



SARL TOXEM
UFR-ST
25, rue Philippe Lebon
BP540
76058 Le Havre cedex
Tél : 06 19 35 73 11
jerome.couteau@toxem.com

Étude HBN-3

FACIR

Functional Analysis of Chemicals Induce TP53 Restoration

DEMANDEUR:

HBN

Échantillons:

ADN Téloméractives[®]

Adresse du demandeur:

HBN
1 rue des Pénitents Blancs
31000 Toulouse

Étude réalisée par:

TOXEM
UFR-ST
25, rue Philipe Lebon
BP540
Le Havre 76058 cedex

Date de réception des Échantillons:

Début d'expérimentation:

23 novembre 2015

Fin d'expérimentation:

23 décembre 2015

FACIR

INTRODUCTION

Le but de cette expérimentation est de déterminer les capacités du produit *ADN téloméractives*[®] à jouer le rôle de « béquille moléculaire » vis-à-vis de différentes protéines TP53 non fonctionnelles.

Le gène suppresseur de tumeur *tp53* code pour une protéine de 53 KDa qui est un facteur de transcription régulant l'expression de nombreux gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire, la différenciation, l'apoptose et dans la réparation de l'ADN. Ainsi, la protéine TP53 est facteur essentiel dans l'équilibre entre division cellulaire et maintien de l'intégrité du génome.

La fréquence des mutations observées sur le gène *tp53* dans les cancers humains montre que son inactivation est un évènement génétique important vers la tumorigenèse. Il s'agit de l'altération génétique la plus fréquemment rencontrée chez l'Homme tout type de tumeurs confondues. En effet, le gène *tp53* est muté dans près de 50% des cancers humains.

Les mutations du gène *tp53* ont pour conséquences d'induire l'expression d'une protéine non fonctionnelle ayant perdu tout ou partie de son activité transcriptionnelle et ne pouvant donc plus jouer son rôle dans le maintien de l'intégrité du génome.

Il existe donc un réel intérêt à détecter la capacité qu'ont certaines molécules chimiques à se fixer sur la protéine TP53 et à lui redonner une structure tridimensionnelle lui permettant de se fixer sur les éléments de réponse des gènes dont elle doit induire l'expressions. Ce rôle de « béquille moléculaire » a été mis en évidence par Maurici *et al.* en 2001 pour l'Amifostine [1].

Dans cette étude, une souche de levure (organisme eucaryote) a été transformée avec des plasmides permettant l'expression de différents mutants thermosensibles ou non du gène *tp53*. Les souches ainsi obtenues ont été transfectées avec un plasmide contenant un système rapporteur permettant une expression constitutive de la RFP (fluorescence rouge) et une expression TP53 dépendante de la GFP (fluorescence verte). Ainsi par un simple rapport de la fluorescence verte / fluorescence rouge, il est possible de déterminer en temps réel la capacité d'une molécule chimique à rétablir la fonctionnalité d'une protéine TP53 mutée et donc son aptitude à se fixer sur un de ses élément de réponse.

[1] Amifostine (WR2721) restores transcriptional activity of specific p53 mutant proteins in a yeast functional assay. Maurici D, Monti P, Campomenosi P, North S, Frebourg T, Fronza G, Hainaut P. *Oncogene*. 2001 Jun 14;20(27):3533-40.

DESCRIPTION DU TEST

Les levures exprimant différents mutants de la protéine TP53 ont été exposées à deux concentrations de l'échantillon à tester et à un contrôle positif (Amifostine).

Les levures ont été incubées pendant 24h à 33°C (température à laquelle les mutants thermosensibles expriment une protéine TP53 mutante et donc non fonctionnelle) à deux concentrations du produit *ADN Téloméactives*[®]. Toutes les heures pendant 11 heures (cinétique courte) puis à 24h (cinétique longue), les fluorescences verte (GFP : excitation 470 nm, émission 508 nm) et rouge (RFP : excitation 532 nm, émission 588 nm) ont été mesurées. Les résultats sont présentés sous forme de graphiques représentant l'évolution du rapport de fluorescence vert/rouge. Un test statistique (test de *STUDENT*) a été réalisé pour déterminer les différences significatives par rapport au témoin négatif (levure + solvant). Les valeurs significativement différentes au risque 0,05 et 0,01 sont annotées d'astérisques (respectivement * et **).

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1.	Échantillons	
	Nom	• <i>ADN Téloméactives</i> [®]
	Description	• Comprimé brun
	Concentrations testées (mg/mL)	0,5 / 1 (3 réplicats par quantité testée)
2.	Substances témoins	
	Témoin négatif	Milieu minimum SD-HL
	Témoin positif	Amifostine, CAS number 112901-68-5 (Ethyol© 500 mg)
3.	Mutants TP53 utilisés	
	Mutant A159V	
	Mutant H214R	
	Mutant Y234C	
	Mutant I254N	
	Mutant V272G	
	Mutant R175H	

RÉSULTATS

Données brutes : Rapport de fluorescence GFP/RFP

Les tableaux 1 à 7 pages 5 à 8 représentent les rapports de fluorescence vert/rouge lors de l'incubation des souches de levures pendant 24h en présence ou non d'*ADN Téloméractives*[®] et du témoin positif (Amifostine).

Tableau 1: Données concernant le rapport de fluorescence GFP/RFP de la souche de levure transformée avec le gène *tp53* sauvage (WT) en présence ou non d'*ADN Téloméractives*[®] ou du témoin positif (Amifostine).

	WT			<i>ADN Téloméractives</i> [®] 0,5 g/L			<i>ADN Téloméractives</i> [®] 1 g/L			Amifostine 8mM		
0h	2,43	2,38	2,40	2,24	2,28	2,20	2,15	2,20	2,26	2,39	2,45	2,42
1h	2,30	2,30	2,36	2,17	2,19	2,21	2,13	2,17	2,20	2,31	2,29	2,28
2h	2,26	2,17	2,26	2,03	2,00	2,12	2,05	2,06	2,18	2,11	2,17	2,24
3h	2,19	2,22	2,25	2,11	2,12	2,17	2,05	2,09	2,15	2,19	2,20	2,23
4h	2,10	2,13	2,20	2,02	2,03	2,20	2,04	2,10	2,22	2,16	2,17	2,35
5h	2,36	2,32	2,33	2,16	2,15	2,21	2,08	2,13	2,22	2,18	2,20	2,25
6h	2,46	2,39	2,41	2,07	2,09	2,24	2,10	2,15	2,28	2,04	2,05	2,09
7h	2,43	2,49	2,56	2,14	2,16	2,23	2,15	2,14	2,24	1,98	2,01	2,09
8h	2,43	2,39	2,46	2,08	2,11	2,24	2,14	2,20	2,33	2,00	2,05	2,10
9h	2,49	2,51	2,56	2,14	2,16	2,21	2,14	2,16	2,24	1,97	1,99	2,07
10h	2,42	2,43	2,46	2,04	2,08	2,28	2,15	2,25	2,39	2,04	2,09	2,07
11h	2,56	2,55	2,59	2,13	2,15	2,20	2,13	2,17	2,25	1,97	1,97	2,04
24h	3,67	3,19	2,93	2,04	2,04	1,99	2,04	2,06	2,01	1,94	1,95	1,92

Tableau 2: Données concernant le rapport de fluorescence GFP/RFP de la souche de levure transformée avec le gène *tp53* muté au niveau du codon 159 (MT 159) en présence ou non d'*ADN Téloméractives*[®] ou du témoin positif (Amifostine).

	WT			<i>ADN Téloméractives</i> [®] 0,5 g/L			<i>ADN Téloméractives</i> [®] 1 g/L			Amifostine 8mM		
0h	2,22	2,17	2,20	2,16	2,15	2,19	2,14	2,11	2,08	2,21	2,21	2,17
1h	2,21	2,25	2,22	2,11	2,10	2,04	2,09	2,07	2,07	2,15	2,18	2,17
2h	2,18	2,17	2,14	2,15	2,12	2,13	2,08	2,12	2,12	2,17	2,12	2,16
3h	2,21	2,16	2,20	2,09	2,16	2,09	2,12	2,10	2,11	2,13	2,14	2,22
4h	2,19	2,16	2,17	2,03	2,14	2,14	2,11	2,09	2,09	2,08	2,16	2,22
5h	2,07	2,13	2,14	2,07	2,04	2,03	2,02	2,05	2,06	2,12	2,18	2,16
6h	1,94	2,04	2,03	1,98	2,02	2,00	2,02	2,03	2,04	2,16	2,22	2,21
7h	2,00	1,94	1,95	2,01	1,99	1,99	2,01	1,98	1,97	2,24	2,18	2,15
8h	2,04	1,93	1,96	1,98	1,97	1,99	2,01	1,99	1,99	2,26	2,20	2,21
9h	2,05	2,01	2,02	1,92	1,95	1,98	2,00	1,98	1,97	2,31	2,24	2,26
10h	2,02	2,01	2,01	2,01	1,99	2,01	2,00	1,98	1,97	2,35	2,31	2,31
11h	2,05	2,05	2,07	1,97	1,95	1,99	1,98	2,00	2,01	2,45	2,38	2,37
24h	1,58	1,60	1,75	1,68	1,69	1,81	1,48	1,57	1,73	2,28	2,29	2,39

Tableau 3: Données concernant le rapport de fluorescence GFP/RFP de la souche de levure transformée avec le gène *tp53* muté au niveau du codon 175 (MT 175) en présence ou non d'ADN Téloméactives® ou du témoin positif (Amifostine).

	WT			ADN Téloméactives® 0,5 g/L			ADN Téloméactives® 1 g/L			Amifostine 8mM		
0h	1,02	0,95	1,03	1,02	0,98	0,96	1,00	1,04	1,04	0,98	0,93	0,96
1h	1,04	0,98	1,06	1,05	1,01	1,02	1,07	1,07	1,08	0,95	0,95	0,97
2h	0,96	0,92	0,97	0,99	0,96	0,94	1,01	0,98	0,97	0,85	0,86	0,87
3h	0,98	0,92	0,94	0,94	0,91	0,88	0,97	0,96	0,93	0,80	0,81	0,82
4h	0,87	0,82	0,87	0,86	0,85	0,78	0,84	0,86	0,81	0,69	0,69	0,69
5h	0,73	0,73	0,66	0,72	0,71	0,69	0,75	0,76	0,74	0,63	0,63	0,62
6h	0,60	0,60	0,58	0,60	0,60	0,58	0,61	0,62	0,60	0,56	0,58	0,54
7h	0,58	0,56	0,57	0,57	0,56	0,53	0,58	0,59	0,55	0,54	0,54	0,51
8h	0,52	0,48	0,52	0,51	0,52	0,48	0,49	0,51	0,48	0,49	0,51	0,48
9h	0,48	0,44	0,48	0,48	0,46	0,44	0,46	0,46	0,42	0,46	0,47	0,45
10h	0,43	0,47	0,46	0,42	0,43	0,40	0,38	0,38	0,37	0,44	0,46	0,42
11h	0,40	0,46	0,44	0,40	0,39	0,36	0,38	0,37	0,35	0,42	0,42	0,41
24h	0,18	0,16	0,26	0,18	0,16	0,14	0,17	0,15	0,16	0,25	0,25	0,21

Tableau 4: Données concernant le rapport de fluorescence GFP/RFP de la souche de levure transformée avec le gène *tp53* muté au niveau du codon 214 (MT 214) en présence ou non d'ADN Téloméactives® ou du témoin positif (Amifostine).

	WT			ADN Téloméactives® 0,5 g/L			ADN Téloméactives® 1 g/L			Amifostine 8mM		
0h	2,26	2,21	2,14	2,19	2,16	2,16	2,14	2,09	2,12	2,21	2,22	2,18
1h	2,22	2,23	2,24	2,17	2,17	2,12	2,15	2,12	2,13	2,21	2,22	2,19
2h	2,21	2,17	2,20	2,15	2,10	2,10	2,15	2,12	2,10	2,17	2,15	2,18
3h	2,14	2,14	2,17	2,11	2,17	2,11	2,11	2,13	2,10	2,12	2,16	2,18
4h	2,10	2,11	2,09	2,07	2,02	2,01	2,07	2,07	2,08	2,12	2,14	2,16
5h	2,12	2,06	2,07	2,10	2,05	2,07	2,06	2,05	2,07	2,09	2,10	2,13
6h	1,98	1,98	2,09	1,95	2,00	1,99	1,98	2,01	2,04	2,03	2,06	2,10
7h	1,98	1,99	1,98	1,94	1,92	1,93	1,96	1,96	1,92	2,04	2,12	2,06
8h	1,95	1,95	1,95	1,94	1,93	1,91	1,92	1,94	1,91	2,07	2,10	2,07
9h	2,01	1,94	1,97	1,90	1,86	1,88	1,88	1,85	1,87	2,08	2,11	2,09
10h	1,92	1,95	1,98	1,83	1,85	1,81	1,82	1,85	1,87	2,08	2,13	2,13
11h	1,90	1,90	1,98	1,80	1,80	1,78	1,81	1,82	1,83	2,08	2,09	2,10
24h	1,47	1,46	1,54	1,34	1,37	1,45	1,22	1,30	1,40	1,83	1,98	2,03

Tableau 5: Données concernant le rapport de fluorescence GFP/RFP de la souche de levure transformée avec le gène *tp53* muté au niveau du codon 234 (MT 234) en présence ou non d'ADN Téloméactives® ou du témoin positif (Amifostine).

	WT			ADN Téloméactives® 0,5 g/L			ADN Téloméactives® 1 g/L			Amifostine 8mM		
0h	2,90	2,88	2,96	2,67	2,73	2,74	2,57	2,60	2,60	2,85	2,81	2,96
1h	2,91	2,97	2,93	2,59	2,62	2,71	2,51	2,59	2,65	2,95	2,81	2,91
2h	2,88	2,93	2,93	2,64	2,64	2,71	2,51	2,60	2,68	2,86	2,90	2,93
3h	2,96	2,94	2,95	2,68	2,64	2,76	2,60	2,64	2,74	2,89	2,85	2,92
4h	2,93	2,95	2,93	2,66	2,70	2,81	2,57	2,69	2,75	2,89	2,93	3,01
5h	2,94	2,96	2,96	2,81	2,75	2,86	2,68	2,74	2,80	2,94	3,03	3,06
6h	2,75	2,89	2,99	2,83	2,87	2,85	2,72	2,80	2,77	3,02	2,98	2,96
7h	2,88	3,01	2,94	2,79	2,79	2,91	2,74	2,86	3,00	3,01	3,07	3,14
8h	2,95	2,96	2,99	2,81	2,86	2,99	2,75	2,89	3,01	3,09	3,16	3,19
9h	2,95	2,98	3,05	2,95	2,93	3,02	2,84	2,94	3,10	3,19	3,28	3,32
10h	3,04	3,09	3,08	2,96	3,06	3,16	2,92	3,08	3,20	3,28	3,35	3,36
11h	3,05	3,13	3,14	2,97	3,01	3,23	3,01	3,17	3,40	3,37	3,39	3,45
24h	3,24	3,66	3,71	3,78	3,89	3,95	3,92	4,13	3,80	4,14	4,24	3,94

Tableau 6: Données concernant le rapport de fluorescence GFP/RFP de la souche de levure transformée avec le gène *tp53* muté au niveau du codon 254 (MT 254) en présence ou non d'ADN Téloméactives® ou du témoin positif (Amifostine).

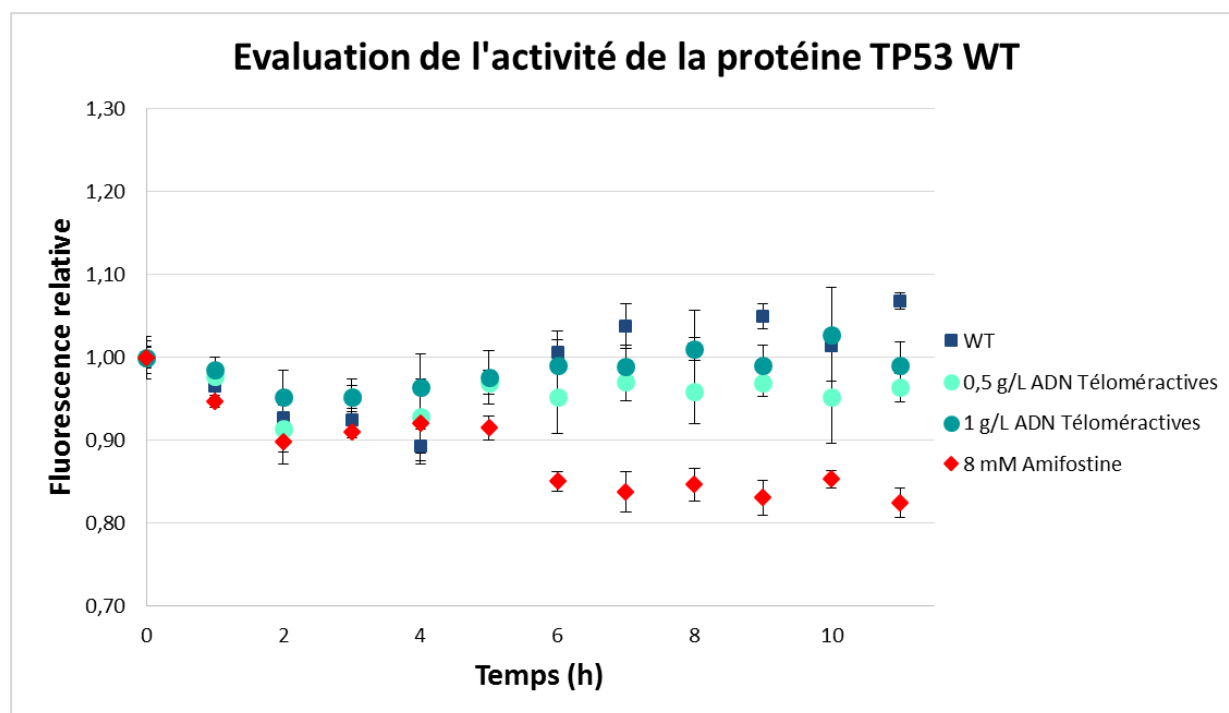
	WT			ADN Téloméactives® 0,5 g/L			ADN Téloméactives® 1 g/L			Amifostine 8mM		
0h	2,23	2,19	2,19	2,19	2,12	2,11	2,15	2,10	2,10	2,20	2,22	2,24
1h	2,17	2,14	2,26	2,08	2,00	2,00	2,05	2,10	1,96	2,07	2,17	2,08
2h	2,08	2,10	2,13	2,02	2,02	2,04	2,05	2,11	2,00	2,05	2,13	2,05
3h	1,96	1,94	1,87	1,92	1,85	1,80	1,89	1,88	1,88	1,92	1,98	1,93
4h	1,79	1,81	1,85	1,79	1,82	1,82	1,84	1,88	1,86	1,78	1,87	1,81
5h	1,62	1,54	1,58	1,63	1,54	1,56	1,64	1,64	1,63	1,62	1,71	1,68
6h	1,57	1,57	1,60	1,50	1,54	1,58	1,56	1,60	1,63	1,54	1,65	1,62
7h	1,47	1,47	1,41	1,37	1,33	1,34	1,38	1,39	1,40	1,43	1,50	1,49
8h	1,43	1,47	1,51	1,30	1,33	1,36	1,34	1,40	1,40	1,41	1,50	1,50
9h	1,34	1,29	1,32	1,16	1,14	1,17	1,18	1,18	1,21	1,35	1,39	1,39
10h	1,32	1,37	1,42	1,11	1,17	1,23	1,12	1,20	1,25	1,29	1,39	1,41
11h	1,23	1,20	1,25	1,03	1,02	1,04	1,03	1,05	1,06	1,26	1,29	1,30
24h	0,79	0,84	0,92	0,68	0,79	0,89	0,64	0,85	0,98	0,89	1,02	1,08

Tableau 7: Données concernant le rapport de fluorescence GFP/RFP de la souche de levure transformée avec le gène *tp53* muté au niveau du codon 272 (MT 272) en présence ou non d'ADN Téloméactives® ou du témoin positif (Amifostine).

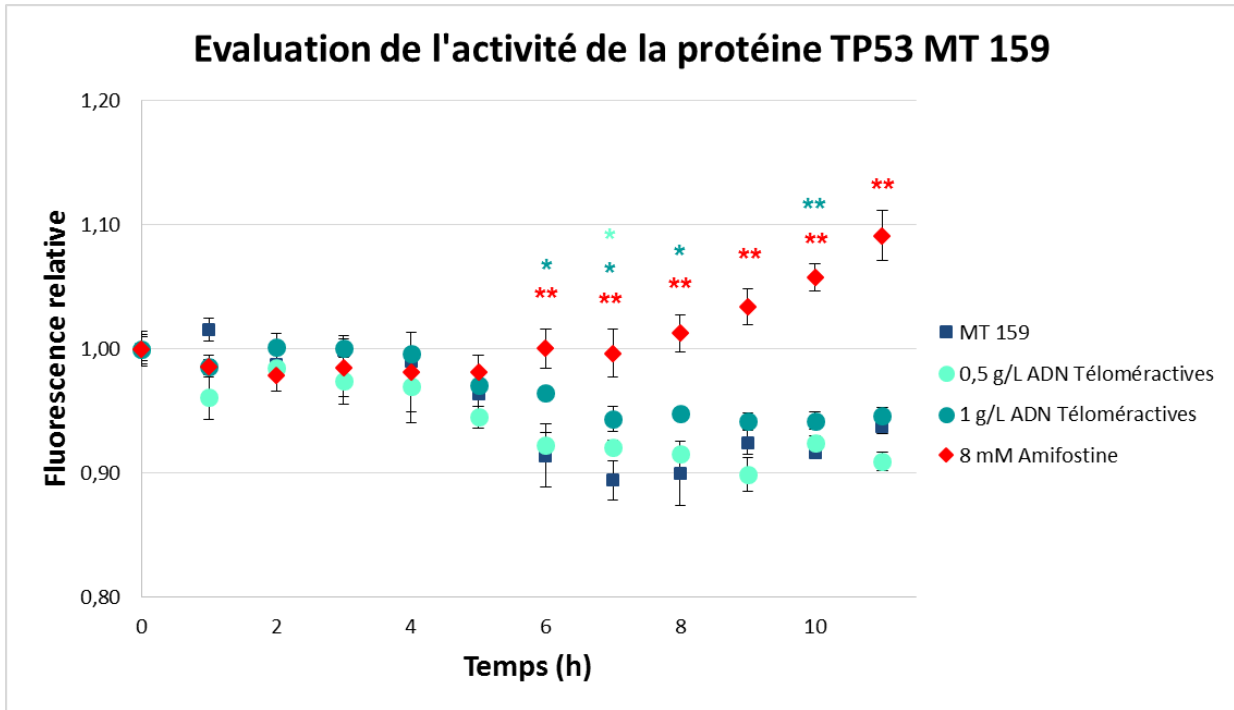
	WT			ADN Téloméactives® 0,5 g/L			ADN Téloméactives® 1 g/L			Amifostine 8mM		
0h	2,57	2,54	2,56	2,40	2,47	2,46	2,38	2,38	2,41	2,58	2,55	2,59
1h	2,45	2,50	2,62	2,41	2,34	2,42	2,32	2,29	2,39	2,59	2,59	2,49
2h	2,46	2,49	2,47	2,44	2,42	2,46	2,35	2,35	2,43	2,54	2,50	2,46
3h	2,37	2,38	2,44	2,25	2,28	2,34	2,25	2,33	2,34	2,44	2,48	2,46
4h	2,38	2,40	2,37	2,29	2,31	2,36	2,29	2,35	2,31	2,38	2,47	2,43
5h	2,29	2,22	2,23	2,07	2,13	2,27	2,18	2,23	2,22	2,42	2,38	2,44
6h	2,27	2,21	2,21	2,18	2,17	2,17	2,18	2,20	2,20	2,37	2,35	2,35
7h	2,08	2,15	2,22	1,99	2,03	2,14	2,06	2,13	2,09	2,31	2,27	2,35
8h	2,14	2,12	2,13	2,07	2,09	2,08	2,13	2,13	2,07	2,27	2,27	2,20
9h	1,98	1,94	1,96	1,87	1,91	2,03	1,92	2,01	1,99	2,24	2,28	2,22
10h	1,98	1,99	1,94	1,95	1,96	1,92	1,97	1,97	1,96	2,18	2,17	2,19
11h	1,81	1,83	1,81	1,74	1,75	1,89	1,80	1,88	1,85	2,19	2,20	2,14
24h	1,28	1,32	1,35	1,41	1,45	1,44	1,44	1,41	1,46	1,73	1,71	1,72

GRAPHIQUES

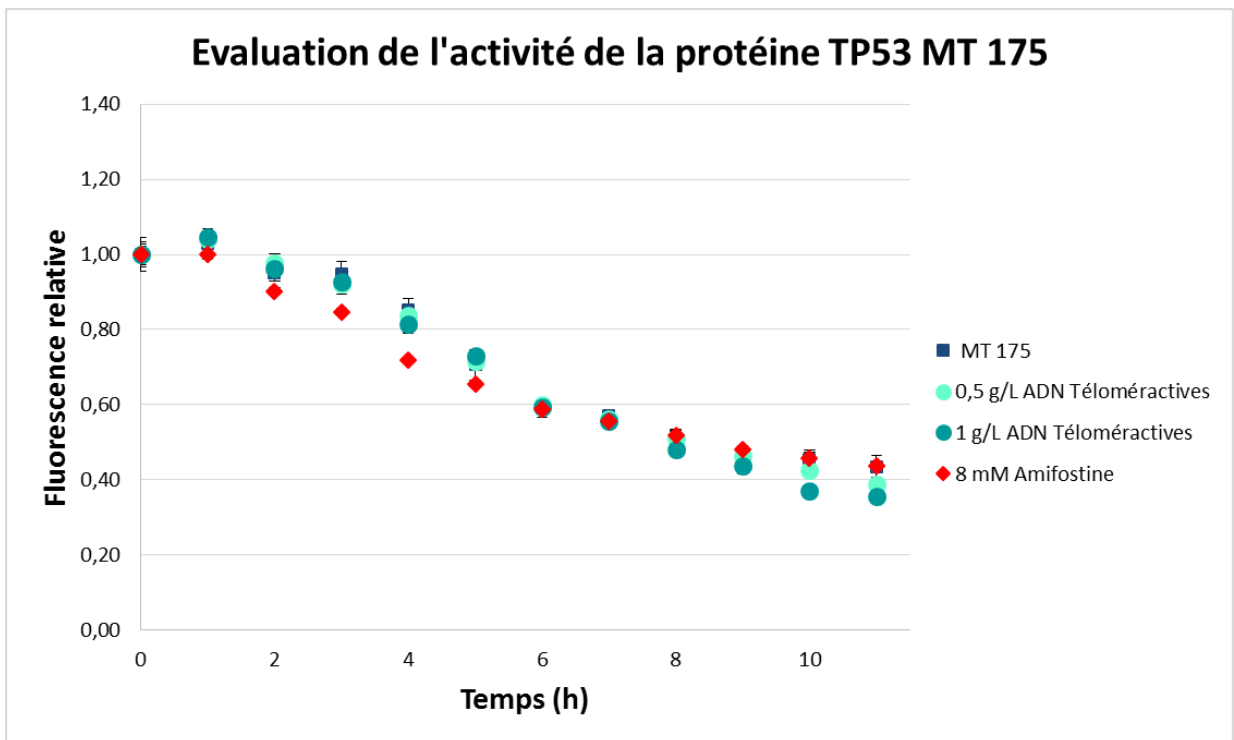
Les graphiques 1 à 7 pages 8 à 11 représentent la fluorescence relative au contrôle à t=0h observée lors de l'incubation des souches de levures pendant 11h (cinétique courte) en présence ou non d'ADN Téloméactives® et du témoin positif (Amifostine).



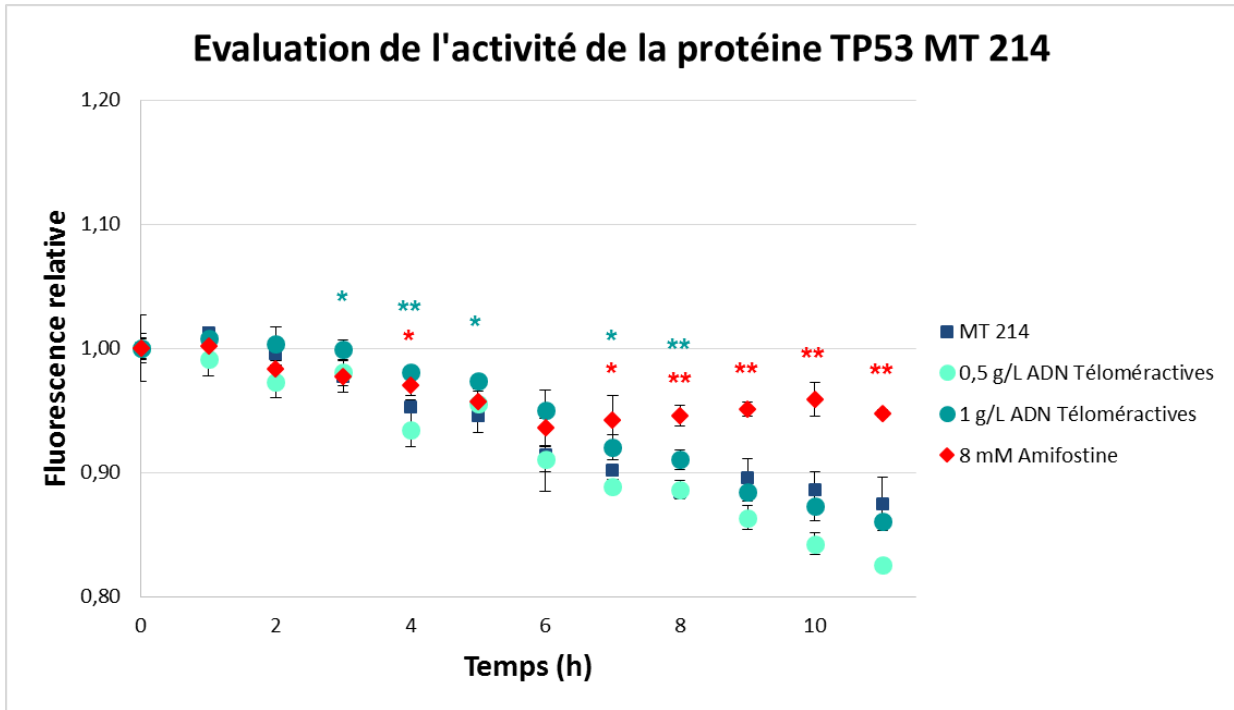
Graphique 1: Fluorescence relative à l'activité de la protéine TP53 de la souche sauvage en fonction du temps avec ou sans d'ADN Téloméactives® ou d'Amifostine. Les valeurs statistiquement différentes du contrôle à t=0h sont marquées d'une * ($p < 0,05$) ou de ** ($p < 0,01$).



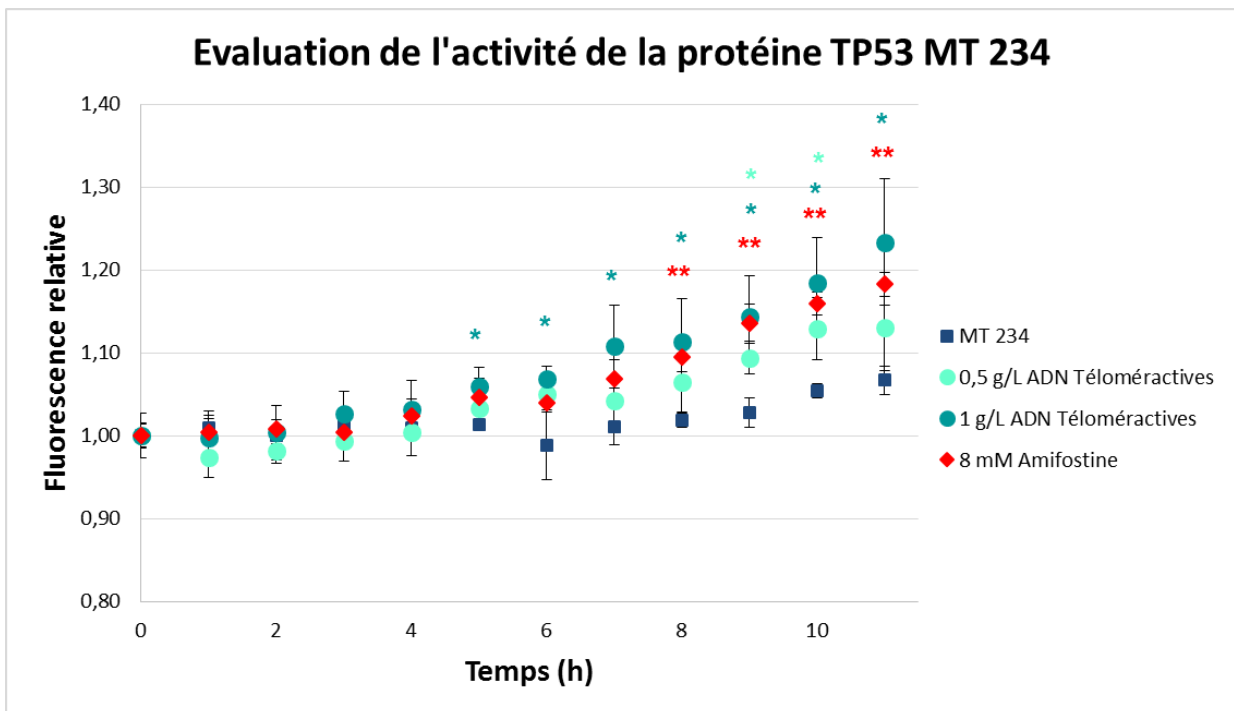
Graphique 2: Fluorescence relative à l'activité de la protéine TP53 de la souche mutée MT 159 en fonction du temps avec ou sans d'ADN Téloméractives® ou d'Amifostine. Les valeurs statistiquement différentes du contrôle à t=0h sont marquées d'une * (p<0,05) ou de ** (p<0,01).



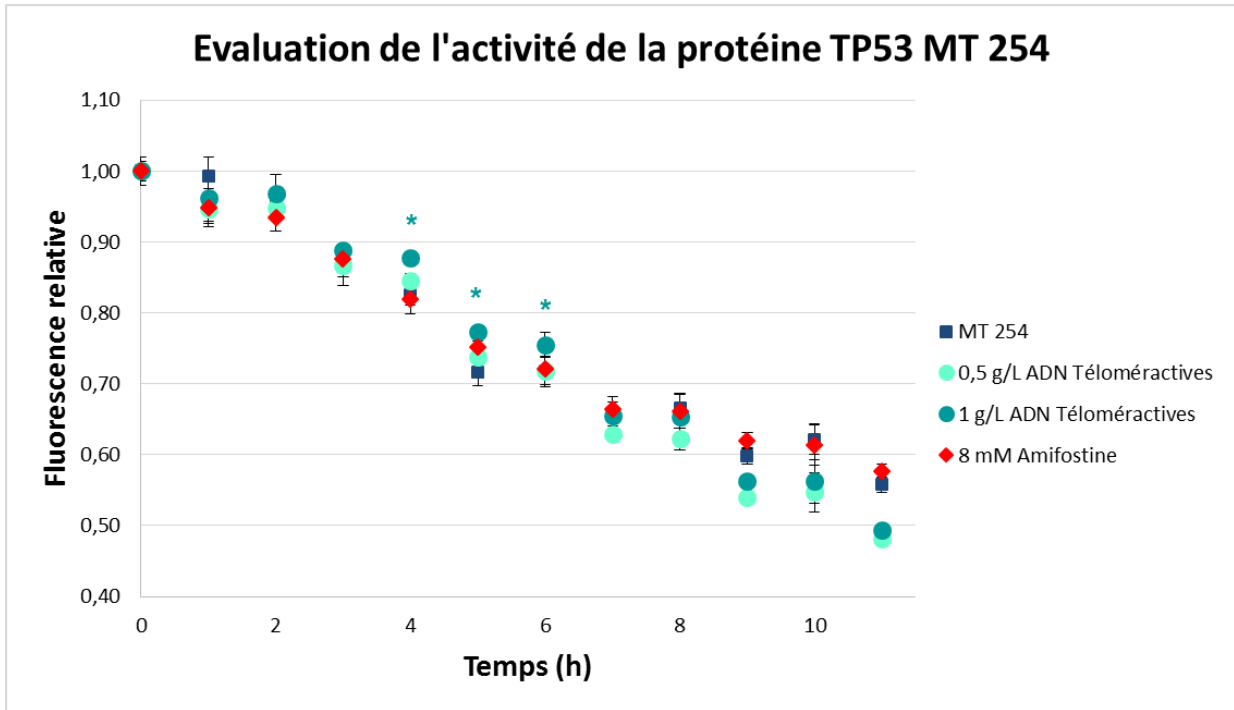
Graphique 3: Fluorescence relative à l'activité de la protéine TP53 de la souche mutée MT 175 en fonction du temps avec ou sans d'ADN Téloméractives® ou d'Amifostine. Les valeurs statistiquement différentes du contrôle à t=0h sont marquées d'une * (p<0,05) ou de ** (p<0,01).



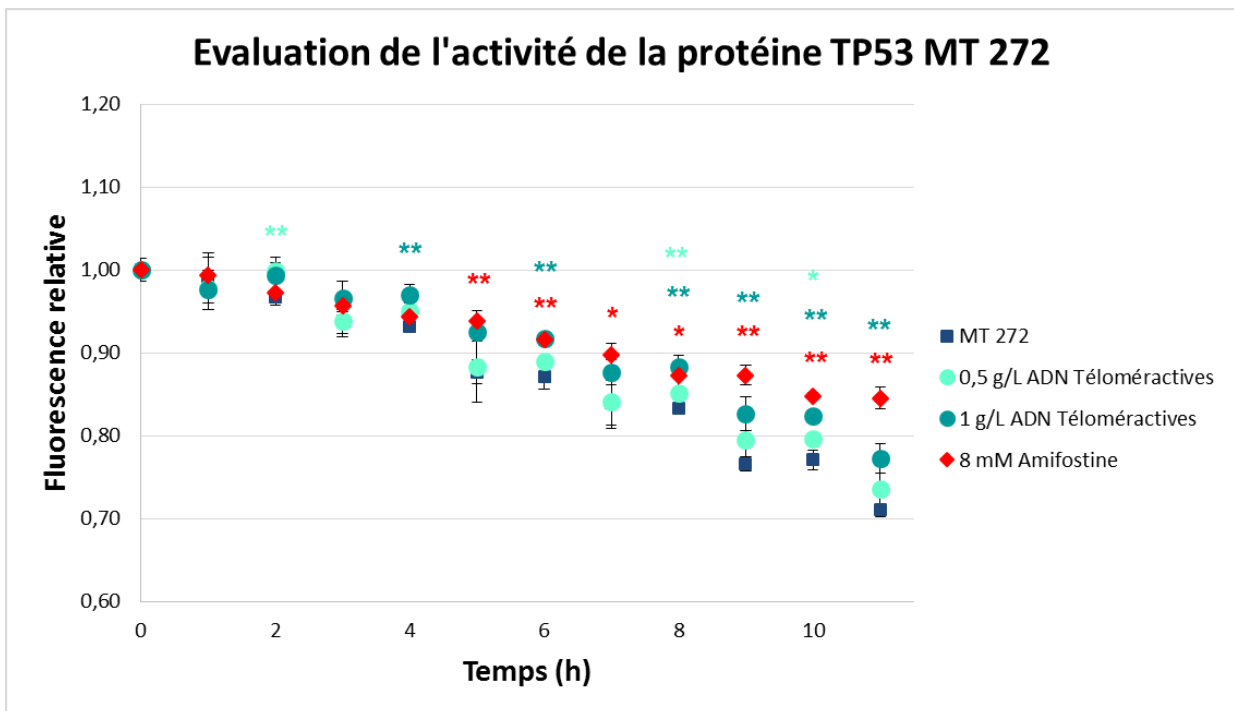
Graphique 4: Fluorescence relative à l'activité de la protéine TP53 de la souche mutée MT 214 en fonction du temps avec ou sans d'ADN Téloméreactives® ou d'Amifostine. Les valeurs statistiquement différentes du contrôle à t=0h sont marquées d'une * (p<0,05) ou de ** (p<0,01).



Graphique 5: Fluorescence relative à l'activité de la protéine TP53 de la souche mutée MT 234 en fonction du temps avec ou sans d'ADN Téloméreactives® ou d'Amifostine. Les valeurs statistiquement différentes du contrôle à t=0h sont marquées d'une * (p<0,05) ou de ** (p<0,01).

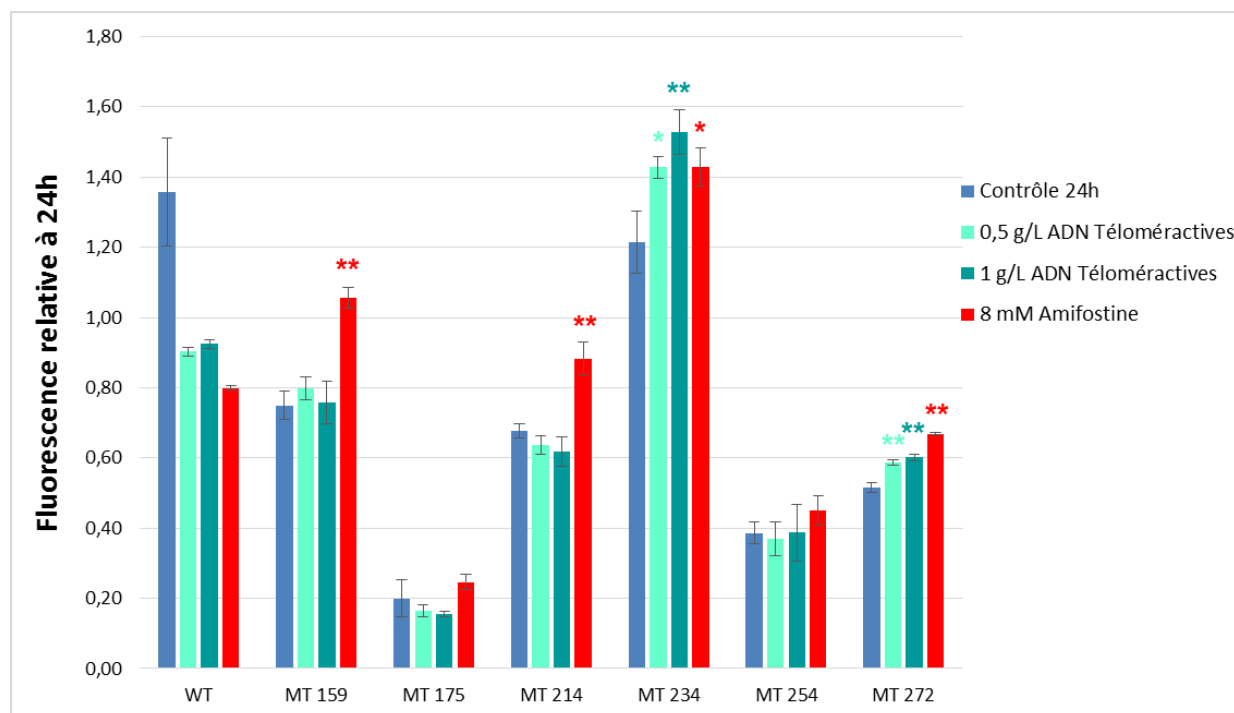


Graphique 6: Fluorescence relative à l'activité de la protéine TP53 de la souche mutée MT 254 en fonction du temps avec ou sans d'ADN Téloméreactives® ou d'Amifostine. Les valeurs statistiquement différentes du contrôle à t=0h sont marquées d'une * ($p < 0,05$) ou de ** ($p < 0,01$).



Graphique 7: Fluorescence relative à l'activité de la protéine TP53 de la souche mutée MT 272 en fonction du temps avec ou sans d'ADN Téloméreactives® ou d'Amifostine. Les valeurs statistiquement différentes du contrôle à t=0h sont marquées d'une * ($p < 0,05$) ou de ** ($p < 0,01$).

Le graphique 8 page 12 représente la fluorescence relative au contrôle t=0h des différentes souches testées en présence ou non d'*ADN Téloméreactives*[®] ou d'Amifostine après 24h d'incubation (cinétique longue).



Graphique 8: Fluorescence relative à l'activité de la protéine TP53 des différentes souches testées après 24h d'incubation avec ou sans d'*ADN Téloméreactives*[®] ou d'Amifostine. Les valeurs statistiquement différentes du contrôle sans molécule test sont marquées d'une * ($p < 0,05$) ou de ** ($p < 0,01$).

CONCLUSION

Les résultats montrent une capacité dose dépendante du produit *ADN Téloméreactives*[®] à restaurer de manière transitoire l'activité transcriptionnelle des protéines TP53 mutantes **MT 159** (entre 6h et 8h) et **MT 214** (jusqu'à 8 heures).

On observe également une capacité dose dépendante du produit *ADN Téloméreactives*[®] à restaurer à plus long terme (24 heures) et toujours de façon dose dépendante l'activité transcriptionnelle des protéines TP53 mutantes **MT 272** et **MT 2342**. En effet, l'activité de la protéine **TP53 MT 272** augmente statistiquement à partir de 6h jusqu'à atteindre à 24h **13,5%** avec 0,5 g/L et **15,4%** avec 1 g/L d'*ADN Téloméreactives*[®] de plus que le contrôle négatif. De la même manière, l'activité de la protéine **TP53 MT 234** augmente statistiquement à partir de 5 heures d'incubation jusqu'à atteindre à 24h **18%** (avec 0,5 g/L d'*ADN Téloméreactives*[®]) et

26,4% (avec 1 g/L d'*ADN Téloméreactives*[®]) de plus que le contrôle négatif soit pour cette dernière concentration **7% de plus que l'Amifostine**.

Le produit *ADN Téloméreactives*[®] est donc capable sur certaines protéines TP53 mutées de restaurer de façon partielle une activité transcriptionnelle. Cette restauration permet potentiellement à la protéine mutée de jouer un rôle important dans le maintien de l'intégrité du génome (réparation de l'ADN, apoptose, régulation du cycle cellulaire) et donc dans la prévention de la transformation tumorale.