, les cellules cancéreuses comportent souvent des mutations dans la protéine p53. Celles-ci peuvent soit causer la perte de fonction directe du facteur de transcription par incapacité de lier l'ADN, ou causer un changement dans la structure protéique, ce qui mène également à la perte de fonction de p53. De façon similaire, les mutations de PrP^c retrouvées dans les formes génétiques des maladies à prion sont aussi soupçonnées pour affecter la structure de la protéine. Ce phénomène n'a pas été prouvé, mais des chercheurs pensent que ces mutations facilitent le mauvais repliement de PrP^c en PrP^{sc} (ABID et SOTO, 2006; AGUZZI *et al.*, 2008; MORENO-GONZALEZ et SOTO, 2011). Des mutations dans la protéine permettent donc autant à p53 que PrP de prédisposer un individu à une pathologie associée au mauvais repliement protéique.

Au niveau structural, PrP et p53 comportent également des similarités. Par exemple, les deux protéines contiennent un domaine N-terminal partiellement non-structuré (BELL *et al.*, 2002; DONNE *et al.*, 1997). Dans le cas de p53, des études suggèrent que sa portion N-terminale non structurée permet à la protéine de lier différents partenaires d'interaction. Cette polyvalence de liaison contribuerait donc à expliquer les rôles de p53 dans la régulation d'autant de processus cellulaires (GALEA *et al.*, 2008). En comparaison avec les autres facteurs de transcription, p53 ne fait pas exception : la présence d'un domaine protéique flexible est un phénomène courant chez les activateurs ou inhibiteurs de la transcription (LODISH *et al.*, 2005; KHAN et KUMAR, 2009). Une telle flexibilité structurale permet en effet aux facteurs de transcription de lier de multiples différentes protéines ayant pour but la régulation de l'expression génique. Grâce à celle-ci, la cellule peut produire une quantité minimale de facteurs de transcription différents, ceux-ci étant capables de créer une variété étonnante de combinaisons par leur liaison à un très grand nombre de partenaires (KHAN et KUMAR, 2009).

De façon intéressante, la portion N-terminale non-structurée de PrP est aussi associée à une foule de fonctions cellulaires comme l'endocytose de PrP, la neuroprotection, la localisation nucléaire et la conversion de PrP^c en PrP^{sc} (BELAND et ROUCOU, 2012). La protéine PrP possède aussi une région composée de séquences de huit acides aminés répétés plusieurs fois, nommée *octapeptide repeat* dans son domaine N-terminal non structuré. Ces séquences servent, entre autres, à lier des ions divalents de cuivre (Cu²⁺), de zinc ou de nickel. Lorsque cette région de la protéine lie des Cu²⁺, elle devient partiellement repliée, c'est-à-dire que la liaison des ions cause l'apparition d'une structure dans la protéine (BREYDO et UVERSKY, 2011). Il a aussi été montré que la liaison de Cu²⁺ par PrP promouvoit l'agrégation de la protéine en oligomères et agrégats amorphes (BOCHAROVA *et al.*, 2005). À la lumière de ces résultats, il est clair que la région non structurée de PrP peut jouer un rôle au niveau de son agrégation et il serait donc important de vérifier si c'est également le cas pour le domaine N-terminal non structuré de p53. Enfin, l'absence de structure d'une région protéique est aussi une caractéristique de plusieurs protéines impliquées dans des maladies, dont plusieurs prionoïdes, tels qu'Aβ, tau, α-synucléine et Huntingtin (BREYDO et UVERSKY, 2011).

Gain et perte de fonction reliés à l'agrégation

La transformation de PrP^c en PrP^{sc} résulte non seulement en la perte de fonction de la protéine native, mais aussi en un gain de fonction de la forme agrégée. L'hypothèse la plus généralement acceptée propose que PrP^{sc} acquière des propriétés toxiques une fois agrégée. En fait, les agrégats de PrP^{sc} sont responsables de plusieurs événements toxiques pour la cellule, comme l'inhibition du transport axonal et le déclenchement des voies de l'apoptose (WESTERGARD *et al.*, 2007). Actuellement, plusieurs équipes de recherche suggèrent que la présence d'une mutation dans la protéine p53 peut aussi induire un gain de fonction.

Des études précédentes ont suggéré un gain de fonction des mutants de p53 via des interactions protéine-protéine entre p53 muté et d'autres protéines cellulaires qui résultent en la perte de fonction de ces protéines (LIU *et al.*, 2010). Par exemple, il a déjà été démontré que certains mutants de p53 peuvent interagir avec la protéine p73 et l'empêcher d'effectuer sa fonction (LI et PRIVES, 2007). Plus récemment, l'équipe de Liu, D.P. *et al.* ont proposé que les mutants de p53 peuvent induire de l'instabilité génétique dans la cellule. Par l'étude des voies de signalisation induites par des mutants de p53, l'équipe de recherche a démontré que la kinase *ataxia telangiectasia mutated* (ATM) était inactivée par les mutants de contact p53 R248Q et R273H ainsi que le mutant structural p53 R175H (LIU *et al.*, 2010). Étant donné que cette kinase régule les réponses cellulaires aux bris d'ADN double-brin lors de son recrutement par le complexe MRN (complexe composé des protéines Mre11, Rad50 et Nbs1), son inactivation introduit une instabilité génétique dans la cellule. L'instabilité génétique permettrait donc à une cellule cancéreuse d'acquérir des mutations pouvant favoriser sa prolifération. Cependant, le mécanisme précis qui entraîne ce gain de fonction n'était pas connu, jusqu'à la publication en 2011 des résultats de Xu, J. *et al.* Cette dernière équipe propose que le gain de fonction des mutants structuraux de p53 provienne de leur capacité d'agrégation. Comme mentionné précédemment, certains mutants de p53 peuvent interagir avec p73 et inhiber sa fonction. L'équipe de recherche démontre que les mutants structuraux de p53 peuvent non seulement agréger dans la cellule, mais aussi co-agrégation avec les protéines p63 et p73, des protéines de la même famille que p53. Cette co-agrégation serait donc un moyen par lequel les mutants de p53 séquestrent les protéines p63 et p73 et, par le fait même, inhibent leur fonction. Puisque l'interaction entre des mutants de p53 et des membres du complexe MRN a déjà été montrée (LIU *et al.*, 2010), il est aussi possible que l'agrégation des formes mutantes de p53 soit responsable d'empêcher le recrutement d'ATM par le complexe MRN et donc de l'instabilité génétique induite en absence d'une protéine ATM fonctionnelle.

Enfin, l'agrégation des mutants de p53 serait aussi responsable de la perte de fonction de p53WT par sa séquestration dans des agrégats (LIU *et al.*, 2010; XU *et al.*, 2011). Les agrégats formés de ces deux protéines serviraient de puits où des monomères de p53 seraient constamment recrutés et séquestrés. La cellule ainsi affectée perd non seulement l'activité de la protéine p53WT, mais accumule celle-ci, ainsi que la forme mutante de la protéine, sous forme d'agrégats intracellulaires. Des évidences récentes appuyant ce modèle montrent que l'agrégation de p53WT peut être accélérée *in vitro* en présence d'agrégats de p53 R248Q (ANO BOM *et al.*, 2012). Ces observations expliquent au moins partiellement le rôle à jouer des agrégats de p53 dans des cellules cancéreuses.

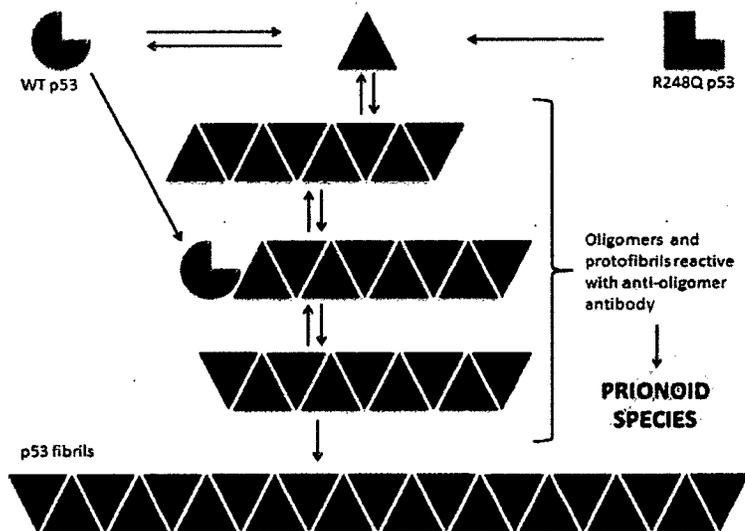


Figure 6 : Un modèle de recrutement de p53WT par p53 mutant

La co-agrégation de p53 mutant avec p53WT amène un changement de conformation de p53WT et peut entraîner la formation d'agrégats de la protéine. Le recrutement de la protéine p53WT par une version mutante de la même protéine est une caractéristique associée aux prions. Tirée de (ANO BOM *et al.*, 2012).

Problématique et hypothèses de recherche

Problématique

Actuellement, les prions sont les seules espèces protéiques connues dont il a été démontré l'infectiosité chez les mammifères. Leur implication dans les maladies à prion démontre effectivement que la présence de PrP est nécessaire et suffisante au développement de ces pathologies. Le fait que des agrégats protéiques puissent se transmettre d'un individu à un autre pour propager une maladie amène une toute autre dimension à la définition d'un agent infectieux. En effet, la définition classique d'une maladie infectieuse comprend généralement un agent infectieux comportant des acides nucléiques, comme une bactérie ou un virus, alors que la théorie supporte maintenant un agent infectieux uniquement composé de protéines et dépourvu d'acides nucléiques dans le cas des maladies à prion. Afin de déterminer si ce phénomène est propre aux prions, plusieurs équipes de recherche tentent présentement d'élucider le mécanisme d'action d'agrégats protéiques impliqués dans un grand nombre d'autres pathologies neurodégénératives comme les maladies d'Alzheimer, de Parkinson ou de Huntington. Jusqu'à maintenant, les prionoïdes ne démontrent pas la caractéristique clé des prions, la transmission d'un organisme à l'autre de façon à propager la maladie. En effet, il semble que la protéine prion soit beaucoup plus efficace à ce sujet que tout autre agrégat protéique connu, de là l'apparition d'épidémies comme le Kuru ou le vCJD. C'est le critère qui différencie les prions des prionoïdes.

De nombreuses autres protéines à tendance agrégative, mais impliquées dans des pathologies non neurodégénératives, sont aussi considérées comme des prionoïdes possibles. Ces protéines ont toutes en commun la capacité d'agréger spontanément et de causer une pathologie qui affecte les humains. Le cancer est une de ces pathologies, en plus d'être une cause majeure de décès humain dans le monde. La protéine p53, dont le rôle général est d'empêcher l'apparition de

cancers, est un candidat prionoïde intéressant. En effet, le mécanisme d'agrégation et d'accumulation de p53 dans des cellules cancéreuses reste à ce jour mal expliqué. L'effet de tels agrégats sur la protéine p53 endogène à ces cellules et leur rôle exact dans la pathologie du cancer sont aussi inconnus. De plus, très peu d'études ont été menées au sujet de la capacité d'agrégation de la protéine p53FL, malgré le fait que la séquence primaire de celle-ci reste intouchée par des mutations dans la moitié des cancers. Enfin, aucune étude jusqu'à présent n'a démontré l'entrée des agrégats de p53 dans des cellules ni leur transmission d'une cellule à une autre.

Objectifs

Les principaux arguments qui soutiennent mon projet de recherche sont les suivants : d'abord, le manque d'information au sujet des agrégats de p53WT guide mon projet vers l'agrégation et la caractérisation d'agrégats de p53FL, c'est-à-dire la séquence 1-393 en acides aminés de la protéine. Ensuite, à l'exception d'essais de cytotoxicité, l'effet des agrégats de p53 sur des cellules en culture n'a pas été détaillé. Aussi, dans le but de montrer des caractéristiques prionoïdes de la protéine, mon projet a pour objectif d'investiguer la possibilité que des agrégats exogènes de p53 puissent induire l'agrégation de la protéine p53 cellulaire endogène. Pour ce faire, l'internalisation des agrégats de p53 par des cellules en culture devra être démontrée.

AVANT-PROPOS

p53 aggregates penetrate cells and induce the co-aggregation of cellular p53

Karolyn J. Forget, Guillaume Tremblay, Xavier Roucou

Statut de l'article : soumis au journal PLoS One

De la part de PLOS ONE

Envoyé : 9 avril 2013 08:37

À : Roucou, Xavier

Objet : Submission Confirmation for p53 aggregates penetrate cells and induce the co-aggregation of intracellular p53

Dear Dr. Roucou,

Your submission entitled "p53 aggregates penetrate cells and induce the co-aggregation of intracellular p53" has been received by PLOS ONE. You will be able to check on the progress of your paper by logging on to Editorial Manager as an author. The URL is <http://pone.edmgr.com/>.

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

PLOS ONE

Contribution de l'étudiante : Ma contribution à cet article inclut la réalisation de toutes les expériences relatives aux figures, sauf pour la figure 9a. J'ai aussi monté les figures et participé à la rédaction des sections Introduction, Matériel et Méthodes, Résultats et Discussion de l'article.

**AUTORISATION D'INTÉGRATION
D'UN ARTICLE ÉCRIT EN COLLABORATION
À UN MÉMOIRE OU UNE THÈSE**

Je (ou nous), soussigné(e)s, soussigné(s), co-auteur(s), co-auteur(s) de l'article intitulé :

p53 aggregates penetrate cells and induce the co-aggregation
of cellular p53

reconnais (reconnaissons) que ledit article sera inclus comme partie constituante du mémoire de la thèse

de l'étudiant(e) (nom) : Karolyn Forget

inscrit(e) au programme de Biochimie

de la Faculté de Médecine et Sciences de la Santé de l'Université de Sherbrooke

En foi de quoi, j'ai (nous avons) signé cet engagement en un nombre suffisant d'exemplaires*

Signature _____ Date : 18 déc 2012

Nom Karolyn Forget

Coordonnées _____

Signature _____ Date : 18-12-12

Nom Guillaume Tremblay

Coordonnées _____

Signature _____ Date : 18-12-12

Nom Xavier Roucou

Coordonnées _____

Signature _____ Date : _____

Nom _____

Coordonnées _____

- * Un exemplaire pour l'étudiante, l'étudiant, un exemplaire pour chaque personne signataire et un exemplaire pour le Service des bibliothèques (à remettre avec le mémoire ou la thèse au moment du dépôt final).

RÉSUMÉ DE L'ARTICLE

Les maladies à prion sont un cas unique de pathologie où l'agent infectieux, le prion, est une protéine. La protéine prion possède plusieurs caractéristiques qui la rendent particulière vis-à-vis d'autres protéines cellulaires, telles que sa capacité à agréger et à transmettre sa conformation agrégée à la protéine soluble. Les agrégats de la protéine prion sont aussi capables de se transmettre d'une cellule à l'autre ainsi que d'un organisme à un autre. De plus en plus, on associe l'agrégation de protéines à différentes maladies humaines, comme les maladies d'Alzheimer, de Parkinson et le diabète de type 2. Certaines protéines impliquées dans ces pathologies font partie des prionoïdes, une catégorie réservée aux protéines qui démontrent plusieurs des caractéristiques associées aux prions. Récemment, la protéine p53, facteur de transcription fortement impliqué dans le cancer, a été montrée comme étant capable d'agréger *in vitro*. Une accumulation de la protéine a également été observée dans des cellules tumorales, laissant croire que l'agrégation de p53 se produit également *in vivo*, et pourrait avoir un rôle dans le développement du cancer. L'objectif de cette étude est de montrer que la protéine p53 possède des caractéristiques de prions. Les résultats obtenus montrent une agrégation *in vitro* de p53WT pleine longueur ainsi que de sa forme tronquée, p53C. De plus, des cellules en culture sont capables d'internaliser ces agrégats, qui co-agrègent ensuite avec la protéine p53 endogène de ces cellules. Enfin, nos résultats montrent clairement que l'internalisation des agrégats par les cellules se fait par la macropinocytose. Nous avons donc réussi à prouver que la protéine p53 agit comme un prion puisqu'elle s'agrège spontanément, ses agrégats sont internalisés par des cellules en culture et sont capables de co-agréger avec la protéine soluble.

ARTICLE

p53 aggregates penetrate cells and induce the co-aggregation of cellular p53

Karolyn J. Forget¹, Guillaume Tremblay¹, and Xavier Roucou¹

¹Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Université de Sherbrooke,
Sherbrooke, Quebec, J1E 4K8, Canada

Corresponding address: Dr Xavier Roucou, Département de biochimie (Z8-2001),
Faculté de Médecine, Université de Sherbrooke, 3201 Jean Mignault,
Sherbrooke, Québec J1E 4K8, Canada, Tel. (819) 821-8000x72240; Fax. (819)
820-6831; E-Mail: xavier.roucou@usherbrooke.ca

Short title: p53 prion-like aggregates

ABSTRACT

Prion diseases are unique pathologies in which the infectious particles are prions, a protein aggregate. The prion protein has many particular features, such as spontaneous aggregation, conformation transmission to other native PrP proteins and transmission from an individual to another. Protein aggregation is now frequently associated to many human diseases, for example Alzheimer's disease, Parkinson's disease or type 2 diabetes. A few proteins associated to these conformational diseases are part of a new category of proteins, called prionoids: proteins that share some, but not all, of the characteristics associated with prions. The p53 protein, a transcription factor that plays a major role in cancer, has recently been suggested to be a possible prionoid. The protein has been shown to accumulate in multiple cancer cell types, and its aggregation has also been reproduced *in vitro* by many independent groups. These observations suggest a role for p53 aggregates in cancer development. This study aims to test the «prion-like» features of p53. Our results show *in vitro* aggregation of the full length and N-terminally truncated protein (p53C), and penetration of these aggregates into cells. According to our findings, the aggregates enter cells using macropinocytosis, a non-specific method of entry. Lastly, we also show that once internalized by the cell, p53C aggregates can co-aggregate with endogenous p53 protein. Together, these findings suggest prion-like characteristics for p53 protein, based on the fact that p53 can spontaneously aggregate, these aggregates can penetrate cells and co-aggregate with cellular p53.

INTRODUCTION

Many human neurodegenerative and non-neurodegenerative pathologies are related to protein aggregation: these disorders belong to a large family of protein 'conformational diseases', which includes, most notably, Alzheimer's disease and prion diseases but also Parkinson's disease, Amyotrophic lateral sclerosis, chronic pancreatitis, and amyloid A amyloidosis. In these diseases, insoluble protein aggregates accumulate inside or outside the cells. The propagation of protein aggregates has been well studied; particularly in prion diseases where it has been shown that, *in vitro* and *in vivo*, exogenous prion protein (PrP) aggregates can induce misfolding of soluble cellular PrP^C into aggregates, termed PrP^{Sc} [1-3]. Since then, many groups have shown the same phenomena with Amyloid- β (A β) in Alzheimer's disease, Tau and α -synuclein in Parkinson's disease, SOD1 and TDP-43 in amyotrophic lateral sclerosis and Huntingtin in Huntington's disease [1,4]. Oftentimes, the terms prion-like or prionoid are used to describe proteins that show similar characteristics to prions, such as molecular recruitment and misfolding induction, and intercellular transmission.

A fairly recent candidate for prion-like characteristics is p53 protein, a transcription factor whose function is lost in more than 50% of cancers [5,6]. Many reasons led to the consideration of p53 as a potential prion-like protein. First, it is widely known that p53 has limited structural stability, due in part to the unstructured nature of its N-terminal domain [7]. In fact, different groups have shown that the p53 transactivation (amino acids 1-92), central or core (amino acids 93-312) and tetramerization (amino acids 313-393) domains can all misfold and form fibrillar aggregates *in vitro* in mild denaturing conditions [8-10]. Also noteworthy is the low thermodynamic stability of the core domain, a domain targeted by more than 90% of point mutations that inactivate p53 in cancer [11,12]. Secondly, p53 accumulation in the form of aggregates has been observed in the perinuclear region of several tumor cell lines expressing endogenous p53 mutants, including MOG-G-CCM astrocytoma, HT-1376 bladder carcinoma, Detroit 562 pharynx carcinoma and 1301 T-cell leukemia [13]. Some

human neuroblastoma tumors overexpressing wild type p53 also display large p53 positive cytoplasmic protein aggregates [14,15]. Recently, studies have confirmed the co-aggregation of wild-type and mutant p53 in breast cancer and colorectal cancer tissues [13,16]. Finally, dominant-negative activity of p53 missense mutants results from mutant-induced co-aggregation of wild-type p53 in cells co-transfected with mutant and wild-type p53 [13].

Together, these observations suggest an implication for misfolded and aggregated p53 in some cancers and support the hypothesis that p53 aggregates could display prion-like activity. Transmission of the misfolded conformation is a critical feature in the propagation of prion-like proteins [3,17]. Yet, whether p53 aggregates can penetrate the cells plasma membrane and interact with intracellular soluble wild-type p53 to propagate their misfolded conformation is unknown.

Here we report that recombinant exogenous wild-type p53 aggregates generated *in vitro* can penetrate cells by macropinocytosis and induce aggregation of endogenous wild-type p53. This result reveals a key feature of p53 aggregates and supports their prion-like character.

MATERIAL AND METHODS

Cloning of p53^{GFP}, p53 and p53C (core domain, amino acids 93-393)

Human p53 was amplified by PCR using Addgene plasmid 11770 [18] as a template and forward 5'-gggccatatggaggagccgcagtcagatccta-3' and reverse 5'-gtggatcctcagtctgagtcaggcccttctgtct-3' primers. p53C was amplified by PCR using forward 5'-gggccatatgcatcttctgtccctccagaaaacc-3' and reverse 5'-gtggatcctcagtctgagtcaggcccttctgtct-3' primers. The PCR products were introduced in the NdeI and BamHI restriction sites of pet28a. Primers were purchased from IDT. All constructs were sequenced in both orientations.

Purification, aggregation and labeling of p53 and p53C

The plasmid pet28a containing the cDNA of human N-terminally His-tagged p53 or p53C was transformed into *Escherichia coli* strain BL21 λ DE3. The resulting bacteria were grown at 37 °C to an OD₆₀₀= 0,6 before overnight induction at 22°C with 0,5 mM isopropyl β -D-thiogalactosidase (IPTG). After induction, cells were harvested by centrifugation, incubated 30 min on ice in lysis buffer (50 mM NaH₂PO₄, 1 M NaCl, 40 mM imidazole) and 1 mg/mL lysozyme then sonicated 3 times at 30% amplitude for 30 s (Fisher Scientific). The lysate was centrifuged at 10,000 g 30 minutes and supernatant was incubated 1 h at 4 °C with HisPur Ni-NTA resin (Thermo Scientific). Purification was performed using disposable chromatography columns (Bio Rad): the resin was washed four times using lysis buffer containing 100 mM imidazole. Eight elution fractions were collected using 250 μ L of lysis buffer containing 150 or 200 mM imidazole. The imidazole was then removed from the purified protein using 30 K (p53) or 10 K (p53C) Amicon Ultra centrifugal filters (Millipore) and completing the volume to 15 mL with 50 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl and 5% glycerol. Centrifugation was performed at 3,700 g for 30 minutes. Protein concentration was measured using extinction coefficients of ϵ_{280} =36035 cm⁻¹M⁻¹ (p53) or 18910 cm⁻¹M⁻¹ (p53C) determined with ProtParam [19]. Protein aggregation was induced by incubation at 42 °C for 24 h [20,21]. Labeling of p53 and p53C with DyLight 650 (Thermo Scientific) was carried out following the manufacturer's instructions.

Western blot

Following purification, 4 ng of recombinant p53 or p53C was denatured at 95 °C in SDS-PAGE sample buffer [0.5% SDS (w/v), 1,25% 2-mercaptoethanol (v/v), 4% glycerol (v/v), 0,01% bromophenol blue (w/v), 15 mM Tris-HCl, pH 6,8]. Proteins were either stained using Coomassie Blue or detected by western blot using anti-p53 1C12 (1:1000) (Cell Signaling) or anti-pentaHis (1:1000) (Qiagen) antibodies. For trypsin assays, 100 µL of DyLight 650-labeled p53 at 5 µM was incubated in 500 µL of either pre-warmed 0,25% trypsin/EDTA or phosphate-buffered saline (PBS) at 37 °C during 5 minutes. Digestion was stopped by placing the tubes on ice. 100 µL of diluted protein was precipitated using chloroform/methanol [22] and denatured at 95 °C in SDS-PAGE sample buffer.

In vitro characterization of p53 aggregates

Binding of 8-anilino-1-naphthalenesulfonate (ANS) to p53 aggregates in PBS 20 mM was evaluated by measuring the fluorescence enhancement of 8-anilino-1-naphthalenesulfonate (10 µM) in the presence of 5 µM protein preparation upon excitation at a wavelength of 380 nm. The emission spectra were integrated from 400 to 600 nm.

Electron microscopy analyses were carried out as previously described [23].

Cell culture

Human adenocarcinoma HeLa cells and mouse fibroblast NIH3T3 cells (ATCC) were cultured in DMEM medium supplemented with 10% fetal calf serum, penicillin/streptomycin 1X, sodium pyruvate 1 mM and amphotericin β 2,5 µg/mL in 5% CO₂ humidified atmosphere at 37 °C. All reagents for cell culture were purchased from Wisent.

Uptake of extracellular p53 aggregates and confocal microscopy

HeLa and NIH3T3 cells were plated on microscope coverslips in 24-well plates in 500µL medium. After 24 h, the cells were exposed to 1 µM of DyLight 650-

labeled p53 aggregates with or without 50 µg/mL Dextran-488 (10 000 kDa, Invitrogen) overnight and then washed and incubated with 0,25% Trypsin/EDTA during 90 s to remove the excess of aggregates. Cells were fixed using 4% paraformaldehyde in PBS for 20 minutes at room temperature, washed once in PBS and permeabilized in PBS containing 0,15% Triton X-100 for 5 min. Cells were blocked in PBS containing 10% Normal Goat Serum (Wisent) for 20 min and then incubated 20 min with Phalloidin-Alexa 568 (Invitrogen). Cells were incubated for 5 minutes at room temperature with Hoechst (Sigma-Aldrich), then washed three times in PBS and mounted with SlowFade Gold (Invitrogen) onto microscope slides. Confocal analyses were carried out as previously described [24]. For time-dependent analysis of aggregate entry, HeLa cells were seeded in 6-well plates and DyLight 650-labeled p53 aggregates were added for 15 h, 6 h, 3 h, or 1 h before trypsinization. 50 000 cells were analyzed by flow cytometry (FACS Aria, BD Biosciences) for each time point.

De novo- and co-aggregation of cellular p53 with recombinant p53 aggregates

NIH3T3 cells were plated on glass coverslips in 24-well plates in 500 µL medium. Transfection of p53^{GFP} construct or pEGFPN1 empty vector (Clontech) was performed using GeneCellin (BioCellChallenge) following the product manual. After 24 h, the cells were exposed to 1 µM recombinant p53 aggregates for 24 h and then fixed using 4% paraformaldehyde in PBS for 20 minutes at room temperature. Cells were washed once in PBS, incubated for 5 minutes at room temperature with Hoechst, then washed three times in PBS and mounted with Slowfade Gold onto microscope slides.

For co-aggregation experiments, HeLa cells were plated in 24-well plates in 500 µL medium. Cells were exposed to 1 µM of DyLight 650-labeled recombinant p53 aggregates for 24 h, treated with 0,25% trypsin/EDTA and re-plated onto glass coverslips. Cells were left to recover overnight then treated with 100 µM etoposide (Sigma-Aldrich) for 2 h. Cells were fixed using 4% paraformaldehyde, permeabilized for 5 min in 0,15% Triton X-100 (Bioshop) then stained with Sudan

Black B (Sigma-Aldrich) as previously described [25]. Briefly, cells were incubated in 0,1% Sudan Black B in 70% ethanol for 20 minutes in a humid chamber. Next, cells were washed 3 times in PBS-tween 0,02% and a final wash was performed using PBS. Cells were incubated for 5 minutes at room temperature with Hoechst in PBS, then washed three times in PBS and mounted with Slowfade Gold onto microscope slides.

Perturbation of endocytosis

All inhibitors were purchased from Sigma-Aldrich. HeLa cells seeded 100 000 cells/well in 6-well plates were incubated in 50 μ M genistein, 5 μ M chlorpromazine hydrochloride, 100 μ M 5-*N*-ethyl-*N*-isopropyl-amiloride (EIPA), 25 μ g/mL cytochalasin D, 5 mM methyl- β -cyclodextrin (M β CD) or vehicle in combination with 1 μ M DyLight 650-labeled p53 aggregates and left for 3 h. Cells were trypsinized and analysed by flow cytometry. The effect of the dominant-negative (DN) mutant was determined by transfection of HeLa cells with dynamin K44A DN 24 h prior to exposure to DyLight 650-labeled p53 aggregates. 50 000 events were recorded per experiment and only single cell events were analysed.

RESULTS

WT p53 aggregates *in vitro*

Wild-type human p53 protein was expressed in bacteria, purified (Fig. 7a) and aggregation was induced at 42 °C. The aggregates formed were characterized by their ability to bind 8-anilinonaphtalene-1-sulphonate, a fluorescent molecular probe used to determine conformational changes by binding to exposed hydrophobic regions of a protein [26]. An increase in fluorescence intensity, as seen in figure 7b, indicates binding of the dye to hydrophobic regions of the aggregates. Observation of the aggregates by electronic microscopy revealed their amorphous nature (fig. 7c), as opposed to amyloid or fibrillar species seen for A β or α -synuclein [27,28]. Atomic force microscopy revealed the presence of bigger aggregates for p53 protein incubated at 42 °C compared to recombinant p53 protein left at 4 °C. Appearance of the aggregates using this technique was more granular, similar to aggregates of the p53 core domain seen previously [9].

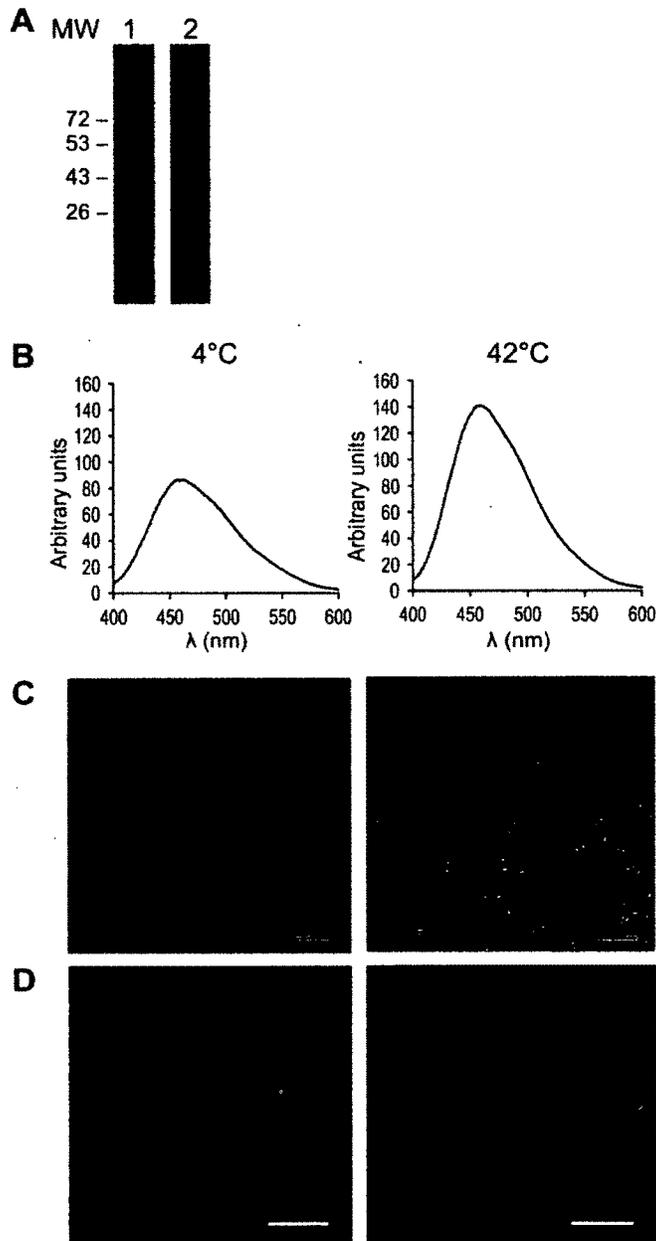


Figure 7 : p53 forms amorphous aggregates at 42 °C.

(A) Purified p53 protein were resolved by 10% SDS-PAGE and stained with Coomassie Blue (lane 1) or analyzed by Western Blot (lane 2). (B) 5 μ M p53 protein was left at 4 °C (soluble) or heated at 42 °C (aggregates) for 24 h and analyzed by ANS fluorescence (C) Transmission electron microscopy showing mostly soluble or aggregated p53. (D) Atomic force microscopy showing mostly soluble or aggregated p53. Scale bars: 500 nm (C) and 1 μ m (D).

p53 aggregates enter HeLa and NIH3T3 cells

Similar to other protein aggregates [29-32] we investigated the possibility that p53 aggregates could also enter cells. HeLa cells incubated with DyLight 650-labeled p53 aggregates for different periods of time were treated with 0,25% trypsin/EDTA and sorted by FACS. Because p53 aggregates were discovered to be completely digested by 0,25% trypsin/EDTA within 5 minutes (Fig. 8a), treatment with trypsin was used to remove extracellular aggregates, leaving intact only aggregates that have been internalized. As shown in figure 8b, p53 aggregates enter HeLa cells in a time-dependent manner, with the majority of cells having internalized fluorescent aggregates after 15 h. Aggregate internalization was also visualized by confocal microscopy in two different cell lines using the same conditions (Fig. 8c). HeLa and NIH3T3 cells were incubated with DyLight 650-labeled p53 aggregates for 24 h, treated with 0,25% Trypsin/EDTA and re-plated onto microscope slides in fresh medium overnight. Staining of actin with phalloidin was also used to visualize the cell contour and confirm that the aggregates are intracellular.

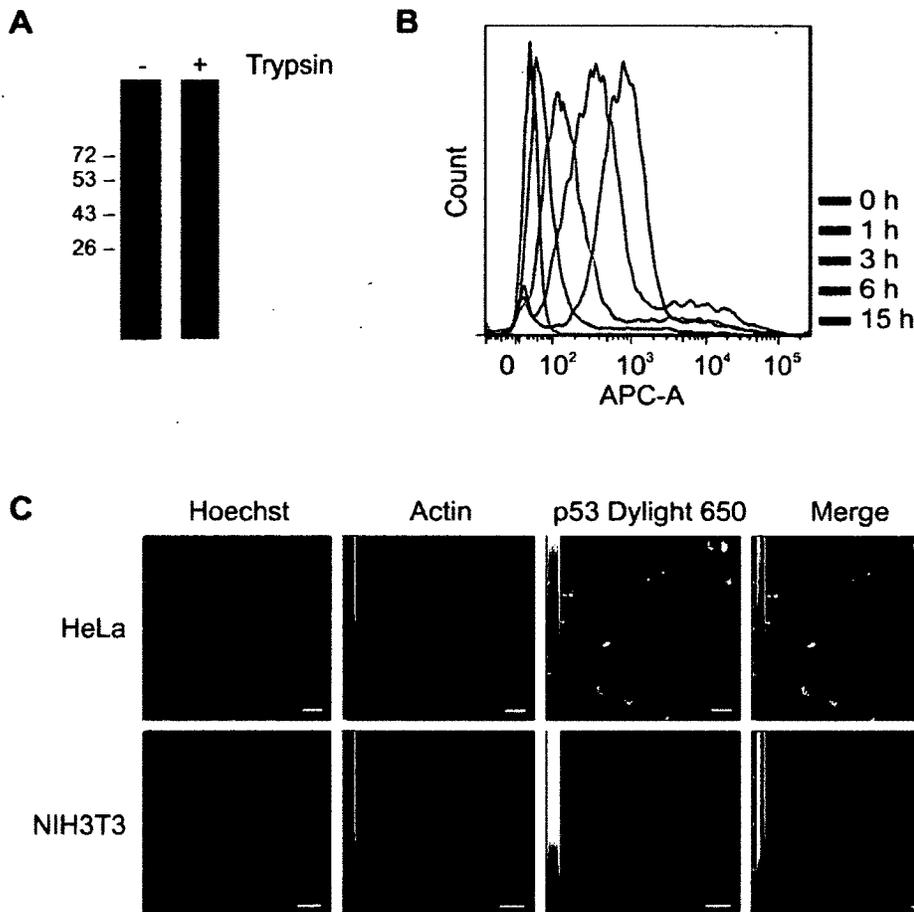


Figure 8 : p53 aggregates are internalized by HeLa and NIH3T3 cells

(A) Aggregated p53 was treated with trypsin for 5 min, resolved by 10% SDS-PAGE and analysed by Western Blot. (B) HeLa cells were incubated with 1 μ M DyLight 650-conjugated p53 aggregates for 24 h and analysed by flow cytometry. (C) HeLa and NIH3T3 were incubated with 1 μ M DyLight 650-conjugated p53 aggregates for 24 h and visualized by confocal microscopy. Scale bars: 5 μ m.

p53 aggregates enter HeLa cells via macropinocytosis

We next examined the mechanism by which the aggregates penetrate HeLa cells by adding Dextran-488, a marker of fluid-phase endocytosis, in the cell media along with DyLight 650-labeled p53 aggregates. Confocal microscopy shows a partial colocalization of dextran-488 with the aggregates (Fig. 9a, arrows). This finding indicates that p53 aggregates can enter cells via endocytosis. Thus, we

used inhibitors of different endocytic pathways to pinpoint which ones contributed to the internalisation of p53 aggregates. We used chlorpromazine, an inhibitor of clathrin-coated pits, to determine whether p53 aggregates enter cells via a clathrin-dependent endocytosis [33]. Using flow-cytometry analysis, we determined that chlorpromazine did not affect internalization of DyLight 650-labeled p53 aggregates (Fig. 9b). Similar results were obtained when cells were exposed to genistein, a tyrosine kinase inhibitor that inhibits caveolin-dependent endocytosis (Fig. 9b). Lipid-raft dependent endocytosis inhibition with M β CD, which disrupts lipid rafts by extracting cholesterol from membranes [34], did not significantly affect internalization of aggregates by the cells. Exposure of cells to EIPA, an inhibitor of Na⁺/H⁺ pumps essential for macropinocytosis, however, greatly diminished entry of p53 aggregates into cells. The actin-polymerization inhibitor cytochalasin D produced a similar effect to EIPA, suggesting actin is an important component for internalization of p53 aggregates. Another potent inhibitor of p53 aggregate entry into cells was the dynamin dominant-negative mutant K44A (Fig. 9b). Taken together, these results suggest macropinocytosis as the mechanism of entry of the p53 aggregates into HeLa cells, and that normal function of Na⁺/H⁺ pumps, dynamin and actin are needed for the internalization to occur.

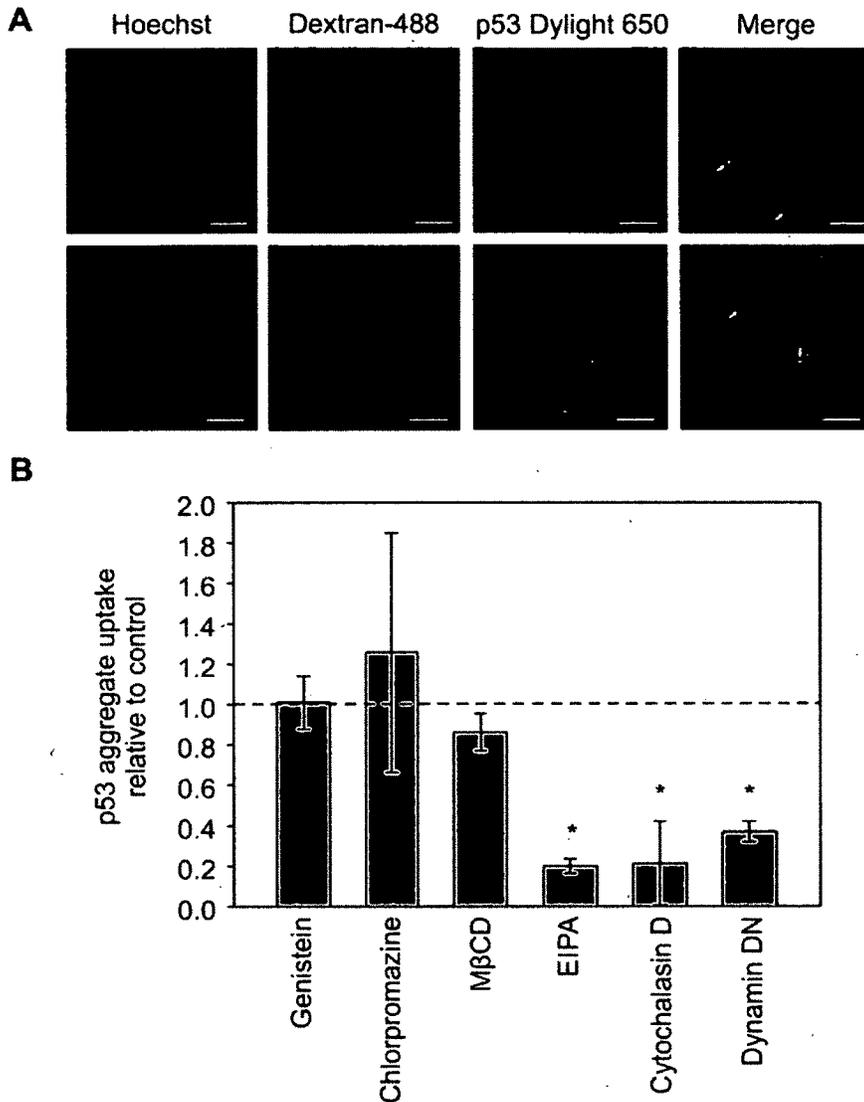


Figure 9 : p53 aggregates are internalized via macropinocytosis

(A) HeLa cells were incubated with 1 μ M DyLight 650-conjugated p53 aggregates and 50 μ g/mL Dextran-488 overnight, and visualized by confocal microscopy. (B) HeLa cells were either treated with the indicated component or transfected with dominant-negative dynamin 24 h before incubation with 1 μ M DyLight 650-conjugated p53 aggregates for 3h and analysed by flow cytometry. Mean value of 3 replicates is shown; 50000 events were recorded per experiment. Scale bars: 10 μ m.

Recombinant p53 aggregates can induce aggregation of soluble p53

We next investigated whether p53 aggregates could induce aggregation of soluble p53, similarly to PrP^c being recruited to form PrP^{Sc} aggregates. NIH3T3 cells were transiently transfected with p53^{GFP} or peGFPN1 (empty vector) and incubated with soluble or aggregated p53 for 24 h. Aggregation of p53^{GFP}; but not GFP, was observed following incubation with p53 aggregates (Fig. 10a). Furthermore, aggregation of p53^{GFP} was much more frequent in cells incubated with p53 aggregates than those incubated with soluble p53 (Fig. 10a). To show that p53 aggregates are formed only if the cells are incubated with aggregates of the same protein, the p53^{GFP} or GFP-transfected cells were incubated with A β oligomers. The proportion of cells with p53^{GFP} aggregates was significantly higher in cells incubated with p53 aggregates than A β oligomers (Fig. 10b). These results strongly suggest that only extracellular p53 aggregates can induce aggregation of soluble p53^{GFP} in cells. To show direct contact between recombinant p53 aggregates and intracellular p53^{GFP}, expression of endogenous soluble p53 was induced in HeLa cells using the topoisomerase inhibitor etoposide for 2 h following overnight incubation of the cells with DyLight 650-labeled p53C aggregates. p53C purification and aggregation were characterized by SDS-PAGE and electron microscopy, respectively (Fig. 10c). Aggregates morphology observed by electron microscopy was found to be similar to that obtained for p53 full length (compare Fig. 10c with Fig. 7c). Incubation of the external aggregates with cells treated with etoposide and expressing soluble p53 led to co-aggregation, observed by revealing endogenous p53 with 1C12 anti-p53 antibody, whose epitope is located in the N-terminal part of p53 absent in truncated DyLight 650-p53C (Fig. 10d). Together, these results show that exogenous p53C aggregates enter cells and induce intracellular aggregation of endogenously expressed p53.

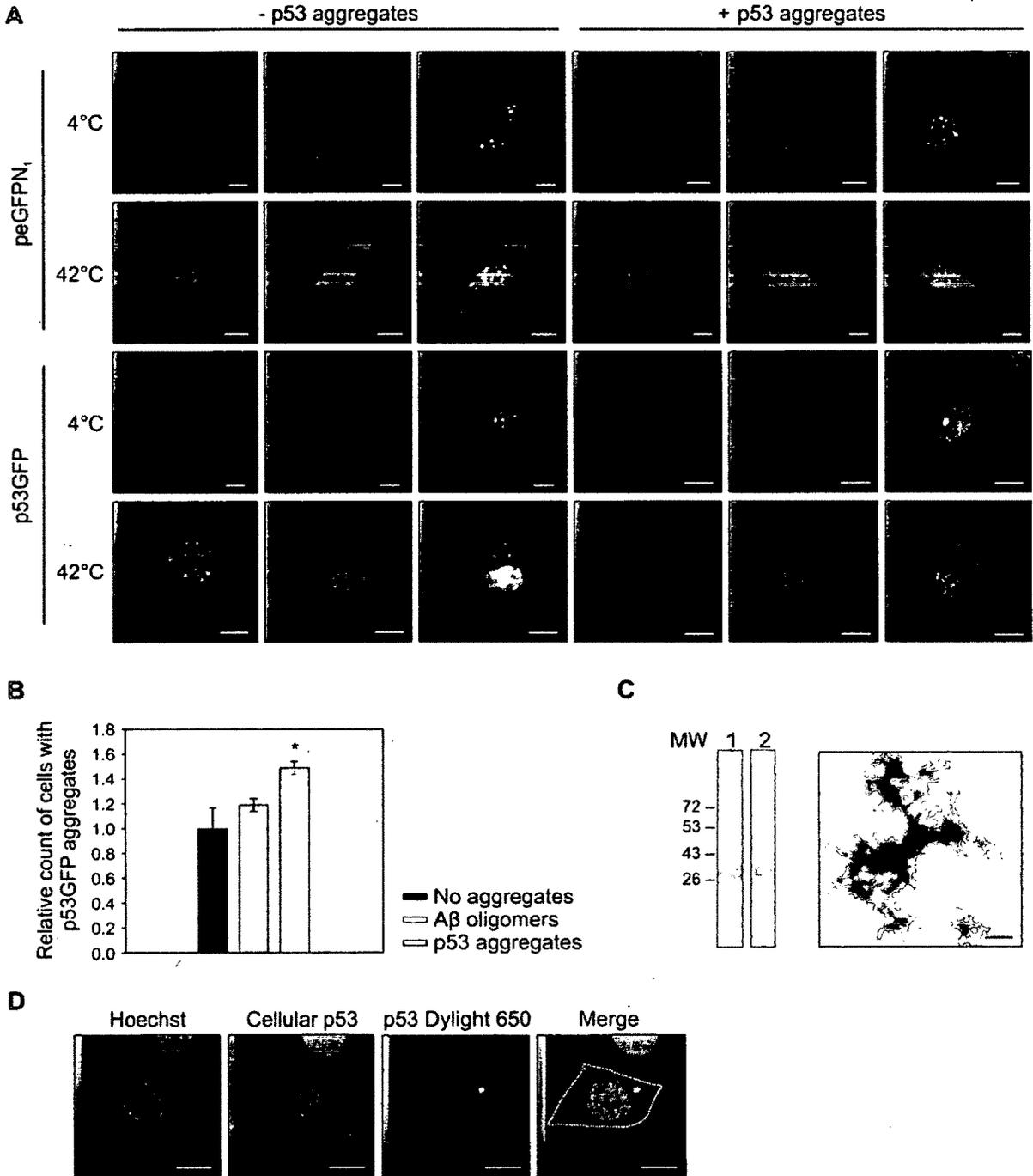


Figure 10 : De novo aggregation of soluble p53 with recombinant p53 aggregates

(A) NIH3T3 cells were transfected with p53GFP or pEGFPN1 24 h prior to addition of 1 μ M purified p53 protein incubated at 4 °C or 42 °C during 24 h. (B) Relative count of cells containing p53GFP aggregates when incubated with either 1 μ M p53 aggregates, A β oligomers or without aggregates. Mean value of 3

experiments is shown; 100 cells counted per experiment. (C) Purified p53C protein was resolved by 10% SDS-PAGE and stained with Coomassie Blue (lane 1) or analyzed by Western Blot (lane 2). Transmission electron microscopy showing aggregated p53C. (D) NIH3T3 cells were incubated with 1 μ M DyLight 650-conjugated p53C aggregates for 24 h, treated with 0,25% Trypsin/EDTA and re-plated onto microscope slides that were incubated with 100 μ M etoposide for 2 h before visualization by confocal microscopy. Scale bars: 5 μ m (A), 500 nm (B) and 10 μ m (C).

DISCUSSION

Since half of all cancers harbour a WT p53 protein, we investigated whether p53 could form aggregates even in the absence of a structural mutation. In this study, we emphasize the shared characteristics between p53 and prionoids. The most notable features of prionoids are protein aggregation, internalisation of aggregates into cells, co-aggregation with the endogenous corresponding protein and cell-to-cell transfer of the aggregates.

The p53 protein has limited structural stability, due in part to the unstructured nature of its N-terminal domain [7] not unlike PrP and α -synuclein [35,36]. This feature is thought to facilitate the aggregation of p53, which has been carried out previously using heat, acidic pH and high pressure [8,9,16,37]. Nevertheless, many of these earlier studies only use specific domains of the protein for aggregation studies; the aggregation of the full-length protein has only received limited attention, despite its possible involvement in cancer.

Many previous studies show internalization of aggregates such as aggregated PrP, tau and expanded polyglutamine [30-32]. However, this is the first time that p53 aggregate entry into cells has been shown. Colocalization of dextran-488 with the aggregates (Fig. 9a, arrows) indicates that p53 aggregates can enter cells via endocytosis, similarly to PrP and other prionoid aggregates, such as Tau and SOD1 [29-31]. Despite this finding, one cannot eliminate the possibility that p53 aggregates penetrates the cell by direct diffusion through the plasma membrane, similarly to polyglutamine aggregates [32].

The different drugs used to perturb endocytosis confirmed its involvement in p53 aggregate internalization, as p53 entry strongly depends on dynamin I activity and is greatly affected by EIPA, a Na^+/H^+ ion pump inhibitor. In fact, the dynamin-dependent and EIPA-sensitive aspects of p53 aggregate internalization are reminiscent of macropinocytosis-like mechanisms involved in bluetongue virus-1 and Ebola virus uptake [38]. The size of intracellular p53 aggregates ($> 1 \mu\text{m}$) as seen in figure 8 not only strengthens the possibility that macropinocytosis is

involved in their internalization but also eliminates the possibility that aggregates enter cells via clathrin- or caveolin-coated pits. In fact, clathrin or caveolin-coated vesicles are approximately 120 and 60 nm in size, respectively, whereas macropinosomes vary in size from 0,2 to 5 μm [39,40]. Although genistein and chlorpromazine had no significant effect on p53 aggregate entry into cells, clathrin- and caveolin-dependant mechanisms of entry cannot be eliminated as a possible secondary entry mechanism for p53 aggregates, because small aggregates may not have been detected by FACS analyses.

Until now, co-aggregation of exogenous p53 aggregates with soluble p53 has only been shown *in vitro* with the use of a known mutant of p53C, p53 R248Q [16]. In the present study we not only show the formation of aggregates using WT p53, but also that these aggregates can recruit cellular WT p53 to form *de novo* aggregates within the cells. The co-aggregation of protein aggregates and their corresponding protein *in cellulo* is found to be a key feature in the propagation of prion-like protein aggregates, such as TDP-43, α -synuclein, SOD1, tau and Huntingtin [29,31,32,41,42]. Finally, in this study we emphasize the importance of using the full-length p53 protein in aggregation studies relating to cancer, as less than 10% of cancers harbour a truncated form of the protein [43]. Thus, full-length p53 must be used to mimic physiological conditions as accurately as possible.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the people from the electron microscopy facility of the Faculty of Medicine at the University of Sherbrooke, Leonid Volkov (confocal microscopy), Yannick Miron (AFM) and Isabelle Marois (FACS).

REFERENCES

1. Guest W, Silverman J, Pokrishevsky E, O'Neill M, Grad L, et al. (2011) Generalization of the prion hypothesis to other neurodegenerative diseases: an imperfect fit. *J Toxicol Environ Health A* 74: 1433-1459.
2. Aguzzi A (2009) Cell biology: Beyond the prion principle. *Nature* 459: 924-925.
3. Aguzzi A, and Rajendran L (2009) The transcellular spread of cytosolic amyloids, prions, and prionoids. *Neuron* 64: 783-790.
4. Frost B, and Diamond M (2010) Prion-like mechanisms in neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci* 11: 155-164.
5. Silva JL, Vieira TC, Gomes MP, Bom AP, Lima LM, et al. (2010) Ligand binding and hydration in protein misfolding: insights from studies of prion and p53 tumor suppressor proteins. *Acc Chem Res* 43: 271-279.
6. Muller PA, Vousden KH, and Norman JC (2011) P53 and its Mutants in Tumor Cell Migration and Invasion. *J Cell Biol* 192: 209-218.
7. Bell S, Klein C, Muller L, Hansen S, and Buchner J (2002) p53 Contains Large Unstructured Regions in its Native State. *J Mol Biol* 322: 917-927.
8. Rigacci S, Bucciantini M, Relini A, Pesce A, Gliozzi A, et al. (2008) The (1-63) Region of the p53 Transactivation Domain Aggregates In Vitro into cytotoxic Amyloid Assemblies. *Biophys J* 94: 3635-3646.
9. Ishimaru D, Andrade LR, Teixeira LS, Quesado PA, Maiolino LM, et al. (2003) Fibrillar aggregates of the tumor suppressor p53 core domain. *Biochemistry* 42: 9022-9027.
10. Higashimoto Y, Asanomi Y, Takakusagi S, Lewis MS, Uosaki K, et al. (2006) Unfolding, aggregation, and amyloid formation by the tetramerization domain from mutant p53 associated with lung cancer. *Biochemistry* 45: 1608-1619.
11. Vousden KH, and Lu X (2002) Live or let die: the cell's response to p53. *Nat Rev Cancer* 2: 594-604.
12. Xu X, Ma Z, Wang X, Xiao ZT, Li Y, et al. (2012) Water's potential role: Insights from studies of the p53 core domain. *J Struct Biol* 177: 358-366.
13. Xu J, Reumers J, Couceiro J, De Smet F, Gallardo R, et al. (2011) Gain of function of mutant p53 by coaggregation with multiple tumor suppressors. *Nat Chem Biol* 7: 285-295.
14. Ostermeyer AG, Runko E, Winkfield B, Ahn B, and Moll UM (1996) Cytoplasmically Sequestered Wild-Type p53 Protein in Neuroblastoma is Relocated to the Nucleus by a C-Terminel Peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 15190-15194.
15. Moll UM, Ostermeyer AG, Haladay R, Winkfield B, Frazier M, et al. (1996) Cytoplasmic sequestration of wild-type p53 protein impairs the G1 checkpoint after DNA damage. *Mol Cell Biol* 16: 1126-1137.
16. Ano Bom AP, Rangel LP, Costa DC, de Oliveira GA, Sanches D, et al. (2012) Mutant p53 Aggregates into Prion-like Amyloid Oligomers and Fibrils: IMPLICATIONS FOR CANCER. *J Biol Chem* 287: 28152-28162.
17. Soto C (2012) Transmissible proteins: expanding the prion heresy. *Cell* 149: 968-977.

18. Stommel JM, Marchenko ND, Jimenez GS, Moll UM, Hope TJ, et al. (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.
19. Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M.R., Appel, R.D., and Bairoch, A. (2005). Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. In: Walker, JM editor. *The Proteomics Protocols Handbook*. pp. 571-607.
20. Ang HC, Joerger AC, Mayer S, and Fersht AR (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.
21. Bullock AN, Henckel J, DeDecker BS, Johnson CM, Nikolova PV, et al. (1997) Thermodynamic stability of wild-type and mutant p53 core domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 14338-14342.
22. Wessel D, and Flugge UI (1984) A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal Biochem* 138: 141-143.
23. Roostae A, Cote S, and Roucou X (2009) Aggregation and amyloid fibril formation induced by chemical dimerization of recombinant prion protein in physiological-like conditions *J Biol Chem* 284: 30907-30916.
24. Roucou X, Giannopoulos PN, Zhang Y, Jodoin J, Goodyer CG, et al. (2005) Cellular prion protein inhibits proapoptotic Bax conformational change in human neurons and in breast carcinoma MCF-7 cells. *Cell Death Differ* 12: 783-795.
25. Viegas MS, Martins TC, Seco F, and do Carmo A (2007) An improved and cost-effective methodology for the reduction of autofluorescence in direct immunofluorescence studies on formalin-fixed paraffin-embedded tissues. *Eur J Histochem* 51: 59-66.
26. Yoshimura T (1993) Monitoring Protein Conformational Changes during Membrane Fusion. *Methods Enzymol* 221: 72-82.
27. Luhrs T, Ritter C, Adrian M, Riek-Loher D, Bohrmann B, et al. (2005) 3D structure of Alzheimer's amyloid-beta(1-42) fibrils. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 17342-17347.
28. von Bergen M, Friedhoff P, Biernat J, Heberle J, Mandelkow EM, et al. (2000) Assembly of tau protein into Alzheimer paired helical filaments depends on a local sequence motif ((306)VQIVYK(311)) forming beta structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 5129-5134.
29. Münch C, O'Brien J, and Bertolotti A (2011) Prion-like propagation of mutant superoxide dismutase-1 misfolding in neuronal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 3548-3601.
30. Magalhaes AC, Silva JA, Lee KS, Martins VR, Prado VF, et al. (2002) Endocytic intermediates involved with the intracellular trafficking of a fluorescent cellular prion protein. *J Biol Chem* 277: 33311-33318.
31. Frost B, Jacks R, and Diamond M (2009) Propagation of tau misfolding from the outside to the inside of a cell. *J Biol Chem* 284: 12845-12852.

32. Ren PH, Lauckner JJ, Kachirskaja I, Heuser JE, Melki R, et al. (2009) Cytoplasmic penetration and persistent infection of mammalian cells by polyglutamine aggregates. *Nat Cell Biol* 11: 219-225.
33. Bosch B, Grigorov B, Senserrich J, Clotet B, Darlix JL, et al. (2008) A clathrin-dynamin-dependent endocytic pathway for the uptake of HIV-1 by direct T cell-T cell transmission. *Antiviral Res* 80: 185-193.
34. Sandgren KJ, Wilkinson J, Miranda-Saksena M, McInerney GM, Byth-Wilson K, et al. (2010) A differential role for macropinocytosis in mediating entry of the two forms of vaccinia virus into dendritic cells. *PLoS Pathogens* 6: e1000866.
35. Aguzzi A, Baumann F, and Bremer J (2008) The prion's elusive reason for being. *Annu Rev Neurosci* 31: 439-477.
36. Bussell R, Jr, and Eliezer D (2001) Residual structure and dynamics in Parkinson's disease-associated mutants of alpha-synuclein. *J Biol Chem* 276: 45996-46003.
37. Lee AS, Galea C, DiGiammarino EL, Jun B, Murti G, et al. (2003) Reversible amyloid formation by the p53 tetramerization domain and a cancer-associated mutant. *Journal of Molecular Biology* 327: 699-709.
38. Iversen TG, Frerker N, and Sandvig K (2012) Uptake of ricinB-quantum dot nanoparticles by a macropinocytosis-like mechanism. *J Nanobiotechnology* 10: 33.
39. Sallusto F, Cella M, Danieli C, and Lanzavecchia A (1995) Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J Exp Med* 182: 389-400.
40. Swanson JA (2008) Shaping cups into phagosomes and macropinosomes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9: 639-649.
41. Luk KC, Song C, O'Brien P, Stieber A, Branch JR, et al. (2009) Exogenous alpha-synuclein fibrils seed the formation of Lewy body-like intracellular inclusions in cultured cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 20051-20056.
42. Furukawa Y, Kaneko K, Watanabe S, Yamanaka K, and Nukina N (2011) A seeding reaction recapitulates intracellular formation of Sarkosyl-insoluble transactivation response element (TAR) DNA-binding protein-43 inclusions. *J Biol Chem* 286: 18664-18672.
43. Weinberg, RA (2007) *The Biology of Cancer* New York, NY, USA: Garland Science. 864p.

DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Les agrégats de p53 et p53C formés par la chaleur sont amorphes

La nature amorphe des agrégats de p53 et p53C formés par la chaleur diffère de ce qui a été observé pour les agrégats de p53 formés à l'aide d'autres techniques, comme par la pression ou un pH acide (LEE *et al.*, 2003; RIGACCI *et al.*, 2008). Ces dernières conditions transforment en fibres amyloïdes le domaine central et le domaine C-terminal de la protéine (HIGASHIMOTO *et al.*, 2006; ISHIMARU *et al.*, 2003). La morphologie des agrégats observés au microscope électronique ressemble à celle des agrégats de p53C formés par Ano Bom *et al.* en 2012. Ces derniers agrégats liaient la Thioflavine T, un colorant spécifique pour les structures en feuillet β des fibres amyloïdes. Par contre, la morphologie des agrégats de p53FL formés par la chaleur dans la présente étude ne correspond pas à celle des fibres amyloïdes, c'est-à-dire que l'on n'observe pas de fibres par microscopie électronique. Il est tout de même possible qu'une faible proportion de ces agrégats soit des oligomères précurseurs des fibres amyloïdes. C'est pourquoi il serait intéressant de vérifier si des colorants comme la Thioflavine T ou le Congo Red se lient aux agrégats de p53FL formés par la chaleur. Ceci permettrait de déterminer si les agrégats de la protéine p53FL comportent des propriétés des fibres amyloïdes.

À 42°C, la protéine p53FL se retrouve entièrement dénaturée (BELL *et al.*, 2002). La chaleur a donc été utilisée pour faire agréger la protéine. À cette température, la protéine expose les groupements latéraux de ses résidus hydrophobes, comme le montrent les résultats de spectroscopie à fluorescence (figure 7). La liaison de l'ANS aux groupements hydrophobes exposés a déjà été observée pour des agrégats de la portion N-terminale (résidus 1-63) de la protéine p53 lors

d'études structurales (RIGACCI *et al.*, 2008), mais pas pour la protéine p53FL (résidus 1-393). Puisque dans près de 90% des cancers, la protéine p53 est retrouvée sous sa forme pleine longueur, sans troncation ou délétion, l'étude de p53FL permet de mieux représenter ce qui se passe dans les cancers, par opposition à p53C ou toute autre forme tronquée de p53. De plus, des différences de stabilité et de thermodynamisme ont déjà été soulevées entre p53FL et le domaine central de la protéine (BELL *et al.*, 2002). En raison de ces différences, il est possible que des résultats obtenus avec p53C ne reflètent pas ce qui se produit avec p53FL et vice-versa. C'est pourquoi il est important d'étudier le comportement fonctionnel et l'agrégation de p53FL plutôt que de p53C si l'objectif est d'appliquer ces connaissances à la maladie du cancer.

Parmi les techniques utilisées pour causer l'agrégation de la protéine p53, l'incubation en conditions acides semble être l'événement le plus probable en conditions physiologiques. La déstabilisation de la structure de p53 dans un environnement à pH acide peut se produire si la protéine se retrouve dans un compartiment cellulaire comme le lysosome, par exemple. D'ailleurs, la protéine p53 surexprimée dans des cellules MCF7 a déjà été colocalisée avec un marqueur des lysosomes, ce qui suggère que la protéine cellulaire peut s'y retrouver dans certaines conditions. De plus, l'agrégation des domaines N- et C-terminal de p53 ainsi que la dénaturation du domaine central de la protéine ont tous été démontrés précédemment en conditions acides (BOM *et al.*, 2010; LEE *et al.*, 2003; RIGACCI *et al.*, 2008).

Les agrégats de p53 sont internalisés par des cellules en culture via la macropinocytose

Dans le présent ouvrage, l'entrée des agrégats de p53 dans des cellules en culture est montrée dans deux types cellulaires très différents, soit des cellules cancéreuses humaines HeLa (FROST *et al.*, 2009) provenant du col de l'utérus et des fibroblastes embryonnaires murins NIH 3T3. L'internalisation d'agrégats protéiques par des cellules en culture est un phénomène bien documenté pour des agrégats impliqués dans diverses pathologies neurodégénératives, telles que les maladies d'Alzheimer, de Parkinson, de Huntington et les maladies à prion (DESPLATS *et al.*, 2009; FROST *et al.*, 2009; MAGALHAES *et al.*, 2005; NAGELE *et al.*, 2002; REN *et al.*, 2009). Cependant, le mécanisme d'entrée peut varier d'un agrégat à l'autre : l'internalisation de PrP^{Sc} et du peptide formé des résidus 243-375 de la protéine tau implique l'endocytose (FROST *et al.*, 2009; GREIL *et al.*, 2008; MAGALHAES *et al.*, 2005), alors que les fibres de polyglutamine semblent pénétrer directement dans la bicouche lipidique pour atteindre le cytosol (REN *et al.*, 2009).

Jusqu'à maintenant, aucun groupe de recherche n'a caractérisé le mécanisme d'entrée des agrégats de p53 dans des cellules. Cette étude est donc la première à préciser la voie d'internalisation des agrégats de p53. La première approche utilisée, la colocalisation d'agrégats de p53 fluorescents avec des molécules de dextran marqué, a montré l'implication de l'endocytose dans le mécanisme d'entrée. De plus, l'internalisation des agrégats de p53 en présence de cytochalasine D, une mycotoxine inhibitrice de la polymérisation de l'actine, diminue de façon importante. Puisque le réarrangement du réseau d'actine sous-jacent à la membrane plasmique est nécessaire entre autres pour la formation de vésicules endocytiques, ce résultat suggère qu'une déformation de la membrane plasmique est nécessaire à l'entrée des agrégats, ce qui renforce l'hypothèse

concernant l'endocytose. Cependant, ce résultat ne permet pas de déterminer précisément quelle voie d'endocytose est utilisée par les agrégats. En effet, plusieurs voies endocytiques existent et dépendent de différents facteurs protéiques. Elles peuvent être inhibées en utilisant des drogues ciblant des facteurs nécessaires à leur bon fonctionnement. Des telles drogues inhibitrices ciblant chacun des voies d'endocytose ont donc été utilisées afin de déterminer le mécanisme exact d'internalisation des agrégats de p53. La diminution importante d'entrée des agrégats de p53 en présence de la molécule 5-(N-Ethyl-N-isopropyl) amiloride (EIPA) dans le milieu de culture suggère fortement que la macropinocytose est une voie importante pour l'internalisation des agrégats de p53. En effet, l'EIPA fait partie d'un groupe de composés appelés amilorides, qui inhibent les pompes échangeuses d'ions Na^+/H^+ dans la membrane plasmique. La conséquence ultime de la présence de cette drogue est un déséquilibre du pH intracellulaire et un arrêt de la macropinocytose par la cellule. La diminution d'internalisation observée en présence de cette drogue suggère donc que les agrégats utilisent la macropinocytose pour entrer dans les cellules. La macropinocytose est une voie utilisée par plusieurs types cellulaires pour internaliser de façon non-spécifique des macromolécules situées dans l'espace extracellulaire. Cette voie d'endocytose est totalement indépendante de la clathrine et de la cavéoline, deux protéines dont le rôle principal est d'assembler un manteau protéique sur la membrane externe des vésicules endocytiques en formation. De plus, contrairement aux voies d'endocytose dépendantes de la clathrine ou de la cavéoline, la macropinocytose permet l'entrée non spécifique de macromolécules, c'est-à-dire même sans liaison de celles-ci à un récepteur situé sur la membrane plasmique.

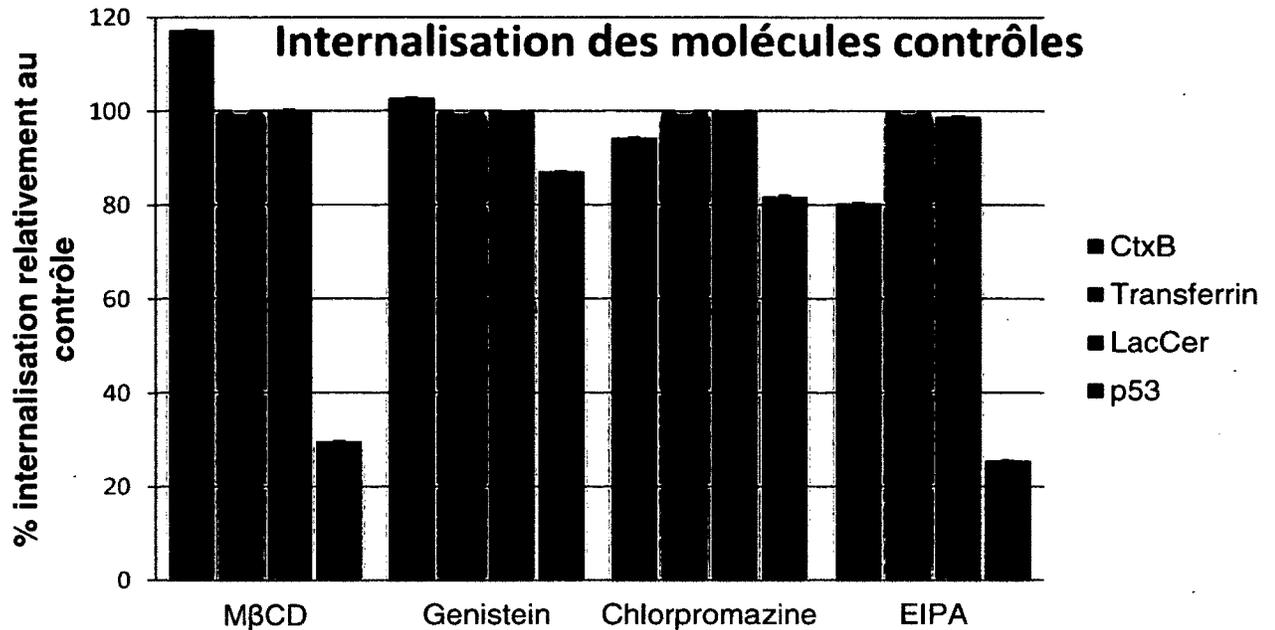


Figure 11 : Effet des différents inhibiteurs d'endocytose sur les molécules contrôles

L'internalisation des molécules contrôles fluorescentes dans des cellules incubées avec différentes drogues inhibitrices de l'endocytose a été mesurée par cytométrie de flux. Les drogues MβCD et EIPA ont été efficaces pour contrer l'internalisation des agrégats de p53 Alexa Fluor 647, alors que genistein et chlorpromazine ne semblent pas avoir eu un effet prononcé sur aucune des molécules ou agrégats.

Comme illustré à la figure 11, l'entrée de la transferrine, un peptide connu pour être internalisé par la cellule dans des vésicules à manteau de clathrine, n'a pas été affecté par la présence de la chlorpromazine. C'est le même résultat qui a aussi été obtenu pour la sous-unité B de la toxine du choléra (CtxB) et le lactosylcéramide (LacCer), dont l'internalisation n'a pas souffert malgré la présence des inhibiteurs d'endocytose correspondants, soit genistein et MβCD. Il est possible que les concentrations utilisées des inhibiteurs soient trop faibles pour avoir un effet sur l'internalisation des molécules contrôles. C'est le cas pour genistein, laquelle a déjà été testée comme étant inefficace pour empêcher l'internalisation de la sous-unité B de la toxine du choléra à une concentration

quatre fois plus grande que celle utilisée dans l'expérience présente (DOS SANTOS *et al.*, 2011). Enfin, la concentration relative des inhibiteurs par rapport à la molécule contrôle utilisée pourrait aussi être un facteur important. En fait, en excès de molécule contrôle, il est possible que même une concentration normalement efficace d'inhibiteur n'aie pas d'effet sur l'endocytose de la molécule. Par contre, il est aussi possible que les drogues inhibitrices n'ayant pas produit d'effet soient simplement inactives, par exemple dans le cas où la conservation du produit a été inadéquate ou trop prolongée. Cela ne semble pas être le cas pour le M β CD, puisque celui-ci a eu un effet sur l'internalisation des agrégats de p53, mais c'est une possibilité pour genistein et chlorpromazine. Pour conclure, puisque les inhibiteurs utilisés n'ont pas eu d'effet significatif sur l'endocytose des différentes molécules contrôles, il est impossible d'éliminer les voies d'endocytose dépendantes de la clathrine, de la cavéoline et du cholestérol comme des voies possibles d'internalisation des agrégats de p53.

De façon similaire aux agrégats de SOD1 dans les cellules N2a (MÜNCH *et al.*, 2011), les agrégats de p53 semblent entrer par macropinocytose dans les cellules HeLa puisque, dans les deux cas, la cytochalasine D et EIPA ont inhibé de façon significative leur entrée. La différence majeure entre l'internalisation des agrégats de p53 et de SOD1 est la dépendance ou non à la dynamine I. Effectivement, le mécanisme d'entrée des agrégats de p53 semble dépendre fortement de la dynamine I, alors que ce n'est pas le cas pour SOD1. Malgré cette différence, il est possible que les agrégats de SOD1 et p53 soient internalisés tous deux via la macropinocytose. Même si le rôle de la dynamine dans l'endocytose dépendante de la clathrine ou de la cavéoline est bien documenté (CONNER et SCHMID, 2003), son implication dans les autres voies d'endocytose indépendantes des manteaux de clathrine ou de cavéoline est très peu connue (HUANG *et al.*, 2008). Des mécanismes d'endocytose indépendants de la clathrine et de la cavéoline mais dépendants de la dynamine ont aussi déjà été observés pour l'entrée de certains virus, mais leur caractérisation ne permet pas de préciser si ces virus utilisent la macropinocytose ou une autre voie moins

bien connue (CAO *et al.*, 2007; HUANG *et al.*, 2008). Donc, sans pouvoir conclure sur le mécanisme exact d'internalisation des agrégats de p53, l'étude présente révèle que celle-ci dépend d'un pH intracellulaire équilibré, de l'actine et de la dynamine I. Il est aussi intéressant de noter que la dynamine I est impliquée dans l'internalisation d'agrégats d' α -synucléine, un prionoïde connu (DESPLATS *et al.*, 2009; LEE *et al.*, 2010a).

Une autre caractéristique distingue l'internalisation de SOD1 et p53 : la cinétique d'entrée. Pour les agrégats de SOD1, 15 minutes sont suffisantes à leur internalisation par la majorité des cellules (MÜNCH *et al.*, 2011), alors que dans le cas de p53, plus de 3 heures sont nécessaires pour atteindre le même taux de cellules positives pour les agrégats et ce, même avec une concentration cinq fois plus élevée d'agrégats. Cette observation suggère que le mécanisme d'internalisation des agrégats de p53 diffère de celui de SOD1 et qu'il pourrait dépendre de facteurs supplémentaires, entre autres de la dynamine I. Cependant, puisque la lignée cellulaire utilisée dans les deux études n'était pas la même, il est impossible de déterminer la raison exacte pour cette divergence.

Le mécanisme d'internalisation précis n'est connu que pour très peu d'agrégats protéiques jusqu'à maintenant. En ce sens, notre étude portant sur l'internalisation des agrégats de la protéine p53 est novatrice : elle caractérise plus précisément le mode d'entrée qu'une simple colocalisation des agrégats avec des molécules de dextran ou avec le récepteur de la transferrine, deux méthodes largement utilisées pour déterminer l'implication de l'endocytose et la dépendance à la clathrine.

Les agrégats de p53 recombinant co-agrègent avec p53 endogène

La co-agrégation d'agrégats protéiques internalisés avec la protéine endogène est aussi une caractéristique importante des prionoïdes qui a été montrée pour les agrégats de la protéine Huntingtin, tau, TDP-43, α -synucléine et SOD1 (FROST *et al.*, 2009; FURUKAWA *et al.*, 2011; LUK *et al.*, 2009; MÜNCH *et al.*, 2011; REN *et al.*, 2009). La co-agrégation d'agrégats exogènes de p53 avec la protéine cellulaire n'avait jamais été montrée auparavant. Cette étude révèle donc une nouvelle caractéristique des agrégats de p53 : leur capacité de causer l'agrégation de la protéine soluble. L'induction de l'agrégation de p53 cellulaire a d'abord été démontrée indirectement via la formation d'agrégats de p53GFP dans des cellules en culture incubées avec des agrégats de p53 recombinant. Ce résultat montre que la présence des agrégats exogènes a eu comme conséquence l'agrégation de p53GFP dans ces cellules, mais ne montre pas l'interaction directe des agrégats avec la protéine cellulaire. La co-agrégation a été visualisée plus tard par microscopie confocale suite à une expérience d'immunofluorescence. Les résultats de cette expérience ont montré la juxtaposition des agrégats de p53C fluorescents au marquage correspondant à p53 endogène. Ensemble, ces résultats confirment que les agrégats de p53C sont capables d'entrer dans des cellules en culture exprimant p53WT et de recruter la protéine p53 endogène à ces cellules afin de la faire agréger à son tour.

L'impact de l'agrégation de p53 cellulaire sur la protéine elle-même ainsi que les cellules ne peut être que spéculé pour l'instant, faute de résultats convaincants. Puisque la présence d'agrégats de p53 *in cellulo* n'a jusqu'à maintenant été observée que dans des cellules cancéreuses (MOLL *et al.*, 1996; OSTERMEYER *et al.*, 1996), une hypothèse évidente est celle de la perte de fonction de p53 cellulaire suite à son agrégation, par séquestration de la protéine. La conséquence d'une telle perte de fonction de la protéine sur la cellule

engendrerait, au fil du temps, l'apparition de dommages à l'ADN ainsi qu'une forte susceptibilité au développement d'une tumeur. D'ailleurs, ces phénomènes sont observés dans des animaux transgéniques n'exprimant pas la protéine p53 (DONEHOWER, 1996). En ce sens, l'agrégation de la protéine p53WT lui conférerait un potentiel oncogénique, même sans l'apparition de mutations dans sa séquence primaire en acides aminés.

Idéalement, la co-agrégation d'agrégats de p53 avec la protéine endogène devrait être faite à l'aide d'agrégats de p53FL. Dans le cadre de cette étude, il était primordial de pouvoir différencier la protéine recombinante exogène et la protéine endogène par deux marquages différents. L'utilisation d'agrégats de la p53FL recombinante aurait entraîné leur marquage par l'anticorps anti-p53 utilisé pour reconnaître la protéine endogène, mais puisque l'épitope reconnu par cet anticorps se trouve en N-terminal de la protéine, des agrégats de p53C pouvaient être utilisés pour mimer l'action d'agrégats de p53FL sans être reconnus par cet anticorps. Pour ces raisons techniques, p53C a été utilisée dans ces expériences, mais une démonstration de la co-agrégation d'agrégats de p53WT plein longueur avec la protéine cellulaire aurait encore plus d'impact. En effet, la troncation de la protéine p53 dans le cancer est une mutation peu fréquente (moins de 10% des cas) (ROBLES *et al.*, 2002), c'est-à-dire que dans une grande majorité des cancers la protéine p53 est entière. C'est pourquoi la co-agrégation d'agrégats de p53FL avec p53 cellulaire serait une expérience en conditions plus physiologiques.

Puisque la co-agrégation de p53 recombinant avec p53 cellulaire a lieu dans le cytoplasme, les agrégats de p53 recombinant doivent nécessairement y être libérés. Jusqu'à maintenant, la façon par laquelle un agrégat protéique internalisé par endocytose accède au cytosol reste inconnue (AGUZZI et RAJENDRAN, 2009). Généralement lors de l'endocytose, les cargos se trouvant dans les endosomes sont resécrétés à l'extérieur de la cellule ou dégradés, suite à la fusion de l'endosome avec un lysosome. La possibilité que l'agrégation prenne

place dans un compartiment cellulaire entourée d'une membrane où se trouvent à la fois l'agrégat de p53 recombinant et la protéine p53 cellulaire n'a pas été vérifiée. Ceci pourrait être fait à l'aide d'un marquage des membranes cellulaires avec une molécule fluorescente afin de vérifier si une membrane entoure l'agrégat formé. Néanmoins, la protéine p53 cellulaire se situe généralement majoritairement au noyau et faiblement au cytosol et sa localisation dans d'autres compartiments cellulaires n'a été que très peu documentée jusqu'à maintenant, laissant peu d'espoir pour cette dernière hypothèse.

La formation des agrégats de p53 et leur transmission d'une cellule à l'autre sont-elles envisageables physiologiquement?

Jusqu'à maintenant, les résultats expérimentaux obtenus ont montré que dans un environnement contrôlé, des agrégats de la protéine p53WT peuvent être formés et peuvent aussi être internalisés par des cellules HeLa et NIH3T3 en culture. Cependant, la faisabilité de tous ces événements dans un organisme entier et surtout, dans un environnement non contrôlé n'a pas été vérifiée. La section qui suit discute des points les plus importants qui contribuent à déterminer la probabilité qu'un tel phénomène se produise de façon naturelle.

D'abord, la formation des agrégats de p53WT en laboratoire s'effectue à l'aide d'une concentration relativement élevée de la protéine purifiée (950 mg p53/g protéine recombinante si on considère une pureté de 95% de la purification protéique) dans une solution tampon à une température contrôlée. Comme mentionné dans l'introduction, le niveau de p53 dans une cellule saine reste toujours relativement bas, étant donné la dégradation très rapide de la protéine en absence de stress. Dans des lignées de cellules non cancéreuses, Hassapoglidou et al. ont déterminé que la concentration de p53 est de 0,8-1,4 µg p53/g protéines provenant du lysat cellulaire, une concentration 1 million de fois plus petite que celle utilisée expérimentalement. Toutefois, dans des lignées

cellulaires cancéreuses, il a été remarqué que la quantité relative de p53 est généralement plus élevée, et ce phénomène est encore plus marqué dans des lignées cellulaires cancéreuses où la séquence d'acides aminés de la protéine p53 comporte une ou plusieurs mutations ponctuelles. Dans ces conditions, la concentration cellulaire de p53 peut s'élever jusqu'à 108 mg p53/g de protéines extraites (HASSAPOGLIDOU *et al.*, 1993; LIANIDOU *et al.*, 1999), c'est-à-dire 100 fois plus élevée que dans des cellules saines. Une telle augmentation est significative, certes, mais la concentration de p53 maximale dans une cellule reste toujours 10 000 fois en deçà de la concentration utilisée pour l'agrégation *in vitro*. Cependant, la concentration de la protéine p53 n'est pas le seul élément à considérer lorsque l'on veut déterminer sa capacité à agréger; la présence de chaperones et, de façon très importante, le temps, peuvent jouer un rôle dans la capacité d'agrégation *in cellulo* de p53.

D'abord, certaines protéines chaperones ont été démontrées comme liant p53 *in cellulo*. Puisque les chaperones sont des molécules connues pour lier des protéines afin de faciliter leur bon repliement, la conséquence directe sur l'agrégation de celles-ci de leur liaison à p53. Premièrement, la protéine chaperone HSP90 est connue pour empêcher l'agrégation de p53WT ou catalyser sa désagrégation, du moins *in vitro* (WALERYCH *et al.*, 2004). D'autres publications démontrent une stabilisation de la conformation mutante de p53 par HSP90 (PENG *et al.*, 2001), ce qui vient au moins partiellement à l'encontre des résultats de l'équipe précédente, puisqu'une telle stabilisation faciliterait grandement l'agrégation de p53 mutant. Même si la conséquence exacte d'une liaison entre HSP90 et p53 demeure controversée, sa présence semble effectivement avoir des répercussions sur la stabilité de la protéine. En conditions de haute température, cette chaperone abondamment exprimée (CREVEL *et al.*, 2001) pourrait donc grandement influencer la capacité d'agrégation de p53. Deuxièmement, la chaperone CHIP lie elle aussi la protéine p53 pour réguler sa conformation. Elle se lie de manière plus importante à la conformation mutante de p53 *in vitro*, mais son effet exact est encore inconnu. Un point important à

noter, cependant, est l'effet de la liaison de CHIP sur d'autres protéines qui agrègent : CHIP est connue pour empêcher l'agrégation de tau, les protéines à polyglutamine et CFTR (ALBERTI *et al.*, 2004; MEACHAM *et al.*, 2001; MILLER *et al.*, 2005; SAHARA *et al.*, 2005; SHIMURA *et al.*, 2004). Plus récemment, des avancées ont été effectuées dans ce domaine pour clarifier le rôle des différentes chaperones, et leur rôle a été découvert comme étant dépendant de la conformation de p53. En effet, dans des cellules exprimant une forme mutante de p53, HSP90 agit comme stabilisateur de p53 mutant en empêchant sa dégradation par MDM2 et CHIP, et ce, en formant un complexe avec p53, alors que dans des cellules exprimant p53WT, HSP90 prévient l'agrégation de p53 en jouant son rôle classique de chaperone (LI *et al.*, 2011).

Ensuite, un facteur supplémentaire entre en jeu de façon importante lorsque l'on parle de probabilité d'agrégation dans un organisme entier : le temps. En effet, celui-ci joue en faveur de l'agrégation, puisque plusieurs décennies de vie augmentent la probabilité de nucléation d'un agrégat de p53. La nucléation, c'est-à-dire la rencontre de deux molécules dont les domaines-cibles sont exposés et accessible pour l'agrégation, est connue pour être l'étape limitante dans la formation d'agrégats de la protéine prion (BRUNDIN *et al.*, 2010; SOTO *et al.*, 2006). Si l'étape initiale dans l'agrégation de p53 est une phase de nucléation semblable à celle de PrP, il est possible que le hasard d'une rencontre protéine-protéine dans une conformation propice à l'agrégation joue un rôle extrêmement important sur la probabilité d'agrégation de p53 dans un organisme vivant. Cette probabilité dépend inévitablement de la concentration de p53 dans la cellule au moment précis de la rencontre. Puisqu'une vie s'échelonne sur plusieurs décennies, cela laisse place à des milliards de rencontres potentielles entre deux protéines. Plutôt que seulement 24 h *in vitro*, les protéines p53 dans les cellules de l'organisme disposent d'amplement de temps pour entrer en contact. La probabilité qu'au cours d'une vie entière deux protéines p53 mal repliées entrent en contact et que cette rencontre initie la nucléation d'un agrégat semble plus vraisemblable que pendant un court laps de temps compté en nombre d'heures.

À l'aide d'un calcul simplifié et en considérant un lien linéaire entre la concentration de protéine p53 et le temps, on peut facilement déterminer si l'agrégation de p53 mutant est probable ou non chez un individu comportant un allèle mutant du gène codant pour p53. Durant les manipulations, 24 h était le temps requis l'échantillon de p53 purifiée et à concentration élevée pour observer une agrégation massive de la protéine. À concentration 10 000 fois moins élevée, dans une cellule d'un organisme par exemple, on pourrait donc s'attendre à ce que l'agrégation prenne 10 000 fois plus de temps, c'est-à-dire 10 000 jours, ce qui correspond à un peu plus de 27 ans. Ce calcul, bien que purement hypothétique, démontre malgré tout que dans de telles conditions, la formation d'agrégats de p53 chez un individu, même si elle ne semble que très peu probable, n'est pas totalement impossible. En réalité, l'atteinte de conditions optimales pour l'agrégation de la protéine *in cellulo* est donc peu probable, mais extrêmement difficile à quantifier.

Une autre interrogation pertinente est celle de la capacité de p53 à s'agrèger en présence de mutations ponctuelles dans son domaine de tétramérisation. En effet, le domaine de tétramérisation de p53, situé en C-terminal de la protéine, permet un rapprochement des monomères, essentiel pour la liaison à l'ADN. On pourrait également penser que ce domaine serait nécessaire à l'agrégation de la protéine. Cependant, de nombreux indices suggèrent que l'agrégation de p53 ne dépend aucunement de sa capacité à former des dimères ou des tétramères. Premièrement, des formes tronquées de p53 comportant uniquement soit le domaine central de liaison à l'ADN ou le domaine N-terminal ont été montrées comme étant capable de s'agrèger *in vitro* (ISHIMARU *et al.*, 2003; RIGACCI *et al.*, 2008). Deuxièmement, une étude montre que le domaine de tétramérisation de p53 seul, soit WT ou comportant la mutation R337H qui inhibe sa tétramérisation, peut former des fibres amyloïdes lorsque placé dans des conditions de haute température *in vitro* (LEE *et al.*, 2003). Cette observation suggère que peu importe la capacité de tétramérisation de la protéine, cette dernière peut former des agrégats lorsque placée dans les conditions optimales

pour leur formation. Finalement, une séquence d'acides aminés responsable de l'agrégation de p53 a été identifiée récemment comme étant les résidus 251 à 257 de la protéine. Cette séquence, bien que non suffisante à elle seule pour faire agréger p53, semble nécessaire à l'agrégation de la protéine pleine longueur (XU *et al.*, 2011).

Enfin, la dernière partie de cet ouvrage sera dédiée à adresser le problème de la transmission des agrégats de p53 d'une cellule à une autre. Pour que ce phénomène puisse s'effectuer, les protéines en question doivent se retrouver à l'extérieur des cellules, donc être sécrétées ou excrétées d'une manière ou d'une autre, puis être réinternalisées par une autre cellule. Grâce aux travaux présentés ici, l'internalisation d'agrégats de p53 est maintenant mieux caractérisée. Cependant, le mécanisme par lequel les agrégats sont sécrétés reste encore totalement inconnu, principalement parce que p53 n'a jamais été documentée comme étant une protéine sécrétée et que la sécrétion des agrégats de p53 par la cellule n'a toujours pas été documentée. En réalité, comme pour plusieurs des prionoïdes connus, le mécanisme exact de propagation d'une cellule à l'autre des agrégats de p53 est encore flou. Différents modèles proposés pour d'autres prionoïdes pourraient s'appliquer, incluant l'utilisation d'exosomes par les agrégats, l'exocytose qui relâche les protéines dans l'espace extracellulaire ou encore un transport trans-synaptique ou des «tunneling nanotubes» (AGUZZI et RAJENDRAN, 2009; LEE *et al.*, 2010b). Certains de ces mécanismes pourraient être utilisés par les agrégats de la protéine p53, mais jusqu'à maintenant aucun résultat ne peut nous le confirmer.

Une théorie distincte a été proposée spécialement pour p53 par une équipe coréenne. Dans leur publication en 2010, Lee, S.Y., *et al.* ont émis l'hypothèse comme quoi les agrégats de p53 pourraient être libérés par les cellules nécrotiques au centre des tumeurs cancéreuses. En effet, il est généralement accepté que la mort par nécrose permet le relâchement de plusieurs protéines cellulaires dû à la rupture de la membrane plasmique. Leurs résultats, obtenus à

l'aide d'un modèle de tumeurs sphéroïdes cultivées en agar mou, démontrent qu'une forme insoluble de p53 est retrouvée dans le cœur nécrotique des tumeurs ((LEE *et al.*, 2010c). Pour illustrer la transmission d'une cellule à l'autre des agrégats de p53, on peut ensuite poser l'hypothèse selon laquelle les agrégats dans le milieu extracellulaire sont internalisés à l'aide de la macropinocytose, par les cellules vivantes avoisinantes comme démontré dans l'article scientifique ci-joint, Pour le moment, la théorie selon laquelle les agrégats libérés lors de la nécrose sont réinternalisés par les cellules avoisinantes n'a pas été confirmée, mais elle reste totalement plausible, surtout lorsque l'on considère le rôle possible des agrégats de p53 dans le cancer.

Conclusions

Comme l'ont montré précédemment d'autres équipes de recherche, la protéine p53 comportant une mutation ponctuelle est capable d'agrégater dans les cellules cancéreuses et causer l'agrégation de p53WT, ce qui entraîne la perte de fonction de la protéine (ANO BOM *et al.*, 2012; XU *et al.*, 2011). Les résultats de la présente étude ajoutent à ce modèle le fait que la protéine tronquée mais sans mutations (p53C) peut produire un effet similaire. La protéine p53FL a été montrée comme étant capable d'agrégater en conditions dénaturantes et d'être internalisée par des cellules en culture. De plus, les résultats démontrent que les agrégats de p53 peuvent entrer dans des cellules selon un mécanisme dépendant de l'actine, d'un pH intracellulaire équilibré et de la dynamine I. Enfin, la co-agrégation des agrégats exogènes de p53C avec la protéine cellulaire démontre que p53 possède une caractéristique importante des prionoïdes, le recrutement de la protéine native. Bien que les connaissances au sujet de l'agrégation de p53FL soient actuellement limitées, notre étude est un ajout important à ce domaine et ouvre la porte à des études subséquentes portant sur d'autres caractéristiques prionoïdes possibles de p53, comme le transfert des agrégats de cellule en cellule ou d'un organisme à l'autre.

REMERCIEMENTS

J'aimerais remercier mon directeur de recherche Xavier Roucou pour m'avoir accueillie dans son laboratoire et m'avoir permis de vivre 2 années de recherche inoubliables. Merci à Guillaume Tremblay pour m'avoir montré une grande leçon de vie en science : « N'essaie pas de gagner du temps, essaie plutôt de ne pas en perdre ». Enfin, un merci spécial à Kevin Ya, qui a été très patient et qui m'a supporté pendant les bons et moins bons moments de ma maîtrise.

LISTE DES RÉFÉRENCES

- Abid, K., and Soto, C. (2006). The intriguing prion disorders. *Cell Mol. Life Sci.* **63**, 2342-2351.
- Aguzzi, A. (2009). Cell biology: Beyond the prion principle. *Nature* **459**, 924-925.
- Aguzzi, A., Baumann, F., and Bremer, J. (2008). The prion's elusive reason for being. *Annu. Rev. Neurosci.* **31**, 439-477.
- Aguzzi, A., and Rajendran, L. (2009). The transcellular spread of cytosolic amyloids, prions, and prionoids. *Neuron* **64**, 783-790.
- Aguzzi, A., Sigurdson, C., and Heikenwaelder, M. (2008). Molecular mechanisms of prion pathogenesis. *Annu. Rev. Pathol.* **3**, 11-40.
- Alberti, S., Bohse, K., Arndt, V., Schmitz, A., and Hohfeld, J. (2004). The cochaperone HspBP1 inhibits the CHIP ubiquitin ligase and stimulates the maturation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Mol. Biol. Cell* **15**, 4003-4010.
- Alberts, B. (2008). *Molecular biology of the cell* (New York: Garland Science).
- 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., Rangel, L.P., Costa, D.C., de Oliveira, G.A., Sanches, D., Braga, C.A., Gava, L.M., Ramos, C.H., Cepeda, A.O., 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.
- Auluck, P.K., Caraveo, G., and Lindquist, S. (2010). alpha-Synuclein: membrane interactions and toxicity in Parkinson's disease. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **26**, 211-233.
- Balint, E.E., and Vousden, K.H. (2001). Activation and activities of the p53 tumour suppressor protein. *Br. J. Cancer* **85**, 1813-1823.
- Barrow, C.J., Yasuda, A., Kenny, P.T., and Zagorski, M.G. (1992). Solution conformations and aggregational properties of synthetic amyloid beta-peptides of Alzheimer's disease. Analysis of circular dichroism spectra. *J. Mol. Biol.* **225**, 1075-1093.

- Beland, M., and Roucou, X. (2012). The prion protein unstructured N-terminal region is a broad-spectrum molecular sensor with diverse and contrasting potential functions. *J. Neurochem.* *120*, 853-868.
- Bell, S., Klein, C., Muller, L., Hansen, S., and Buchner, J. (2002). p53 Contains Large Unstructured Regions in its Native State. *J Mol Biol* *322*, 917-927.
- Bocharova, O.V., Breydo, L., Salnikov, V.V., and Baskakov, I.V. (2005). Copper(II) inhibits in vitro conversion of prion protein into amyloid fibrils. *Biochemistry* *44*, 6776-6787.
- Bom, A.P., Freitas, M.S., Moreira, F.S., Ferraz, D., Sanches, D., Gomes, A.M., Valente, A.P., Cordeiro, Y., and Silva, J.L. (2010). The p53 core domain is a molten globule at low pH: functional implications of a partially unfolded structure. *J. Biol. Chem.* *285*, 2857-2866.
- Bonn, D., and Ault, A. (1997). Prusiner awarded the Nobel prize for work on prions. *Lancet* *350*, 1079.
- Borras, C., Gomez-Cabrera, M., and Viña, J. (2011). The dual role of p53: DNA protection and antioxidant. *Free Radic. Res.* *45*, 643-695.
- Bosch, B., Grigorov, B., Senserrich, J., Clotet, B., Darlix, J.L., Muriaux, D., and Este, J.A. (2008). A clathrin-dynamin-dependent endocytic pathway for the uptake of HIV-1 by direct T cell-T cell transmission. *Antiviral Res.* *80*, 185-193.
- Breydo, L., and Uversky, V.N. (2011). Role of metal ions in aggregation of intrinsically disordered proteins in neurodegenerative diseases. *Metallomics* *3*, 1163-1180.
- Brundin, P., Melki, R., and Kopito, R. (2010). Prion-like transmission of protein aggregates in neurodegenerative diseases. *Nature Reviews.Molecular Cell Biology* *11*, 301-307.
- Bullock, A.N., and Fersht, A.R. (2001). Rescuing the function of mutant p53. *Nat. Rev. Cancer.* *1*, 68-76.
- Bullock, A.N., Henckel, J., DeDecker, B.S., Johnson, C.M., Nikolova, P.V., Proctor, M.R., Lane, D.P., and Fersht, A.R. (1997). Thermodynamic stability of wild-type and mutant p53 core domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *94*, 14338-14342.
- Bussell, R., Jr, and Eliezer, D. (2001). Residual structure and dynamics in Parkinson's disease-associated mutants of alpha-synuclein. *J. Biol. Chem.* *276*, 45996-46003.

Butler, J.S., and Loh, S.N. (2005). Kinetic partitioning during folding of the p53 DNA binding domain. *J. Mol. Biol.* *350*, 906-918.

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.

Cao, H., Chen, J., Awoniyi, M., Henley, J.R., and McNiven, M.A. (2007). Dynamin 2 mediates fluid-phase micropinocytosis in epithelial cells. *J. Cell. Sci.* *120*, 4167-4177.

Chandler, R.L. (1961). Encephalopathy in mice produced by inoculation with scrapie brain material. *Lancet* *1*, 1378-1379.

Chen, M., Zhang, S., Liu, Q., Liu, P., Busuttill, K., Wang, C., Besenbacher, F., Li, Y.M., and Dong, M. (2012). An investigation into the formation of annular aggregates of human islet amyloid polypeptide on tantalum oxide surfaces. *Chemistry* *18*, 2493-2497.

Conner, S.D., and Schmid, S.L. (2003). Regulated portals of entry into the cell. *Nature* *422*, 37-44.

Crevel, G., Bates, H., Huikeshoven, H., and Cotterill, S. (2001). The *Drosophila* Dpit47 protein is a nuclear Hsp90 co-chaperone that interacts with DNA polymerase alpha. *J. Cell. Sci.* *114*, 2015-2025.

Deleault, N.R., Lucassen, R.W., and Supattapone, S. (2003). RNA molecules stimulate prion protein conversion. *Nature* *425*, 717-720.

Deleault, N.R., Piro, J.R., Walsh, D.J., Wang, F., Ma, J., Geoghegan, J.C., and Supattapone, S. (2012). Isolation of phosphatidylethanolamine as a solitary cofactor for prion formation in the absence of nucleic acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *109*, 8546-8551.

Desplats, P., Lee, H.J., Bae, E.J., Patrick, C., Rockenstein, E., Crews, L., Spencer, B., Masliah, E., and Lee, S.J. (2009). Inclusion formation and neuronal cell death through neuron-to-neuron transmission of alpha-synuclein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 13010-13015.

Dobson, C.M. (2001). The structural basis of protein folding and its links with human disease. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* *356*, 133-145.

Donehower, L.A. (1996). The p53-deficient mouse: a model for basic and applied cancer studies. *Semin. Cancer Biol.* *7*, 269-278.

Donne, D.G., Viles, J.H., Groth, D., Mehlhorn, I., James, T.L., Cohen, F.E., Prusiner, S.B., Wright, P.E., and Dyson, H.J. (1997). Structure of the recombinant

full-length hamster prion protein PrP(29-231): the N terminus is highly flexible. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *94*, 13452-13457.

dos Santos, T., Varela, J., Lynch, I., Salvati, A., and Dawson, K.A. (2011). Effects of transport inhibitors on the cellular uptake of carboxylated polystyrene nanoparticles in different cell lines. *PLoS One* *6*, e24438.

Eisele, Y.S., Obermuller, U., Heilbronner, G., Baumann, F., Kaeser, S.A., Wolburg, H., Walker, L.C., Staufenbiel, M., Heikenwalder, M., and Jucker, M. (2010). Peripherally applied Abeta-containing inoculates induce cerebral beta-amyloidosis. *Science* *330*, 980-982.

el-Deiry, W.S., Tokino, T., Velculescu, V.E., Levy, D.B., Parsons, R., Trent, J.M., Lin, D., Mercer, W.E., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (1993). WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* *75*, 817-825.

Ermonval, M., Mouillet-Richard, S., Codogno, P., Kellermann, O., and Botti, J. (2003). Evolving views in prion glycosylation: functional and pathological implications. *Biochimie* *85*, 33-45.

Finder, V.H., and Glockshuber, R. (2007). Amyloid-beta aggregation. *Neurodegener Dis.* *4*, 13-27.

Flach, K., Hilbrich, I., Schiffmann, A., Gaertner, U., Krueger, M., Leonhardt, M., Waschipky, H., Wick, L., Arendt, T., and Holzer, M. (2012). Tau oligomers impair artificial membrane integrity and cellular viability. *J. Biol. Chem.* *287*, 43223-43233.

Frost, B., and Diamond, M. (2010). Prion-like mechanisms in neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci* *11*, 155-164.

Frost, B., Jacks, R., and Diamond, M. (2009). Propagation of tau misfolding from the outside to the inside of a cell. *J Biol Chem* *284*, 12845-12852.

Furukawa, Y., Kaneko, K., Watanabe, S., Yamanaka, K., and Nukina, N. (2011). A seeding reaction recapitulates intracellular formation of Sarkosyl-insoluble transactivation response element (TAR) DNA-binding protein-43 inclusions. *J. Biol. Chem.* *286*, 18664-18672.

Galea, C., Bowman, P., and Kriwacki, R.W. (2005). Disruption of an Intermonomer Salt Bridge in the p53 Tetramerization Domain Results in an increased Propensity to Form Amyloid Fibrils. *Protein Science* *14*, 2993-3003.

Galea, C.A., Wang, Y., Sivakolundu, S.G., and Kriwacki, R.W. (2008). Regulation of cell division by intrinsically unstructured proteins: intrinsic flexibility, modularity, and signaling conduits. *Biochemistry* *47*, 7598-7609.

- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M.R., Appel, R.D., and Bairoch, A. (2005). Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. In *The Proteomics Protocols Handbook*, Walker, J. M. ed., Humana Press) pp. 571-607.
- Green, D., and Kroemer, G. (2009). Cytoplasmic functions of the tumour suppressor p53. *Nature* *458*, 1127-1157.
- Greil, C.S., Vorberg, I.M., Ward, A.E., Meade-White, K.D., Harris, D.A., and Priola, S.A. (2008). Acute cellular uptake of abnormal prion protein is cell type and scrapie-strain independent. *Virology* *379*, 284-293.
- Griffith, J.S. (1967). Self-replication and scrapie. *Nature* *215*, 1043-1044.
- Guest, W., Silverman, J., Pokrishevsky, E., O'Neill, M., Grad, L., and Cashman, N. (2011). Generalization of the prion hypothesis to other neurodegenerative diseases: an imperfect fit. *J Toxicol Environ Health A* *74*, 1433-1459.
- Hassapoglidou, S., Diamandis, E.P., and Sutherland, D.J. (1993). Quantification of p53 protein in tumor cell lines, breast tissue extracts and serum with time-resolved immunofluorometry. *Oncogene* *8*, 1501-1509.
- 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.
- Huang, C.Y., Lu, T.Y., Bair, C.H., Chang, Y.S., Jwo, J.K., and Chang, W. (2008). A novel cellular protein, VPEF, facilitates vaccinia virus penetration into HeLa cells through fluid phase endocytosis. *J. Virol.* *82*, 7988-7999.
- Huang, L., Jin, R., Li, J., Luo, K., Huang, T., Wu, D., Wang, W., Chen, R., and Xiao, G. (2010). Macromolecular crowding converts the human recombinant PrPC to the soluble neurotoxic beta-oligomers. *FASEB J.* *24*, 3536-3543.
- Imran, M., and Mahmood, S. (2011). An overview of human prion diseases. *Virol. J.* *8*, 559.
- Ironside, J.W. (2012). Variant Creutzfeldt-Jakob disease: an update. *Folia Neuropathol.* *50*, 50-56.
- Ishimaru, D., Andrade, L.R., Teixeira, L.S., Quesado, P.A., Maiolino, L.M., Lopez, P.M., Cordeiro, Y., Costa, L.T., Heckl, W.M., Weissmuller, G., Foguel, D., and Silva, J.L. (2003). Fibrillar aggregates of the tumor suppressor p53 core domain. *Biochemistry* *42*, 9022-9027.

- Iversen, T.G., Frerker, N., and Sandvig, K. (2012). Uptake of ricinB-quantum dot nanoparticles by a macropinocytosis-like mechanism. *J. Nanobiotechnology* 10, 33.
- Kamada, R., Nomura, T., Anderson, C.W., and Sakaguchi, K. (2011). Cancer-associated p53 tetramerization domain mutants: quantitative analysis reveals a low threshold for tumor suppressor inactivation. *J. Biol. Chem.* 286, 252-258.
- Kerman, A., Liu, H.N., Croul, S., Bilbao, J., Rogaeva, E., Zinman, L., Robertson, J., and Chakrabarty, A. (2010). Amyotrophic lateral sclerosis is a non-amyloid disease in which extensive misfolding of SOD1 is unique to the familial form. *Acta Neuropathol.* 119, 335-344.
- Khan, S.H., and Kumar, R. (2009). An overview of the importance of conformational flexibility in gene regulation by the transcription factors. *J. Biophys.* 2009, 210485.
- Kopito, R. (2000). Aggresomes, inclusion bodies and protein aggregation. *Trends Cell Biol.* 10, 524-530.
- Lambert, M.P., Barlow, A.K., Chromy, B.A., Edwards, C., Freed, R., Liosatos, M., Morgan, T.E., Rozovsky, I., Trommer, B., Viola, K.L., *et al.* (1998). Diffusible, nonfibrillar ligands derived from Abeta1-42 are potent central nervous system neurotoxins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 6448-6453.
- Lasagna-Reeves, C.A., Castillo-Carranza, D.L., Sengupta, U., Guerrero-Munoz, M.J., Kiritoshi, T., Neugebauer, V., Jackson, G.R., and Kaye, R. (2012). Alzheimer brain-derived tau oligomers propagate pathology from endogenous tau. *Sci. Rep.* 2, 700.
- Lasmezas, C.I., Deslys, J.P., Demaimay, R., Adjou, K.T., Lamoury, F., Dormont, D., Robain, O., Ironside, J., and Hauw, J.J. (1996). BSE transmission to macaques. *Nature* 381, 743-744.
- Lee, A.S., Galea, C., DiGiammarino, E.L., Jun, B., Murti, G., Ribeiro, R.C., Zambetti, G., Schultz, C.P., and Kriwacki, R.W. (2003). Reversible amyloid formation by the p53 tetramerization domain and a cancer-associated mutant. *J. Mol. Biol.* 327, 699-709.
- Lee, H.J., Suk, J.E., Patrick, C., Bae, E.J., Cho, J.H., Rho, S., Hwang, D., Masliah, E., and Lee, S.J. (2010a). Direct transfer of alpha-synuclein from neuron to astroglia causes inflammatory responses in synucleinopathies. *J. Biol. Chem.* 285, 9262-9272.

- Lee, S.J., Desplats, P., Sigurdson, C., Tsigelny, I., and Masliah, E. (2010b). Cell-to-cell transmission of non-prion protein aggregates. *Nat. Rev. Neurol.* *6*, 702-706.
- Lee, S.Y., Jeong, E.K., Jeon, H.M., Kim, C.H., and Kang, H.S. (2010c). Implication of necrosis-linked p53 aggregation in acquired apoptotic resistance to 5-FU in MCF-7 multicellular tumour spheroids. *Oncol. Rep.* *24*, 73-79.
- Legname, G., Baskakov, I.V., Nguyen, H.O., Riesner, D., Cohen, F.E., DeArmond, S.J., and Prusiner, S.B. (2004). Synthetic mammalian prions. *Science* *305*, 673-676.
- Li, D., Marchenko, N.D., Schulz, R., Fischer, V., Velasco-Hernandez, T., Talos, F., and Moll, U.M. (2011). Functional inactivation of endogenous MDM2 and CHIP by HSP90 causes aberrant stabilization of mutant p53 in human cancer cells. *Mol. Cancer. Res.* *9*, 577-588.
- Li, J., Englund, E., Holton, J., Soulet, D., Hagell, P., Lees, A., Lashley, T., Quinn, N., Rehncrona, S., Björklund, A., *et al.* (2008). Lewy bodies in grafted neurons in subjects with Parkinson's disease suggest host-to-graft disease propagation. *Nat. Med.* *14*, 501-504.
- Li, Y., and Prives, C. (2007). Are interactions with p63 and p73 involved in mutant p53 gain of oncogenic function? *Oncogene* *26*, 2220-2225.
- Lianidou, E.S., Levesque, M.A., Katsaros, D., Angelopoulou, K., Yu, H., Genta, F., Arisio, R., Massobrio, M., Bharaj, B., and Diamandis, E.P. (1999). Immunofluorometric assay of p53 protein versus sequencing of p53 exons 5 to 9 for the detection of p53 abnormalities in ovarian carcinoma. *Anticancer Res.* *19*, 749-756.
- Liu, D., Song, H., and Xu, Y. (2010). A common gain of function of p53 cancer mutants in inducing genetic instability. *Oncogene* *29*, 949-956.
- Lodish, H., Berk, A., Mastudaira, P., Kaiser, C., Krieger, M., and Scott, M. (2005). *Biologie Moléculaire de la Cellule* (Bruxelles: De Boeck).
- Lohrum, M.A., Woods, D.B., Ludwig, R.L., Balint, E., and Vousden, K.H. (2001). C-terminal ubiquitination of p53 contributes to nuclear export. *Mol. Cell. Biol.* *21*, 8521-8532.
- Luhrs, T., Ritter, C., Adrian, M., Riek-Loher, D., Bohrmann, B., Dobeli, H., Schubert, D., and Riek, R. (2005). 3D structure of Alzheimer's amyloid-beta(1-42) fibrils. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 17342-17347.

- Luk, K.C., Song, C., O'Brien, P., Stieber, A., Branch, J.R., Brunden, K.R., Trojanowski, J.Q., and Lee, V.M. (2009). Exogenous alpha-synuclein fibrils seed the formation of Lewy body-like intracellular inclusions in cultured cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 20051-20056.
- Magalhaes, A.C., Baron, G.S., Lee, K.S., Steele-Mortimer, O., Dorward, D., Prado, M.A., and Caughey, B. (2005). Uptake and neuritic transport of scrapie prion protein coincident with infection of neuronal cells. *J. Neurosci.* *25*, 5207-5216.
- Magalhaes, A.C., Silva, J.A., Lee, K.S., Martins, V.R., Prado, V.F., Ferguson, S.S., Gomez, M.V., Brentani, R.R., and Prado, M.A. (2002). Endocytic intermediates involved with the intracellular trafficking of a fluorescent cellular prion protein. *J. Biol. Chem.* *277*, 33311-33318.
- Martin, O.C., and Pagano, R.E. (1994). Internalization and sorting of a fluorescent analogue of glucosylceramide to the Golgi apparatus of human skin fibroblasts: utilization of endocytic and nonendocytic transport mechanisms. *J. Cell Biol.* *125*, 769-781.
- Meacham, G.C., Patterson, C., Zhang, W., Younger, J.M., and Cyr, D.M. (2001). The Hsc70 co-chaperone CHIP targets immature CFTR for proteasomal degradation. *Nat. Cell Biol.* *3*, 100-105.
- Menendez, D., Inga, A., and Resnick, M.A. (2009). The expanding universe of p53 targets. *Nat. Rev. Cancer.* *9*, 724-737.
- Meyer-Luehmann, M., Coomaraswamy, J., Bolmont, T., Kaeser, S., Schaefer, C., Kilger, E., Neuenschwander, A., Abramowski, D., Frey, P., Jaton, A., *et al.* (2006). Exogenous induction of cerebral beta-amyloidogenesis is governed by agent and host. *Science*, *313*, 1781-1785.
- Miller, V.M., Nelson, R.F., Gouvion, C.M., Williams, A., Rodriguez-Lebron, E., Harper, S.Q., Davidson, B.L., Rebagliati, M.R., and Paulson, H.L. (2005). CHIP suppresses polyglutamine aggregation and toxicity in vitro and in vivo. *J. Neurosci.* *25*, 9152-9161.
- Moll, U.M., Ostermeyer, A.G., Haladay, R., Winkfield, B., Frazier, M., and Zambetti, G. (1996). Cytoplasmic sequestration of wild-type p53 protein impairs the G1 checkpoint after DNA damage. *Mol. Cell. Biol.* *16*, 1126-1137.
- Moll, U.M., Riou, G., and Levine, A.J. (1992). Two distinct mechanisms alter p53 in breast cancer: mutation and nuclear exclusion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *89*, 7262-7266.

- Morales, R., Duran-Aniotz, C., Castilla, J., Estrada, L.D., and Soto, C. (2011). De novo induction of amyloid-beta deposition in vivo. *Mol. Psychiatry*
- Moreno-Gonzalez, I., and Soto, C. (2011). Misfolded protein aggregates: mechanisms, structures and potential for disease transmission. *Semin. Cell Dev. Biol.* *22*, 482-487.
- Muller, P.A., Vousden, K.H., and Norman, J.C. (2011). P53 and its Mutants in Tumor Cell Migration and Invasion. *J. Cell Biol.* *192*, 209-218.
- Münch, C., O'Brien, J., and Bertolotti, A. (2011). Prion-like propagation of mutant superoxide dismutase-1 misfolding in neuronal cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 3548-3601.
- Naeem, A., and Fazili, N.A. (2011). Defective Protein Folding and Aggregation at the Basis of Neurodegenerative Diseases: The Darker Aspect of Proteins. *Cell Biochemistry and Biophysics* *61*, 237-250.
- Nagele, R.G., D'Andrea, M.R., Anderson, W.J., and Wang, H.Y. (2002). Intracellular accumulation of beta-amyloid(1-42) in neurons is facilitated by the alpha 7 nicotinic acetylcholine receptor in Alzheimer's disease. *Neuroscience* *110*, 199-211.
- Natan, E., Baloglu, C., Pagel, K., Freund, S.M., Morgner, N., Robinson, C.V., Fersht, A.R., and Joerger, A.C. (2011). Interaction of the p53 DNA-binding domain with its n-terminal extension modulates the stability of the p53 tetramer. *J. Mol. Biol.* *409*, 358-368.
- Neumann, M., Sampathu, D.M., Kwong, L.K., Truax, A.C., Micsenyi, M.C., Chou, T.T., Bruce, J., Schuck, T., Grossman, M., Clark, C.M., *et al.* (2006). Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science* *314*, 130-133.
- Novitskaya, V., Bocharova, O.V., Bronstein, I., and Baskakov, I.V. (2006). Amyloid fibrils of mammalian prion protein are highly toxic to cultured cells and primary neurons. *J. Biol. Chem.* *281*, 13828-13836.
- Ostermeyer, A.G., Runko, E., Winkfield, B., Ahn, B., and Moll, U.M. (1996). Cytoplasmically Sequestered Wild-Type p53 Protein in Neuroblastoma is Relocated to the Nucleus by a C-Terminal Peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A* *93*, 15190-15194.
- Peng, Y., Chen, L., Li, C., Lu, W., and Chen, J. (2001). Inhibition of MDM2 by hsp90 contributes to mutant p53 stabilization. *J. Biol. Chem.* *276*, 40583-40590.

- Pountney, D.L., Lowe, R., Quilty, M., Vickers, J.C., Voelcker, N.H., and Gai, W.P. (2004). Annular alpha-synuclein species from purified multiple system atrophy inclusions. *J. Neurochem.* *90*, 502-512.
- Prusiner, S.B. (1998). Prions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *95*, 13363-13383.
- Prusiner, S.B., and DeArmond, S.J. (1991). Molecular biology and pathology of scrapie and the prion diseases of humans. *Brain Pathol.* *1*, 297-310.
- Puoti, G., Bizzi, A., Forloni, G., Safar, J.G., Tagliavini, F., and Gambetti, P. (2012). Sporadic human prion diseases: molecular insights and diagnosis. *Lancet Neurol.* *11*, 618-628.
- Ren, P.H., Lauckner, J.J., Kachirskaja, I., Heuser, J.E., Melki, R., and Kopito, R.R. (2009). Cytoplasmic penetration and persistent infection of mammalian cells by polyglutamine aggregates. *Nat Cell Biol* *11*, 219-225.
- Rigacci, S., Bucciantini, M., Relini, A., Pesce, A., Gliozzi, A., Berti, A., and Stefani, M. (2008). The (1-63) Region of the p53 Transactivation Domain Aggregates In Vitro into cytotoxic Amyloid Assemblies. *Biophys J* *94*, 3635-3646.
- Robles, A.I., Linke, S.P., and Harris, C.C. (2002). The p53 network in lung carcinogenesis. *Oncogene* *21*, 6898-6907.
- Roostae, A., Cote, S., and Roucou, X. (2009). Aggregation and amyloid fibril formation induced by chemical dimerization of recombinant prion protein in physiological-like conditions *J Biol Chem* *284*, 30907-30916.
- Roucou, X., Giannopoulos, P.N., Zhang, Y., Jodoin, J., Goodyer, C.G., and Leblanc, A. (2005). Cellular prion protein inhibits proapoptotic Bax conformational change in human neurons and in breast carcinoma MCF-7 cells. *Cell Death Differ* *12*, 783-795.
- Rozemuller, A.J., Jansen, C., Carrano, A., van Haastert, E.S., Hondius, D., van der Vies, S.M., and Hoozemans, J.J. (2012). Neuroinflammation and common mechanism in Alzheimer's disease and prion amyloidosis: amyloid-associated proteins, neuroinflammation and neurofibrillary degeneration. *Neurodegener Dis.* *10*, 301-304.
- Safar, J.G., Kellings, K., Serban, A., Groth, D., Cleaver, J.E., Prusiner, S.B., and Riesner, D. (2005). Search for a prion-specific nucleic acid. *J. Virol.* *79*, 10796-10806.
- Sahara, N., Murayama, M., Mizoroki, T., Urushitani, M., Imai, Y., Takahashi, R., Murata, S., Tanaka, K., and Takashima, A. (2005). In vivo evidence of CHIP up-regulation attenuating tau aggregation. *J. Neurochem.* *94*, 1254-1263.

- Sallusto, F., Cella, M., Danieli, C., and Lanzavecchia, A. (1995). Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J. Exp. Med.* *182*, 389-400.
- Sandgren, K.J., Wilkinson, J., Miranda-Saksena, M., McInerney, G.M., Byth-Wilson, K., Robinson, P.J., and Cunningham, A.L. (2010). A differential role for macropinocytosis in mediating entry of the two forms of vaccinia virus into dendritic cells. *PLoS Pathog.* *6*, e1000866.
- Sasaki, M., Nie, L., and Maki, C.G. (2007). MDM2 binding induces a conformational change in p53 that is opposed by heat-shock protein 90 and precedes p53 proteasomal degradation. *J. Biol. Chem.* *282*, 14626-14634.
- Shimura, H., Schwartz, D., Gygi, S.P., and Kosik, K.S. (2004). CHIP-Hsc70 complex ubiquitinates phosphorylated tau and enhances cell survival. *J. Biol. Chem.* *279*, 4869-4876.
- Silva, J.L., Vieira, T.C., Gomes, M.P., Bom, A.P., Lima, L.M., 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. *AccChem Res* *43*, 271-279.
- Sipe, J.D., Benson, M.D., Buxbaum, J.N., Ikeda, S.I., Merlini, G., Saraiva, M.J., and Westermark, P. (2012). Amyloid fibril protein nomenclature: 2012 recommendations from the Nomenclature Committee of the International Society of Amyloidosis. *Amyloid*
- Smeenk, L., and Lohrum, M. (2010). Behind The Scenes: Unravelling the Molecular Mechanisms of p53 Target Gene Selectivity. *International Journal of Oncology* *37*, 1061-1070.
- Sonnichsen, B., De Renzis, S., Nielsen, E., Rietdorf, J., and Zerial, M. (2000). Distinct membrane domains on endosomes in the recycling pathway visualized by multicolor imaging of Rab4, Rab5, and Rab11. *J. Cell Biol.* *149*, 901-914.
- Soto, C. (2012). Transmissible proteins: expanding the prion heresy. *Cell* *149*, 968-977.
- Soto, C., Estrada, L., and Castilla, J. (2006). Amyloids, prions and the inherent infectious nature of misfolded protein aggregates. *Trends Biochem. Sci.* *31*, 150-155.
- Stefani, M. (2004). Protein misfolding and aggregation: new examples in medicine and biology of the dark side of the protein world. *Biochim. Biophys. Acta* *1739*, 5-25.

- Stohr, J., Watts, J.C., Mensinger, Z.L., Oehler, A., Grillo, S.K., DeArmond, S.J., Prusiner, S.B., and Giles, K. (2012). Purified and synthetic Alzheimer's amyloid beta (A β) prions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *109*, 11025-11030.
- 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.
- Swanson, J.A. (2008). Shaping cups into phagosomes and macropinosomes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *9*, 639-649.
- Tompa, P., Tusnady, G.E., Friedrich, P., and Simon, I. (2002). The role of dimerization in prion replication. *Biophys. J.* *82*, 1711-1718.
- Vetri, V., D'Amico, M., Fodera, V., Leone, M., Ponzoni, A., Sberveglieri, G., and Militello, V. (2011). Bovine Serum Albumin protofibril-like aggregates formation: solo but not simple mechanism. *Arch. Biochem. Biophys.* *508*, 13-24.
- Viegas, M.S., Martins, T.C., Seco, F., and do Carmo, A. (2007). An improved and cost-effective methodology for the reduction of autofluorescence in direct immunofluorescence studies on formalin-fixed paraffin-embedded tissues. *Eur. J. Histochem.* *51*, 59-66.
- Volles, M.J., and Lansbury, P.T., Jr. (2002). Vesicle permeabilization by protofibrillar alpha-synuclein is sensitive to Parkinson's disease-linked mutations and occurs by a pore-like mechanism. *Biochemistry* *41*, 4595-4602.
- von Bergen, M., Friedhoff, P., Biernat, J., Heberle, J., Mandelkow, E.M., and Mandelkow, E. (2000). Assembly of tau protein into Alzheimer paired helical filaments depends on a local sequence motif ((306)VQIVYK(311)) forming beta structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *97*, 5129-5134.
- Vousden, K.H., and Lu, X. (2002). Live or let die: the cell's response to p53. *Nat Rev Cancer* *2*, 594-604.
- Vousden, K., and Prives, C. (2009). Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53. *Cell* *137*, 413-431.
- Walerych, D., Kudla, G., Gutkowska, M., Wawrzynow, B., Muller, L., King, F.W., Helwak, A., Boros, J., Zylicz, A., and Zylicz, M. (2004). Hsp90 chaperones wild-type p53 tumor suppressor protein. *J. Biol. Chem.* *279*, 48836-48845.
- Wang, F., Wang, X., Yuan, C.G., and Ma, J. (2010). Generating a prion with bacterially expressed recombinant prion protein. *Science* *327*, 1132-1135.

- Weinberg, R.A. (2007). *The Biology of Cancer* (New York, NY, USA: Garland Science).
- Wessel, D., and Flugge, U.I. (1984). A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal. Biochem.* *138*, 141-143.
- Westergard, L., Christensen, H.M., and Harris, D.A. (2007). The cellular prion protein (PrP(C)): its physiological function and role in disease. *Biochim. Biophys. Acta* *1772*, 629-644.
- World Health Organization. (2012). Variant Creutzfeldt-Jakob disease. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs180/en/>
- Xu, J., Reumers, J., Couceiro, J., De Smet, F., Gallardo, R., Rudyak, S., Cornelis, A., Rozenski, J., Zwolinska, A., Marine, J., *et al.* (2011). Gain of function of mutant p53 by coaggregation with multiple tumor suppressors. *Nat Chem Biol* *7*, 285-295.
- Xu, X., Ma, Z., Wang, X., Xiao, Z.T., Li, Y., Xue, Z.H., and Wang, Y.H. (2012). Water's potential role: Insights from studies of the p53 core domain. *J Struct Biol* *177*, 358-366.
- Yoshimura, T. (1993). Monitoring Protein Conformational Changes during Membrane Fusion. *Methods Enzymol* *221*, 72-82.
- Zhang, B., Une, Y., Fu, X., Yan, J., Ge, F., Yao, J., Sawashita, J., Mori, M., Tomozawa, H., Kametani, F., and Higuchi, K. (2008). Fecal transmission of AA amyloidosis in the cheetah contributes to high incidence of disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 7263-7268.
- Ziemer, M.A., Mason, A., and Carlson, D.M. (1982). Cell-free translations of proline-rich protein mRNAs. *J. Biol. Chem.* *257*, 11176-11180.
- Zraika, S., Hull, R.L., Verchere, C.B., Clark, A., Potter, K.J., Fraser, P.E., Raleigh, D.P., and Kahn, S.E. (2010). Toxic oligomers and islet beta cell death: guilty by association or convicted by circumstantial evidence? *Diabetologia* *53*, 1046-1056.

ANNEXE

Matériel et méthodes supplémentaires

Figure 11

Des cellules HeLa ont étéensemencées au nombre de 20 000 cellule par puits dans des plaques 24 puits. Le lendemain, les cellules ont été incubées pendant 3 h avec 1 μM agrégats p53C-Dylight 647, 500 nM BODIPY® FLC₅ lactosylceramide (Invitrogen), 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ transferrin tetramethylrhodamine (Invitrogen), 7,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ cholera toxin subunit B Alexa Fluor 488 (Invitrogen) et 50 μM genistein, 5 μM chlorpromazine, 5 mM M β CD, 100 μM EIPA ou un volume équivalent de DMSO. Les cellules incubées avec BODIPY® FLC₅ lactosylceramide ont été lavées 6 x 10 min dans PBS 5% BSA sans acides gras (Sigma-Aldrich) (MARTIN et PAGANO, 1994).

Les cellules incubées avec transferrine tetramethylrhodamine ont été lavées dans 150 mM NaCl, 10 mM acide acétique, 0,1 M glycine, pH 3,5 afin d'éliminer les molécules de tranferrine liées à la surface extérieure des cellules (SONNICHSEN *et al.*, 2000).

Toutes les cellules ont ensuite été trypsinées et lavées en préparation pour le passage au trieur de cellules à fluorescence (FACS Aria, BD Biosciences). Un duplicata de 10 000 événements a été analysé.

Figure 12

Des cellules HeLa cells ont étéensemencées dans des plaques 24 puits et co-transfectées avec les plasmides rapporteurs PG13 ou MG15 (Addgene plasmides 16442 et 16443) (EL-DEIRY *et al.*, 1993), ainsi que p53GFP et pRLTK Renilla luciférase. Vingt-quatre heures après la transfection, les cellules ont été incubées avec le tampon ou 1 μM d'agrégats ou de monomères de p53

recombinant. L'activité luciférase a été mesurée à l'aide du système *Dual-Luciferase Reporter Assay* (Promega) et d'un luminomètre. L'activité transcriptionnelle de p53 a été calculée comme un ratio activité luciférase Firefly/activité luciférase Renilla. Les valeurs ont ensuite été rapportées sur la valeur obtenue pour les cellules PG13 dans agrégats pour chaque expérience.