



**HAL**  
open science

# Implication de la protéine suppresseur de tumeurs p53 dans la mort cellulaire induite par les lymphocytes T cytotoxiques et les cellules NK : rôle dans la régulation de l'apoptose dépendante du granzyme B

Thouraya Saadoun Ben Safta

► **To cite this version:**

Thouraya Saadoun Ben Safta. Implication de la protéine suppresseur de tumeurs p53 dans la mort cellulaire induite par les lymphocytes T cytotoxiques et les cellules NK : rôle dans la régulation de l'apoptose dépendante du granzyme B. Cancer. Université Paris Saclay (COMUE), 2017. Français. NNT : 2017SACLS162 . tel-01580315

**HAL Id: tel-01580315**

**<https://theses.hal.science/tel-01580315v1>**

Submitted on 1 Sep 2017

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

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

NTT: 2017SACLS162

THESE DE DOCTORAT  
DE  
L'UNIVERSITE PARIS-SACLAY  
PREPAREE A

**INSERM UMR 1186, GUSTAVE ROUSSY**

ÉCOLE DOCTORALE N°582  
Cancérologie : biologie - médecine - santé (CBMS)

Spécialité: Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Présentée par:

**Mme Thouraya BEN SAFTA–SAADOUN**

**Implication de la protéine suppresseur de tumeurs p53 dans la mort cellulaire induite par les lymphocytes T cytotoxiques et les cellules NK : rôle dans la régulation de l'apoptose dépendante du granzyme B**

Thèse présentée et soutenue à **Gustave Roussy** à Villejuif, le **30 juin 2017**

**Composition du Jury :**

Pr. Eric SOLARY	Gustave Roussy, Villejuif	Président
Dr. Armand BENSUSSAN	Hôpital St Louis, Paris	Rapporteur
Dr. Robin FAHRAEUS	Hôpital St Louis, Paris	Rapporteur
Dr. Jacques BERTOGLIO	Gustave Roussy, Villejuif	Examineur
Dr. Denis MARTINVALET	Université de Genève	Examineur
Dr. Salem CHOUAIB	Gustave Roussy, Villejuif	Co-Directeur de thèse
Dr. Jérôme THIERY	Gustave Roussy, Villejuif	Co-Directeur de thèse









*Je dédie ce manuscrit aux personnes à qui je dois le plus,  
à mes chers parents Hayet et Zoubeir  
à mon cher époux Omar*



## Remerciements

*J'aimerais tout d'abord remercier le Dr Armand Bensussan, et le Dr Robin Fahraeus d'avoir pris le temps de relire mon travail de thèse et d'accepter d'en être rapporteurs. Je tiens à remercier le professeur Eric SOLARY de m'avoir fait l'honneur de présider ce jury. Je remercie également le Dr Jacques Bertoglio ainsi que le Dr Denis Martinvalet pour leur participation en qualité d'examineurs. J'adresse ma sincère reconnaissance à tous les membres du jury d'avoir accepté d'assister à la présentation de ce travail, particulièrement à monsieur Martinvalet qui s'est déplacé depuis Genève.*

*Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à mes chers directeurs de thèse le Dr Salem Chouaib et le Dr Jérôme Thiery pour la confiance qu'ils ont pu m'accorder durant ces années. Je remercie Salem de m'avoir intégré dans son équipe, d'avoir cru en moi d'avoir toujours suivis de près mon travail malgré les charges dues à ses différentes responsabilités. Je tiens à remercier chaleureusement Jérôme, sans qui ce travail n'aurait pas été possible. Je le remercie pour sa rigueur, sa patience, son aide constante et omniprésente, pour son soutien, ses encouragements, ses précieux conseils ainsi que de m'avoir permis de forger mon esprit critique et d'acquérir une certaine autonomie dans mon travail.*

*Je remercie notre directrice d'unité Fathia Mami-Chouaib pour sa positivité, sa bonne humeur et ses bons conseils. Je souhaite également remercier mes charmants co-bureaux: Merci Gwendoline Gros pour beaucoup de choses mais surtout pour nos délicieux moments de gourmandise dans le bureau. Merci Dr Stéphane Terry pour tout ce que j'ai pu apprendre à tes côtés pour ta générosité intellectuelle ainsi que pour curiosité scientifique qui poussent la réflexion jusqu'à l'infini. Je remercie également du fond du cœur ma dernière co-bureau / co-thésarde / co-auteur, celle qui m'a accompagné tous les jours pendant ma thèse comme une binôme: Linda Ziani. Merci d'avoir quasi tout partagé avec moi pour ton aide si précieuse tant pour la technique que pour le raisonnement scientifique, je te souhaite le meilleur pour l'avenir.*

*Je remercie particulièrement les "filles de Fathia" : Marine Leclerc, Ludiane Gauthier, Ines Malenica et le Dr Stéphanie Cognac pour leur bonne humeur contagieuse et leurs précieux conseils, je leur souhaite le meilleur pour la suite.*

*Je pense aussi à tous les chercheurs, les post-docs et les doctorants du laboratoire qui contribuent à rendre l'unité U1186 un si agréable lieu de travail. Merci au Dr Sophie Couvé, au Dr Sophie Gad, et au Dr Mehdi Khaled pour nos discussions enrichissantes, vos remarques toujours positives et pertinentes. Merci au Dr Jean-Henri Bourhis, au Dr Vinhod Vinodh Rajagopalan, Abderemane Abdou, Stéphanie Buart, Aurelie Durgeau ainsi qu' à Alice Nordlinger. Je souhaite aussi remercier l'agréable et indispensable à l'unité Christine Leroy pour sa patience, sa disponibilité, son aide et sa bonté de cœur.*

*Je n'oublie pas de remercier mes collègues, qui sont partis vers d'autres horizons les Dr Saoussen Karray, Sanam Peyvandi, Fayçal Djenidi, Intissar Akaley, Marie Boutet, Yasmin Virk ainsi que au Dr et philosophe persan Arash Nanbakhsh, pour tous les moments agréables que nous avons partagés au labo et qui m'ont beaucoup manqués après leur départ.*

*Enfin, un énorme merci pour ceux qui s'auto-nomment "Hypoxia team", que certains les nomment "le trio d'enfer", et qui sont pour moi tout simplement des ange-gardiens, les Drs Meriem Hasmim, Zaeem Noman et Yosra Messai. Je remercie Meriem pour toutes ces discussions scientifiques qui m'ont souvent éclairé les idées et qui étaient sans aucun doute d'une grande aide, je la remercie pour tous les fous-rires provoqué par des westerns incompréhensibles. Je tiens à remercier Zaeem, pour son amitié, son soutien, ses blagues hilarantes et surtout pour tous les tag ZN don't touch! du pur Lab'Art qui marque l'histoire de notre cher laboratoire à jamais. Enfin je remercie du fond du cœur ma douce Yosra. Depuis mon premier jour dans l'unité, mon admiration et mon estime à ton égard n'ont cessé de grandir. Intelligente, aimante et bienveillante elle a toujours su trouver le mot juste pour égayer mes journées les plus difficiles.*

*Je remercie également la fondation Arc d'avoir soutenu mon travail me permettant ainsi de finir de ma dernière année de thèse dans les meilleurs des conditions.*

*Je voudrais également remercier le Dr Bassam Janji de nous avoir permis d'établir une collaboration avec son équipe ainsi que pour toutes les conversations téléphoniques que nous avons eu depuis le Luxembourg et qui m'ont été d'une grande aide.*

*Merci au labo voisin, plus particulièrement aux génialissimes voisines, les Drs Loetitia Favre, Justine Debernardi, Claire Lhuilier et Aude Robert.*

*A titre plus personnel, j'aimerais exprimer ma gratitude que j'ai envers tous mes amis pour leur soutien leurs encouragements, je ne les cite pas car j'ai de une chance inestimable de les avoir si nombreux, mis à part Rachad Al Khoury qui a réussi à mettre la main dans la pâte et donc à avoir un traitement de faveur.*

*Je remercie également, mes sœurs de cœur, je pense à Heger, Nedra et Fatma.*

*Je tiens à remercier chaleureusement ma belle sœur Meriem et mes beaux parents pour leur amour, soutien et tout ce qu'ils ont fait pour moi.*

*Je remercie également tous les membres de ma famille, particulièrement les tout premiers meilleurs amis que j'ai eu dans ma vie, mes deux chers frères je j'aime tant: Amine et Yacine. Je remercie aussi ma brillante belle sœur Manel, ainsi que mes deux adorables petites nièces Layla et Selima pour tout le bonheur qu'elles ont pu m'apporter.*

*Je ne pourrai jamais assez remercier mes parents ni exprimer tout l'amour, l'estime et le respect que j'ai toujours eu pour eux. Aucun mot ne pourrait décrire ma reconnaissance à l'égard des sacrifices qu'ils ont du réaliser pour faire de moi la personne que je suis aujourd'hui. J'ai eu la chance inestimable de recevoir, dès ma première enfance, une éducation basée sur l'amour du savoir, l'importance des observations et des raisonnements rationnels. A 18 ans, mes parents m'ont mis dans un avion, m'ont donné l'opportunité de bénéficier des prestigieuses universités françaises où j'ai tant appris et depuis ils n'ont cessé de m'accompagner, de m'encourager, de croire en moi et de m'apporter toute leur aide tout le long de mon parcours qui se matérialise aujourd'hui avec cette thèse. Merci papa. Merci maman. Merci pour tout!*

*Je garde mon dernier remerciement à celui qui a embelli ma vie, mon bien aimé compagnon de vie Omar. Je le remercie pour la rationalité, le soutien, le réconfort, l'amitié et plus encore pour l'amour qu'il m'a démontré pendant ces années, me permettant de surmonter mes soucis et me donnant la force de mener mes travaux dans les meilleures conditions possibles.*





## Sommaire

<b>Remerciements.....</b>	<b>1</b>
<b>Sommaire .....</b>	<b>4</b>
<b>Table des illustrations .....</b>	<b>7</b>
<b>Liste des Tableaux.....</b>	<b>8</b>
<b>Liste des abréviations.....</b>	<b>9</b>
<b>Avant propos.....</b>	<b>12</b>
<b>Introduction .....</b>	<b>14</b>
<b>I. La réponse immunitaire antitumorale.....</b>	<b>15</b>
1. Le concept de l'immuno-surveillance antitumorale .....	15
2. Déroulement de la réponse immune antitumorale.....	18
2.1. Initiation .....	18
2.2. Rôle des cellules dendritiques .....	20
2.3. Rôle des lymphocytes T CD4 <sup>+</sup> auxiliaire .....	22
3. Les lymphocytes cytotoxiques : les effecteurs clés de la réponse immune antitumorale.....	23
3.1. Les cellules tueuses naturelles (Natural Killer ; NK).....	23
3.2. Les lymphocytes T CD8 <sup>+</sup> cytotoxiques (CTL).....	27
<b>II. Les mécanismes de cytotoxicité des cellules effectrices .....</b>	<b>30</b>
1. La voie d'exocytose des granules cytotoxiques : généralités .....	31
1.1. Contenu des granules cytotoxiques .....	31
1.2. Mécanismes d'exocytose des granules cytotoxiques.....	33
1.3. La perforine : une protéine clé pour la cytotoxicité à médiation cellulaire .....	34
1.4. Mécanismes de cytotoxicité et rôles physiologiques des granzymes .....	39
1.5. Rôle dans l'immunité antitumorale .....	46
2. La voie des récepteurs à domaine de mort .....	47

2.1. La voie Fas/FasL .....	48
2.2. La voie TRAIL-R/TRAIL .....	49
<b>III. Mécanismes d'échappement tumoral à la réponse immune .....</b>	<b>50</b>
1. Echappement à la reconnaissance .....	51
2. Influence du microenvironnement tumoral .....	52
3. Expression des molécules check-point.....	54
4. Echappement aux fonctions effectrices lymphocytaires .....	55
4.1. Résistance à la voie Perforine/Granzymes .....	55
4.2. Résistance à la voie des récepteurs à domaine de mort.....	56
<b>IV. La protéine suppresseur de tumeur p53 .....</b>	<b>57</b>
1. Historique : découverte de p53.....	57
2. Importance de p53 dans la suppression des tumeurs.....	58
3. Le gène <i>TP53</i> , membre d'une famille multigénique .....	59
4. Structure et organisation fonctionnelle de la protéine p53 .....	60
4.1. La région N-terminale .....	61
4.2. La région centrale.....	62
4.3. La région C-terminale .....	63
5. Régulation de l'activité de la protéine p53.....	63
5.1. Activation.....	64
5.2. Dégradation .....	66
6. Fonctions biologiques de p53.....	68
6.1. Régulation du cycle cellulaire .....	70
6.2. Réparation de l'ADN.....	70
6.3. Régulation de l'autophagie.....	71
6.3.1. Autophagie : Généralités .....	71
6.3.2. Les différentes étapes de l'autophagie .....	74
6.3.3. Implication de p53 dans le processus d'autophagie .....	78
6.4. Induction et régulation de l'apoptose .....	81
6.4.1. La mitochondrie : carrefour de la mort.....	81
6.4.2. P53 et apoptose par la voie intrinsèque .....	84
6.4.3. P53 et apoptose par la voie extrinsèque .....	87

6.5. Rôle de p53 dans la réponse immune antitumorale .....	88
7. P53 : une cible thérapeutique .....	90
7.1. Inactivation par mutations .....	90
7.2. Inactivation de p53 par d'autres mécanismes .....	92
7.3. Stratégies de réactivation.....	93
7.3.1. Stratégie Génétique .....	93
7.3.2. Stratégie pharmacologique .....	95
<b>Objectifs: .....</b>	<b>101</b>
<b>Résultats: .....</b>	<b>103</b>
<b>Légendes des figures.....</b>	<b>124</b>
<b>Discussion .....</b>	<b>130</b>
<b>Bibliographie.....</b>	<b>145</b>
<b>Annexes.....</b>	<b>174</b>

## Table des illustrations

<b>Figure 1:</b> Description de la relation entre une tumeur et son système immunitaire qui l'infiltrer avec les trois phases de l'immunoediting des cancers .....	16
<b>Figure 2:</b> Représentation schématique de la réponse immune antitumorale idéale .....	20
<b>Figure 3:</b> Activation des cellules tueuses naturelles (NK) .....	25
<b>Figure 4:</b> Principaux constituants des granules cytotoxiques .....	32
<b>Figure 5:</b> Etapes nécessaires pour l'exocytose du contenu des granules cytotoxiques .....	34
<b>Figure 6:</b> Structure primaire de la perforine .....	35
<b>Figure 7:</b> Mode d'action de la perforine dans l'internalisation des Gzms .....	39
<b>Figure 8:</b> Voies de mort cellulaire induite par le granzyme A .....	42
<b>Figure 9:</b> Les voies apoptotiques induites par le Granzyme B .....	44
<b>Figure 10:</b> Les récepteurs à domaine de mort et leurs ligands .....	48
<b>Figure 11:</b> La voie de signalisation des récepteurs Fas et DR4/DR5 .....	50
<b>Figure 12:</b> Séquence et structure de p53 .....	60
<b>Figure 13:</b> Les réponses cellulaires induites par p53 activée par les signaux de stress sont importantes pour la suppression tumorale .....	69
<b>Figure 14:</b> Le processus de l'autophagie .....	74
<b>Figure 15:</b> Présentation d'un modèle de formation de la membrane d'isolation au niveau du site de contact RE-mitochondrie.....	76
<b>Figure 16:</b> Les deux systèmes ubiquitine-like impliqués dans l'élongation du phagophore dans les cellules de Mammifères .....	77
<b>Figure 17:</b> Régulation de l'autophagie par p53 .....	79
<b>Figure 18:</b> Interactions potentielles entre les membres de la famille Bcl-2 .....	83
<b>Figure 19:</b> Rôle de p53 dans la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe..	86
<b>Figure 20 :</b> Les mutations de p53 les plus fréquentes .....	91
<b>Figure 21:</b> Les stratégies actuelles les plus connues pour la réactivation de p53.....	94
<b>Figure 22:</b> Structures chimiques et fonction de PRIMA-1 et de APR-246 (PRIMA-1Met)...	99
<b>Figure 23:</b> Modèle proposé pour le rôle de p53 dans la voie de signalisation apoptotique induite par GzmB .....	135

**Figure 24:** Représentation schématique du mécanisme d'action par lequel p53 réactivée par CP-31398 potentialise l'apoptose induite par le GzmB..... 142

## Liste des Tableaux

**Tableau 1:** Caractéristiques des différentes voies de mort cellulaire induites par les granzymes humains ..... 40

**Tableau 2:** Exemples de modifications post-traductionnelles de p53 et conséquences fonctionnelles respectives .....64

**Tableau 3:** Régulation de p53 par les ubiquitines ligases E3 ..... 68

## Liste des abréviations

**ADCC:** Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity  
**AMP:** Adénosine MonoPhosphate  
**AMPK:** AMP- activated kinase  
**APAF-1:** Apoptotic Peptidase Activating Factor 1  
**ARF-BP1:** ARF-Binding Protein 1  
**ARNm:** Acide ribonucléique messenger  
**ATG:** Autophagy related genes  
**ATM:** Ataxia Telangiectasia Mutated  
**ATR:** ATM-related  
**Bad:** Bcl-2 antagonist of cell death  
**Bak:** Bcl-2 antagonist killer 1  
**Bax:** Bcl-2-associated x protein  
**Bcl-2:** B-cell lymphoma-2  
**Bcl-xL:** B-cell lymphoma extra arge  
**BECN1:** Beclin-1  
**BH:** Bcl-2-Homology  
**Bid:** Bcl-2 interacting domain death agonist  
**Bim:** Bcl-2 interacting médiateur of apoptosis  
**CAD:** Caspase Activated DNase  
**CAF:** Cancer Associated Fibroblast  
**Caspase:** Cystein-dependent ASPartate-specific proteASES  
**CD:** Cluster de différenciation  
**CDK:** Cyclin-Dependent Kinase  
**cFLIP:** Cellular FLICE/caspase-8 Inhibitory Protein  
**CG:** Granules Cytotoxiques  
**CHIP:** C-terminus of Hsc70 Interacting Protein, a 70 kDa homodimer  
**CHK:** CHeckpoint Kinase  
**CMH:** Complexe majeur d'histocompatibilité  
**COP1:** COnstitutively Photomorphogenic 1  
**CPA:** Cellules présentatrices de l'antigène  
**CTL:** Cytotoxic T lymphocyte  
**DC:** Dendritic Cell  
**DcR:** Decoy Receptor  
**DD:** Death domain  
**DECP1:** Double FYVE-containing protein 1  
**DED:** Death effector domain  
**DISC:** Death Inducing Signaling Complex  
**DRAM-1:** Damage-regulated autophagy regulator  
**EGF:** Endothelial Growth Factor  
**EndoG:** Endonuclease G  
**ER:** Réticulum endoplasmique  
**ERK:** Extracellular signal–Regulated Kinases

**FADD:** Fas associated death domain  
**FHL:** Familial Hemophagocytic Lymphohistiocytosis  
**FIP200:** Focal adhesion kinase family Interacting Protein of 200 kD  
**GAAD:** GranzymeA-Activated DNase  
**Gadd45:** Growth Arrest and DNA Damage  
**GM-CSF:** Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating factor  
**GrzmB:** Granzyme B  
**GSK3 $\beta$ :** Glycogen Synthase Kinase 3  $\beta$   
**HDM2:** Human double minute 2  
**hGzmB:** Granzyme B humain  
**HIF:** Hypoxia-Inductible Factor  
**IAP:** Inhibitor of Apoptosis Protein  
**ICAD:** Inhibitor of CAD ou DFF45  
**IDO:** Indoleamine 2,3-DiOxygénase  
**IFN:** InterFeroN  
**Ig:** ImmunoglobulineIL: InterLeukin  
**iNOS:** Inducible Oxyde Nitrique Synthase  
**JNK:** c-JUN NH2 terminal Kinase  
**KIR:** Killer cell Ig-like Receptor  
**MACPF:** Membrane Attack Complex/Perforin  
**MAPK:** Mitogen-activated protein kinases  
**Mcl-1:** Myeloid cell leukemia 1  
**MDM2:** Murine Double Minute 2  
**MDSC:** Myeloid-Derived Suppressor Cells  
**MIC:** MHC class I Chain-related molecule  
**MOM:** Mitochondrial Outer Membrane  
**MOMP:** Mitochondrial Outer Membrane Permiabilization  
**MTOC:** MicroTubule Organizing Center  
**mTORC:** mamlian TOR complex  
**NER:** Nucleotide excision repair  
**NES:** Nuclear Export Signal  
**NF- $\kappa$ B:** Nuclear Factor-  $\kappa$ B  
**NK:** Natural Killer cell  
**NKG2D:** NK cell group 2D  
**NKT:** Natural Killer T cell  
**NLS:** Nuclear Localization Signal  
**NO:** Nitric Oxide  
**PAMP:** Pathogen associated molecular pattern  
**PARP:** Poly-ADP-Ribose Polymerase  
**PBMC:** Peripheral blood mononuclear cells  
**PCNA:** Proliferating Nuclear Antigen  
**PD-L1:** Programmed Death Ligand1  
**PFN:** Perforine  
**PGE2:** ProstaGlandin E2  
**PI:** Phosphatidylinositol



**PI3K:** Phosphoinositide 3 kinase  
**PI3P:** Phosphatidylinositol-3-phosphate  
**PRR:** Pattern recognition receptors  
**PS:** Phosphatidylsérine  
**PUMA:** P53 Upregulated Modulator of Apoptosis  
**RING:** Really interesting new gene  
**ROS:** Reactive Oxygen Species  
**SESN1/2:** Sestrine-1 ou 2  
**SI:** Synapse Immunologique  
**SNARE:** Soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein REceptor  
**TAD:** Transactivation domain  
**TAP:** Transporter associated with Antigen Processing  
**TCR:** T Cell Receptor  
**TGFβ:** Transforming Growth Factor β  
**TIL:** Tumor Infiltrating Lymphocytes  
**TLR:** Toll-like receptor  
**TMH:** Transmembrane Helical Region  
**TNF:** Tumor Necrosis Factor  
**TNFR:** Tumor Necrosis Factor Receptor  
**TOR:** Target Of Rapamycin  
**TRADD:** TNF Receptor-Associated Death Domain  
**TRAIL:** TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand  
**TRAIL-R:** TRAIL Receptor  
**TSC1/2:** Tuberous sclerosis 1/2  
**ULBP:** UL16 Binding Protein  
**ULK:** Unc-51 like kinase  
**VEGF:** Vascular Endothelial Growth Factor  
**WIPI:** WD-repeat protein interacting with phosphoinositides

## Avant propos

Une des orientations actuelles de l'immunologie des tumeurs consiste à comprendre les mécanismes impliqués dans la résistance des cellules tumorales à l'élimination induite par les cellules effectrices cytotoxiques immunitaires (cellules T CD8<sup>+</sup> cytotoxiques ou CTL et cellules tueuses naturelles ou NK). Sur la base de plusieurs travaux *in vitro* et *in vivo*, ainsi que sur différentes maladies décrites chez l'Homme, il apparaît que la voie principale de lyse induite par les CTL et les cellules NK pour détruire leurs cellules cibles tumorales implique l'exocytose par les cellules effectrices du contenu des granules cytotoxiques au niveau de la synapse immunologique formée entre les effecteurs cytotoxiques et leurs cellules cibles. Les granules cytotoxiques contiennent la protéine formant des pores ; la perforine (PFN) et une famille de serine-protéases hautement spécifiques connue sous le nom de granzymes (Gzms). Parmi ces Gzms, le granzyme B (GzmB) est l'un des principaux inducteurs de l'apoptose induite par cette voie. Cependant, au cours de la progression tumorale, les cellules cancéreuses peuvent acquérir la capacité à échapper au contrôle immunitaire en développant différents mécanismes de résistance. En particulier, la sensibilité des cellules tumorales à la mort induite par les cellules effectrices cytotoxiques, peut être modulée au cours de la transformation maligne. Dans ce cadre, des travaux menés au sein de notre laboratoire ont mis en évidence l'importance de la protéine suppresseur de tumeurs p53, mutée dans 50% des tumeurs humaines, dans la coordination de l'amplitude de la réponse apoptotique au GzmB. C'est dans ce contexte que s'inscrit l'axe principale de mon travail de thèse qui vise à étudier le rôle de p53 dans la régulation de la lyse des cellules tumorales induite par la voie PFN/GzmB et de déterminer si la réactivation d'une fonction sauvage de p53 dans les tumeurs qui en sont mutées pourrait abolir ou atténuer cette résistance à la mort et sensibiliser ainsi les cellules tumorales au système immunitaire. La première partie de ce manuscrit présente les connaissances actuelles sur le déroulement de la réponse immune antitumorale, les mécanismes de cytotoxicité mis en jeu par des cellules effectrices ainsi que les mécanismes d'échappement développés par les cellules tumorales au cours de la transformation maligne. Le rôle de la protéine p53 dans la suppression tumorale, son implication dans la réponse

immune antitumorale ainsi que les stratégies de réactivation de ses fonctions ont également été décrits. Dans une seconde partie, l'ensemble des résultats est présenté et discuté.

# Introduction

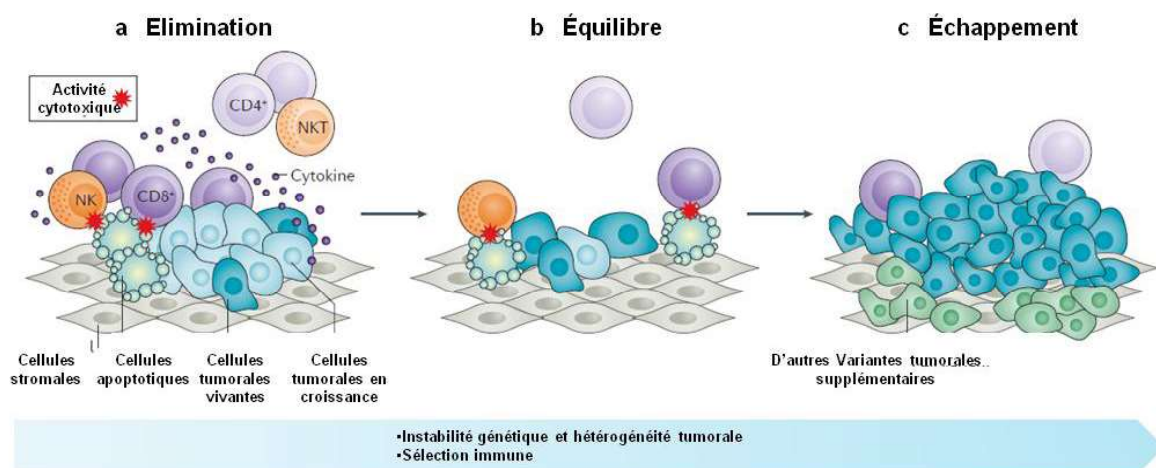


# I. La réponse immunitaire antitumorale

## 1. Le concept de l'immuno-surveillance antitumorale

L'immuno-surveillance des cancers est un concept initialement proposé en 1909 par Paul Ehrlich. Selon ce concept, des cellules cancéreuses et/ou pré-cancéreuses sont constamment identifiées et éliminées par le système immunitaire de l'hôte avant même que des manifestations cliniques se produisent. Toutefois, à cette époque, les bases moléculaires et cellulaires de l'immunité étaient très peu connues et cette hypothèse n'a pas pu être testée expérimentalement. L'idée que le système immunitaire, connu pour protéger efficacement l'hôte contre les différents agents pathogènes, pourrait également reconnaître et détruire les cellules tumorales a ainsi été discutée il y a plus d'un siècle et a été plus récemment examinée en détail. En effet, des études menées en 1970 par Frank Macfarlane Burnet ont permis d'affiner ce concept en proposant que des modifications génétiques menant à une tumeur maligne étaient fréquentes dans les cellules somatiques et que le système immunitaire était responsable de l'élimination de ces cellules mutantes potentiellement dangereuses (Burnet, 1970). A côté de nombreux mécanismes suppresseurs de tumeurs intrinsèques, ce processus d'immuno-surveillance antitumorale a ainsi commencé à émerger comme un suppresseur extrinsèque de tumeurs. En effet, si la réparation de l'ADN, l'apoptose, ou la sénescence ne permettent pas d'éliminer les cellules transformées, le système immunitaire interviendrait dans la destruction de ces dernières. L'hypothèse de l'immuno-surveillance a été ensuite validée expérimentalement, principalement grâce à l'augmentation de l'incidence des tumeurs malignes chez des souris immuno-déficientes. En effet, des études menées sur des modèles murins sévèrement immunodéprimés, montrent que ces souris présentent une incidence des tumeurs significativement plus élevée que les souris sauvages, suggérant que l'immuno-surveillance est essentielle pour le contrôle du développement des tumeurs (Dunn et al., 2004 ; Mapara and Sykes, 2004). En outre, un certain nombre d'observations cliniques ont apporté des preuves appuyant la notion d'immuno-surveillance antitumorale chez l'homme. Parmi ces preuves, on peut par exemple citer un risque élevé de développement de tumeurs chez les patients immunodéprimés, des cas de régression tumorale spontanée et une infiltration de

lymphocytes T dans les tumeurs qui présentent un bon pronostic, ces différents éléments suggérant tous un rôle du système immunitaire dans la suppression de la croissance tumorale. Les patients avec une immunodéficience d'origine génétique (dont un des cas extrêmes est représenté par les « enfants-bulles »), une immunodéficience acquise (dont l'exemple le plus connu est celui du SIDA) ou encore une immunodéficience induite par une thérapie (pour empêcher le rejet de transplantation) sont ainsi souvent exposés à un risque très élevé de développement de cancers (Swann and Smyth, 2007). Cependant, le fait que des tumeurs malignes se développent également chez des patients immuno-compétents suggère que la surveillance immunitaire est seulement une partie du processus. Le concept de l'immunosurveillance antitumorale a ainsi été progressivement remplacé au cours des dernières années par une théorie appelée « immunoediting » (Mittal et al., 2014). L'immunoediting est un processus dynamique qui permet de façonner l'immunogénicité des tumeurs au cours de leur développement. Trois étapes distinctes d'interaction entre la tumeur et le système immunitaire de l'hôte ont ainsi été postulées: une phase d'élimination, d'équilibre et enfin d'échappement (Mittal et al., 2014) (Figure 1).



**Figure 1: Description de la relation entre une tumeur et le système immunitaire de l'hôte qui l'infiltré, avec les trois phases de l'immunoediting**

La progression tumorale est liée à l'instabilité génétique des cellules cancéreuses. Elle se déroule en 3 étapes au cours desquelles de nouveaux variants du clone initial apparaissent, entraînant une hétérogénéité tumorale. Dans la première phase (a), la phase d'élimination, le système immunitaire est capable de contrôler et éliminer les cellules tumorales. Dans la deuxième phase (b), la phase d'équilibre, des variants du clone initial ayant une capacité plus élevée à survivre et résister aux attaques immunitaires, apparaissent. Cela entraîne la troisième phase (c) pendant laquelle, la tumeur échappe au contrôle immunitaire et des variantes supplémentaires de cellules tumorales se développent. Adapté de (van der Burg et al., 2016)

La phase d'élimination représente l'étape au cours de laquelle les cellules tumorales sont rejetées avec succès par les systèmes immunitaires inné et adaptatif par des mécanismes divers, et peut donc être considérée comme l'étape d'immunosurveillance décrite précédemment (Mittal et al., 2014). Dans le cas où la tumeur est complètement détruite, l'élimination représente le point final de l'immunoediting. Toutefois, si les cellules tumorales ne sont pas complètement éliminées, celles-ci peuvent entrer dans l'état d'équilibre dans lequel le système immunitaire contrôle la croissance tumorale et la tumeur peut entrer dans un état de dormance pendant de nombreuses années. De plus, au cours de cette phase d'équilibre, les cellules tumorales subissent des altérations génétiques qui leur permettent d'échapper au contrôle immunitaire et proliférer de manière illimitée, ce qui conduit à des tumeurs cliniquement apparentes. Plusieurs mécanismes peuvent conduire à cet état d'échappement, tels que la diminution de la reconnaissance immune, une augmentation de la résistance à l'attaque par des cellules immunitaires ou le développement d'un microenvironnement tumoral immunosuppresseur (Mittal et al., 2014). Dans ce cas de figure, le système immunitaire épargne les cellules tumorales qui sont moins immunogènes et/ou plus résistantes à la lyse. On peut ainsi parler d'une véritable pression de sélection exercée par le système immunitaire qui a pour conséquence une sélection de variants résistants qui vont pouvoir survivre et proliférer (Fridman et al., 2014). La preuve initiale en faveur de cette théorie de l'immunoediting des cancers a été fournie par l'observation que des carcinomes primaires provenant d'animaux immunodéficients sont immunogènes et régressent après transplantation chez des hôtes immunocompétents, alors que des carcinomes primaires d'hôtes immunocompétents sont faiblement immunogènes et échappent aux réponses immunitaires lorsqu'ils sont transplantés dans des hôtes immunocompétents (Shankaran et al., 2001). Les mécanismes par lesquels les tumeurs échappent à l'immuno-surveillance sont très nombreux et seront détaillés plus tard dans le manuscrit (voir chapitre: III. Mécanismes d'échappement tumoral à la réponse immune).

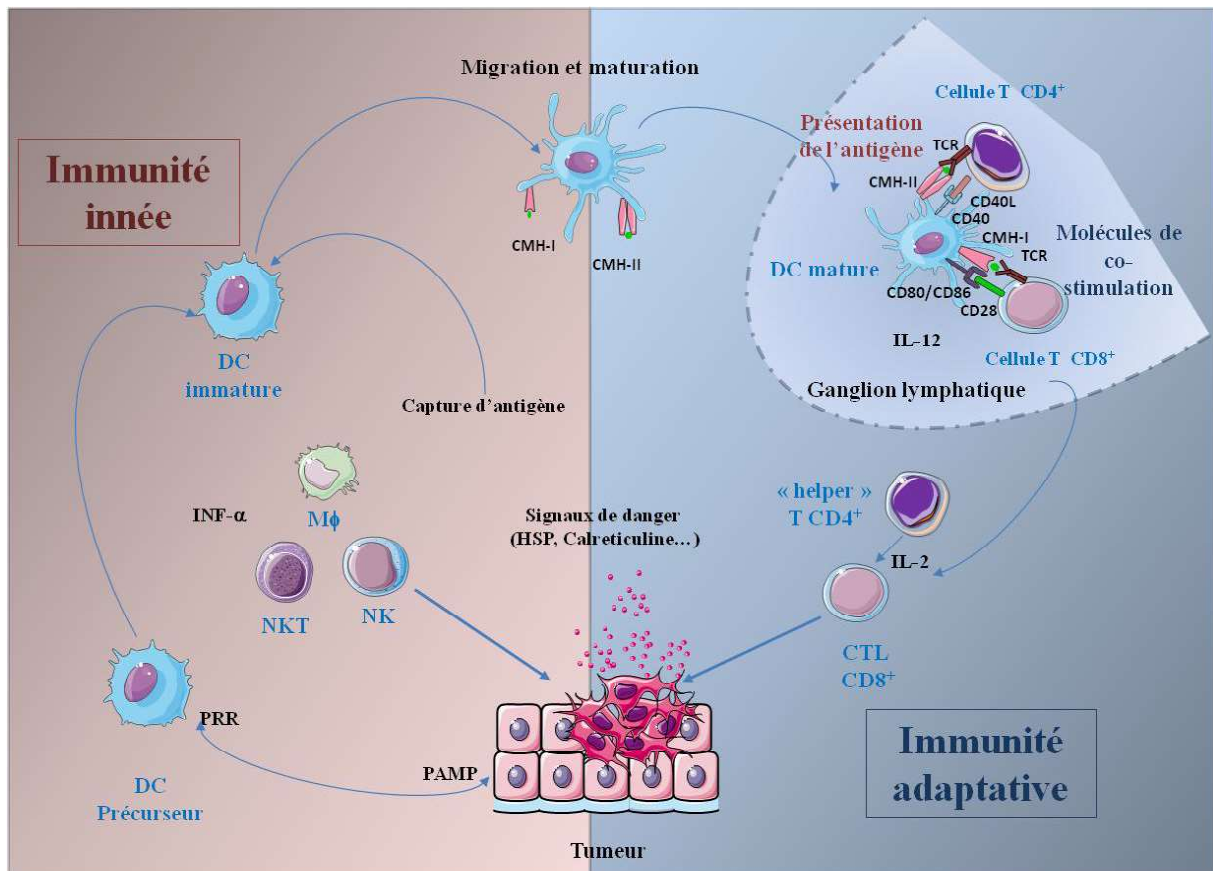


## 2. Déroutement de la réponse immune antitumorale

### 2.1. Initiation

La réponse immune antitumorale débute par la mise en action de la réponse immunitaire innée qui constitue la première ligne de défense qui protège l'organisme hôte contre notamment les pathogènes ou les cellules transformées reconnus comme du "non soi". Les protéines du complément ainsi qu'une composante cellulaire telles que les granulocytes, les macrophages et les cellules naturelles tueuses (NK), constituent cette première ligne de défense. Lorsqu'une tumeur grossit, elle envahit de façon anarchique les tissus environnants et forme une masse tumorale. La croissance tumorale nécessite un apport important en oxygène et en nutriments pour répondre aux besoins métaboliques de ces cellules tumorales en pleine division. La sécrétion de molécules angiogéniques par la tumeur naissante, aboutit à la prolifération des cellules vasculaires, qui migrent puis s'agencent en vaisseaux fonctionnels par une stabilisation et un modelage des structures cellulaires. On assiste donc à l'apparition de nouveaux vaisseaux qui vont d'un côté favoriser "métaboliquement" la croissance tumorale mais aussi vont permettre, grâce à des signaux inflammatoires, l'infiltration de cellules de l'immunité innée au niveau du site tumoral qui s'effectue peu de temps après la formation d'une tumeur solide (Reiman et al., 2007). Les cellules effectrices de l'immunité innée les plus efficaces dans l'élimination des cellules tumorales sont les cellules NK (Natural Killer) qui, lorsqu'elles sont activées, induisent la mort cellulaire programmée des cellules tumorales. Les mécanismes de cytotoxicité de ces cellules seront décrits plus tard (voir paragraphe: 3.1. Les cellules tueuses naturelles). D'autres cellules importantes dans l'initiation de la réponse immune antitumorale sont une sous-population particulière de lymphocytes qui co-expriment à la fois des marqueurs de cellules NK, notamment CD161 et CD56, et le récepteur des cellules T (TCR). Ces cellules dites « NKT », lorsqu'elles sont activées, sont capables de sécréter des cytokines pro-inflammatoires telles de l'IFN- $\gamma$  (Interféron- $\gamma$ ) ou du TNF- $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ ) et d'activer les cellules NK, les macrophages, les cellules B et de recruter des cellules dendritiques myéloïdes (DC) (Naumov et al., 2001). En outre, les NKT possèdent une activité cytolytique propre puisqu'elles expriment les molécules qui induisent la mort des cellules cibles, notamment la perforine, les Granzymes et FasL (Fas Ligand)

(Metelitsa et al., 2001) et sécrètent de forts taux de chimiokines MIP-1 $\alpha$  et MIP-1 $\beta$  (macrophage inflammatory proteins-1  $\alpha$  et  $\beta$ ), ce qui leur permet de recruter des monocytes et de cellules T et de favoriser ainsi l'initiation de la réponse immunitaire spécifique. Dans un scénario idéal, les cellules de l'immunité innée sont capables de détruire les cellules tumorales. Ces dernières, lorsqu'elles sont lysées ou stressées émettent des signaux de danger comme la protéine HSP (Heat Shock Proteins) ou la calréticuline (une protéine chaperonne Ca<sup>2+</sup> dépendante) et libèrent également des antigènes tumoraux. Les DC (dont le rôle est détaillé ci dessous) sont capables de reconnaître ces signaux de danger et de capturer les antigènes tumoraux libérés et font le lien entre la réponse immune innée et la réponse immune adaptative. La réponse immune spécifique (ou adaptative) se caractérise par une mémoire immunologique permettant une destruction plus efficace et plus rapide lors d'un deuxième contact avec le même pathogène. Elle est assurée par deux grandes classes de lymphocytes, les lymphocytes B, qui sont les précurseurs des plasmocytes sécrétant les immunoglobulines ou anticorps, et les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>, qui assurent des fonctions effectrices et régulatrices de la réponse immunitaire spécifique. Ces deux types de réponse vont coopérer entre elles afin d'éliminer, tout du moins potentiellement, les cellules tumorales (Figure 2).



**Figure 2: Représentation schématique de la réponse immunitaire antitumorale idéale.**

Les macrophages ( $M\phi$ ), les NK, et les NKTs forment la première ligne de défense contre la croissance tumorale. Les précurseurs des DC reconnaissent des molécules PAMP (Pathogen Associated Molecular Pattern) à la surface des cellules tumorales, via leurs récepteurs PRR (Pattern Recognition Receptors). Les DC sécrètent alors de l'IFN- $\alpha$  qui active les cellules de l'immunité innée. Les signaux de danger (HSP, calréticuline, ...) émis par les cellules tumorales lysées et/ou stressées sont reconnus grâce aux récepteurs de « capture » par les DC immatures. Suite à l'internalisation d'antigènes (Ag) tumoraux présents au niveau du site tumoral, les DC subissent un processus de maturation et migrent vers les organes lymphoïdes secondaires. La maturation des DC s'accompagne d'un changement phénotypique et de l'expression de molécules nécessaires à la présentation antigénique aux cellules de l'immunité adaptative ( $T CD8^+$  et  $T CD4^+$ ). Les lymphocytes  $T CD4^+$  ont un rôle auxiliaire ou « helper » dans l'initiation et le maintien de la réponse cytotoxique antitumorale. En effet, ils peuvent activer en retour les cellules présentatrices d'antigènes via l'interaction CD40/CD40L, induisant ainsi la maturation terminale des DC. Les DC activées sont alors capables d'initier la réponse  $T CD8^+$  spécifique (via la sécrétion d'IL-12 et l'expression de molécules de co-stimulation CD8/CD86), générant, avec le soutien des cellules  $T CD4^+$  « helper », des lymphocytes T cytotoxiques (CTL, Cytotoxic T Lymphocytes). Ces derniers migrent vers le site tumoral où ils pourront lyser spécifiquement les cellules malignes.

## 2.2. Rôle des cellules dendritiques

Les cellules dendritiques (DC), facilement reconnaissables par une morphologie caractérisée par des multiples prolongements cytoplasmiques nommés dendrites, peuvent

avoir une origine myéloïde ou lymphoïde et possèdent comme fonction principale le déclenchement de la réponse immunitaire adaptative. A l'état basal, les DC sont dites « immatures » et résident au sein des tissus périphériques jouant ainsi un rôle de sentinelles. Au cours de leur processus d'activation, les DC reconnaissent des molécules PAMP (Pathogen-Associated Molecular Patterns) exprimées à la surface des cellules malignes notamment, *via* leurs récepteurs PRR (Pattern Recognition Receptor). Les DC sont alors capables de sécréter des interférons de type I (IFN- $\alpha$  et  $-\beta$ ), qui active les macrophages, les cellules NK et NKT. Une des caractéristiques principales des DC est la capture d'antigènes grâce à leurs grandes capacités de phagocytose et d'endocytose. En réponse à des stimuli pro-inflammatoires et/ou de danger, les DC capturent les antigènes tumoraux présents au niveau du site tumoral et rentrent dans un processus de maturation. Ce dernier est associé à une augmentation de l'expression des molécules du CMH de classe I et II (complexe majeur d'histocompatibilité I et II), à une augmentation de leurs capacités de présentation antigénique, et à l'expression de récepteurs de chimiokines favorisant leur migration vers les organes lymphoïdes secondaires dans la zone riche en cellules T (Gabrilovich, 2004). Pendant la phase de maturation, les DC perdent progressivement leurs capacités migratoires et leur fonction de cellules phagocytaires pour devenir des cellules présentatrices d'antigènes professionnelles résidentes au niveau des ganglions drainants. Dans ces organes lymphoïdes secondaires, les DC induisent à la fois l'activation des T CD4<sup>+</sup> et T CD8<sup>+</sup> naïfs. Cette activation des cellules T CD8<sup>+</sup> est notamment possible grâce à la présentation croisée, une caractéristique majeur et propre aux DC qui consiste en l'aptitude à présenter des peptides qui sont dérivés d'antigènes exogènes sur des molécules du CMH de classe I (CMH-I) (Spel et al., 2013).

Ces antigènes exogènes peuvent avoir différentes sources, notamment des tumeurs nécrotiques, des corps apoptotiques, des peptides de protéines chaperonnes ou encore des exosomes libérés par les cellules tumorales (Albert et al., 1998 ; den Haan et al., 2000). En parallèle, il est important de noter que l'activation d'une réponse T CD8<sup>+</sup> cytotoxique est dépendante d'une réponse T CD4<sup>+</sup> auxiliaire (Bennett et al., 1997). En effet, l'interaction entre le complexe CMH-II/peptide exprimé par la DC et le TCR de la cellule T CD4<sup>+</sup>, va permettre à la DC d'induire l'expression de la molécule CD40L sur la cellule T CD4<sup>+</sup>.

L'interaction CD40/CD40L va finaliser la maturation de la DC. A ce stade, la cellule dendritique acquiert ses propriétés optimales d'activation lymphocytaire, en augmentant son expression de molécules de co-stimulation CD80 et CD86 et en sécrétant de l'IL-12 (Bennett et al., 1997; Hashimoto et al., 2011 ). Les DC totalement matures, vont alors avoir la capacité d'activer les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> par la présentation d'Ag tumoraux par la voie des molécules du CMH-I, en présence de molécules de co-stimulation. En l'absence de molécules de co-stimulation, l'activation n'a pas lieu et conduit à une anergie lymphocytaire.

### 2.3. Rôle des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> auxiliaire

Les lymphocytes auxiliaires appelés également T CD4<sup>+</sup> ou encore T<sub>H</sub> pour T<sub>Helper</sub> sont aussi des cellules clés de la réponse immunitaire adaptative. Ils prolifèrent pour activer d'autres types de cellules qui agiront de manière plus directe sur la réponse immunitaire. Les cellules T CD4<sup>+</sup> naïves peuvent être activées suite à l'interaction entre leur TCR et les complexes CMH-II/peptide antigénique. Activées, les cellules T CD4<sup>+</sup> vont pouvoir stimuler les DC via la molécule CD40 (Figure 2) qui est un facteur critique pour rendre les DC pleinement compétentes pour l'activation des cellules T CD8<sup>+</sup> (Bennett et al., 1997).

Plusieurs travaux ont par ailleurs démontré que les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> peuvent être subdivisés, selon leur profil sécrétoire cytokinique, en deux groupes (Mosmann et al., 1986): les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> de type T<sub>H1</sub> et de type T<sub>H2</sub>. Les lymphocytes T<sub>H2</sub> sont caractérisés par la sécrétion d'IL-4, d'IL-5, d'IL-9, d'IL-10 et d'IL-13 et sont impliqués dans le développement d'une réponse humorale (Pearce et al., 2012). Les lymphocytes T<sub>H1</sub> produisent et sécrètent quant à eux, de l'IL-2, de l'IL-12, de l'IFN- $\gamma$  et du TNF- $\alpha$  qui sont impliqués dans l'activation, le développement et la persistance d'une réponse T CD8<sup>+</sup> cytotoxique (CTL) (détaillée dans le paragraphe suivant).

Ces dernières années, différents travaux ont également identifié d'autres populations lymphocytaires T CD4<sup>+</sup> avec des fonctions différentes. En effet, les cellules T CD4<sup>+</sup> naïves sont disposées à avoir au moins 4 destins différents, déterminés en fonction de l'intensité de leur stimulation et de la présence de certaines cytokines, donnant naissance à d'autres populations fonctionnellement hétérogènes, notamment les lymphocytes T<sub>H17</sub> (Muranski and Restifo, 2013) et les lymphocytes T régulateurs (Treg). Les lymphocytes T<sub>H17</sub> sont capables

de produire de l'IL-17 en réponse au TGF- $\beta$  (Transforming Growth Factor  $\beta$ ) et certaines interleukines (IL-6 et IL-21) (Yang et al., 2008). Les lymphocytes T régulateurs (Treg) expriment quand à eux le facteur de transcription Foxp3 (Forkhead box protein 3) et CD25 (Sakaguchi et al., 2013). Les Treg sont des inhibiteurs puissants de l'immunité antitumorale et représentent un des plus grands obstacle à l'immunothérapie du cancer (Zou, 2006) (voir chapitre échappement: influence du microenvironnement tumoral). En résumé, selon le contexte et l'influence du microenvironnement tumoral les différentes populations des cellules T CD4<sup>+</sup> jouent un rôle fondamental dans l'induction et la régulation d'une réponse T CD8<sup>+</sup> fonctionnelle, qui est elle-même cruciale pour une réponse immune antitumorale efficace.

### **3. Les lymphocytes cytotoxiques : les effecteurs clés de la réponse immune antitumorale**

Les principales cellules tueuses (cytotoxiques) impliquées dans l'élimination des cellules tumorales sont les cellules NK, effectrices de la réponse immune innée et les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> cytotoxiques ou CTL impliqués dans la réponse immune adaptative.

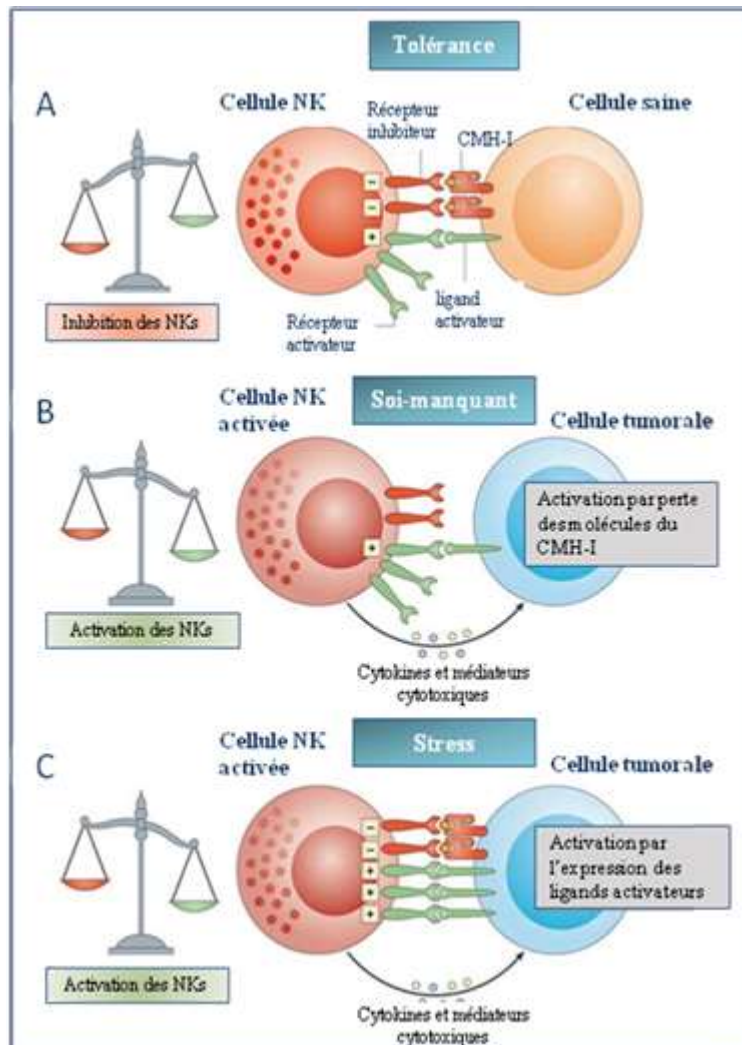
#### **3.1. Les cellules tueuses naturelles (Natural Killer ; NK)**

Décrites pour la première fois en 1975 par Rolf Kiessling, les cellules NK sont des lymphocytes granuleux dotés de capacités à tuer directement des cellules cibles, notamment tumorales, en l'absence d'immunisation préalable, d'où l'origine de leur nom de « cellules tueuses naturelles » (Kiessling et al., 1975). Ces cellules NK constituent le type cellulaire le mieux connu pour sa fonction cytotoxique et sa capacité à produire des cytokines après la stimulation. Chez l'Homme, les cellules NK se caractérisent phénotypiquement par la présence des molécules CD56, CD16 (Fc $\gamma$ RIIIA) et par l'absence des marqueurs des lymphocytes T (CD3 et TCR) et des lymphocytes B (CD19 et BCR). Les cellules NK se développent dans la moelle osseuse et constituent 5-10% des lymphocytes circulant dans le sang. On peut retrouver des cellules NK au niveau de différents tissus notamment dans les ganglions lymphatiques, les muqueuses mais aussi de façon plus abondante au niveau de la rate, du foie ou de l'utérus. Ces cellules sont également capables d'infiltrer le

microenvironnement des tumeurs solides, cette infiltration étant associée à un pronostic favorable chez les patients (Villegas et al., 2002).

Contrairement aux lymphocytes T, les cellules NK ne reconnaissent pas des antigènes étrangers, mais sont activées par des changements qui affectent les molécules du "soi" exprimées à la surface des cellules autologues. Le modèle d'activation des cellules NK le plus ancien est basé sur la reconnaissance du "soi manquant" et notamment sur l'absence d'expression par les cellules cibles des molécules du CMH-I (Ljunggren and Karre, 1985). Ce mode de reconnaissance dépendant du CMH-I, explique en partie pourquoi des cellules malignes ou infectées par des virus ou présentant une altération de l'expression du CMH-I sont potentiellement éliminées par les cellules NK, tandis que des cellules «saines» sont protégées (Algarra et al., 2000). A l'heure actuelle, le modèle d'activation des cellules NK se base sur une balance de signaux activateurs et inhibiteurs dépendant de l'expression par ces cellules de divers récepteurs activateurs ou inhibiteurs et de l'expression par les cellules cibles de ligands induits en réponse à différents types de stress cellulaire ou à des lésions de l'ADN (Figure 3).





**Figure 3: Activation des cellules tueuses naturelles (NK).**

(A) Les cellules NK sont tolérantes aux cellules saines, car la force des signaux d'activation qu'elles reçoivent en rencontrant ces cellules est atténuée par l'engagement des récepteurs inhibiteurs (tolérance). (B) La perte de l'expression des molécules du CMH-I par les cellules tumorales lève l'inhibition exercée par ces molécules et contribue donc à l'activation des cellules NK. C'est ce qu'on appelle le déclenchement de l'activation des cellules NK par le mécanisme du «soi-manquant». (C) Les cellules stressées expriment à leur surface des ligands activateurs des cellules NK. Si la somme des signaux activateurs surmonte la signalisation inhibitrice délivrée par les molécules du CMH-I, la balance penche vers une activation des cellules NK. Dans un scénario idéal, les deux conditions d'activation des cellules NK (B et C) entraînent une élimination tumorale soit directement, *via* les deux principales voies de lyse ou soit indirectement, par la production de cytokines pro-inflammatoires telles que l'interféron- $\gamma$ . Adapté de (Vivier et al., 2012).

Parmi les récepteurs présents à la surface des cellules NK, on trouve notamment une famille de récepteurs de type lectine appartenant à la famille des KIR (Killer Immunoglobulin-like Receptor). L'interaction de ces récepteurs avec les molécules du CMH-I



délivre un signal inhibiteur pour l'activation des cellules NK. Au contraire, l'engagement d'autres types de récepteurs de type « activateurs » comme les récepteurs NCR (NKp46, NKp44, NKp30) ou NKG2D (NK cell group 2D), joue un rôle dans l'activation des cellules NK. NKG2D est d'ailleurs le récepteur activateur associé à la transformation cellulaire ou aux infections le mieux caractérisé. Il est exprimé sous forme d'homodimère sur toutes les cellules NK chez l'Homme, mais également constitutivement exprimé sur les cellules CD8<sup>+</sup> du sang périphérique et de l'intraépithélium intestinal (Raulet, 2003). NKG2D possède un rôle primordial, en particulier en ce qui concerne la reconnaissance et la lyse de cellules tumorales. Plusieurs ligands de NKG2D ont été identifiés chez l'Homme, à savoir les molécules MICA, et MICB (MHC class I Chain-related molecule A et B) et les protéines de la famille des ULBP (UL16 Binding Protein 1-6) (Fernandez-Messina et al., 2012).

De plus, le niveau d'expression de CD56 à la surface des cellules NK permet leur classification en deux sous-populations fonctionnellement distinctes, les cellules NK CD56<sup>bright</sup> et CD56<sup>dim</sup> (Campos et al., 2014). L'activité cytotoxique des cellules CD56<sup>dim</sup> NK est significativement plus élevée que celle des cellules CD56<sup>bright</sup>. Les NK CD56<sup>dim</sup> contiennent beaucoup plus de perforine, de granzymes et de granules cytotoxiques que la population CD56<sup>bright</sup> et elles forment plus de conjugués avec leurs cellules cibles (Jacobs et al., 2001). De plus, les NK CD56<sup>dim</sup> peuvent déployer contre les cellules tumorales une voie de cytotoxicité dépendante des anticorps appelée la voie ADCC (Antibody Dependant Cellular Cytotoxicity). En effet, les cellules NK expriment à leur surface le récepteur du fragment Fc des Ig (CD16) qui leur permet de lier le fragment constant des IgG (Clynes et al., 2000). En revanche, en ce qui concerne les cellules NK CD56<sup>bright</sup>, la situation est inversée. En effet, la population CD56<sup>bright</sup> est surtout capable d'induire une forte production d'IFN- $\gamma$  (20 à 30 fois plus élevée que dans la population CD56<sup>dim</sup>) (Fehniger et al., 1999). Les principales cytokines libérées par les NK CD56<sup>bright</sup> sont l'IFN- $\gamma$ , le TNF- $\alpha$ , le GM-CSF (Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating factor), l'IL-1 $\beta$ , l'IL-2, l'IL-5, l'IL-6, l'IL-8, l'IL-10 et l'IL-13 (Reefman et al., 2010). Ces cytokines sont capables d'agir directement sur les cellules tumorales, ou indirectement sur d'autres populations immunitaires. A titre d'exemple, les NK peuvent moduler à la fois la réponse immune antitumorale innée en favorisant l'activation des macrophages, et la maturation des cellules dendritiques, mais

peuvent moduler la réponse adaptative également, en favorisant la polarisation des cellules T CD4<sup>+</sup> vers la voie Th1, contribuant ainsi à l'activation des lymphocytes CD8<sup>+</sup> T cytotoxiques grâce à leur production d'IFN- $\gamma$  (Harizi, 2013).

### 3.2. Les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> cytotoxiques (CTL)

Les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> assurent des fonctions effectrices de la réponse immunitaire spécifique. Après le développement dans le thymus, les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> naïfs entrent dans la circulation et migrent vers les organes lymphoïdes secondaires où ils peuvent potentiellement rencontrer un peptide antigénique présenté par des CPA professionnelles. Trois signaux sont nécessaires pour l'activation des lymphocytes T CD8<sup>+</sup>. Le premier signal est délivré par l'interaction du récepteur des cellules T (TCR) avec le CMH-I chargé avec un peptide antigénique tumoral et présenté par les DC matures. Le deuxième, signal est quand à lui déclenché suite à l'interaction entre les molécules de co-stimulation exprimées à la surface des DC et les LT CD8<sup>+</sup> (ex: CD70/CD27) (Chen and Flies, 2013). Finalement, le troisième signal consiste à la stimulation induite par les cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-12. L'activation des LT CD8<sup>+</sup> conduit à leur prolifération ainsi qu'à leur différenciation qui s'accompagne d'importantes modifications dans leur profil d'expression génique et de l'acquisition de différentes fonctions (Kaech et al., 2002). L'état de différenciation des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> est un facteur déterminant pour leur capacité à répondre de manière efficace à la progression tumorale. On peut distinguer 4 populations différentes de cellules T CD8<sup>+</sup>: les lymphocytes T naïfs, effecteurs, effecteur/mémoire, et mémoire centraux. Chaque population présente un état d'activation et de différenciation distinct, associé à diverses caractéristiques fonctionnelles et phénotypiques (Romero et al., 2007). Au cours du processus de différenciation des cellules T CD8<sup>+</sup>, les signaux activateurs sont intégrés dans le noyau sous la forme de facteurs de transcription qui se lient à des éléments régulateurs et activent la transcription des gènes codant pour différentes protéines fonctionnelles notamment, des molécules cytotoxiques. Parmi ces facteurs de transcription, deux régulateurs clés appartenant à la famille T-box: T-bet (*TBX21*) et Eomesodermin (*EOMES*) qui sont responsables de

l'expression de la perforine, des granzymes et de l'IFN- $\gamma$  (Glimcher et al., 2004; Pearce et al., 2003 ).

L'activation de l'expression du gène *PFNI* nécessite la production d'IL-2 ainsi que d'autres cytokines (IL-4, IL-7, IL-9, IL-15, IL-21). Environ 5 à 7 jours après leur stimulation, les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> naïfs se différencient en lymphocytes T cytotoxiques qui expriment la PFN et quelques Gzms (Hamann et al., 1997). Une autre caractéristique de la différenciation des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> cytotoxiques est la perte du potentiel de domiciliation au niveau des ganglions lymphatiques, due à une diminution d'expression de CCR7 (C-C chemokine receptor type 7) et de la L-selectine (CD62L). A ce stade, les T CD8<sup>+</sup> acquièrent la capacité à migrer au niveau de tissus et de sites inflammatoires ou tumoraux signalés par des chimiokines grâce à l'augmentation de leur expression des molécules d'adhésion comme CD44, des intégrines  $\beta$ 1 et  $\beta$ 2 ou encore de récepteurs aux chimiokines CCR5 et CCR2 (Kaech et al., 2002). Les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> anti-tumoraux sont capables de reconnaître spécifiquement des antigènes tumoraux exprimés à la surface de la cellule tumorale. Quelques centaines d'épitopes de peptides tumoraux reconnus par les cellules T sont répertoriés et disponibles sur la base de données: "Cancer Immunity Peptide Database". Bien qu'ils soient trop nombreux pour être mentionnés ici, les antigènes tumoraux reconnus par les CTL peuvent être classés en différentes catégories, selon leur profil d'expression dans les tumeurs et les tissus sains et en fonction de l'origine du peptide épitopique (Restifo et al., 2012) :

- *Les antigènes de tissus différenciés non modifiés*

Après la transformation, les cellules tumorales continuent généralement à exprimer des antigènes qui sont caractéristiques de leur tissu d'origine et capables d'être reconnu par les lymphocytes T CD8<sup>+</sup>. Par exemple, les antigènes de différenciation des mélanocytes MDA (Melanocyte Differentiation Antigens) tels que le PMEL (gp100), MART1 (Melanoma antigen recognized by T cells 1), TRP1 et TRP2 (Tyrosinase Related Protein), sont exprimés par la plupart des tumeurs du mélanome, mais sont également exprimés par des mélanocytes normaux dans la couche basale de la peau, dans l'épithélium pigmentaire rétinien dans les yeux et dans l'oreille interne où ils sont associés à la production de mélanine (Overwijk and Restifo, 2000). L'utilisation de ces antigènes comme cibles pour la thérapie basée sur le

transfert adoptif ou pour une thérapie vaccinale présente un risque de réactions auto-immunes sauf pour les tissus qui ne sont pas essentiels à la vie (Palmer et al., 2008).

- *Les antigènes sur-exprimés*

Ces sont les produits de gènes exprimés souvent de manière ubiquitaire dans les cellules normales, mais qui sont surexprimés dans les cellules tumorales. Parmi eux on trouve par exemple p53 mutée, le proto-oncogène HER2/Neu, Hsp70....

- *Les produits de gènes mutés*

L'instabilité génétique est une caractéristique majeure de la cellule tumorale. Elle génère de nombreux antigènes associés aux tumeurs. En effet, les différentes mutations, délétion, insertion ou translocation des gènes codant des protéines impliquées dans le contrôle de la prolifération, la mobilité et l'adhésion cellulaire (tels que les proto-oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeur) génèrent des protéines anormales. L'expression de ces protéines anormales par les cellules tumorales peut fournir des peptides portant une mutation, qui seront reconnus par des lymphocytes T. Ces nouveaux antigènes sont à l'heure actuelle appelé « néo-antigènes » (Davies and Samuels, 2010). En comparaison avec les antigènes non mutés, ces néo-antigènes sont particulièrement intéressants pour le contrôle des tumeurs, car les cellules T qui sont spécifiques pour ces néo-antigènes ne sont pas affectées par la tolérance centrale. En conséquence, les néo-antigènes semblent représenter des cibles idéales pour l'immunothérapie anticancéreuse basée sur les cellules T (Schumacher and Schreiber, 2015).

- *Les antigènes viraux*

Certains cancers associés à une transformation induite par des virus peuvent exprimer des produits viraux, qui sont des cibles attrayantes parce qu'ils ne sont pas exprimés par les tissus normaux. En effet, il est possible de cibler des protéines virales oncogéniques codées par les virus associés au cancer, comme celles induites par le virus d'Epstein-Barr (Brenner, 2010) ou du papillomavirus (Kenter et al., 2009).

- *Les antigènes produits par des changements épigénétiques*

Les changements épigénétiques peuvent déclencher l'expression d'une catégorie de protéines non mutées appelées antigènes de la lignée germinale du cancer ou antigènes du type "Cancer-testis" (Hofmann et al., 2008). Les antigènes "Cancer-testis" sont normalement exprimés par les cellules germinales dans les testicules et les ovaires fœtaux, mais sont

également exprimés par de nombreux types de tumeurs. Ces antigènes sont parmi les cibles immunothérapeutiques les plus attrayantes en raison de leur expression partagée par de nombreux types histologiques tumoraux et leur absence d'expression dans les tissus normaux (par exemple: MAGE-A/B/C, NY-ESO-1...).

- *Les antigènes du stroma et des vaisseaux tumoraux non transformés*

Les tumeurs contiennent de nombreux autres types cellulaires, y compris un grand nombre de cellules stromales. Des résultats récents indiquent que le ciblage de ces types cellulaires peut également favoriser l'élimination tumorale (Engels et al., 2012). Par exemple, une étude a montré que l'ablation des cellules mésenchymateuses infiltrant les tumeurs qui exprimaient la protéine d'activation des fibroblastes (FAP) a conduit à une nécrose tumorale (Kraman et al., 2010). Ces données suggèrent que les lymphocytes T pourraient induire une réponse immune antitumorale sans cibler directement les cellules tumorales. De plus, la néo-vascularisation des tumeurs peut être soumise à une attaque immunitaire car, par rapport à la vascularisation existante, elle peut exprimer des niveaux plus élevés de certaines molécules, telles que le récepteur du facteur de croissance endothélial vasculaire 2 (VEGFR2) (Chinnasamy et al., 2010).

## **II. Les mécanismes de cytotoxicité des cellules effectrices**

Malgré des différences non négligeables que présentent les lymphocytes T cytotoxiques et les cellules NK dans leur mode d'activation et leur mode de reconnaissance des leurs cibles, ces cellules effectrices ou « tueuses » détruisent leurs cellules cibles, notamment tumorales, par des mécanismes similaires. Deux voies principales de lyse sont ainsi utilisées par les cellules NK et les CTL. La première voie consiste en l'exocytose polarisée du contenu des granules cytotoxiques (CG) au niveau de la synapse immunologique formée entre la cellule effectrice et sa cellule cible. La deuxième voie dépend de l'engagement de récepteurs pro-apoptotiques dits « à domaine de mort » appartenant à de la superfamille du récepteur au TNF- $\alpha$  par leurs ligands respectifs exprimés par les CTL/NK activées.

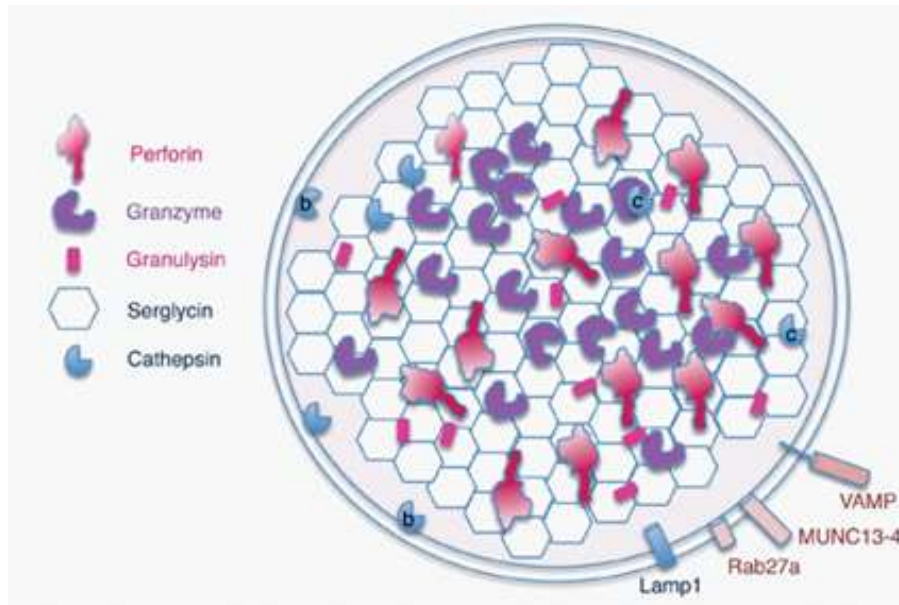
## 1. La voie d'exocytose des granules cytotoxiques : généralités

La voie d'exocytose des granules cytotoxiques représente la voie de lyse majeure utilisée par les CTL et les cellules NK pour détruire leurs cellules cibles, notamment tumorales. En effet, les CTL ainsi que les cellules NK contiennent des lysosomes sécrétoires spécialisés appelés granules cytotoxiques (CG). Ces granules contiennent des enzymes capables d'induire la mort des cellules cibles appelées granzymes (Gzms) (pour « granule enzymes »). De plus, la perforine (PFN), un autre composant des CG, est une protéine capable de former des pores qui sont indispensables pour délivrer les granzymes dans le cytoplasme des cellules cibles et ainsi initier leur mort. Suite à la reconnaissance des cellules cibles par les CTL et les NK, une séquence d'événements coordonnés va conduire à la libération polarisée du contenu des CG au niveau d'une zone finement organisée, appelée synapse immunologique (SI), aboutissant à la destruction de la cellule cible. Après avoir lysé une cellule cible, les cellules effectrices demeurent intactes, et possèdent donc la capacité de lyser d'autres cibles, on parle ainsi de « tueuses en série ».

### 1.1. Contenu des granules cytotoxiques

Les CG sont présents uniquement dans les cellules tueuses et contiennent à la fois des molécules lysosomales classiques et des molécules effectrices spécifiques aux CG responsables de l'élimination des cellules cibles (Trapani, 2012). En effet, comme les lysosomes classiques (présents dans toutes les cellules), les CG contiennent la protéine membranaire CD107a/Lamp1 et des enzymes lysosomales comme les cathepsines (Figure 4). Il est cependant important de noter que les cathepsines B et C jouent un rôle particulier dans les granules cytotoxiques. En effet, la cathepsine B associée à la membrane des granules, contribuerait à protéger la cellule tueuse contre les dommages membranaires induits par sa propre PFN après l'exocytose des CG, même si ce dernier point reste sujet à controverse (Balaji et al., 2002). La cathepsine C, quant à elle, clive les pro-granzymes. Ce clivage est accompagné d'un changement conformationnel, responsable de l'activation des Gzms (Pham et al., 2004). Les CG contiennent également des protéines associées à la membrane spécifiques

aux lysosomes sécrétoires, notamment VAMP8, Munc13-4 et Rab27a. Ces molécules sont responsables du trafficking vésiculaire et sont essentielles à l'exocytose des granules et à la libération de leur contenu au niveau de la SI (Loo et al., 2009) (Fukuda, 2013) (Figure 4).



**Figure 4: Principaux constituants des granules cytotoxiques.**

Les molécules effectrices cytolytiques, la perforine, les granzymes et la granulysine sont liées à une matrice de protéoglycanes (serglycine). Les granules cytotoxiques contiennent également des molécules trouvées dans tous les lysosomes, tels que Lamp1 (CD107a) et des cathepsines, ainsi que des protéines associées à la membrane spécifiques aux lysosomes sécrétoires, telles que VAMP8, Munc13-4 et Rab27a essentielles à l'exocytose des granules cytotoxiques. D'après Lieberman J. <http://oncohemakey.com/cell-mediated-cytotoxicity-3/>

En outre, les CG contiennent des composants qui leur sont propres et les distinguent des lysosomes « normaux ». Comme mentionnés précédemment, les CG contiennent des molécules effectrices spécifiques, notamment la PFN et une famille de Gzms qui sont complexés avec un protéoglycane riche en sulfate de chondroïtine appelé serglycine. La serglycine joue un rôle important dans la maturation des CG ainsi que dans le stockage de la PFN et du GzmB (Sutton et al., 2016). En effet, l'interaction granzyme-serglycine est décrite pour empêcher la diffusion des granzymes dans la cellule tueuse et maintenir leur concentration avant la sécrétion au centre des granules. De même, la PFN se trouve dans le noyau central des CG liée à ces protéoglycanes sous forme de monomères (Metkar et al., 2002) (Figure 4). La PFN est une protéine formant des pores (dont le mécanisme d'action est détaillé dans le paragraphe II.1.3). Une autre molécule qui forme également des pores, la

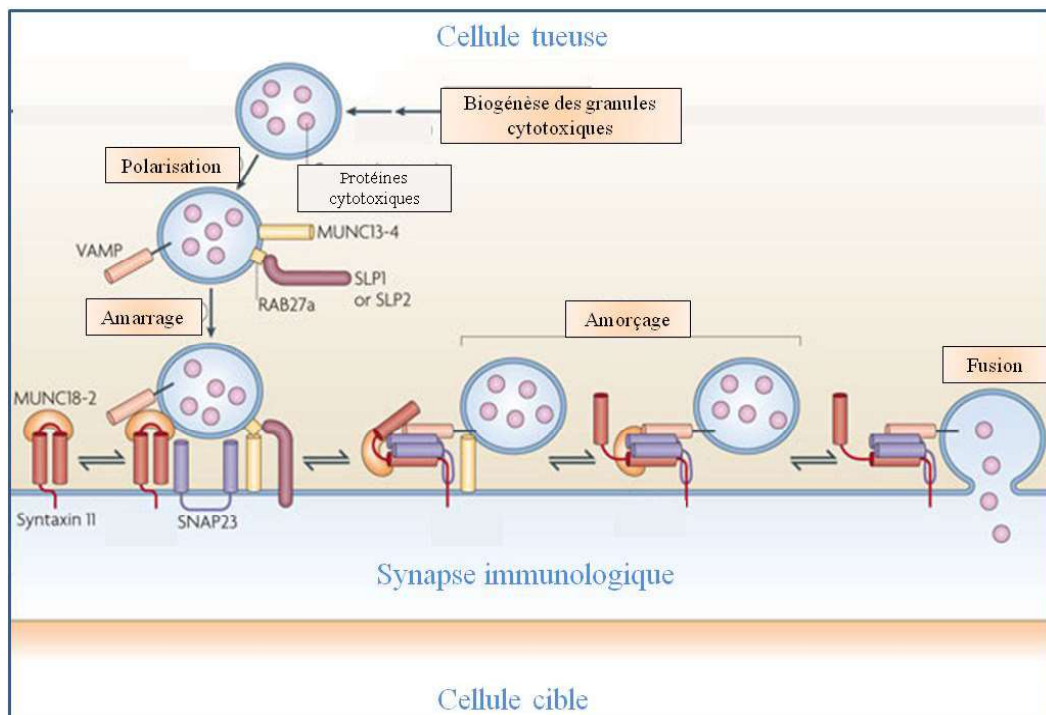
granulysine a été décrite comme possédant une activité antibactérienne et antiparasitaire. (Dotiwala et al., 2016). Chez l'homme, cinq Gzms ont été identifiés (les GzmA, B, H, K et M) (Figure 4). Ces Gzms sont codées dans trois clusters distincts: les gènes des GzmA et GzmK (deux tryptases) sont localisés sur le chromosome 5 ; les gènes des GzmB et GzmH sont localisés sur le chromosome 14 et le gène du GzmM qui clive après une Met ou une Leu est localisé sur le chromosome 19 (Chowdhury and Lieberman, 2008). Les mécanismes d'action de ces Gzms seront détaillés dans le paragraphe II. 1.4)

## **1.2. Mécanismes d'exocytose des granules cytotoxiques**

Après l'engagement avec leurs récepteurs activateurs (TCR et récepteurs activateurs des NK), les lymphocytes cytotoxiques sont activés et prêts à lyser leurs cellules cibles. Cette activation est rehaussée par les récepteurs de co-stimulation (pour les CD8 ou CD4) et des molécules d'adhésion comme LFA-1 qui forment un cluster bien organisé en anneau concentrique constituant la synapse immunologique (SI) entre le lymphocyte cytotoxique et la cellule cible (Orange, 2007). L'activation de la cellule tueuse conduit à un influx de calcium intracellulaire qui induit, à son tour, à différents événements moléculaires aboutissant à la polarisation des CG du cytosol vers la SI. Cette polarisation des granules cytotoxiques est à la fois dépendante du réseau des microtubules et du cytosquelette d'actine. En effet, par son action de polymérisation accrue au niveau de la SI, l'actine entraîne la translocation du centre organisateur des microtubules (MTOC) dans cette zone, ce qui va conduire à l'acheminement des granules lytiques au centre de la synapse pour que leur contenu puisse être libéré par exocytose (Mentlik et al., 2010). Différentes protéines motrices sont impliquées dans le déplacement des CG le long des microtubules, parmi lesquelles la dynéine et le diacylglycérol (Quann et al., 2009). L'amarrage des CG au niveau de la membrane plasmique de la cellule tueuse est orchestré par la liaison de la protéine Rab27a du côté cytosolique de la membrane des CG matures avec les protéines SPL1 et SPL2 (synaptotagmin-like protein) qui sont ancrées à la membrane plasmiques du lymphocyte. Ces granules vont commencer alors la fusion avec la membrane plasmique grâce à l'interaction de Munc13-4 présents sur leur surface avec la syntaxin 11 présente sur la membrane plasmique. Ceci entraîne la formation d'un complexe de type SNARE (Soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor Attachment



protein REceptor) composé des protéines VAMP (Vesicle-Associated Membrane Protein), syntaxin 11 et SNAP23 (SyNaptosomal-Associated Protein of 23 kDa) (Krzewski et al., 2011 ; Loo et al., 2009). L'activation conformationnelle du complexe SNARE, requière d'autre part la participation des protéines Munc18-2, ce qui va permettre la fusion de la membrane des CG avec la membrane plasmique, conduisant à l'exocytose du contenu des granules dans la synapse immunologique (de Saint Basile et al., 2010) (Figure 5).



**Figure 5: Etapes nécessaires pour l'exocytose du contenu des granules cytotoxiques.**

Suite à l'activation de la cellule cytotoxique, les granules cytotoxiques (CG) sont polarisés vers le site de formation de la synapse immunologique. Les CG matures s'accrochent à la membrane plasmique du lymphocyte par l'interaction de RAB27a avec les protéines SLP1 ou SLP2. De plus, les CG interagissent avec un complexe d'ancrage formé de MUNC18-2 et de syntaxine 11 dans une conformation fermée. Les vésicules accrochées sont alors amorcées par MUNC13-4, ce qui induit le passage de la syntaxine 11 d'une conformation fermée à une conformation ouverte. Un complexe SNARE se forme alors entre VAMP, syntaxine 11 et SNAP23. La finalisation de la réaction de fusion se produit lorsque MUNC18-2 change de conformation induisant la fusion de la membrane des CG avec la membrane plasmique, ce qui va permettre l'exocytose du contenu cytotoxique des granules dans la synapse immunologique. Adapté de (de Saint Basile et al., 2010).

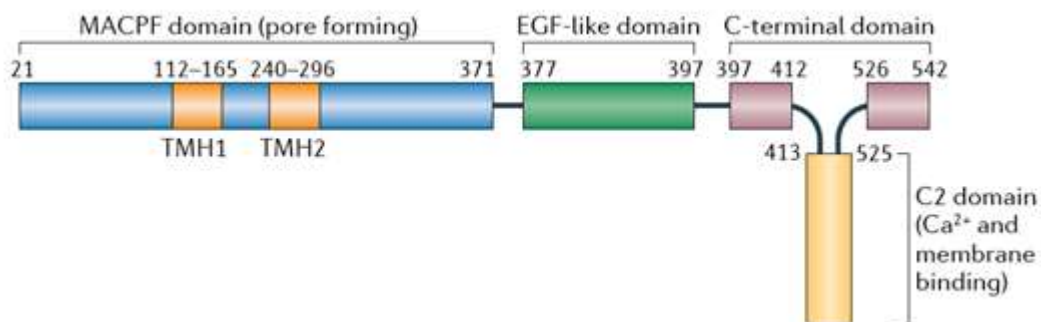
### 1.3. La perforine : une protéine clé pour la cytotoxicité à médiation cellulaire

Comme il a été déjà mentionné, la cytotoxicité et l'expression de la PFN sont étroitement corrélées. Les CTL et les NK représentent les classes majeures des lymphocytes exprimant cette protéine.

#### 1.3.1. Structure de la protéine

La PFN est initialement synthétisée sous forme de monomères constitués de 533 acides aminés formant trois domaines fonctionnels (Figure 6):

- (1) un domaine N-terminal encore appelé complexe d'attaque membranaire ou MACPF (Membrane Attack Complex/PerForin). Ce domaine contient deux  $\alpha$ -hélices TMH1 et TMH2 (Transmembrane Helical Region) impliquées dans l'insertion des monomères de PFN dans les membranes riches en cholestérol
- (2) un deuxième domaine de type « EGF-like »
- (3) un troisième domaine C-terminal contenant un domaine C2 de fixation au  $\text{Ca}^{2+}$  et de liaison à la membrane



**Figure 6: Structure d'un monomère de perforine.**

La perforine est formée de 3 domaines fonctionnels. Le MACPF contient deux régions de pénétration membranaire TMH1 et TMH2, suivi du domaine EGF, puis du domaine C-terminal (comprenant une région à liaison disulfure courte) contenant le domaine C2 de liaison au  $\text{Ca}^{2+}$  et de liaison à la membrane.

Des travaux de cristallographie à rayons X à partir de plusieurs protéines reliées à la perforine, notamment la protéine C9 du complément, ont montré que ces protéines sont homologues au niveau de leur domaine MACPF avec les CDC (Cholesterol-Dependent

Cytolysins) chez les bactéries. Cette relation inattendue a fourni plusieurs indices mécanistiques sur la fonction de la PFN (Rosado et al., 2007).

### 1.3.2. Mécanisme d'insertion dans les membranes

A forte concentration, les monomères de PFN se multimérisent au niveau des membranes riches en cholestérol en formant des pores de 5 à 15 nm de diamètre par un processus dépendant du  $\text{Ca}^{2+}$  et du cholestérol (Law et al., 2010). Des études de biophysique plus récentes ont montré que la PFN peut former deux types de pores: des petits pores appelés "pré-pore", composés d'environ 7 monomères et d'autres pores d'une dimension beaucoup plus large et plus stables (Praper et al., 2011 ; Thiery et al., 2011). Des expériences de reconstruction par cryo-microscopie électronique suggèrent également que ces grands pores se composent d'environ 19 à 24 monomères de PFN et possèdent un lumen assez large pour faire passer facilement les monomères du GzmB ou les dimères du GzmA. De plus, la formation des pores de PFN nécessite la présence de cholestérol dans les membranes cibles, ceci expliquant pourquoi cette protéine est inactive face aux pathogènes qui ne synthétisent pas le cholestérol.

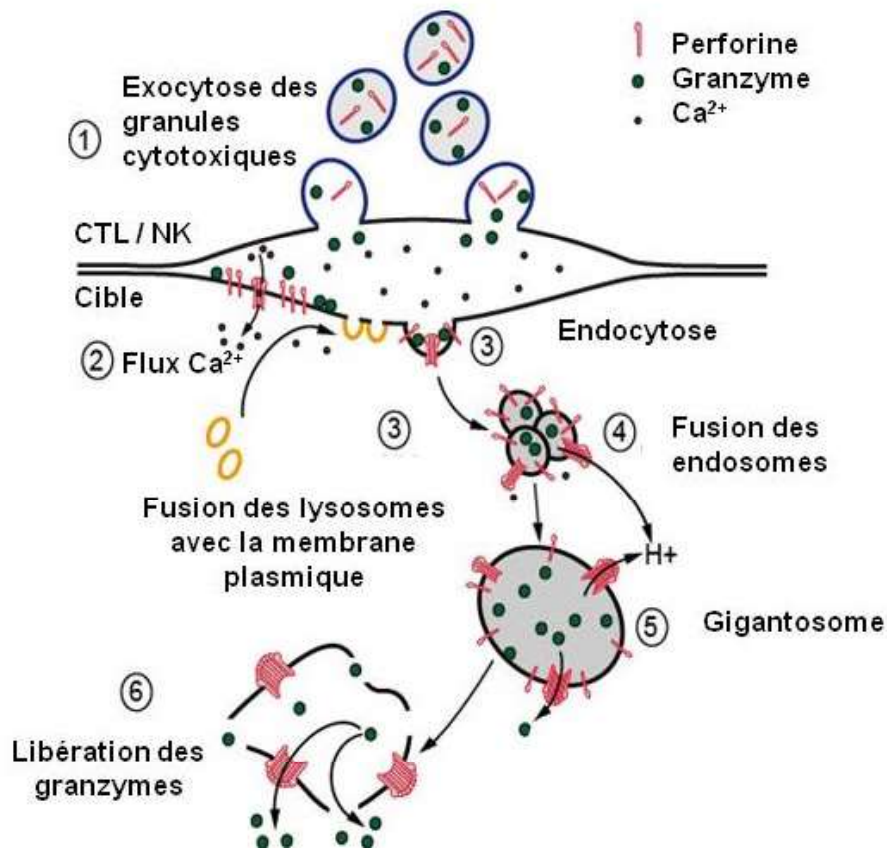
Le processus de formation d'un pore de PFN est un processus qui peut être divisé en 3 étapes: (1) liaison des monomères à la membrane, (2) multimérisation et (3) formation de pores transmembranaires. Chacune de ces étapes implique des transitions structurales. Le domaine C2 de la perforine, qui va initier l'amarrage de la protéine avec les lipides membranaires, contient des résidus d'acides aspartiques qui vont pouvoir fixer jusqu'à 4 atomes de  $\text{Ca}^{2+}$  (Voskoboinik et al., 2005). Pendant la formation des pores, les hélices  $\alpha$  du domaine MACPF (extrémité N-terminale) se détendent pour s'insérer dans la membrane lipidique comme des feuillets  $\beta$  qui s'assemblent en tonneau  $\beta$  durant la multimérisation (Ramachandran et al., 2004). Entre les deux domaines N et C-terminal se trouve le domaine EGF-like, dont le rôle demeure très mal connu. Néanmoins, il a été démontré que les monomères de PFN peuvent interagir avec l'hélices- $\alpha$  de la région MACPF à partir de ce domaine ce qui lui conférerait un rôle dans l'orientation des monomères de PFN vers la membrane (Law et al., 2010).

### 1.3.3. Mécanisme d'internalisation des granzymes induite par la perforine

Historiquement, le premier modèle proposé permettant d'expliquer l'internalisation des Gzms induite par la PFN s'est basé sur ses capacités à former directement des pores suffisamment larges dans la membrane plasmique des cellules cibles, pour permettre la diffusion passive des Gzms dans le cytosol de la cible. Des expériences de microscopie électronique et cryo-électronique ainsi que des études structurales de cristallographie à rayons X, ont d'ailleurs montré que les pores de PFN (avec un diamètre interne de 16 à 22 nm) devraient facilement permettre aux Gzms (d'un diamètre globulaire d'environ 4 nm) de diffuser à travers la membrane plasmique de la cellule cible (Baran et al., 2009; Law et al., 2010).

Néanmoins, ce mode d'action de la PFN a été contesté. En effet, à forte concentration, la PFN forme des pores qui tuent les cellules cibles par nécrose, tandis qu'à une concentration dite « sublytique » (mimant les conditions physiologiques d'induction d'apoptose par les CTL/NK), les pores qui se forment au niveau de la membrane plasmique pourraient être trop petits et/ou trop instables pour laisser passer passivement de grosses protéines comme les Gzms (Sauer et al., 1991). Des travaux ont suggéré que les Gzms seraient internalisés dans les cellules cibles dans des endosomes (Kawasaki et al., 2000; Metkar et al., 2002). D'autres groupes ont quand à eux, mis en évidence l'existence de récepteurs pour le GzmB, notamment le CI-M6PR (Cation-Independent Mannose-6-Phosphate Receptor) et l'IGFIIR (Insulin-like Growth Factor II Receptor). Ces récepteurs membranaires augmenterait l'interaction du GzmB avec les cellules cibles (Motyka et al., 2000 ; Veugelers et al., 2006). Cependant, d'autres travaux plus récents ont clairement démontré que ces récepteurs ne sont pas essentiels ni pour l'internalisation du GzmB, ni pour l'apoptose induite par cette voie (Dressel et al., 2004 ; Kurschus et al., 2005). De plus, pour qu'une apoptose optimale de la cellule cible se produise, la PFN et les Gzms doivent être co-endocytés. Ultérieurement, un modèle hybride a été proposé, en se basant sur la capacité de la PFN (dose sublytique) à perméabiliser la membrane plasmique de la cellule cible permettant un influx transitoire de calcium dans la cellule cible, conduisant à l'internalisation des Gzms par un processus de réparation membranaire connu, appelé « wound healing response » (McNeil and Kirchhausen, 2005; Reddy et al., 2001). Au cours de ce processus, l'influx de calcium déclenche une réaction

rapide de réparation de la membrane perméabilisée où les lysosomes fusionnent avec la membrane plasmique, dans le but d'apporter du matériel membranaire nouveau et remplacer la membrane endommagée. Les lésions membranaires induites par la PFN (ou par les CTL/NK) semblent être réparées très rapidement par ce mécanisme de « cicatrisation », protégeant les cellules cibles de la nécrose et empêchant l'entrée passive de petites molécules. Néanmoins et de manière importante, ce mécanisme a aussi pour conséquence l'internalisation rapide des Gzms dans des endosomes d'une taille anormalement élevée (appelés « gigantosomes ») (Keefe et al., 2005). Cette endocytose qui permet d'internaliser les zones de membrane plasmique endommagées par la PFN est dépendante de la voie dynamine II/clathrine et permet l'internalisation du GzmB dans les cellules cibles et l'apoptose induite par les CTL/NK (Thiery et al., 2010). Par la suite, d'autres études ont montré que la PFN endocytée dans les gigantosomes, continue à se multimériser pour former de nouveaux pores plus stables et possiblement plus larges que ceux formés à la membrane plasmique, permettant une diffusion du GzmB vers le cytoplasme des cellules cibles. Ce phénomène est amplifié par la suite par une rupture de la membrane de ces endosomes induite par les pores de PFN, permettant une libération complète du GzmB endocyté (Thiery et al., 2011) (Figure 7).



**Figure 7: Mode d'action de la perforine dans l'internalisation des Gzms**

Après l'exocytose du contenu des granules cytotoxiques dans la synapse immunologique (1) la PFN se multimérise au niveau de la membrane plasmique de la cellule cible pour former de petits pores laissant passer un influx de  $\text{Ca}^{2+}$  (2) déclenchant une réponse de réparation de la membrane plasmique (3) au cours de laquelle les lysosomes fusionnent avec la membrane et la PFN et les Gzms sont rapidement internalisés grâce à un processus d'endocytose dépendant de la dynamine et de la clathrine. Les endosomes contenant PFN et Gzm fusionnent ensuite par fusion homotypique dépendante de Rab5 en réponse au flux transitoire de  $\text{Ca}^{2+}$  (4) pour former des gigantesomes. Dans les gigantesomes, la PFN continue à se multiplier pour former des pores nouveaux et éventuellement plus grands, empêchant l'acidification de l'organelle et provoquant une certaine libération de Gzms (5), avant d'induire une rupture endosomale et une libération complète des Gzms dans le cytoplasme de la cellule cible (6), où ils initient la mort cellulaire programmée. Modèle adapté de (Thiery et al., 2011).

#### 1.4. Mécanismes de cytotoxicité et rôles physiologiques des granzymes

Les granzymes sont principalement exprimés par les lymphocytes cytotoxiques même si ceux-ci peuvent être également présents chez d'autres populations leucocytaires. Ces granzymes sont synthétisés de manière similaire à d'autres serine-protéases et activés en deux

étapes. Premièrement, les granzymes sont ciblés au niveau du réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi pour l'élimination de la séquence « leader », laissant un dipeptide à l'extrémité amino-terminale de la pro-enzyme (Masson and Tschopp, 1987). Ce dipeptide est ensuite clivé à l'intérieur du granule par la cathepsine C, permettant l'activation du granzyme. Malgré le stockage des Gzms en tant que protéines actives totalement matures, ces protéases ont une activité minimale à pH acide dans les CG. En revanche, une fois internalisés dans les cellules cibles, les Gzms sont complètement actifs et peuvent déclencher la mort cellulaire en clivant leurs substrats spécifiques, présents dans le cytoplasme, les mitochondries et/ou les noyaux. De plus, ces Gzms activent indépendamment différentes voies de mort cellulaire en parallèle, avec des caractéristiques moléculaires ou phénotypique distinctes ou présentant des similitudes (Tableau 1). Cette redondance est sans doute un mécanisme évolutif fournissant une plus forte protection de l'hôte contre les pathogènes ou les tumeurs qui sont susceptibles d'échapper à la mort cellulaire impliquant cette voie des granules cytotoxiques.

Granzyme	A	B	H	K	M
<b>Type de cellule qui l'exprime</b>					
Lymphocytes T CD8 cytotoxique	++	++	+	+	
Lymphocytes T CD4 cytotoxique	+	+			
Tregs	-	+			
NKs	+	+/-			+
Cellules myéloïdes	-	+			
<b>Caractéristiques communes</b>					
Perte de l'intégrité membranaire	+	+	+	+	?
Marquage Annexine V	+	+	+	+	?
Condensation de la chromatine	+	+	+	+	?
Domages à l'ADN	+	+	+	+	?
Dépolarisation mitochondriale	+	+	+	+	?
Activation des caspases	-	+	-	-	?
<b>Type de dommage à l'ADN</b>					
Fragmentation de l'ADN	-	+	-	-	?
Cassures simple brin	+	-	+	+	-?
Marquage TdT	+	+	+	+	
Marquage Klenow	+	+	+	+	-?
<b>Type de dommage à la mitochondrie</b>					
Inhibition par sur expression de Bcl-2	-	+	?	?	?
Libération du cytochrome C	-	+	+?	?	?
Gonflement mitochondrial	+	+	++	+	+
Autophagie	-	-	-	-	+?

**Tableau 1:** Caractéristiques des différentes voies de mort cellulaire induites par les granzymes humains. Adapté de (Chowdhury and Lieberman, 2008)

#### 1.4.1. Induction de la mort cellulaire par le Granzyme A (GzmA)

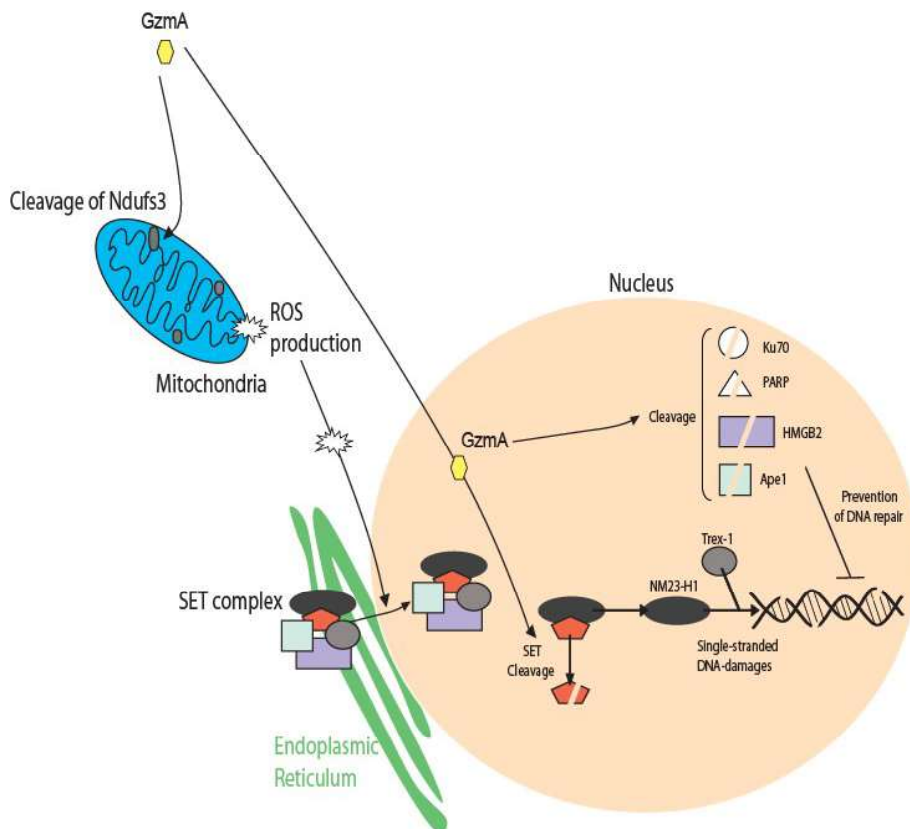
Bien qu'il soit le premier Gzm à avoir été décrit et le plus largement exprimé par les cellules cytotoxiques, les mécanismes moléculaires d'action du GzmA restent moins bien définis que ceux du GzmB. Le GzmA est une tryptase qui induit une mort cellulaire indépendante des caspases. Les cellules traitées avec du GzmA subissent un « blebbing » (bourgeonnement) de la membrane plasmique, perdent l'intégrité de leur membrane et présentent des signes de dysfonctionnement mitochondrial avec notamment une augmentation de la génération de dérivés réactifs de l'oxygène (ROS), une perte du potentiel mitochondrial transmembranaire et une perturbation de la morphologie des mitochondries. En effet, des travaux ont montré que le GzmA clive la sous-unité Ndufs3 du complexe I de la chaîne de transport d'électrons, interfère avec la fonction rédox mitochondriale et génère des anions superoxyde (Martinvalet et al., 2008; Martinvalet et al., 2005 ). Ces anions superoxydes entraînent par la suite la translocation dans le noyau d'un complexe de réponse au stress normalement associé au réticulum endoplasmique, connu sous le nom de complexe SET (Beresford et al., 2001). Le complexe SET est composé de trois nucléases:

- Ape1: une endonucléase de type réparation/excision de base
- Trex1 : une exonucléase 5'-3'
- NM23-H1: une deuxième endonucléase.

Le complexe SET contient également les protéines modifiant la chromatine SET et pp32, et la protéine de liaison à l'ADN, HMGB2. Une des fonctions de ce complexe SET est de réparer les sites abasiques générés au niveau l'ADN par les dommages oxydatifs. Une fois dans le noyau, le GzmA clive la protéine SET permettant ainsi à l'endonucléase NM23-H1 de générer des coupures simple-brin sur l'ADN. L'exonucléase Trex1 étend ensuite la cassure (Chowdhury et al., 2006). Simultanément, le GzmA clive et inactive HMGB2 et Ape1, interférant avec la réparation de ces cassures (Fan et al., 2003). De plus, la GzmA interfère avec la reconnaissance de l'ADN endommagé par le clivage de Ku70 et de poly-ADP-ribose polymérase (PARP-1) (Zhu et al., 2009). Dans le noyau, le GzmA ouvre également la chromatine en clivant l'histone H1 et en enlevant les queues des histones rendant l'ADN plus accessible à toute nucléase (Zhang et al., 2001). L'ensemble de ces processus aboutissent ainsi à des cassures de l'ADN en fragments beaucoup plus grands que les fragments oligo-



nucléosomaux générés au cours de la mort cellulaire induite par les caspases ou par le GzmB (Figure 8).



**Figure 8: Voies de mort cellulaire induite par le granzyme A**

Dans les mitochondries, le GzmA clive la sous-unité Ndufs3 du complexe I de la chaîne de transport d'électrons, qui interfère avec la fonction rédox de la mitochondrie et génère des ROS. Ces derniers induisent la translocation nucléaire du complexe SET, normalement associé au réticulum endoplasmique. Le GzmA est capable également de pénétrer dans le noyau et clive SET, permettant à l'endonuclease NM23-H1 de générer de cassures simple-brin de l'ADN. L'exonucléase Trex1 étend ensuite la cassure. Simultanément, le GzmA clive et inactive HMGB2 et Ape1, interférant avec le processus de réparation de l'ADN par excision de base, et clive Ku70 et PARP interférant avec la reconnaissance de l'ADN endommagé. D'après (Thiery et al., 2015).

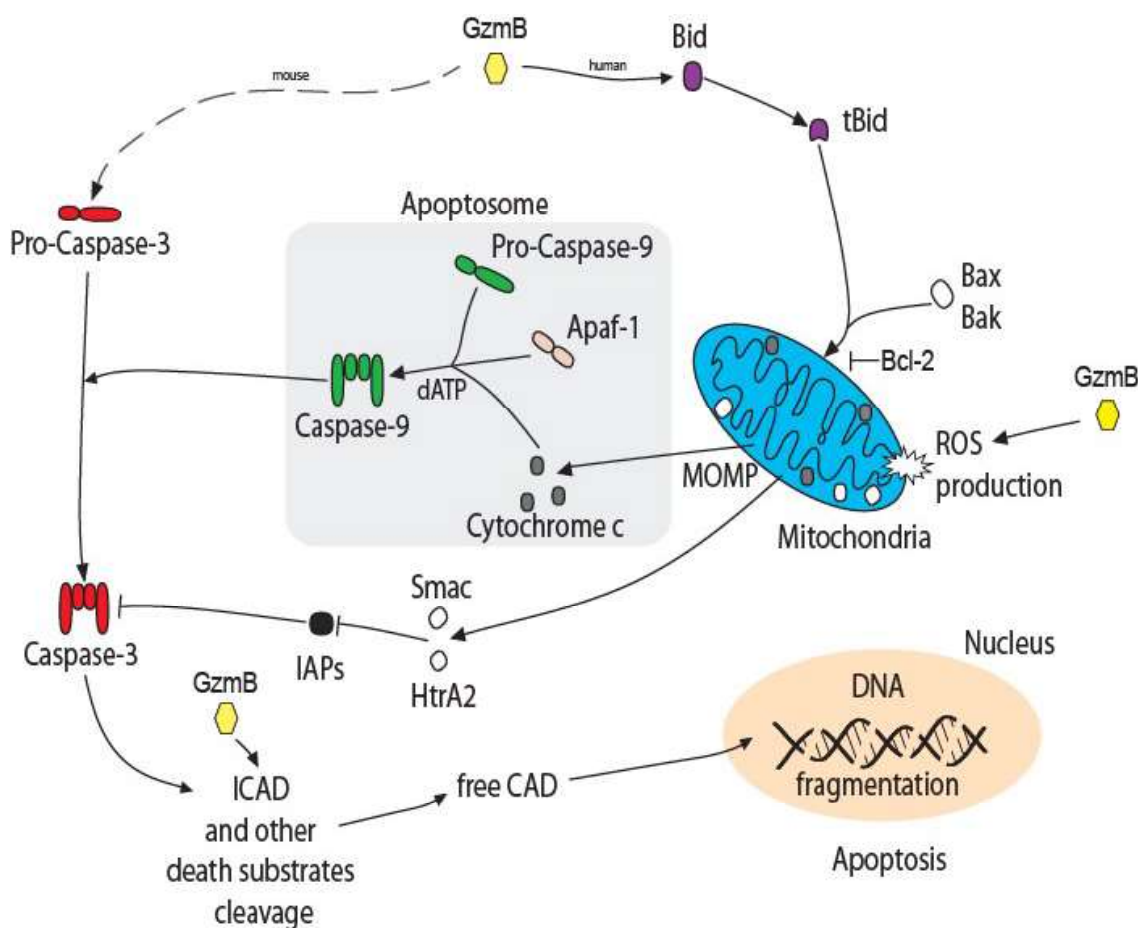
#### 1.4.2. Induction de la mort cellulaire par le Granzyme B (GzmB)

Le GzmB est unique parmi les Gzms car il clive après des résidus d'acide aspartique, comme les caspases. Le GzmB est un puissant inducteur de différentes voies apoptotiques dépendantes ou non dépendantes des caspases (Kaiserman et al., 2006; Lieberman, 2003 ). Une fois libéré dans le cytosol d'une cellule cible, le GzmB peut accéder à plusieurs substrats intracellulaires cruciaux pour l'induction de la mort cellulaire. Néanmoins, il est très important de noter qu'en raison de différences subtiles dans leurs séquences respectives, les GzmB

humains et murins peuvent différer d'une manière importante quant aux substrats préférentiellement ciblés et quant à l'efficacité avec laquelle ils sont clivés. Ces différences ont d'ailleurs introduit de nombreuses controverses et incohérences dans la description des voies de signalisation apoptotiques induites par le GzmB lors des premiers travaux concernant cette protéase où les GzmB humains ou murins étaient utilisés sans distinctions. Ainsi, contrairement au GzmB humain, le GzmB murin clive directement la pro-caspase 3 effectrice qui va à son tour initier la libération de la DNase CAD (Caspase-Activated DNase), impliquée dans la fragmentation de l'ADN conduisant à l'apoptose de la cellule cible, en clivant son inhibiteur ICAD (Inhibitor of CAD) qui induit ainsi la mort cellulaire.

Chez l'Homme, le GzmB (hGzmB) induit préférentiellement l'apoptose des cellules cibles par la voie mitochondriale, qui est un processus hautement régulé impliquant des protéines de la famille Bcl-2 (Sutton et al., 2003). Le hGzmB clive préférentiellement le membre pro-apoptotique de la famille Bcl-2, de type « BH3-only », Bid (Heibein et al., 2000). La forme tronquée de Bid (tBid) va ensuite altérer la membrane mitochondriale externe (OMM) d'une manière Bax et/ou Bak-dépendante pour permettre la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe (MOMP), la libération de facteurs pro-apoptotiques tels que le cytochrome c, le second activateur mitochondrial des caspases (Smac)/Diablo et la serine protéase HtrA2/Omi. Ces deux derniers facteurs facilitent l'activation complète de la caspase 3 en bloquant l'action inhibitrice des IAPs (Inhibitors of Apoptosis Protein). Une fois libéré, le cytochrome c se lie à APAF-1 (Apoptotic Peptidase Activating Factor 1), une protéine cytoplasmique avec un domaine de recrutement des caspases. L'association de plusieurs sous-unités de cytochrome c/APAF-1 forme un complexe recrutant la pro-caspase 9. Ce complexe multimérique, également appelé apoptosome, permet l'activation de la procaspase-9 en présence d'adénosine triphosphate (ATP). Une fois activée, la caspase-9 se dissocie de l'apoptosome et active les caspases effectrices, notamment la caspase-3 (Zou et al., 1999). D'autre part, il a également été montré que le hGzmB est capable d'initier directement l'activation des caspases effectrices (notamment la caspase 3), mais ce clivage de la procaspase 3 reste incomplet sans la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe et la libération subséquente de Smac/Diablo et HtrA2/Omi (Du et al., 2000; Sutton et al., 2003 ).

De plus, le hGzmB induit également la mort cellulaire en générant des ROS au niveau des cellules cibles (Reactive Oxygen Species). En effet, le hGzmB clive directement plusieurs sous-unités du complexe NADH: ubiquinone oxydoréductase à l'intérieur des mitochondries. Ceci conduit à la production mitocentrique des ROS qui ont notamment pour effet de faciliter la libération des facteurs apoptogènes des mitochondries, notamment du cytochrome c (Jacquemin et al., 2015). Enfin, il a été suggéré que GzmB peut induire la mort des cellules cibles en l'absence de Bid, Bax et Bak, notamment en clivant directement ICAD pour libérer l'endonucléase CAD (Thomas et al., 2000) (Figure 9).



**Figure 9: Les voies apoptotiques induites par le Granzyme B**

Le GzmB peut initier les voies apoptotiques mitochondriales en clivant la protéine BH3-only, Bid. Bid-clivée (tBid) favorise l'oligomérisation de Bax et/ou de Bak au niveau de la membrane mitochondriale externe (qui peut être inhibée par la protéine anti-apoptotique Bcl-2) conduisant à la libération du cytochrome c, l'assemblage de "l'apoptosome" suivi par l'activation de la caspase 3 et le clivage de différents substrats qui induisent la mort, y compris ICAD, l'inhibiteur de l'endonucléase CAD. Le GzmB peut également cliver directement la procaspase 3 ou ICAD, et induit une production mitocentrique de ROS pour favoriser l'apoptose. Le GzmB humain opère

préférentiellement par la voie Bid/mitochondrie, alors que GzmB murin induit préférentiellement l'activation directe de la caspase 3. D'après (Thiery et al., 2015)

### 1.4.3. Induction de la mort cellulaire par les Gzms orphelins

Bien que les trois autres granzymes humains (GzmH, GzmK, et GzmM), également appelés granzymes orphelins, aient déjà été identifiés à la fin des années 1980 et au début des années 1990, l'élucidation de leur fonction n'a commencé que plus tard avec l'identification de certains substrats.

La fonction du GzmH a été décrite, en premier lieu, pour son rôle dans l'immunité antivirale. Le GzmH peut en effet interférer avec la réplication d'adénovirus humains en dégradant une protéine de liaison à l'ADN et la protéine d'assemblage adénovirale 100K (Andrade, 2010), mais pourrait également cliver la phosphoprotéine multifonctionnelle La, conduisant à sa translocation cytoplasmique, ce qui interfère avec l'activité traductionnelle du virus de l'hépatite C (Romero et al., 2009). En outre, une mort cellulaire induite par le GzmH a été décrite. Cette mort cellulaire est indépendante des caspases mais on observe une génération de ROS, une dissipation du potentiel membranaire mitochondriale ( $\Delta\Psi_M$ ), une condensation de la chromatine et une fragmentation de l'ADN nucléaire (Fellows et al., 2007).

Le GzmK induit la mort cellulaire par un processus qui est semblable à la fois à l'apoptose induite par le GzmA et le GzmB. Le GzmK provoque le clivage de Bid et induit une MOMP, une libération de cytochrome c et de l'endonuclase G (EndoG), mais semble induire la mort cellulaire indépendamment des caspases (Zhao et al., 2007). D'autres travaux ont également montré que le GzmK clive différents substrats communs avec le GzmA, y compris SET et Ape1, et déclenche également la production de ROS, la translocation de SET vers le noyau et des cassures simple-brin de l'ADN.

Enfin, le GzmM induit également rapidement une mort cellulaire, même si les différentes études publiées restent controversées sur les différents aspects de ce processus. Il a été ainsi décrit que GzmM induit une mort cellulaire indépendante des caspases sans MOMP, ni exposition de la phosphatidyl-sérine ou fragmentation de l'ADN. Cette mort se caractérise

par une morphologie cellulaire unique des cellules cibles, avec un gonflement rapide, une formation de grandes vacuoles cytoplasmiques et une condensation de la chromatine avec une légère segmentation des nucléoles (Bovenschen et al., 2008 ; Cullen et al., 2009 ; Kelly et al., 2004). En revanche, d'autres études ont montré que le GzmM active une mort cellulaire dépendant des caspases sans clivage de Bid, mais avec une MOMP, la libération de cytochrome c, la génération de ROS, une exposition de la phosphatidyl-serine, le clivage de l'inhibiteur d'apoptose XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis protein) et de ICAD suivie de l'activation de CAD, et également une perturbation du réseau de microtubules (Lu et al., 2006).

### 1.5. Rôle dans l'immunité antitumorale

L'importance de la voie d'exocytose des granules cytotoxiques dans l'immunité antitumorale a été dans un premier temps mise en évidence dans des modèles murins. En effet, environ 60% des souris *PFN*<sup>-/-</sup> développent spontanément avec l'âge des lymphomes à cellules B hautement agressifs (Smyth et al., 2000). Ces souris sont également plus sensibles aux tumeurs chimiquement induites (Schreiber and Podack, 2009) et aux adénocarcinomes mammaires induit par des oncogènes (Street et al., 2007). Au cours de leur vieillissement, ces souris développent également des sarcomes et adénomes pulmonaires. Chez l'Homme, une déficience génétique en synthèse ou sécrétion de PFN est associée à divers pathologies que l'on appelle «perforinopathies», y compris la FHL (Familial Hemophagocytic Lymphohistiocytosis), qui est une maladie autosomale récessive débutant tôt dans l'enfance. La FHL de type 2 est associée avec des mutations bi-alléliques du gène *PFN*, et est caractérisée par une prolifération incontrôlée des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> (Brennan et al., 2010), une cytotoxicité des cellules tueuses profondément altérée et une sur-activation des macrophages. Ces pathologies sont souvent de mauvais pronostic, mais certains patients présentant des mutations bi-alléliques hypomorphes qui affectent le repliement ou la stabilité de la PFN, présentent une maladie plus légère qui n'est. Ces patients sont susceptibles de développer des hémopathies malignes, telles que des leucémies ou des lymphomes. (Brennan et al., 2010 ; Janka, 2012). De plus, un variant de PFN présent chez 3 à 17 % de la population caucasienne affectant le repliement correct de la protéine conduit à une prédisposition plus élevée au

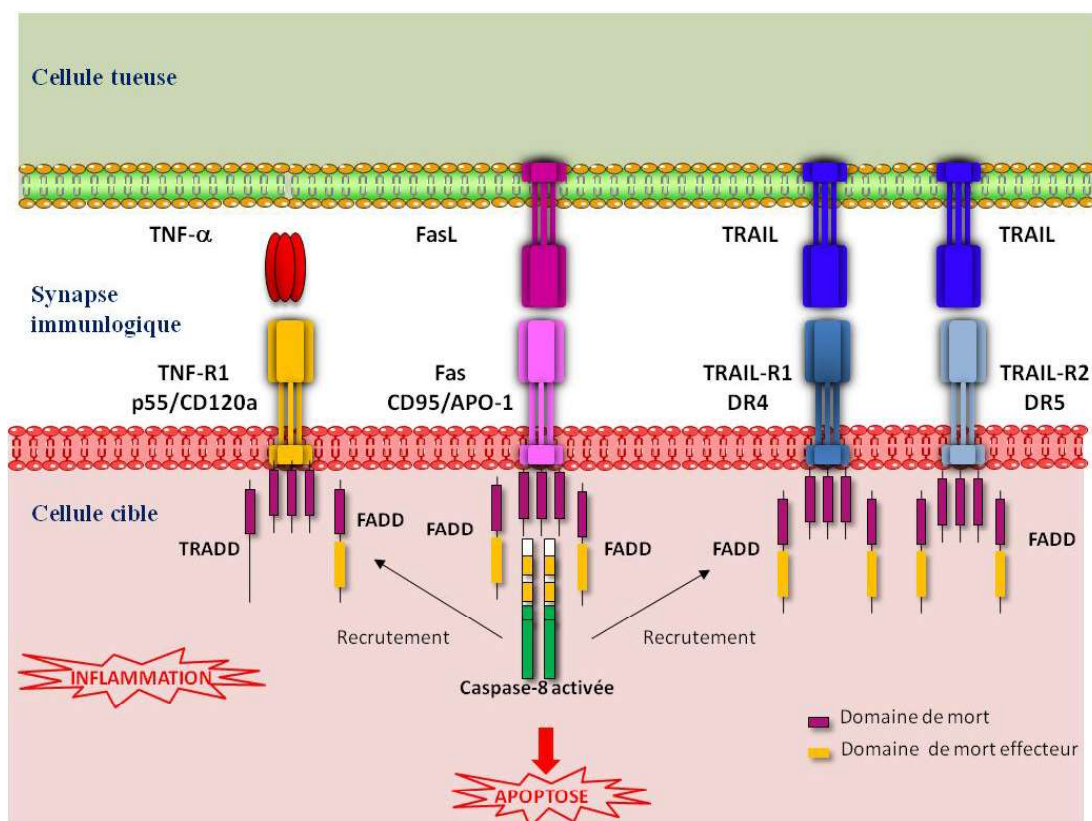
développement des divers lymphomes et leucémies (Cannella et al., 2007). L'ensemble de ces données témoignent du rôle crucial de la PFN dans l'immuno-surveillance tumorale.

En ce qui concerne les Gzms, aucun syndrome clinique humain n'a été identifié avec des mutations sur les 5 gènes codant les Gzms humains. De la même manière, au niveau des modèles murins  $GzmA^{-/-}$ ,  $GzmB^{-/-}$  ou  $GzmM^{-/-}$  générés, seuls des phénotypes légers ont pu être observés (Davis et al., 2001; Pao et al., 2005 ; Shresta et al., 1997 ). Les conséquences immunitaires sévères de la déficience en PFN peuvent donc être contrastées avec les phénotypes légers associés à la déficience en Gzm probablement du fait de la redondance fonctionnelle de ces derniers.

## **2. La voie des récepteurs à domaine de mort**

Les CTL et les NK activés peuvent également tuer leurs cellules cibles grâce à des ligands spécifiques qui ciblent les récepteurs dits « à domaine de mort » (DR/Death Receptors) exprimés par les cellules cibles. Lorsque ces récepteurs sont activés, une plateforme d'initiation de la mort de la cellule cible va alors se mettre en place. La famille des récepteurs à domaine de mort appartient à la superfamille du récepteur de type I au TNF (Tumor Necrosis Factor)- $\alpha$  (TNFR1). La plupart de ces récepteurs sont des protéines transmembranaires de type I, caractérisées par la présence d'un motif intra-cytoplasmique d'environ 80 à 100 acides aminés, appelé domaine de mort (DD/Death Domain) jouant un rôle clé dans transduction du signal apoptotique. Six récepteurs et ligands apparentés ont été identifiés chez l'homme: le récepteur de mort 3 (DR3/APO-3), le récepteur de mort 6 (DR6), mais les mieux étudiés sont FAS (appelé également CD95/APO-1), les récepteurs à TRAIL (TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand) (TRAIL-R1/DR4 et TRAIL-R2/DR5) et le récepteur TNFR1 (TNF-R1/p55/CD120a) (Wilson et al., 2009). Ces récepteurs de mort sont activés par leurs ligands respectifs appartenant tous à la famille du TNF : FasL (Fas ligand)/CD95L, TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) et TNF- $\alpha$  (Ashkenazi and Salvesen, 2014). Lors de la liaison avec leurs ligands respectifs, FAS, DR4 et DR5 déclenchent l'apoptose dans les cellules cibles, mais peuvent éventuellement s'engager dans d'autres voies (NF $\kappa$ B, JNK/c-Jun, p38/MAPK/AP-1) qui activent d'autres fonctions cellulaires, comme l'inflammation (Neumann et al., 2010; Varfolomeev et al., 2005 ). Le

TNF-R1 signale principalement l'activation des cascades NFκB, JNK/c-Jun, p38/MAPK/AP-1, mais peut aussi déclencher la mort cellulaire dans certaines circonstances (Ashkenazi and Salvesen, 2014 ; Walczak, 2011) (Figure 10). Au cours des paragraphes suivants, je détaillerai uniquement les voies de signalisation apoptotiques des récepteurs FAS et DR4/DR5.



**Figure 10: Les récepteurs à domaine de mort (DR) et leurs ligands.**

Les DRs appartiennent à la superfamille TNFR-I. Il existe 6 DRs humains, les 4 DRs les plus étudiés sont représentés ici (de gauche à droite): le récepteur TNFR1 se lie au TNF-α; Fas reconnaît FasL; les récepteurs TRAIL-R1/DR4 et TRAIL-R2/DR5 se lient tous les deux à TRAIL. Ces récepteurs sont caractérisés par la présence d'un motif appelé «domaine de mort» d'environ 80 acides aminés dans leur région C-terminale cytoplasmique. Ce domaine est crucial pour recruter les protéines adaptatrices FADD qui recrutent à leur tour la pro-caspase-8 afin de transmettre le signal apoptotique (voir Figure 11). La signalisation de TRADD est mieux caractérisée en aval du récepteur TNF-R1. Elle active divers programmes d'expression génique qui conduisent principalement à des fonction pro-inflammatoires par les facteurs de transcription NF-kappaB et AP-1.

## 2.1. La voie Fas/FasL



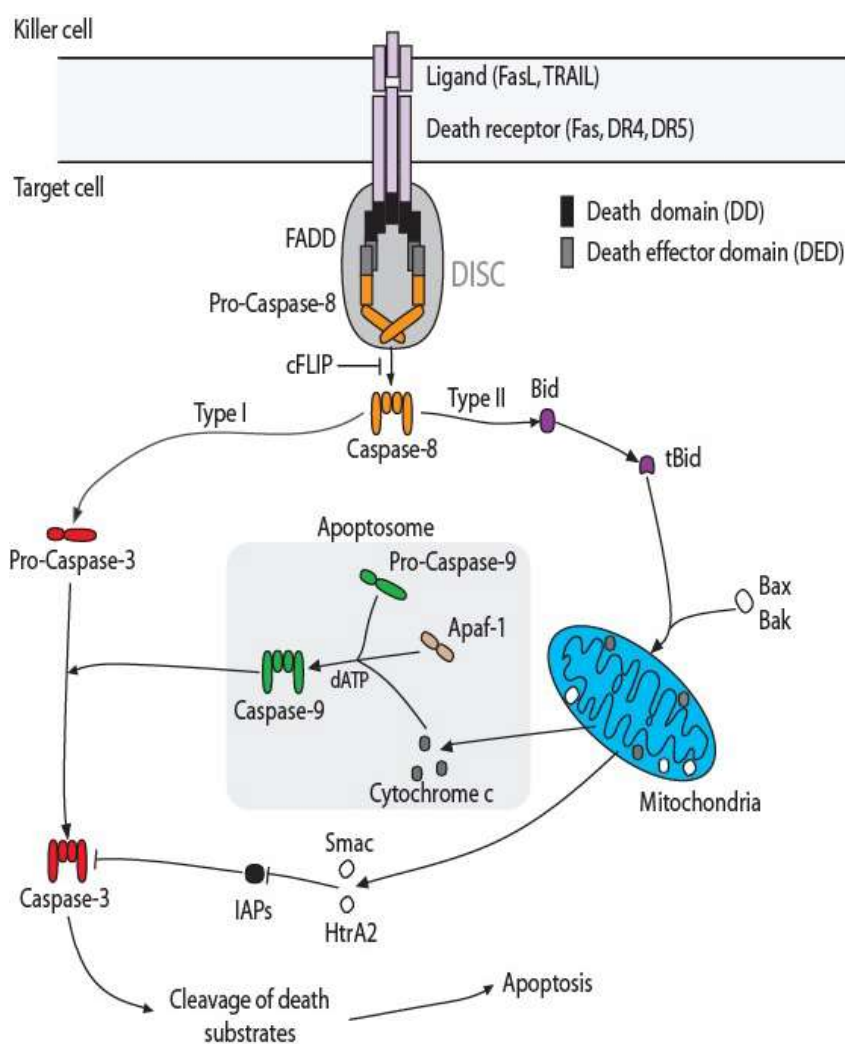
La voie Fas/FasL constitue un mécanisme de régulation homéostatique de l'activité des lymphocytes T cytotoxiques, notamment grâce à un mécanisme connu sous le nom de AICD (Activation-Induced Cell Death). Un dysfonctionnement de cette voie entraîne ainsi des syndromes lymphoprolifératifs auto-immuns (Bi et al., 2007). La voie Fas est également impliquée dans la destruction des cellules cibles, notamment tumorales, par les lymphocytes cytotoxiques (Screpanti et al., 2001 ; Thiery et al., 2005). La liaison de Fas avec FasL provoque la trimérisation du récepteur par des interactions homotypiques. Cela entraîne le recrutement des protéines adaptatrices nommées FADD (Fas-Associated protein with Death Domain) qui possèdent également un DD qui se lie au DD du récepteur. A leur tour, les protéines FADD recrutent et s'associent avec les pro-caspases initiatrices (caspase-8 et/ou la caspase-10), grâce à un second domaine nommée « domaine effecteur de mort » (DED/Death Effector Domain) exprimé à la fois par FADD et les pro-caspases initiatrices. Le complexe de signalisation ainsi formé, et permettant la transduction du signal de mort, est appelé DISC (Death-Inducing Signaling Complex) (Carrington et al., 2006). Au niveau du DISC, les pro-caspases initiatrices vont s'activer par clivage. La quantité de caspase-8 activée générée dans les cellules dites « de type I » est suffisante pour activer directement les caspases effectrices et déclencher l'apoptose. En revanche, l'engagement dans une voie apoptotique pour les cellules dites « de type II » nécessite une amplification du signal grâce à la voie mitochondriale, induite par le clivage de Bid par la caspase 8 (figure 11) (Scaffidi et al., 1998 ; Wilson et al., 2009). Etant donné que les cellules de type II dépendent de cette voie mitochondriale, l'apoptose induite par FasL peut donc être bloquée dans ces cellules par la surexpression de Bcl-2 ou Bcl-XL (Scaffidi et al., 1999). De plus, l'activation de la procaspase-8 en réponse à l'activation de Fas peut également être inhibée par des protéines inhibitrices de type FLICE cellulaire (c-FLIP) qui inhibe l'activation de la caspase 8 au niveau du DISC (Irmeler et al., 1997 ; Ozturk et al., 2012).

## 2.2. La voie TRAIL-R/TRAIL

Le ligand TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) possède deux récepteurs, TRAIL-R1 (récepteur de mort 4, DR4) et TRAIL-R2 (DR5), qui appartiennent également à la famille du TNFR1 et qui ont la particularité d'être exprimés uniquement par les cellules



transformées et pas par les cellules normales (Somasekharan et al., 2013). Une fois liés à TRAIL, ces récepteurs subissent un changement conformationnel, ce qui va permettre le recrutement de la protéine adaptatrice FADD, de la pro-caspase 8, la formation d'un complexe DISC puis l'induction d'une voie de signalisation apoptotique similaire à celle décrite ci-dessus pour Fas (Sprick et al., 2000) (Figure 11).



**Figure 11: La voie de signalisation des récepteurs Fas et DR4/DR5.**

La stimulation des récepteurs Fas, DR4 ou DR5 induite par leur ligand respectifs FasL et TRAIL, entraîne le recrutement de la protéine adaptatrice FADD, qui recrute à son tour la pro-Caspase-8 formant ainsi un complexe de signalisation (DISC). Dans les cellules de type I (à gauche), l'activation de la caspase-8 au niveau du DISC est suffisamment forte pour permettre l'activation directe de la caspase-3, aboutissant au clivage des substrats de mort et à l'apoptose de la cellule. Dans les cellules de type II (à droite), la quantité de caspase-8 activée au niveau du DISC n'est pas suffisante pour permettre l'activation directe des caspases effectrices, et nécessite le déclenchement d'une phase d'amplification mitochondriale par le clivage de la protéine pro-apoptotique Bid. La forme active de Bid, tBid active à son tour les protéines effectrices Bax et Bak, induisant la perméabilisation de

la membrane mitochondriale, la libération de facteurs pro-apoptotiques comme le cytochrome c, Smac, HtrA2, participant à l'activation des caspases et de l'apoptose subséquente. D'après (Thiery et al., 2015)

### **III. Mécanismes d'échappement tumoral à la réponse immune**

Malgré le rôle crucial du système immunitaire dans le contrôle de la progression tumorale, notamment grâce aux populations lymphocytaires décrites dans les chapitres précédents, la combinaison de l'instabilité génétique des cellules tumorales, de la pression de sélection exercée par le système immunitaire et du microenvironnement tumoral conduit à l'émergence au sein des tumeurs de variants résistants à la réponse immune. Ce phénomène représente un obstacle important pour l'efficacité des protocoles d'immunothérapie antitumorale. Ainsi de nombreux travaux ont mis en évidence différents mécanismes permettant à la tumeur d'échapper ou d'interférer avec la réponse immunitaire antitumorale. Ces différents mécanismes d'échappement à l'immunsurveillance peuvent être classifiés comme suit:

#### **1. Echappement à la reconnaissance**

Comme décrit précédemment, l'activation des lymphocytes T cytotoxiques nécessitent la reconnaissance *via* leur TCR d'un complexe CMH/peptide et un signal de co-stimulation. La perte de l'expression d'antigènes tumoraux par une altération de l'apprêtement et/ou de la présentation du peptide antigénique par les molécules du CMH peut ainsi bloquer ces mécanismes de reconnaissance des cellules cibles par les CTL et est souvent associée aux phénotypes tumoraux invasifs. En effet, les mutations et/ou la perte d'un fragment chromosomique, d'un ou plusieurs gènes codant pour la machinerie d'apprêtement du peptide sont la principale cause d'un tel dysfonctionnement (Drake, 2006 ; Marincola et al., 2000). C'est notamment le cas en ce qui concerne la diminution de l'expression de gènes codant pour des protéines importantes dans le transport du peptide antigénique du cytoplasme vers le réticulum endoplasmique, notamment les gènes TAP1 et TAP2 (Transporter associated with Antigen Processing) ou encore la diminution de l'expression des sous unités catalytiques du protéasome LMP2 et LMP7 (Restifo et al., 1996).

De plus, des altérations de la synthèse de la chaîne  $\beta$ 2-microglobuline par perte d'un fragment chromosomique, ou par d'un défaut de transcription, ou des mutations spécifiques

dans un ou plusieurs gènes du CMH-I ont été décrites (Korkolopoulou et al., 1996). De plus, le blocage *in vitro* du signal co-stimulateur inhibe également l'activation des lymphocytes T. En effet, grâce à des modèles expérimentaux murins, il a été montré que le blocage de l'expression des molécules de co-stimulation B7-1 et B7-2, par les cellules tumorales conduit à un phénomène de tolérance des lymphocytes vis à vis des cellules cibles, appelé l'anergie (Schwartz, 2003).

Les cellules tumorales peuvent également utiliser diverses stratégies pour échapper à l'immuno-surveillance par les cellules NK en altérant les mécanismes leurs de reconnaissance. Par exemple, certaines lignées cellulaires de leucémie sur-expriment les molécules du CMH-I fournissant ainsi des signaux inhibiteurs plus forts aux cellules NK (Classen et al., 2003). Un large spectre de tumeurs pourrait aussi souvent surexprimer la molécule HLA-G du CMH-I qui inhibe également l'activation des cellules NK en engageant les récepteurs inhibiteurs ILT-2 et KIR2DL4 (Rouas-Freiss et al., 2005). De la même manière, l'absence d'expression des ligands du récepteur activateur NKG2D par les cellules tumorales induit une diminution de l'activation des cellules NK (Fernandez-Messina et al., 2012).

## **2. Influence du microenvironnement tumoral**

La tumeur est une structure complexe, formée non seulement, de cellules tumorales, mais également d'un ensemble hétérogène de cellules qui interagissent et communiquent entre elles au sein d'une matrice extra cellulaire complexe. Les interactions entre les cellules malignes et les cellules non transformées créent le microenvironnement tumoral. Ces cellules non malignes ont une fonction dynamique et souvent pro-tumorale à tous les stades de la carcinogénèse. En effet, de nombreux facteurs immunosuppresseurs solubles, produits par les cellules tumorales et les cellules non malignes, contribuent à l'échappement tumoral, y compris la molécule pro-angiogénique VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) (Christiansen et al., 2016), le TGF- $\beta$ , l'IL-10, l'indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO) (Munn and Mellor, 2013), le PGE2 (Prostaglandin E2) (Demotte et al., 2008) et bien d'autres. Ces facteurs immunosuppresseurs induisent notamment le recrutement des cellules immunosuppressives, notamment des MDSC (Myeloid-Derived Suppressor Cells), des macrophages de type M2 et des lymphocytes T régulateurs (Treg). Les cellules tumorales se servent ainsi

de ces différents facteurs pour se protéger de la réponse immune antitumorale. Par exemple, le facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF) peut affecter la maturation et la fonction des cellules dendritiques et augmenter l'infiltration des Tregs et MDSC dans la tumeur (Christiansen et al., 2016). De plus, l'expansion des populations de cellules myéloïdes immatures a été observée dans un certain nombre d'études sur des patients et est associée à une suppression accrue de réponses des CTL (Mirza et al., 2006). D'autre part, plusieurs cytokines dérivées de tumeurs ont été impliquées dans l'expansion des cellules myéloïdes immatures, dont l'IL-1 $\beta$  (Song et al., 2005) et le GM-CSF (Serafini et al., 2004). Ce mécanisme de suppression par les cellules myéloïdes est complexe et semble impliquer des contributions de iNOS (Inducible Oxyde Nitrique Synthase) et/ou de l'arginase-1 (Bronte et al., 2003; Mazzone et al., 2002). De plus, la production d'iNOS dégrade le L-Arg en oxyde nitrique (NO) qui, à son tour, empêche l'activation des facteurs de transcription nécessaires pour stabiliser l'ARNm de l'IL-2 et l'expression du récepteur IL-2 par les lymphocytes cytotoxiques (Bronte and Zanovello, 2005).

Une autre composante cellulaire immunosuppressive du microenvironnement est représentée par les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> régulateurs (Tregs). Ces derniers sont concentrés dans la masse tumorale, et leur présence est associée à un pronostic défavorable. Ils inhibent localement les réponses immunitaires effectrices, permettant à la tumeur de progresser. Le blocage de ces cellules CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> *in vivo* par un anticorps anti-CD25 (PC61) a renforcé l'attaque des cellules effectrices et induit le rejet de multiples tumeurs immunogènes dans de multiples souches de souris (Golgher et al., 2002). Cette immuno-surveillance tumorale activée est principalement médiée par des lymphocytes T cytotoxiques CD8<sup>+</sup> spécifiques de tumeur (CTL), mais des cellules T CD4<sup>+</sup> et des cellules NK sont également être impliquées.

En outre, une sous-population de fibroblastes, les fibroblastes dits associés au cancer (CAFs), semble activer de nombreux aspects de la tumorigénèse. Ces fibroblastes activés dans le stroma tumoral sont principalement caractérisés par l'expression de marqueurs de fibroblastes activés, tels que l' $\alpha$ -SMA ( $\alpha$ -smooth muscle actin) et FAP (fibroblast activation protein) (Franco et al., 2010). Les CAFs participent à la croissance tumorale grâce à la sécrétion d'un certain nombre de cytokines et de facteurs de croissance. Ils interfèrent

également avec l'activation des fonctions lytiques des CTL en sécrétant des molécules impliquées dans le recrutement et l'activation de cellules immunosuppressives comme des macrophages du phénotype M2 (*via* CXCL12/SDF1 et de CCL2/MCP-1), les Treg (*via* TGF- $\beta$  et le VEGF) ainsi que les MDSC (*via* le VEGF). De plus, la sécrétion du TGF- $\beta$  par les CAFs peut altérer la fonction des cellules NK en atténuant la production d'IFN- $\gamma$  et en altérant l'expression de ses récepteurs activateurs comprenant NKG2D, NKp30 et NKp44. En outre, la sécrétion de PGE2 et d'IDO par les CAFs peut également diminuer l'expression du récepteur activateur NKG2D sur la surface des cellules NK (Harper and Sainson, 2014).

### 3. Expression des molécules check-point

Les cellules tumorales peuvent exprimer à leur surface des molécules immunosuppressives qui inhibent la fonction des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> à plusieurs étapes au cours d'une réponse immunitaire (Sharma and Allison, 2015). Parmi ces molécules, la plus étudiée actuellement est PD-L1 (Programmed Death Ligand1). L'interaction de PD-L1 avec son récepteur PD1, présent à la surface des cellules T activée, inhibe la prolifération, la survie et les fonctions effectrices des lymphocytes T (cytotoxicité, sécrétion de cytokines) (Tseng et al., 2001), induit l'apoptose des cellules T spécifiques de la tumeur (Dong et al., 2002) et favorise la différenciation des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> en Treg, (Iwai et al., 2002 ; Tsushima et al., 2007). Le ciblage de cette voie de contrôle a ainsi conduit à l'approbation de plusieurs nouvelles thérapies ciblant PD1, grâce à deux anticorps (le pembrolizumab et le nivolumab).

Une autre molécule immunosuppressive présente à la surface des cellules T activée peut engendrer des effets délétères, il s'agit de la molécule CTLA-4 (Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen-4). CTLA-4 régule l'activation précoce des lymphocytes T naïfs et mémoire après l'engagement du TCR. En effet, suite à son interaction avec ses ligands CD80 et CD86, CTLA-4 inhibe l'expansion des effecteurs T CD8<sup>+</sup> et des cellules mémoires. CTLA4 augmente aussi la sécrétion de molécules immunosuppressives (IL-10 et TGF- $\beta$ 1). Par conséquent, et de la même manière que pour PD-1, le blocage de la voie de CTLA4 à l'aide d'anticorps bloquants est utilisé en immunothérapie notamment grâce à l'ipilimumab dans le cas des mélanomes métastatiques. Les résultats obtenus en clinique grâce à cet anticorps sont encourageants, néanmoins, les forts effets indésirables y compris les réactions autoimmunes,

limite son utilisation (Voskens et al., 2013). Enfin, plusieurs autres check-points immunitaires pouvant altérer la réponse immune antitumorale ont été identifiées récemment, parmi lesquelles on trouve BTLA (B and T lymphocyte attenuator) (Le Mercier et al., 2015), TIM3 (T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3) (Ngiow et al., 2011), DD1 $\alpha$  (death domain 1 $\alpha$ ) (Yoon et al., 2015; Zitvogel and Kroemer, 2015) et la protéine LAG3 (lymphocyte activation gene 3) (Nguyen and Ohashi, 2015).

## **4. Echappement aux fonctions effectrices lymphocytaires**

### **4.1. Résistance à la voie Perforine/Granzymes**

Une résistance à la lyse induite par la voie PFN/Gzms a été décrite dans différents modèles tumoraux. Les mécanismes qui contrôlent cette résistance peuvent interférer d'une part avec l'exocytose des granules cytotoxiques, et d'autre part avec la signalisation apoptotique de cette voie de lyse. A titre d'exemple, on peut considérer que les mutations qui affectent les gènes codant pour des protéines impliquées dans le transport des CG vers la synapse immunologique et/ou leur fusion avec la membrane plasmique membranaire (comme MUNC13-4, la syntaxine 11 et STXBP2) altérant la sécrétion du contenu des CG et par conséquent l'activité lytique des cellules cytotoxiques (Cote et al., 2009 ; Feldmann et al., 2003) (zur Stadt et al., 2009), représentent un mécanisme d'échappement à la voie PFN/Gzms. Des mutations au niveau de ces gènes ont ainsi été identifiées chez des individus atteints de FHL avec une susceptibilité augmentée pour le développement d'hémopathies malignes (Cote et al., 2009). De plus, l'absence de relocalisation du MTOC dans les lymphocytes T cytotoxiques induit également une altération de la dégranulation des CG. Ce phénomène semble dépendre d'un facteur présent dans le microenvironnement tumoral qui serait ainsi capable de réguler la fonction cytotoxique des lymphocytes T, du moins celle dépendante de la voie Perforine/Granzymes (Radoja et al., 2001). En outre, l'altération des voies de signalisation apoptotiques mitochondriales joue également un rôle dans l'échappement tumoral. En effet, la surexpression des IAPs (cIAP1, cIAP2, XIAP), des protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2, notamment Bcl-2 et Bcl-XL qui inhibent la MOMP, ainsi que des mutations des protéines pro-apoptotiques Bax ou de Bak ont été

observées dans les cellules cancéreuses (Del Bufalo et al., 1997 ; Meijerink et al., 1998). Des modulateurs de l'inflammation, notamment l'IL- $\beta$ 1 ou l'INF $\gamma$  peuvent également induire l'expression d'un inhibiteur cellulaire de l'activité enzymatique du GzmB, la serpine PI-9/SPI-6 (Kannan-Thulasiraman and Shapiro, 2002), constituant ainsi un autre mécanisme d'échappement à la mort induite par la voie Perforine/Granzymes et par conséquent à la lyse par les CTL et les cellules NK.

#### **4.2. Résistance à la voie des récepteurs à domaine de mort**

Une résistance tumorale aux voies cytotoxiques impliquant les récepteurs à domaine de mort peut être observée dans des tumeurs portant des mutations des gènes codant pour les récepteurs à domaine de mort, comme par exemple FAS (Takahashi et al., 2006), ou DR5 (Shin et al., 2001). De plus, plusieurs mécanismes de résistance semblent être impliqués à différents niveaux de la cascade de transduction du signal conduisant à l'apoptose par cette voie (Zhang and Fang, 2005), comme par exemple des mutations qui touchent la procaspase-8 (Hopkins-Donaldson et al., 2003), la surexpression de molécules antiapoptotiques Bcl-2, Bcl-xL et des IAPs, ainsi que la surexpression de la protéine cFLIP qui est un inhibiteur du clivage la pro-caspase 8 (Hinz et al., 2000; Kataoka et al., 1998 ). En effet, cFLIP est un homologue de la pro-caspase 8 contenant un domaine effecteur de mort et peut donc être recruté au DISC *via* FADD. L'isoforme courte de cFLIP (cFLIPshort) ne possède pas de domaine d'homologie catalytique comme la caspase 8 et agit donc comme un inhibiteur compétitif du clivage de la pro-caspase 8 au niveau du DISC. De plus, l'expression par les cellules tumorales des récepteurs qualifiés de «leurres » pour TRAIL, à savoir DcR1 et DcR2 (DcR : Decoy Receptor), ne permet pas de transduction du signal apoptotique du fait de l'absence de DD fonctionnel et induit une résistance à cette voie (Sheikh et al., 1999).

## IV. La protéine suppresseur de tumeur p53

### 1. Historique : découverte de p53

La découverte de la protéine p53 en 1979 a été l'aboutissement de deux types d'études simultanées impliquant des approches différentes. La protéine p53 a été identifiée pour la première fois à partir de tumeurs murines produites par des cellules transformées par le virus SV40 (virus simien 40). En effet, il a été démontré que des anticorps dirigés contre l'antigène T de SV40 étaient capables de co-immunoprécipiter une protéine cellulaire d'une masse apparente de 53 KDa, appelée par la suite p53. A partir de ces observations, il a été conclu que p53 interagissait avec l'antigène T de SV40 (Kress et al., 1979 ; Lane and Crawford, 1979 ; Linzer and Levine, 1979 ; Rotter et al., 1980). Une deuxième étude indépendante, a permis d'identifier p53 par sa forte expression apparente dans des tumeurs induites par différents composés chimiques (DeLeo et al., 1979).

L'histoire de p53 est un voyage du monde des oncogènes vers le monde des gènes suppresseurs de tumeurs. P53 a tout d'abord été décrite comme un oncogène pouvant participer à la transformation cellulaire. Cette hypothèse a été émise sur la base de la capacité de p53 à immortaliser des cellules (Jenkins et al., 1984) ou à transformer des fibroblastes d'embryons de rat en coopération avec Ras (Eliyahu et al., 1984). Cependant, quelques années plus tard, des études ont démontré que les ADN complémentaires de p53 utilisés dans ces premiers travaux correspondaient à des séquences mutées (Kanzler et al., 1996). Les travaux qui suivirent montrèrent ainsi que p53 sauvage agissait comme un véritable gène suppresseur de tumeurs, et non pas un oncogène. Ainsi, la transfection du gène p53 sauvage dans des cellules d'ostéosarcome p53<sup>-/-</sup> est capable d'abroger le caractère néoplasique de ces cellules (Chen et al., 1990). De nos jours, p53 est reconnu comme étant le gène le plus fréquemment altéré dans les tumeurs humaines.

Contrairement à la plupart des gènes suppresseurs de tumeurs qui sont inactivés par des mutations de type décalage du cadre de lecture ou des mutations non-sens aboutissant à la synthèse aberrante de la protéine ou à sa disparition, le mode d'inactivation de p53 est différent. Près de 90% des mutations du gène *TP53* sont des mutations faux-sens menant à la



synthèse d'une protéine stable qui s'accumule dans le noyau des cellules tumorales (Soussi and Wiman, 2015). L'accumulation de p53 mutée dans des cellules tumorales peut ainsi avoir deux conséquences négatives en faveur de l'oncogenèse. La première conséquence concerne son rôle dominant négatif par hétéro-tetramérisation avec la forme sauvage de p53 issue du second allèle non muté. De plus, un certain nombre de mutations ayant été décrites possède de nouvelles fonctions contribuant à leur potentiel transformant et tumorigène (mutants « gain de fonction ») (Soussi and Wiman, 2015).

## 2. Importance de p53 dans la suppression des tumeurs

Actuellement le monde scientifique est unanimement d'accord sur l'importance de la protéine p53 dans la suppression des tumeurs. Bien que les mécanismes sous-jacents varient par rapport à l'origine et à la progression de divers cancers chez l'Homme, l'inactivation de p53 peut être considérée comme une caractéristique universelle du processus tumorigénique.

L'une des preuves les plus convaincantes du rôle de p53 dans la suppression des tumeurs est la fréquence de mutations de son gène *TP53* dans la majorité des tumeurs solides humaines, notamment le cancer du sein triple négatif, le carcinome épidermoïde de la tête et du cou, le cancer du poumon, le cancer de la prostate ainsi que le cancer ovarien de haut-grade. (Kandoth et al., 2013). De plus, la prédisposition au développement des tumeurs spontanées chez les souris *TP53*<sup>-/-</sup>, ainsi que le risque très élevé de développer des tumeurs malignes chez les personnes atteintes du syndrome de Li-Fraumeni qui héritent d'un allèle *TP53* mutant témoigne également de l'importance de p53 dans la suppression des tumeurs. (Brady and Attardi, 2010; Magnusson et al., 2012 ). Finalement une récente étude a démontré que comparativement à d'autres espèces de mammifères, les éléphants possèdent un taux d'incidence de cancer faible. Cette protection contre les cancers est potentiellement liée à des copies multiples de *TP53*. En effet, les cellules d'éléphants possèdent 20 fois la copie du gène *TP53* et cette augmentation corrèle positivement avec l'augmentation de la réponse apoptotique suite à l'induction des lésions de l'ADN (Abegglen et al., 2015).

### 3. Le gène *TP53*, membre d'une famille multigénique

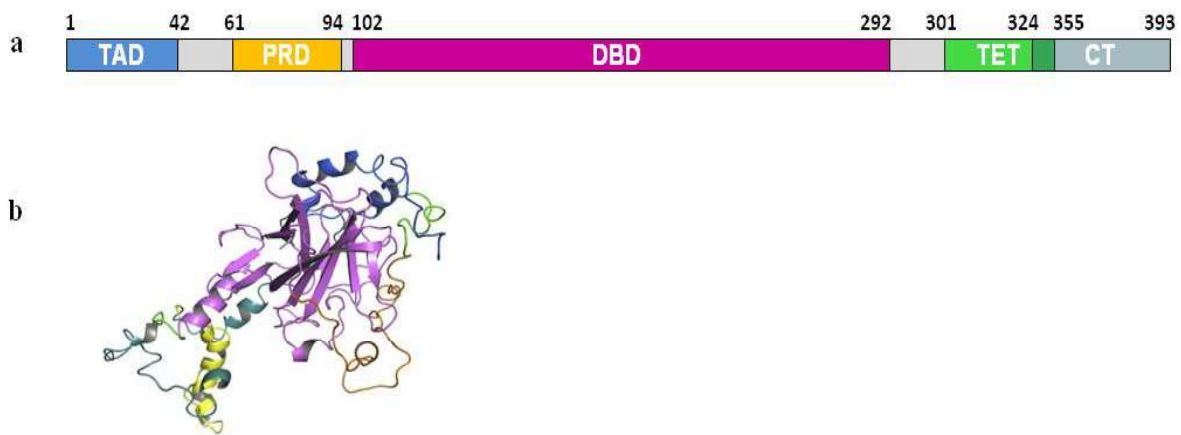
Le gène *TP53* est situé au niveau du bras court du chromosome 17, en position 17p13.1. Il est composé de 10 introns et 11 exons qui codent pour un ARNm de 2,2 Kb. Le gène *TP53* code pour au moins neuf isoformes différentes en raison de l'utilisation de deux promoteurs (P1 et P2), de deux sites d'initiation de la traduction et d'un épissage alternatif (Khoury and Bourdon, 2010). La forme sauvage " full length " de p53 (393 acide aminé), également appelée isoforme  $\alpha$ , est générée à partir du promoteur (P1). Les transcrits initiés à partir d'un promoteur interne (P2) dans l'intron 4 conduisent à la production d'une p53 tronquée au niveau de la partie N-terminal à partir du résidu 133, appelé  $\Delta 133p53$ . L'initiation d'une traduction alternative à partir d'un codon en position 40 conduit à la production d'une protéine p53 avec une délétion des 39 premiers acides aminés, appelé  $\Delta 40p53$ . Cette dernière est une isoforme de p53 dépourvue de son premier domaine transactivateur, qui est donc incapable d'activer la transcription de ses gènes cibles et d'interagir protéine régulatrice MDM2. Un épissage alternatif peut également donner naissance à des isoformes plus courtes de p53 dans leur domaine C-terminal. En effet, comparativement aux isoformes  $\alpha$ , les isoformes  $\beta$  et  $\gamma$  ont respectivement 10 et 15 acides aminés qui remplacent l'extrémité C-terminale (qui s'étend de l'acide aminé 325 au 393). Ces isoformes de p53 peuvent être exprimées dans des tissus humains normaux ainsi que dans certains tissus tumoraux (Khoury and Bourdon, 2010).

En outre, deux protéines apparentées à une même famille multigénique de p53 ont été identifiées en 1997: p63 et p73 (Kaghad et al., 1997 ; Yang et al., 1998). Ces deux protéines partagent des homologies structurales et fonctionnelles très significatives avec p53, en particulier dans le domaine de liaison à l'ADN. En effet, elles sont capables de transactiver des gènes cibles de p53, provoquant l'arrêt du cycle cellulaire ou l'apoptose. De plus, il a été décrit que l'apoptose induite par p53 peut être gravement altérée en l'absence de p63 et de p73 en réponse aux dommages causés à l'ADN (Flores et al., 2002). Avec p53, p63 et p73 forment une famille de facteurs de transcription, sans être totalement redondants fonctionnellement. Chaque membre de la famille p53 possède ses propres fonctions uniques, comme le révèlent les phénotypes distincts observés au niveau des modèles murins " *knockout* " de p53, p63 et p73 (Murray-Zmijewski et al., 2006). L'épissage alternatif de p63 et de p73 donne également

naissance à diverses isoformes, connues sous le nom de  $\Delta Np63/p73\alpha$ ,  $\Delta Np63/p73\beta$  et  $\Delta Np63/p73\gamma$ . Ces isoformes p63/p73 ne possèdent pas de domaine N-terminal, ne sont donc pas capables d'induire l'expression de leurs gènes cibles mais empêchent les fonctions de transactivation de p53, p63 et p73 sauvage (Levrero et al., 1999) (Yang et al., 1998).

#### 4. Structure et organisation fonctionnelle de la protéine p53

La protéine p53 est un facteur de transcription possédant un poids moléculaire apparent de 53kDa et composé de 393 acides aminés (Lamb and Crawford, 1986). La structure primaire de cette protéine peut être divisée en trois régions principales : une région N-terminale (Met1- Ser94), une région centrale (Thr102-Lys292) et une région C-terminale (Pro301-Asp393). Chacune de ces régions contient un ou plusieurs domaines fonctionnels qui seront décrits dans les paragraphes suivant (Figure 12).



**Figure 12: Structure de la protéine p53**

(a) Les domaines fonctionnels de la protéine sont représentés par des couleurs différentes. En bleu (Met1-Asp42): domaine de transactivation N-terminal (TAD), en orange (Asp61-Ser94) : domaine riche en proline (PRD), en violet (Thr102-Lys292) : domaine de liaison à l'ADN central (DBD), en vert (Asp324-Ala355): domaine de tétramérisation (TET) et en gris (Pro301-Ala393) : extrémité C terminale (CT) qui contient une séquence signal de localisation nucléaire (NLS) et une séquence signal d'export nucléaire (NES). (b) Structure tridimensionnelle de p53 obtenue par modélisation d'homologie et simulation dynamique moléculaire (le code couleur des domaines fonctionnels a été respecté par rapport à (a)). Adapté de (Saha et al., 2015).

#### 4.1. La région N-terminale

La partie N-terminale est constituée des 100 premiers acides aminés et peut être divisée en deux sous domaines : un domaine acide de transactivation (TAD/transactivation domain) et un domaine polyproline (PRD/proline-rich domain) (Chang et al., 1995), (Walker and Levine, 1996).

Le TAD (Met1-Asp42) est un domaine acide permettant le recrutement de la machinerie transcriptionnelle, notamment de la sous unité TBP (TATA-Box Binding Protein) et des protéines TAF (TBP-Associated Factors), composants du complexe TFIID (Transcription Factor IID) (Bryant et al., 1995; Lu and Levine, 1995 ). Ce domaine de transactivation intervient également dans l'interaction avec les histones acétyltransférases (co-activateurs de transcription) CBP/p300 et PCAF (Gu et al., 1997 ; Teufel et al., 2007). De plus, ce domaine permet le recrutement de protéines comme Mdm-2, qui est impliquée dans la dégradation de p53. Mdm-2 interagit avec l'hélice  $\alpha$  de p53 formée par les résidus 18 à 26 (Dawson et al., 2003). Les acides aminés Phe19, Trp23 et Leu26 de p53 sont les plus impliqués dans cette interaction car ils s'insèrent profondément dans un repliement de Mdm-2. L'interaction de p53 avec Mdm-2 rend d'une part impossible le recrutement des protéines associées à la machinerie transcriptionnelle et d'autre part stimule la dégradation de p53 par la voie du protéasome en induisant son ubiquitination (Rodriguez et al., 2000).

Le PRD (Asp61-Ser94), quand à lui, doit son nom à une séquence répétée de cinq motifs PXXP (P représentant une proline et X un résidu quelconque) qui constitue un site de liaison pour des protéines contenant des domaines SH3 impliquées dans la transduction du signal. Il semblerait que ce domaine polyproline n'est pas crucial pour la transactivation de nombreux gènes cibles de p53, mais qu'il était essentiel à son activité de répression transcriptionnelle notamment via le co-répresseur Sin3. Cette région riche en proline est aussi importante pour la stabilité de p53, pour sa dégradation par la protéine E6 de HPV16, ainsi que pour l'induction de l'apoptose indépendante de la transcription (Yoon et al., 2015).

## 4.2. La région centrale

La partie centrale de p53 est composée des acides aminés entre la Thr102 et la Lys292 formants un domaine structural capable de lier une séquence d'ADN (DBD/DNA Binding Domain) retrouvée dans certains promoteurs de transcription. La cartographie précise des séquences de liaison pour p53 (ou p53-RE/p53 responsive element) a permis de mettre en évidence une séquence consensus de liaison de p53 à l'ADN, correspondant à deux copies d'un motif de 10 pb (5'-PuPuPu-C(A/T)(T/A)G-PyPyPy-3') séparées par 0 à 13 nucléotides (Zhao et al., 2001). Le DBD de p53 est domaine résistant à la protéolyse, replié de façon indépendante du reste de la protéine et qui nécessite la présence d'un ion  $Zn^{2+}$  pour son activité.

Ce domaine possède une organisation secondaire plutôt stable qui la rend apte à des études cristallographiques qui ont ainsi montré que ce DBD est composé de motifs de type boucle-feuillet-hélice, contenant une boucle L1 (Phe113 à Thr123), deux brins bêta S2 et S2' et un domaine C-terminal, qui se lie au sillon principal de l'ADN. Une autre partie structurale du domaine de liaison à l'ADN se lie au sillon mineur, il s'agit des deux grandes boucles L2 (Lys164-Cys176 et Cys182-Lys194) et L3 (Met237 à Pro250) (Derbyshire et al., 2002 ; Huyen et al., 2004). Ces études structurales ont démontré que le domaine se replie en un sandwich de feuillet  $\beta$  antiparallèle qui coordonne deux boucles pour permettre le contact avec l'ADN. Ces boucles sont stabilisées par un ion  $Zn^{2+}$  pour former le motif de boucle-feuillet-hélice mentionné précédemment.

Finalement, il est très important de noter que selon la base de données du centre international de recherche sur le cancer (IARC), plus de 95% des mutations du gène *TP53* retrouvées dans les tumeurs humaines sont localisées dans cette région. De plus, il a été observé qu'un faible nombre de résidus concentre la majorité de ces mutations et sont ainsi connus sous le nom de "hot-spot". Ces mutations possèdent un effet très important sur l'activité de p53 conduisant à la perturbation de l'organisation structurale de ce domaine et ou à la perte de son activité (Koulgi et al., 2013) (voir paragraphe 9.1.1.).

### **4.3. La région C-terminale**

La partie C terminale de p53 (résidus 300 à 393) est fortement chargée positivement. Ce domaine comporte une région charnière flexible (résidus 300 à 318) connectant la région centrale à la région C-terminale, un domaine d'oligomérisation (tétramérisation) de la protéine (acides aminés 324 à 355) et une région basique (résidus 363 à 393). Comme l'indique son nom, le domaine de tétramérisation (Clore et al., 1995; Jeffrey et al., 1995 ) est essentiel pour la tétramérisation de p53 qui est une étape cruciale pour assurer sa fonction de facteur de transcription. Un signal d'export nucléaire (NES/Nuclear Export Signal) (résidus 340 à 351) et une séquence signal d'import nucléaire (NLS/Nuclear localization sequence) (résidus 316-325) coexistent également dans cette région (Liang and Clarke, 1999). Enfin le domaine C-terminal comporte également une région basique (résidus 363-393) capable de se lier non spécifiquement à l'ADN au niveau des cassures simples et doubles brins ce qui induit la stabilisation et l'activation de la protéine (Bakalkin et al., 1994).

### **5. Régulation de l'activité de la protéine p53**

L'activation de p53 est dépendante de modifications post-traductionnelles particulières conférées à cette protéine, qui elles-mêmes dépendent de la nature des stimuli externes engendrant l'activation, la stabilisation ou la dégradation de p53. Un certain nombre de types de stress extrinsèques ou intrinsèques qui menacent l'intégrité du génome provoquent ainsi l'activation de la protéine p53. Parmi les modifications post-traductionnelles (MPT) les plus fréquentes subies par p53, on trouve des phosphorylations de sérines et/ou thréonines, des acétylations, des ubiquitynation, des méthylations, des glycosylations, des sumoylations et des néddylation des résidus lysine. Ces modifications post-traductionnelles de p53 ont lieu principalement dans les parties N- et C-terminales (Bode and Dong, 2004) (tableau 2).

Sites & modifications post-traductionnelle	Réponse Cellulaire
Ser 15, 37 phosphorylation	Apoptose Perturbation du complexe p53–MDM2
Ser20 phosphorylation	Apoptose Perturbation du complexe p53–MDM2
Ser315 phosphorylation	Ubiquitination et dégradation de p53
Ser6,9, Thr18 (Nécessite une phosphorylation préalable de Ser15)	Stabilisation de p53 <i>via</i> l'inhibition MDM2
Ser392 phosphorylation	Augmentation de l'activité de p53
Ser315, Ser376 phosphorylation	Inhibition de l'apoptose induite par p53
Thr81 phosphorylation	Stabilisation de p53
Ser33, Ser46 phosphorylation	Stabilisation de p53 Apoptose
Thr150, Thr155, Ser149 phosphorylation	Dégradation de p53
Ser376, Thr55 déphosphorylation	Activation of p53
Lys120 acétylation	Stabilisation de p53 activation des gènes cibles impliqués dans l'apoptose
Lys320 acétylation	Activation des gènes responsables de l'arrêt du cycle cellulaire
Lys382 acétylation	Production des ROS , activation de l'expression BAX et apoptose
Lys382 dé-acétylation	Régulation négative des gènes de l'apoptose
Lys370, Lys372, Lys 373, Lys381, Lys 382, Lys386 ubiquitination	Active la dégradation de p53
Lys386 sumoylation	Active la réponse transcriptionnelle de p53

**Tableau 2:** Exemples de modifications post-traductionnelles de p53. (Phosphorylation, Acétylation, Ubiquitination et Sumoylation) et conséquences fonctionnelles respectives. Adapté de (Saha et al., 2015)

## 5.1. Activation

En absence de signaux de stress, p53 se trouve sous une forme latente incapable d'accomplir ses fonctions et possède une demi-vie très courte du fait de sa dégradation continue. Dans un contexte d'initiation ou de progression tumorale, une multitude de types de stress différents peuvent activer p53 (Figure 13), y compris l'hypoxie, le stress oxydatif, la privation de nutriments, les signaux hyper-prolifératifs, les dommages à l'ADN ou l'appauvrissement en ribonucléotide. Le passage de la forme latente de p53 vers sa forme active nécessite donc un stress cellulaire qui va être signalé par différentes protéines



“senseurs” induisant à leur tour des MPT permettant à p53 d'assurer sa fonction soit dans le noyau où il agit comme un facteur de transcription soit dans le cytoplasme pour effectuer d'autres rôles toujours dans le but de maintenir l'intégrité cellulaire et du génome (on parle d'ailleurs souvent de p53 comme « gardienne du génome »). Parmi ces MPT importantes pour l'activation de p53 on retrouve des phosphorylations de sérines et de thréonines et des modifications de lysines. Les conséquences de nombreuses MPT sur p53 ont été étudiées par diverses méthodes expérimentales et leur effet sur la stabilité conformationnelle et le fonctionnement des protéines a également été modélisé à l'aide de méthodes bioinformatiques (Narayanan and Jacobson, 2009). Il a été montré, par exemple, que la phosphorylation de p53 induit un changement conformationnel dans la structure de la protéine augmentant sa stabilité et sa liaison à sa séquence spécifique de l'ADN (Ashcroft et al., 1999)

- **Phosphorylation de sérines et thréonines**

De nombreuses kinases sont impliquées dans ce processus notamment ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated), ATR (ATM-related ) CHK1/CHK2 (Checkpoint Kinase 1 et 2), CDK (Cyclin-Dependent Kinase), JNK (c-JUN NH2 terminal Kinase), MAPK2 (Mitogen-Activated Protein Kinase), p38 kinase, GSK3 $\beta$  (Glycogen Synthase Kinase 3  $\beta$ ), HIPK2 (Homeodomain-Interacting Protein Kinase 2), PKC (Protein Kinase C) et ERK (Extracellular signal-Regulated Kinases). Par exemple, en réponse aux dommages à l'ADN, p53 subit une phosphorylation/déphosphorylation sur 17 sites probables. La kinase de stress ATM phosphoryle ainsi les sérines 15 et 20 au niveau du TAD de p53. De plus, une phosphorylation supplémentaire de la Thr 18 modifie la structure de l'hélice  $\alpha$  avec laquelle MDM2 interagit et induit un changement conformationnel de p53. Ce changement de conformation réduit l'affinité de p53 pour MDM2, inhibant sa dégradation, et permet une association plus forte avec des co-activateurs, tels que p300/CBP. La plupart des résidus sont phosphorylés par de nombreuses kinases différentes en réponse à de nombreux stress cellulaires et sont associés à l'activation de p53. Ceci définit deux niveaux de redondance potentielle car un résidu spécifique peut être phosphorylé par plusieurs kinases (par exemple la Ser15 peut être phosphorylée par au moins 8 kinases), et une kinase spécifique peut phosphoryler plusieurs résidus (par exemple CHK2 peut phosphoryler 7 résidus différents)



(Bode and Dong, 2004). Cependant, certains sites semblent n'être phosphorylés que par une seule kinase spécifique, comme c'est le cas de la Ser 6, de la Ser 9 et de la Thr 18 qui ne sont phosphorylées que par la caséine kinase 1 (CK1). De plus, la Thr18 nécessite la phosphorylation préalable de la Ser15 pour être à son tour phosphorylée. En outre, il a été rapporté que la déphosphorylation de certains résidus corrèle avec l'activation de p53. Par exemple, la Ser 376 est phosphorylée dans des cellules non stressées et déphosphorylée après traitement avec les radiations ionisantes (Stavridi et al., 2001).

- **Modifications de lysines**

Les lysines de la partie C-terminales de p53 peuvent être modifiées par ubiquitynation, acétylation, sumoylation, néddylation et méthylation. La néddylation semble inhiber la transactivation, alors que la sumoylation peut affecter positivement ou négativement la fonction de p53 (Bode and Dong, 2004). Les modifications de la Lys 320 ont été proposées comme favorisant l'arrêt du cycle cellulaire plutôt que l'apoptose (Knights et al., 2006). Contrairement aux Lys 372, 373, 381 et 382, qui sont acétylées par p300 et ubiquitylées par MDM2, la Lys 320 est acétylée par le facteur PCAF (Di Stefano et al., 2005) et ubiquitynylée par E4F1. L'ubiquitynation de la Lys 48 induite par l'ubiquityne-ligase E4F1 semble induire l'arrêt du cycle cellulaire plutôt que favoriser la dégradation de p53 (Le Cam et al., 2006). La méthylation des lysines module également l'architecture de surface de p53, comme pour les histones, laissant une marque qui peut à la fois favoriser ou inhiber la liaison de p53 avec d'autres protéines effectrices (Daniel et al., 2005). Par exemple, la méthylation de la Lys 372 par la méthyltransférase SET9 stabilise p53, alors que la méthylation de la Lys 370 par SMYD2 (SET and MYND domain containing 2) la déstabilise (West and Gozani, 2011).

## 5.2. Dégradation

L'activation de p53 est étroitement associée au contrôle de sa stabilité. Comme mentionné précédemment, la protéine p53 est exprimée de manière constitutive mais son niveau est maintenu bas grâce à une dégradation continue par le protéasome. En réponse au stress, l'ubiquitynation et la dégradation de p53 sont inhibées, conduisant à une stabilisation et une activation rapides de la protéine (Maki and Howley, 1997). Le processus de dégradation

de p53 a été décrit pour la première fois avec la découverte du mécanisme d'action du papilloma virus humain (HPV) et notamment la protéine E6 induisant la dégradation de cette protéine suppresseur de tumeurs (Everett et al., 1997). Depuis, une meilleure compréhension de l'importance de ce processus dans le contrôle de l'activité de p53 a conduit à la découverte d'un certain nombre d'ubiquitine-ligases, qui ciblent p53 vers la voie de dégradation par le protéasome. En particulier, le proto-oncogène MDM2, présent constitutivement dans la cellule, est l'ubiquitine ligase E3 majeure impliquée dans ce processus de régulation de l'homéostasie de p53. MDM2 ubiquitine p53 au niveau de six résidus lysine (K) clés situés à l'extrémité C-terminale de la protéine (K370, K372, K373, K381, K382 et K386) (Rodriguez et al., 2000). MDM2 est capable d'induire à la fois la mono- et poly-ubiquitination de p53, conduisant respectivement à l'export nucléaire de p53 (adressage vers cytosol ou vers les mitochondries) et à sa dégradation par le protéasome. La translocation de p53 dans le cytosol peut également être associée à une activité indépendante de la transcription conduisant à l'apoptose (voir le paragraphe 7.3.).

Cependant il a été montré que p53 continu à être dégradée chez les souris déficientes en *MDM2* suggérant l'existence d'autres mécanismes impliqués dans sa dégradation. Ainsi, un certain nombre d'ubiquitine-ligases E3 possédant un domaine RING semblable à celui de MDM2 et ciblant p53 ont été décrites notamment Pirh2 (P53-induced RING-H2), DDB1 (DNA damage-binding protein 1), synoviolin, COP1 (COnstitutively Photomorphogenic 1), CARP1, CARP2 (Caspase 8/10-Associated RING Proteins 1 and 2). D'autres ligases E3 à domaine HECT (Homologous to E6-AP Carboxyl Terminus) tel que ARF-BP1 (ARF-Binding Protein 1) et WWP1 (WW domain-containing Protein 1), des ligases E3 de domaine U box tels que CHIP (C-terminus of Hsc70 Interacting Protein, a 70 kDa homodimer) et UBE4B (Ubiquitin conjugation factor E4 B) et d'autres ligases à domaine non définies ont aussi été décrites (Chao, 2015). L'impact de ces ligases E3 sur l'activité de p53 est résumé dans le Tableau 3.

E3 ligase	E3 domaine	Validation			Impacte sur l'activité de p53
		L'interaction biochimique et l'activité in vitro de E3 vis-à-vis de p53	Sa déplétion dans les tissus humain altère la stabilité de p53	Modèle de souris	
MDM2	RING	V	V	V	1, 2, 3, 4
Pirh2	RING	V	V	V	1, 5
Trim24	RING	V	V	**	1, 2, 3
Cul1/Skp2	RING	V	V	ND	1
Cul4a/DDB1/Roc	RING	V	V	V	1
Cul5	RING	V	ND	ND	1
Cul7	RING	V	ND	ND	2, 3
Synoviolin	RING	V	V	**	1, 2, 3
TOPORS	RING	V	ND	ND	1, 3
Cop1	RING	V	V	V	1, 3
CARP1/2	RING	V	V	V	1
ARF-BP1	HECT	V	V	V	1
Msl2/WWP1	HECT	V	ND	ND	2, 3
CHIP	U box	V	V	V	1
UBE4B	U box	V	V	V	1, 3
p300/CBP	ND	V	V	ND	1
E4F1	ND	V	ND	V	3
Ubc13	ND	V	ND	ND	2, 3, 5

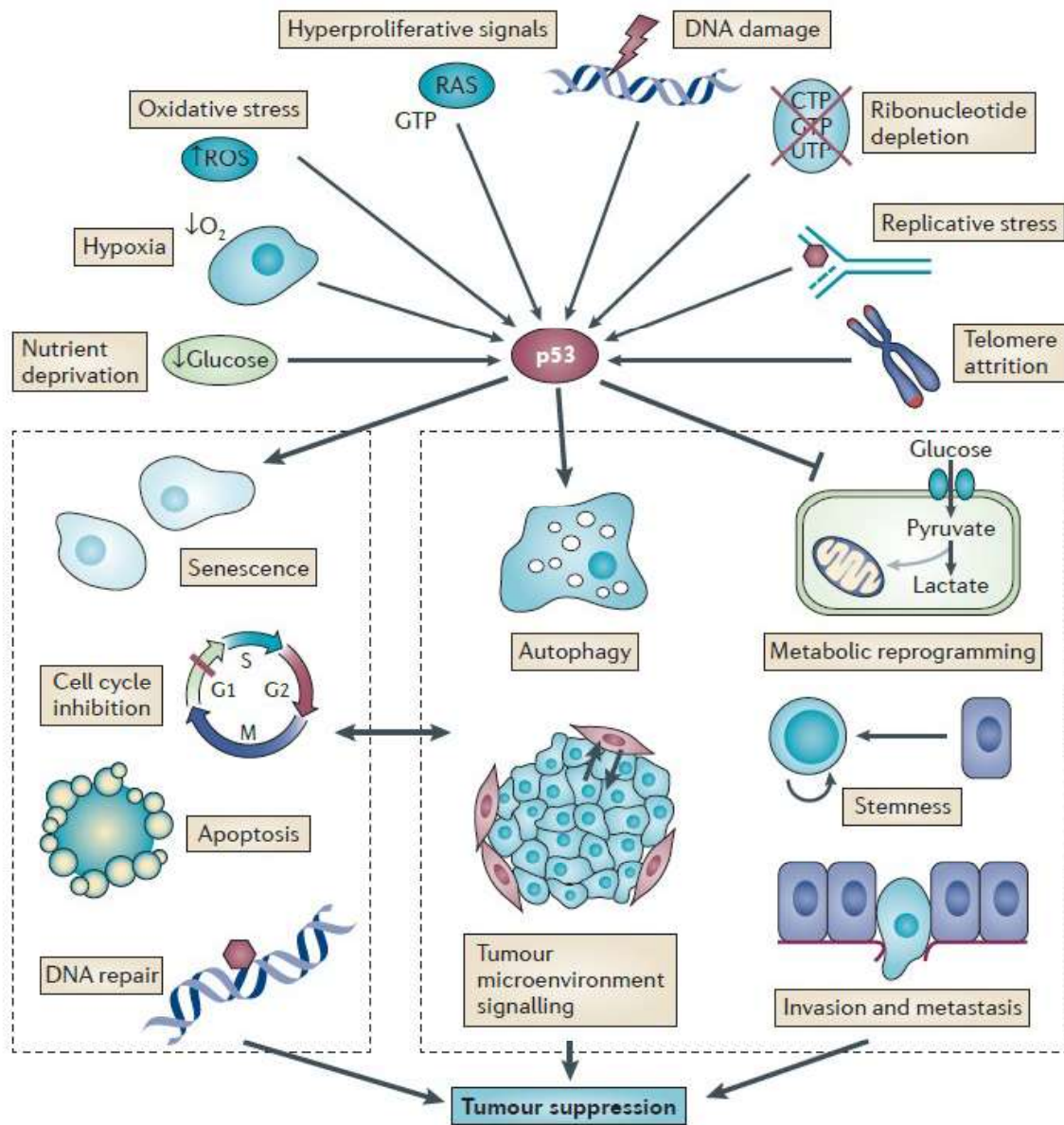
**Tableau 3: Régulation de p53 par les ubiquitines ligases E3**

1 = dégradation; 2 = export; 3 = transcription; 4 = perméabilisation de la membrane mitochondriale externe; 5 = tétramérisation. ND = non déterminé; \*\* = Modèle de drosophile

Adapté de (Chao, 2015)

## 6. Fonctions biologiques de p53

P53 possède des fonctions biologiques multiples associées avec la suppression tumorale. Parmi ces fonctions, certaines sont mieux connues que d'autres, ce qui est notamment le cas pour son implication dans la régulation de la croissance cellulaire (arrêt du cycle cellulaire), dans la réparation de l'ADN, dans l'induction de l'autophagie ou de l'apoptose, mais aussi dans la modulation de la réponse immune antitumorale (Biegging et al., 2014) (Figure 13).



**Figure 13: Les réponses cellulaires induites par p53 activée par les signaux de stress sont importantes pour la suppression tumorale.** La privation en nutriments, l'hypoxie, le stress oxydatif, les signaux hyper prolifératifs, les dommages à l'ADN, le stress réplcatif, l'attrition des télomères et l'appauvrissement en ribonucléotide font partie d'un ensemble de signaux de stress qui sont capables de stabiliser et d'activer p53. P53 activée peut potentiellement induire diverses réponses qui conduisent à la suppression tumorale. Parmi ces réponses cellulaires, les premières établies sont probablement celles qui ont été les plus étudiées, notamment l'arrêt du cycle cellulaire, de la sénescence, l'apoptose et la réparation de l'ADN. De nos jours, il est admis que p53 possède plusieurs autres rôles émergents qui sont tout aussi pertinents que les premiers pour la suppression tumorale, y compris la reprogrammation métabolique, l'activation de l'autophagie, l'implication dans des signalisations entre les cellules du microenvironnement tumoral, l'inhibition de l'auto-renouvellement des cellules souches ainsi que l'inhibition de la transition épithélio-mésenchymateuse. Adapté de (Biegging et al., 2014).

## 6.1. Régulation du cycle cellulaire

Suite à des dommages à l'ADN induits par un stress génotoxique (agents alkylants, radiations ionisantes...), p53 activée par les kinases de stress ATM et ATR, va induire la transcription des gènes cibles intervenant dans la régulation du cycle cellulaire. Les principaux médiateurs de l'arrêt du cycle cellulaire suite à l'activation de p53 sont les protéines p21<sup>WAF1/CIP1</sup>, Gadd45 (Growth Arrest and DNA Damage-45) et 14-3-3 $\sigma$ . Le gène p21<sup>WAF1/CIP1</sup> est l'un des premiers à avoir été identifié comme cible directe de p53. Ce gène code pour une protéine inhibitrice des kinases cycline-dépendantes qui, en association avec les cyclines, jouent un rôle direct dans le déroulement du cycle cellulaire. P21 induit plus spécifiquement une interruption transitoire du cycle cellulaire au niveau des transitions G1-S et G2-M (Agarwal et al., 1995). Les protéines 14-3-3 $\sigma$  et GADD45 induisent quant à elles un arrêt du cycle cellulaire à la transition G2-M (Hermeking et al., 1997). L'arrêt du cycle cellulaire en réponse aux dommages à l'ADN permet aux cellules de réparer leurs génomes, limitant ainsi la propagation de mutations potentiellement oncogéniques (Lane, 1992).

Cependant, et de façon surprenante, les souris déficientes en p21 ne sont pas ou légèrement prédisposées à développer des tumeurs spontanées (Martin-Caballero et al., 2001), probablement parce que d'autres gènes cibles de p53, impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire, restent exprimés. De même, les souris qui sont déficientes pour d'autres gènes cibles de p53, tels que Gadd45a, ne sont pas sensibles au développement spontané des tumeurs, bien qu'elles présentent une forte tumorigénèse en présence d'oncogènes spécifiques ou lors de l'exposition à des cancérigènes (Hollander et al., 1999).

## 6.2. Réparation de l'ADN

P53 régule divers mécanismes de réparation de l'ADN, y compris la réparation par excision de base ou BER ( Base Excision Repair), la réparation par excision de nucléotides ou NER (Nucleotide Excision Repair) et la réparation par jonction d'extrémités non homologues ou NHEJ (Non-Homologous End-Joining) (Seo et al., 2002; Tang et al., 1999 ; Tron et al., 1998 ). P53 induit ainsi la transcription de nombreux gènes cibles impliqués dans différents programmes de réparation de l'ADN tels que Ddb2 (Damage specific DNA binding protein 2)

et XPC (xeroderma pigmentosum, complementation group C) qui sont impliquées dans la reconnaissance des lésions de l'ADN générées par l'irradiation UV, une étape initiale clé de la réparation par NER (Barckhausen et al., 2014).

### **6.3. Régulation de l'autophagie**

#### **6.3.1. Autophagie : Généralités**

La macroautophagie, généralement appelée autophagie, est une voie catabolique essentielle pour l'homéostasie métabolique des cellules. C'est un processus dans lequel les protéines cytoplasmiques superflues et les organites endommagés sont engloutis dans des vésicules autophagiques qui fusionnent finalement avec les lysosomes, entraînant ainsi une dégradation de leur contenu (Yang and Klionsky, 2009). L'autophagie favorise à la fois le recyclage des composants cellulaires et la production d'énergie, et sert donc de mécanisme de survie dans certains contextes de stress métaboliques (comme par exemple le stress nutritionnel) (Levine and Kroemer, 2008). L'autophagie est un mécanisme qui peut également maintenir l'intégrité cellulaire en éliminant des composants cellulaires endommagés, y compris les mitochondries, qui sont une source majeure du stress oxydatif *via* la production de ROS (Mathew and White, 2011). Réputée être impliquée dans de nombreux processus physiologiques et dans de multiples pathologies allant de la neurodégénérescence au cancer, l'autophagie est capable d'orienter le choix entre la survie et la mort cellulaire, jouant ainsi un rôle important dans le développement des cancers. Dans ce contexte, l'autophagie peut avoir un effet pro-survie dans des conditions de stress nutritionnel léger, alors qu'elle peut mener à la mort cellulaire lorsqu'elle est portée à l'extrême. D'autre part, plusieurs altérations génétiques/épigénétiques associées au développement du cancer régulent négativement l'autophagie, ce qui suggère que l'autophagie basale peut fonctionner comme un mécanisme suppresseur de tumeur. Inversement, l'autophagie peut représenter un moyen important d'échapper à la mort cellulaire pour des tumeurs exposées à un microenvironnement stimulant ou soumises à une chimiothérapie (Boya et al., 2013 ; Maiuri et al., 2010).

L'autophagie a été initialement décrite comme un processus de dégradation non spécifique. Cependant, on sait maintenant que l'autophagie a la capacité de cibler

sélectivement de grandes structures, telles que des agents pathogènes intracellulaires, des organites endommagés et des agrégats de protéines. Ce type d'autophagie est appelé «autophagie sélective» et a pour but de maintenir l'homéostasie intracellulaire en éliminant les structures indésirables. Par exemple, l'autophagie sélective dirigée contre des agents pathogènes est appelée «xénophagie» (Nakagawa et al., 2004).

La découverte des gènes liés à l'autophagie chez la levure a constitué un point de démarrage dans l'élucidation du mécanisme moléculaire de l'autophagie. Une quarantaine de gènes codant pour des protéines apparentées à l'autophagie (ATG/AuTophagy-related Genes) ont été identifiés à ce jour, et les 15 gènes codant pour les protéines ATG dans la levure (ATG1-ATG10, ATG12-ATG14, ATG16 et ATG18) sont conservés chez les mammifères. Les protéines ATG peuvent être classées en 6 unités fonctionnelles multi-protéiques (Figure 13) :

**1) Le complexe ULK** : Composé de ULK1, ULK2, ATG13, ATG101 et FIP200, ce complexe initie le processus autophagique après réception de signaux émanant de protéines "senseurs". Son activité est régulée négativement par le complexe de kinase mTORC1 (mammalian Target Of Rapamycin Complex 1) et régulée positivement par la kinase AMPK (AMP-activated protein kinase) (Itakura and Mizushima, 2010 ; Kageyama et al., 2011).

**2) ATG9L (ATG9L1 et ATG9L2)** : Ces protéines membranaires sont nécessaires pour les étapes précoces de formation du phagophore.

Les complexes ULK et ATG9L sont tous les deux nécessaires au recrutement du complexe PI3K de classe III.

**3) Le complexe PI3K de classe III** (phosphatidylinositol-3-OH kinase-III/PI3K-III) : Appelé également complexe « ATG14L », il est composé de ATG14L, VPS34 (la sous-unité catalytique), Beclin-1 et VPS15 (une ser/thr kinase nécessaire pour activer VSP34). Ce complexe s'accumule dans les sites de contact ER-mitochondrie et génère du PI3P nécessaire



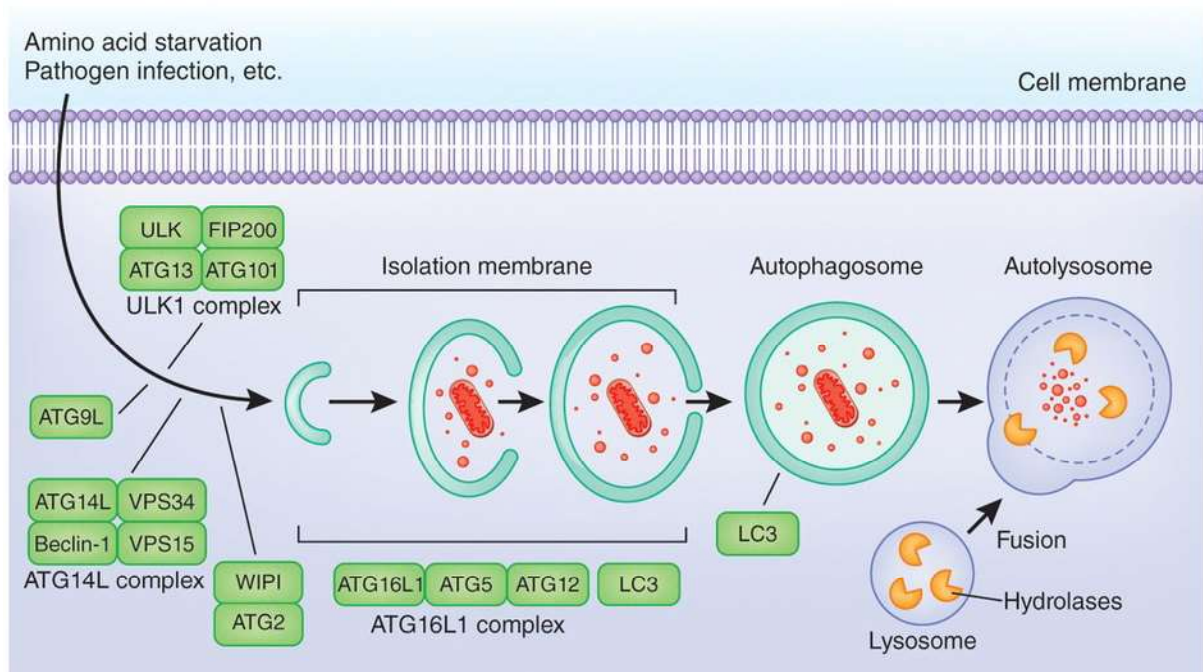
au recrutement des protéines de liaisons y compris les membres de la famille WIPI au niveau de cette plateforme de liaison (Hamasaki et al., 2013).

**4) Le complexe ATG2-WIPI:** constitué de protéines de liaison de la famille WIPI (WD-repeat domain phosphoinositide-interacting/orthologue du ATG18 chez la levure) (WIPI1-WIPI4) qui interagissent avec ATG2A et ATG2B. Ce complexe se lie directement par la protéine WIPI2 à ATG16L1 et recrute le complexe qui lui est associé au niveau de la plateforme de liaison appelée omégasome (Dooley et al., 2014).

**5) Le système de conjugaison ATG5-12-16L1:** Formé de ATG16L1 et du dimère ATG12-ATG5. Ces protéines se localisent spécifiquement au niveau de la membrane d'isolation et se dissocie de celle ci à l'achèvement de la formation de l'autophagosomes. ATG12 est une protéine de type « ubiquitine-like », conjuguée de façon covalente à ATG5 par ATG7 (enzyme E1-like) et ATG10 (enzyme E-like). Ce complexe fonctionne comme une enzyme de type E3 pour l'autre système de conjugaison LC3 (Nakatogawa et al., 2009).

**6) Le système de conjugaison LC3 :** Formé de la protéine LC3 (Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3). Il existe sept orthologues chez les mammifères d'ATG8 (LC3A, LC3B, LC3C, GABARAP, GABARAPL1, GABARAPL2 et GABARAPL3, représenté ici par LC3). La conjugaison de LC3-PE prend place au niveau de la membrane d'isolation dans le site d'accumulation de ATG16L1, qui est nécessaire à la formation du complexe LC3-PE (Fujita et al., 2008b; Nakatogawa et al., 2009 ). Il a été suggéré que LC3 intervient dans la fermeture de la membrane d'isolation (Sou et al., 2008) (Figure 13).





**Figure 14: Le processus de l'autophagie.** En réponse aux signaux inducteurs d'autophagie une membrane d'isolation (ou phagophore) se forme. La fermeture de la membrane d'isolation provoque la formation d'un autophagosome. La fusion subséquente des autophagosomes avec les lysosomes conduit à une dégradation du contenu de l'autophagosome grâce à l'action des hydrolases lysosomales dans l'autolysosome. Les rectangles verts indiquent les protéines ATG nécessaires à la biogénèse des autophagosomes (Shibutani et al., 2015).

### 6.3.2. Les différentes étapes de l'autophagie

L'autophagie est un processus finement régulé. Il est constitué de 3 phases distinctes: l'initiation, l'élongation et la maturation des autophagosomes. L'ensemble de ces événements constitue le flux autophagique.

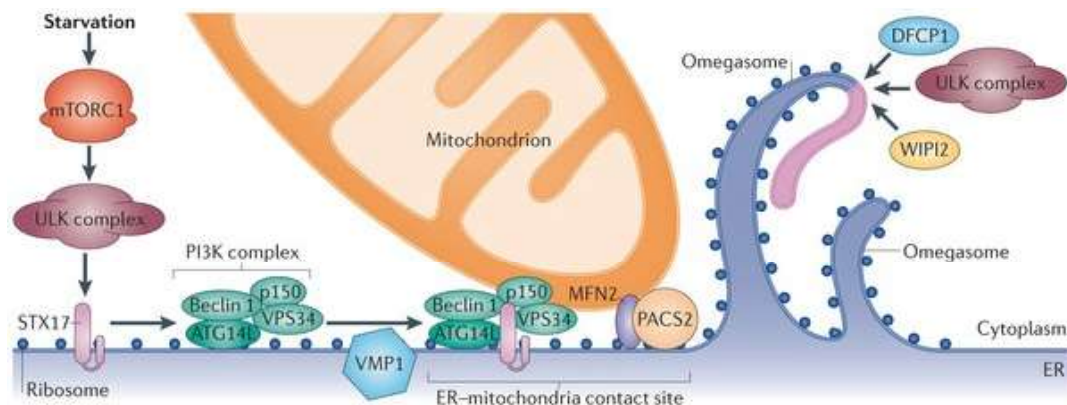
- *Initiation*

L'autophagie a lieu constitutivement à un niveau basal afin d'assurer l'homéostasie cellulaire, mais elle peut également être activée en réponse à une large gamme de stimuli. En effet, en réponse à un stress comme la carence en nutriments, l'hypoxie ou l'absence de facteurs de croissance, le taux d'AMP augmente en inhibant la production d'ATP, ce qui conduit à l'activation de l'AMPK (Hardie, 2007). AMPK, en phosphorylant la protéine TSC2

(Tuberous sclerosis complex 2), active le complexe TSC1:TSC2, conduisant à l'inactivation de Rheb et donc à l'inhibition de l'activité de mTORC1 (cible de la rapamycine du complexe 1 chez les mammifères) (Inoki and Guan, 2006). Lorsqu'elle est activée, mTORC1 inhibe le complexe ULK formé des kinases de type Unc-51 1 et/ou 2 (ULK1/2) avec les protéines ATG13 et FIP200 (Focal adhesion kinase family Interacting Protein of 200 kD). La levée d'inhibition exercée par mTORC1 sur le complexe ULK permet d'initier l'autophagie notamment par la déphosphorylation de ULK1 ou ULK2. ULK1/2, ainsi activées, vont phosphoryler ATG13 et FIP200. D'autre part, une autre protéine essentielle pour l'initiation de l'autophagie, ATG101, va interagir avec ULK1 d'une manière dépendante de ATG13 (Itakura and Mizushima, 2010).

L'origine de la membrane des autophagosomes a été étudiée et débattue, fluctuant entre un mécanisme d'assemblage *de novo* et une formation à partir des membranes du réticulum endoplasmique (ER), du Golgi ou des mitochondries. Plusieurs "autophagologues" soutiennent l'idée qu'il n'y a pas qu'un seul organelle donneur de membrane, mais que la cellule peut plutôt détourner de multiples voies et accéder aux membranes pour s'assurer que l'autophagie peut progresser dans un large éventail de situations. Néanmoins, des observations récentes proposent que la membrane d'isolation se forme à partir de la zone de contact entre le ER et la mitochondrie (Hamasaki et al., 2013 ; Lamb et al., 2013) (Figure 15). En effet, l'accumulation des complexes ULK et ATG9L1 au niveau du ER induit le recrutement du complexe PI3K-III spécifique à l'autophagie (Mizushima et al., 2011) (Kageyama et al., 2011). Ce complexe s'accumule au niveau de la zone de contact entre la mitochondrie et le ER, de manière dépendante de la syntaxine-17 qui réside au niveau de l'ER et des mitochondries (Hamasaki et al., 2013). Dans ce PI3K-III, la sous unité catalytique VPS34, commence à produire du PI3P. L'augmentation de la concentration locale de PI3P et le recrutement ultérieur des protéines effectrices sont nécessaires pour la déformation de l'ER créant ainsi un « omégasome » qui va guider la croissance de la membrane d'isolation. (Funderburk et al., 2010; Simonsen and Tooze, 2009 ) (Figure 15). Parmi ces protéines effectrices on trouve les membres de la famille WIPI (WIPII-WIPI4) et la protéine DECP1 (Double FYVE-containing protein 1). Ces protéines de liaison forment un complexe avec ATG2 (ATG2A et ATG2B). Le complexe reste localisé spécifiquement à la membrane

d'isolation et se dissocie de celle-ci lors de l'achèvement de la formation d'autophagosomes (Mizushima et al., 2001) (Figure 15).



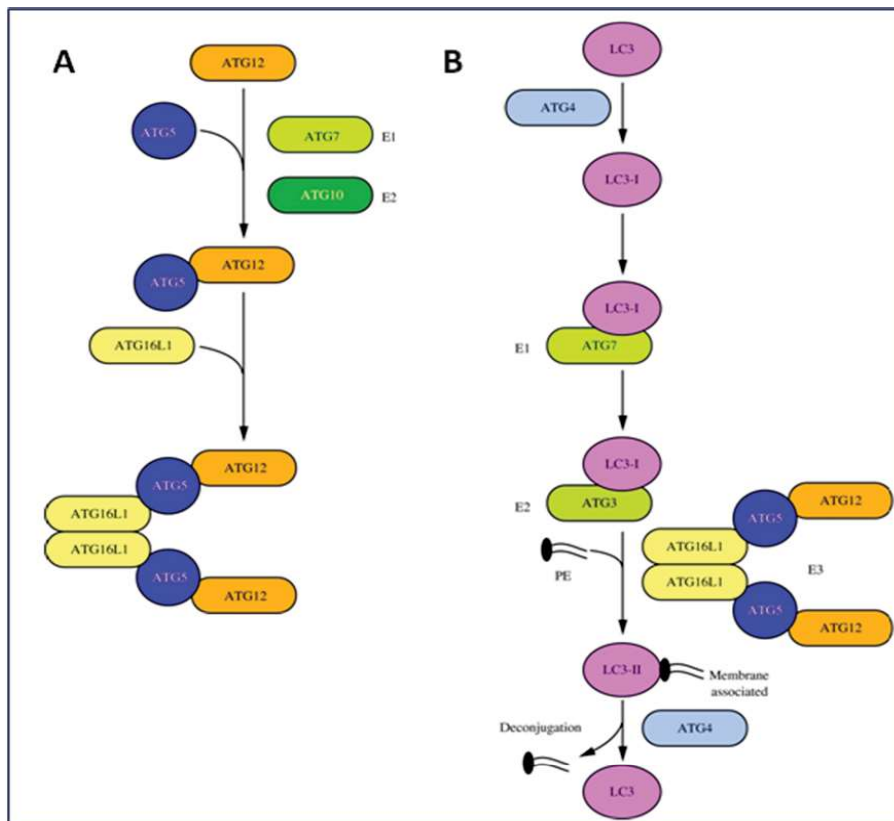
**Figure 15: Présentation d'un modèle de formation de la membrane d'isolation au niveau du site de contact ER-mitochondrie.** Lors de la transmission d'un signal à travers l'axe mTORC1-complexe ULK, la protéine résidente du ER, STX17, est activée et se lie à ATG14L, une sous-unité du complexe PI3K de classe III qui contient Beclin-1, p150 et VPS34. Ce complexe se transloque ensuite au niveau du site de contact RE-mitochondrie, où la PI3K produit localement le phosphatidylinositol-3-phosphate (pas représenté). Ceci déclenche la déformation de la membrane ER, ce qui conduit au recrutement du complexe ULK et les protéines effectrices tels que DFCP1 et WIPI2. Il en résulte la formation de l'omegasome pour créer la membrane d'isolation (rose). Adapté de (Lamb et al., 2013).

- *Elongation*

Pendant l'élongation, le phagophore s'allonge jusqu'à la formation d'une vésicule fermée à double membrane. Cette étape implique, au niveau moléculaire, deux systèmes de conjugaison de type « ubiquitine-like » : le système ATG5-12-16L1 et le système LC3 (Figure 16).

La protéine ATG12 se lie de façon covalente à ATG5 grâce à l'intervention de deux enzymes de type E1 et E2 (ATG7 puis ATG10). Par la suite, ATG16L se lie à ATG5 permettant la dimérisation du complexe ATG12-ATG5-16L1 (Mizushima et al., 2003) (Figure 16-A). Ce complexe s'associe à la membrane du phagophore de manière stable et se dissocie lorsque l'autophagosome est totalement formé (Mizushima et al., 2001). D'autre part, la protéine LC3 est conjuguée à la molécule lipidique membranaire phosphatidyléthanolamine (PE) par l'action séquentielle de ATG7 (E1-like) et de ATG3 (E2-like) suivit par l'action du complexe ATG16L1 (qui fonctionne comme une enzyme E3-like) (Fujita et al., 2008b) (Figure 16-B).

Lorsque LC3 est conjuguée à la molécule lipidique PE, appelée LC3-II, elle peut s'insérer dans la membrane d'isolation. Cette insertion a été décrite comme cruciale dans la fermeture des phagophores en vésicules (Fujita et al., 2008a), dans la régulation de la taille des autophagosomes (Nakatogawa et al., 2007) et dans le contrôle du mouvement des vésicules autophagiques le long des microtubules (Kimura et al., 2008).



**Figure 16: Les deux systèmes de type « ubiquitine-like » impliqués dans l'élongation du phagophore dans les cellules de Mammifères.**

(A) Système ATG12-ATG5-ATG16L. (B) Système LC3. Adapté de (Parzych and Klionsky, 2014)

- *Maturation et fusion avec les lysosomes*

Les vésicules autophagiques nouvellement formées ne possèdent aucune activité lytique en soi et ont donc besoin de fusionner avec les lysosomes afin de dégrader leur contenu. Il est maintenant établi que les autophagosomes interagissent et fusionnent avec d'autres composants de la voie d'endocytose, tels que les endosomes précoces et tardifs et les corps multi-vésiculaires (MVB), générant un organelle hybride appelé amphisome. La raison d'avoir tant de partenaires de fusion n'est pas claire, mais il a été suggéré que les

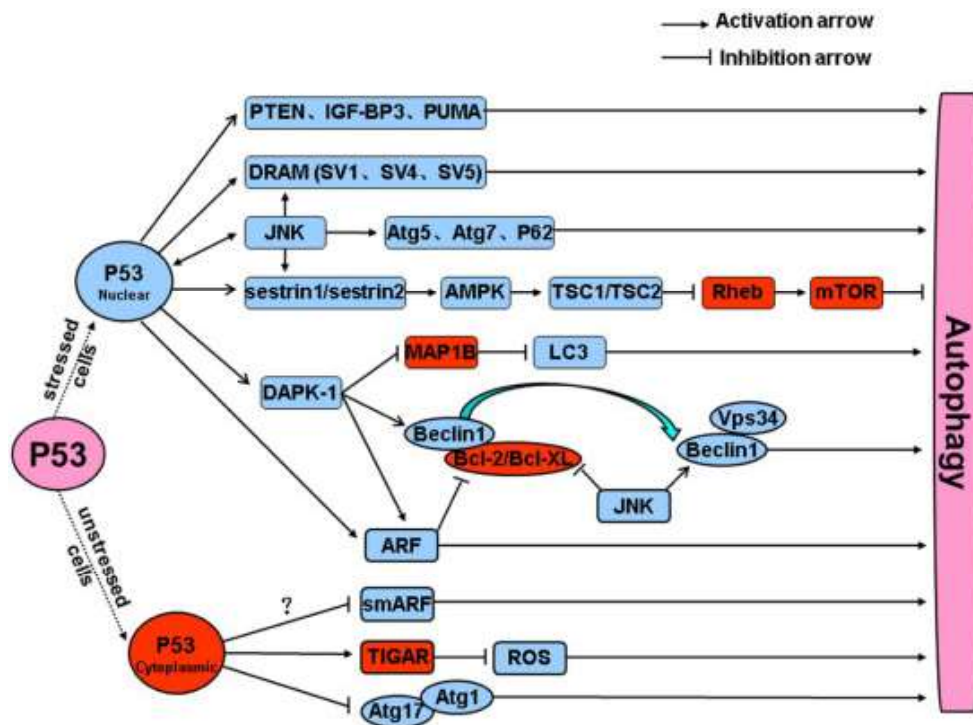
autophagosomes nécessitent des fusions séquentielles pour acquérir le bon ensemble de facteurs pour permettre leur fusion finale avec les lysosomes (Razi et al., 2009). Par exemple, les MVB semblent abandonner leurs fonctions sécrétrices habituelles et jouer un rôle majeur dans la maturation des autophagosomes durant le processus d'autophagie (Fader et al., 2008).

Contrairement aux levures où il existe un seul point de nucléation, dans les cellules des mammifères, les vésicules autophagiques peuvent se former au niveau de plusieurs endroits dans le cytosol et se déplacent bidirectionnellement le long des microtubules, s'accumulant vers le MTOC de manière similaire aux lysosomes. Leur mouvement centripète, dépendant de la protéine moteur dynéine, augmente leur probabilité de rencontre avec les lysosomes, qui sont plus abondants dans la région juxtanucléaire. Un cytosquelette fonctionnel est donc essentiel pour la fusion de ces vésicules autophagiques avec les lysosomes. Les événements de fusion complets sont dépendants de la petite GTPase Rab7 et sont inhibés par des agents induisant une dépolymérisation des microtubules, comme la vinblastine ou le nocodazole (Kochl et al., 2006). Finalement, deux types de fusion entre les autophagosomes et les lysosomes ont été décrites: des fusions complètes avec la création d'une autre organelle hybride, appelée autolysosome ou des fusions transitoires de type «kiss-and-run», qui consistent seulement à transférer le contenu à dégrader dans les lysosomes tout en maintenant les deux vésicules séparées (Jahreiss et al., 2008).

### **6.3.3. Implication de p53 dans le processus d'autophagie**

L'activité transcriptionnelle de p53 semble cruciale pour l'induction de l'autophagie puisque p53 est capable d'activer une multitude de gènes cibles qui codent pour des protéines impliquées dans diverses étapes de l'autophagie, y compris la régulation de l'initiation du processus, la biogenèse des autophagosomes et également la synthèse de constituants des lysosomes (Crighton et al., 2006 ; Gao et al., 2011; Kenzelmann Broz et al., 2013 ). De plus, ces dernières années, il est apparu que p53 peut contrôler le processus autophagique à la fois positivement et négativement en fonction de sa localisation subcellulaire. De façon schématique, une protéine p53 nucléaire favorise l'autophagie, tandis qu'une protéine p53 cytoplasmique a tendance à l'inhiber (Maiuri et al., 2010) (Figure 16).





**Figure 17: Régulation de l'autophagie par p53.**

En fonction de sa localisation cellulaire, p53 peut être un régulateur positif ou négatif de l'autophagie. Dans le noyau, p53 peut activer la voie AMPK et inhiber la voie mTOR, déclenchant ainsi l'autophagie. P53 peut également induire la transcription de gènes inducteurs de l'autophagie y compris DRAM, PTEN, IGF-BP3, DAPK-1 ARF et JNK. En revanche, p53 cytoplasmique inhibe l'autophagie par des mécanismes mal connus. En effet, P53 n'induit pas seulement TIGAR qui inhibe l'autophagie *via* la neutralisation des ROS, mais peut également interférer avec les fonctions pro-autophagiques des smARF (short mitochondrial isoform of ARF), ou directement avec Atg17, inhibant ainsi l'autophagie. Les symboles bleus et rouges représentent respectivement des facteurs pro- ou anti-autophagiques ou des interactions. Adapté de (Tang et al., 2015).

- ***Implication de la protéine p53 nucléaire dans le processus d'autophagie***

Suite à un stress, la translocation nucléaire de p53 peut induire l'autophagie en activant la transcription de TSC2 et de AMPK, deux protéines régulant négativement l'activité de mTOR, favorisant ainsi indirectement l'autophagie (Feng et al., 2007; Feng et al., 2005). De plus, Sestrins 1 et 2, deux activateurs de l'AMPK, sont également up-régulés par p53 (Budanov and Karin, 2008). Un autre gène cible de p53 codant pour une protéine lysosomale, DRAM (damage-regulated autophagy modulator) est nécessaire à l'induction de l'autophagie après activation de p53 en réponse à différents stress (Crighton et al., 2007). La protéine DRAM peut ainsi contribuer à l'accumulation des autophagosomes en modulant la fusion autophagosome-lysosome pour générer des autolysosomes (Lum et al., 2005). Une série de

variants d'épissage de DRAM-1 induits par p53, y compris SV4 et SV5, pourrait également moduler l'autophagie. Contrairement à l'isoforme de la protéine complète DRAM-1 (SV1), les deux isoformes SV4 et SV5 ne se localisent pas au niveau des lysosomes et des endosomes, mais présentent une localisation partielle dans les peroxyosomes et les autophagosomes, respectivement, ainsi que dans le ER (Mah et al., 2012). Une autre protéine cible de p53 contrôlant l'autophagie est la protéine suppresseur de tumeur DAPK-1 (Death associated protein kinase 1). DAPK-1 peut favoriser l'induction de l'autophagie en se liant à la protéine MAP1B associée aux microtubules, qui est un facteur anti-autophagique en interagissant avec LC3 (Gozuacik and Kimchi, 2006 ; Harrison et al., 2008). P53 peut aussi phosphoryler le domaine d'homologie BH3 de Beclin1, un modulateur autophagique essentiel conduisant ainsi à la libération de ce dernier de sa séquestration induite par Bcl-2/Bcl-xL (Zalckvar et al., 2009). La libération de Beclin1 est aussi favorisée avec la répression de la transcription de Bcl-2 et Bcl-xL (Sugars et al., 2001) ou en activant l'expression de Bax, Bad, Bnip3 et PUMA (p53 upregulated modulator of apoptosis) (Levine et al., 2008). Un autre rôle pro-autophagique est également attribué à P53 qui contribue partiellement à l'activation de kinase c-Jun N-terminale (JNK). Cette kinase peut réguler l'autophagie via deux mécanismes distincts. D'une part, la phosphorylation de Bcl-2 par JNK permet de libérer Beclin-1 du complexe Bcl-2-Beclin-1 (Wei et al., 2008). D'autre part, JNK régule l'activité de p53 et favorise la phosphorylation de cette dernière, induisant ainsi l'expression des gènes de l'autophagie, y compris Beclin1, ATG5, Atg7 et p62, constituant ainsi une boucle d'amplification de l'autophagie (Lorin et al., 2010).

- ***Implication de la protéine p53 cytoplasmique dans le processus d'autophagie***

Contrairement à la protéine p53 nucléaire et ses fonctions favorisant l'autophagie, le pool cytoplasmique de p53 semble inhiber l'autophagie dans la plupart des cas, en particulier lorsque les cellules ne sont pas stressées. Il a également été proposé que l'inhibition de p53 induise une autophagie chez les nématodes et les cellules de mammifères, et que p53 cytoplasmique serait principalement responsable de cette inhibition de l'autophagie. Dans la même optique, la restauration de l'expression cytoplasmique de p53 dans des cellules HCT116 déficientes en p53 peut inhiber l'induction d'autophagie (Tasdemir et al., 2008). Les

mécanismes de suppression de l'autophagie induits par le pool cytoplasmique de p53 demeurent mal connus. Néanmoins, il a été décrit que p53 cytoplasmique est capable de se lier avec Beclin-1 ce qui entraîne son ubiquitination et sa dégradation par le protéasome, inhibant ainsi le processus d'autophagie (Tripathi et al., 2014). Un autre groupe a suggéré un mécanisme potentiel dans lequel la protéine p53 cytoplasmique interagirait directement avec FIP200. Ce mécanisme interférerait avec le déclenchement du flux autophagique en inactivant ULK1 et en affectant sa redistribution aux phagophores naissants (Morselli et al., 2011). Ainsi, p53 cytoplasmique semble inhiber l'autophagie mais des études supplémentaires sont nécessaires pour clarifier le rôle dépendant du contexte de p53 dans l'induction ou l'inhibition de l'autophagie.

#### **6.4. Induction et régulation de l'apoptose**

Les capacités de p53 à induire et à réguler l'apoptose sont maintenant clairement démontrées. En réponse à différents signaux de stress (dommages à l'ADN, activation d'oncogènes, hypoxie, stress oxydatif), la protéine p53 va ainsi pouvoir engager la mort cellulaire par apoptose via différents mécanismes, en particulier dépendant des mitochondries.

##### **6.4.1. La mitochondrie : carrefour de la mort**

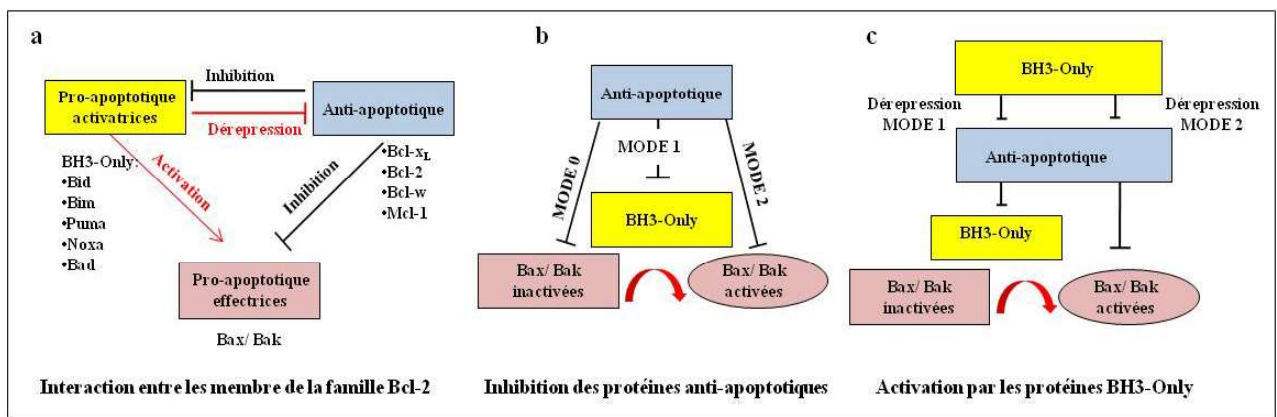
La mitochondrie joue un rôle critique dans la survie cellulaire notamment dans l'apport en énergie grâce à la production d'ATP mais contrôle également la voie de la mort cellulaire programmée. Le contrôle de l'apoptose par la voie mitochondriale (encore appelée voie intrinsèque) est assuré par un groupe de protéines de la famille Bcl-2. Cette famille de protéines se distingue par la présence de quatre domaines d'homologie BCL-2 (BH/Bcl-2 Homology) conservés (BH1, BH2, BH3 et BH4). En particulier, le domaine BH3 est invariablement présent et a un rôle essentiel dans la régulation de la mort cellulaire par la voie mitochondriale. On peut diviser la famille Bcl-2 en trois classes de protéines selon leur structure et leur rôle dans l'induction ou l'inhibition de la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe (MOMP) : les protéines pro-apoptotiques, les protéines pro-apoptotiques BH3-only et les protéines anti-apoptotiques (Figure 17-a).



Les protéines de la famille Bcl-2 sont impliquées dans un réseau complexe d'interactions hétérodimériques qui décident collectivement de la vie ou de la mort de la cellule (Chipuk and Green, 2008 ; Youle and Strasser, 2008). Les membres de la famille anti-apoptotiques tels que Mcl-1, Bcl-2 et Bcl-xL protègent la cellule contre les stimuli apoptotiques, alors que les protéines pro-apoptotiques comme Bax et Bak sont nécessaires à l'apoptose. En effet, Bax et Bak représentent les deux effecteurs clés de la famille Bcl-2 qui s'oligomèrisent pour former des pores qui perméabilisent la membrane mitochondriale externe, induisant la mort de la cellule. En effet, ces pores constituent un passage laissant passer des facteurs apoptogènes, tels que le cytochrome c, de l'espace intermembranaire mitochondrial vers le cytoplasme. Le résultat est double: la perte du cytochrome c désactive la production d'énergie par les mitochondries, mais surtout le cytochrome c cytosolique provoque l'activation des caspases et une cascade protéolytique qui induit la mort cellulaire programmée (Liu et al., 1996). Afin de garder l'intégrité cellulaire et étant donné leur rôle clé dans l'induction de l'apoptose mitochondriale, Bax et Bak sont strictement contrôlés par les membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 (Lindsten et al., 2000; Wei et al., 2001 ). Les protéines BH3-only, quant à elles, initient l'apoptose en déclenchant l'activation de Bax et Bak, soit directement grâce à une interaction rapide du type "hit and run" avec les protéines effectrices, soit indirectement en se liant aux protéines anti-apoptotiques, voir (Figure 17-c).

Plusieurs protéines anti-apoptotiques ont été identifiées chez les mammifères pouvant inhiber l'action de Bax et de Bak. Deux mécanismes de contrôle distincts ont été proposés à savoir les MODE 1 et MODE 2 qui ont été récemment assignés pour décrire respectivement l'inhibition indirecte et directe de Bax et Bak (Figure 17-b). En effet, le MODE 1 suppose que les protéines anti-apoptotiques telles que Bcl-xL ou Bcl-2 séquestrent par interaction directe les protéines BH3-only (comme tBid) pour les empêcher d'activer Bax et Bak. Le MODE 2 suppose quant à lui que les protéines anti-apoptotiques se lient directement aux protéines effectrices Bax et Bak afin de les empêcher de s'oligomériser dans la membrane mitochondriale externe et d'y former des pores (Llambi et al., 2011). Plus récemment, un troisième mode (ou MODE 0) a été décrit. Le MODE 0 suppose que les protéines anti-apoptotiques telles que Bcl-xL inhibent et maintiennent Bax dans le cytosol par rétrotranslocation constante (Edlich et al., 2011).

Quel que soit leur mode de fonctionnement, un dysfonctionnement de ces protéines est associé à plusieurs maladies, faisant des membres de la famille Bcl-2 et leurs sites d'interactions des cibles thérapeutiques potentielles (Green and Kroemer, 2005; Strasser et al., 2011). Des mimétiques du domaine BH3 tels que ABT737, ainsi que ses dérivés ABT263 et ABT199, qui lient et inhibent les protéines anti-apoptotiques Bcl-2, constituent un espoir pour la conception des médicaments personnalisés et sélectifs qui activent le programme apoptotique dans les cellules cancéreuses et ont encouragé la recherche sur les médicaments anticancéreux qui activent directement Bax et Bak (Souers et al., 2013 ; Tse et al., 2008).



**Figure 18: Interactions potentielles entre les membres de la famille Bcl-2.** (a) La famille Bcl-2 peut être divisée en trois classes: les protéines pro-apoptotiques effectrices Bax/Bak, les protéines pro-apoptotiques activatrices BH3-only et les protéines anti-apoptotiques. Les protéines anti-apoptotiques inhibent l'activité des membres pro-apoptotiques de la famille Bcl-2. Les protéines BH3-only activent Bax et Bak soit directement (activation) soit indirectement (dépression). (b) L'inhibition par les protéines pro-survie peut se produire via trois «MODES». Pendant l'inhibition de MODE 0, les protéines anti-apoptotiques telles que Bcl-xL se lient à Bax périphérique aux mitochondries et le rétro-transloque vers le cytosol. Pendant l'inhibition de MODE 1, les protéines anti-apoptotiques séquestrent des protéines BH3-only pour les empêcher d'activer Bax et Bak. Pendant l'inhibition de MODE 2, les protéines anti-apoptotiques se lient à Bax et Bak activés pour empêcher leur oligomérisation dans la membrane mitochondriale externe. (c) Les protéines BH3-only peuvent provoquer l'activation Bax et Bak de deux façons. Bien que certaines protéines BH3-only puissent se lier directement à Bax et Bak pour les activer directement, d'autres protéines BH3-only interagissent avec les protéines anti-apoptotiques soit pour libérer les BH3-only (Dépression du MODE 1), soit directement Bax et/ou Bak activé (Dépression du MODE 2). Adapté de (Westphal et al., 2014)

## 6.4.2. P53 et apoptose par la voie intrinsèque

### ✓ Rôle dépendant de la transcription

P53 est un suppresseur de tumeurs pléiotrope, sa fonction apoptotique puissante est sans doute la fonction la plus étudiée *in vitro* et *in vivo*, et demeure au centre de son activité antinéoplasique. P53 favorise l'apoptose principalement via la voie mitochondriale décrite ci-dessus en régulant la MOMP. En tant que facteur de transcription, p53 stimule l'expression de gènes cibles codant pour les membres pro-apoptotiques de cette voie apoptotique tels que Puma, Noxa, Bax, Bak, Bid, APAF-1 et beaucoup d'autres, souvent de façon dépendante du type cellulaire et du type de stress auquel la cellule répond (Vousden and Lu, 2002). Il est à noter que l'induction des gènes cibles présente une cinétique variable, certains présentant une réponse retardée de plus de 24 h, ce qui est le cas pour Bax. P53 peut également servir à la répression transcriptionnelle de gènes anti-apoptotiques tels que Bcl-2, Bcl-xL et la survivine (un membre de la famille des IAPs).

### ✓ Rôles indépendants de la transcription

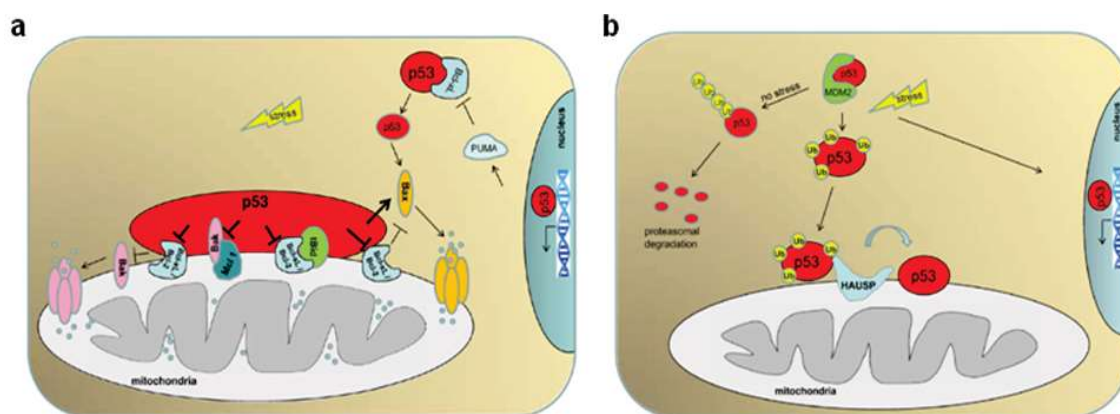
P53 peut également induire l'apoptose d'une manière indépendante de la transcription. Cette voie alternative a été étroitement étudiée ces dernières années et les activités cytoplasmiques et mitochondriales de p53 ont été largement définies (Chipuk et al., 2004 ; Leu et al., 2004; Mihara et al., 2003 ). Ce qui caractérise l'induction de l'apoptose indépendante de l'activité transcriptionnelle de p53 est son accumulation suite à un stress (agents endommageant l'ADN, oncogènes activés, hypoxie et autres) dans le cytoplasme, et plus précisément au niveau des mitochondries, afin de favoriser l'activation des effecteurs de la voie apoptotique mitochondriale Bax et Bak. Plusieurs études réalisées ces dernières années ont confirmé qu'il s'agit d'un mécanisme général de mort cellulaire répondant à un large spectre de stress cellulaire activant p53 et dans différents modèles cellulaires (Arima et al., 2005 ; Moll et al., 2006 ; Sansome et al., 2001). De plus, l'utilisation *in vivo* de protéines p53 génétiquement modifiées, qui sont soit incapables de se transloquer dans le noyau (Chipuk et al., 2004), soit avec une capacité accrue de translocation vers la mitochondrie, (Marchenko et

al., 2007) ont permis de renforcer cette idée. De plus, la capacité de protéines p53 recombinantes à induire rapidement une MOMP et la libération du cytochrome c à partir de mitochondries isolées *in vitro* a pleinement démontré l'effet direct de p53 sur la MOMP (Chipuk et al., 2004).

Grâce à un système de mono-ubiquitynation répété sur plusieurs résidus de p53, MDM2 favorise sa translocation mitochondriale et donc son activité apoptotique mitochondriale directe (Figure 18-a). À son arrivée à la mitochondrie, p53 subit une déubiquitination rapide par la protéine HAUSP (herpes virus-associated ubiquitin-specific protease). P53 non ubiquitynilée, active, est ainsi prête à effectuer ses fonctions apoptotiques au niveau de la mitochondrie (Figure 18-b) (Marchenko et al., 2007).

Concernant le mode d'action de p53 pour induire la MOMP, de nombreux travaux ont été réalisés. Des expériences *in vitro* ont montré que p53 purifiée est capable de déstabiliser le complexe formé par tBid, Bax et Bcl-xL, libérant ainsi les protéines pro-apoptotiques du contrôle négatif exercé par Bcl-xL (Mihara et al., 2003 ; Moll et al., 2006 ; Sansome et al., 2001). Cet effet est induit par une interaction directe avec Bcl-xL, comme le montrent plusieurs études structurales qui ont confirmé l'interaction de p53 avec d'autres protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 (Petros et al., 2004; Tomita et al., 2006 ). P53 interagit également avec Bak, bien que la liaison semble être 10 fois plus faible que celle avec les protéines anti-apoptotiques de la même famille (Leu et al., 2004; Mihara et al., 2003 ). Il n'est pas prouvé clairement si ces interactions se produisent *in vivo*, mais il est clair qu'en réponse à un stress, p53 est capable de perturber le complexe entre Bak et son partenaire anti-apoptotique Mcl-1, en se liant directement à Bak au niveau de la membrane mitochondriale externe, conduisant à l'activation de Bak suivis par la libération du cytochrome C (Sot et al., 2007). En plus de Bak, p53 semble fonctionner comme un activateur direct de Bax cytosolique en absence d'autres protéines activatrices, déclenchant sa translocation vers la mitochondrie et son oligomérisation dans la membrane mitochondriale. Ces événements conduisent à la perméabilisation des membranes des mitochondries isolées *in vitro* (Chipuk et al., 2003; Speidel et al., 2006 ). Néanmoins, un complexe p53-Bax stable n'a jamais été détecté. Cela a été expliqué par un mécanisme de type «hit-and-run» impliquant une activité directe de p53 pour favoriser le changement conformationnel de Bax qui conduit à son

activation mais sans interaction stable entre les deux partenaires protéiques (Chipuk et al., 2004 ; Chipuk et al., 2003). Toutes les interactions mentionnées peuvent être déclinées de différentes manières afin d'expliquer la séquence d'événements qui conduisent à l'apoptose dépendante de p53 qui sont résumés dans la (Figure 18-a).



**Figure 19 : Rôle de p53 dans la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe**

(a) Le programme p53 mitochondrial direct de l'apoptose. Suite à un stress, p53 se retrouve au niveau de la mitochondrie et s'engage dans des interactions avec les membres anti- et proapoptotiques de la famille Bcl-2. Cela va induire une perméabilisation de la membrane mitochondriale externe. P53 interagit avec Bcl-xL et Bcl-2 et neutralise leurs effets inhibiteurs sur Bax et Bak, pour qu'ils puissent s'oligomériser et former des pores dans la membrane mitochondriale externe. L'interaction p53 avec Bcl-xL libère également tBid de son complexe inhibiteur avec Bcl-xL. De plus, p53 peut interagir directement avec Bak, le libérant d'un complexe inhibiteur avec Mcl-1. P53 interagit également avec Bax d'une manière de type «hit and run», ce qui stimule l'oligomérisation Bax et la formation de pores. D'autre part, p53 par son activité transcriptionnelle induit Puma, qui libère alors p53 d'un complexe cytosolique préexistant avec l'inhibiteur Bcl-xL et active les monomères de Bax présents dans le cytosol. Ainsi, p53 agit comme une protéine BH3-only, combinant à la fois l'activation des protéines pro-apoptotiques effectrices et l'activation de fonctions BH3-only. (b) Régulation de la translocation mitochondriale de p53. P53 retrouvée au niveau des mitochondries provient du pool stabilisé en réponse à un stress dans le cytoplasme. La régulation de p53 se fait en deux étapes. La première consiste en plusieurs monoubiquitinations, induites par les niveaux basiques de MDM2 qui génèrent un état intermédiaire de p53 monoubiquitiné, qui sera rapidement stabilisé par une perturbation du complexe p53-MDM2 et détourné vers les mitochondries. La deuxième étape, quand à elle, consiste en la déubiquitination rapide de p53 par HAUSP, à son arrivée à la mitochondrie, ce qui génère une p53 active (non ubiquitinée). Une autre fraction importante de p53 se transloque vers le noyau où elle est stabilisée pour initier son programme d'activation et de répression de la transcription de gènes cibles.

Un premier modèle suggère que la liaison de p53 avec Bcl-xL et/ou Bcl-2 neutralise leurs effets anti-apoptotiques conduisant ainsi à une apoptose dépendante de Bax ou Bak. Dans ce cadre, certains mutants de p53 incapables de se lier à Bcl-xL/Bcl-2 présentent une activité apoptotique réduite (Mihara et al., 2003 ; Tomita et al., 2006). De plus, il a été démontré que le stress génotoxique est capable d'induire la liaison de p53 sauvage à Bcl-2 au niveau des mitochondries et que cette liaison se traduit par une association réduite de la

protéine anti-apoptotique Bcl-2 avec Bax, qui peut donc s'oligomériser et induire la MOMP (Deng et al., 2006). Un deuxième modèle soutient que le pool cytoplasmique de p53 est responsable de l'induction de l'apoptose et prend également en compte le contrôle de la transcription exercée par le pool de p53 nucléaire. Dans les cellules non stressées, p53 est séquestrée dans le cytoplasme par son interaction avec Bcl-xL, ce qui maintient sous contrôle l'induction de l'apoptose. Suite à un stress génotoxique, Bcl-xL cytoplasmique va se lier à la protéine de type BH3-only Puma (qui est une cible transcriptionnelle rapidement induite par p53 nucléaire). Cette interaction Bcl-xL/Puma va permettre la libération de p53 cytoplasmique de son interaction inhibitrice avec Bcl-xL, lui permettant d'activer Bax dans le cytoplasme ou au niveau des mitochondries (Chipuk et al., 2005). Cependant, il a été démontré que l'apoptose indépendante de la transcription induite par p53 se produit également en l'absence de Puma (Wolff et al., 2008).

Néanmoins, les activités de p53 au niveau des mitochondries ne se limitent pas seulement à la régulation de l'apoptose. Des études plus récentes ont décrit un autre rôle de p53 dans l'induction d'une voie irréversible de mort cellulaire par nécrose suite à une défaillance bioénergétique, principalement due à un excès de  $Ca^{2+}$  et de ROS cytosoliques générés lors de dommages oxydatifs et libérés par les mitochondries. En effet, en réponse à de nombreux signaux de stress et en relation directe avec la force du stimulus, il a été démontré que p53 peut induire une nécrose plutôt que de l'apoptose (Vaseva et al., 2012).

#### **6.4.3. P53 et apoptose par la voie extrinsèque**

En réponse à un stress génotoxique, p53 peut activer la transcription des gènes codant pour les récepteurs à domaine de mort, notamment Fas (Owen-Schaub et al., 1995), DR4 (Liu et al., 2004) et DR5 (Takimoto and El-Deiry, 2000) et pourrait donc induire l'apoptose à travers ces voies. Néanmoins, l'expression de Fas en réponse aux agents causant des dommages à l'ADN est spécifique de certains tissus et ne nécessite souvent pas la présence de p53 (Bouvard et al., 2000). De plus, l'expression de récepteurs leurres à TRAIL DcR1 et DcR2 est aussi régulée par p53 (Ruiz de Almodovar et al., 2004). Il existe de plus de nombreux arguments indiquant que les récepteurs à TRAIL ne sont pas, en général, essentiels pour l'apoptose induite par p53. De plus, la perte de FADD ou de la caspase-8 dans des souris

prévient l'apoptose induite par les récepteurs à domaine de mort notamment des cellules lymphoïdes, mais ne prévient pas l'apoptose dépendante de p53 induite par une irradiation- $\gamma$  ou un traitement à l'étoposide (Newton and Strasser, 2000 ; Varfolomeev et al., 1998). En conclusion, l'expression des récepteurs à domaine de mort induite par p53 semble plus être impliquée dans la sensibilisation des cellules aux ligands de la famille du TNF qu'à l'apoptose induite directement par p53.

### **6.5. Rôle de p53 dans la réponse immune antitumorale**

Ces dernières années, plusieurs travaux ont montré l'existence d'un rôle plus large de p53 dans la suppression des tumeurs, notamment en l'impliquant dans la réponse immune antitumorale. Il a été ainsi montré que p53 est capable d'intervenir dans l'initiation de la réponse immune antitumorale à travers l'amélioration de la fonction des DC et cela par le biais de l'augmentation de l'expression des molécules du CMH-I. Cette stimulation de la présentation antigénique augmenterait l'induction de cellules T CD8<sup>+</sup> cytotoxiques qui sont spécifiques des cellules infectées par les virus ou les cellules transformées (Wang et al., 2013). P53 peut également activer une réponse immunitaire antitumorale innée par la régulation directe de l'expression par les cellules tumorales de ligands du récepteur activateur NKG2D, notamment MICA, MICB, ULBP1 et ULBP2 (Textor et al., 2011), conduisant à une amélioration de la destruction des cellules tumorales par les cellules NK. De plus, p53 régule directement au niveau transcriptionnel, l'expression de DD1 $\alpha$  favorisant l'élimination des cellules apoptotiques et des corps apoptotiques en stimulant la phagocytose induite par les macrophages, assurant une réponse immunitaire efficace et précise (Yoon et al., 2015). Néanmoins, DD1 $\alpha$  peut jouer un rôle de molécule check-point immunitaire inhibant la fonction des lymphocytes T. Ainsi, l'induction de l'expression de DD1 $\alpha$  par p53 pourrait participer à l'échappement tumoral aux lymphocytes T cytotoxique (Zitvogel and Kroemer, 2015). En outre, un certain nombre de micro ARNs (miRNA) régulés par p53 ont également été impliqués dans la régulation de l'immunité adaptative et innée, y compris le groupe miR-17-92 127, miR-145 et let-7 (Nakatogawa et al., 2009; Sachdeva et al., 2009 ). Par exemple, miR34, induit par p53, se lie directement à la région 3' non traduite du gène codant pour PD-L1, suggérant que p53 module spécifiquement la réponse immunitaire antitumorale en

régulant l'expression de PD-L1 via miR-34 (Cortez et al., 2016). P53 activée peut également intervenir dans la réponse immune antitumorale en induisant la transactivation des gènes qui codent pour la molécule d'adhésion intracellulaire 1 (ICAM-1) (Gorgoulis et al., 2003), qui est un modulateur important de la formation des synapses immunologiques entre la cellule tueuse et la cellule tumorale.

Finalement, p53 peut intervenir dans la réponse immune antitumorale innée et adaptative en contrôlant l'étape finale du processus, ou plus précisément en contrôlant les voies apoptotiques de lyse induites par les NK et les CTL. En effet la protéine suppresseur de tumeurs est capable d'induire ou de réprimer l'expression des protéines pro- et anti-apoptotiques tels que la procaspase-8, Bax, Noxa, Puma, Bcl-2/xL (Vousden and Lu, 2002). De plus, le rétablissement de la fonction p53 sauvage dans des cellules tumorales exprimant une p53 mutée ou la réactivation de la voie p53 dans les cellules exprimant MDM2 en excès peut les sensibiliser à TRAIL, au TNF $\alpha$  et à FasL (Weinmann et al., 2008) (Aguilar-Lemarroy et al., 2002; Meijer et al., 2013 ; Muret et al., 2012 ). De la même manière, il a été montré dans notre laboratoire que la restauration d'une p53 sauvage dans un modèle de carcinome pulmonaire exprimant une p53 mutée, restaure l'expression du récepteur Fas à la surface cellulaire et sensibilise les cellules tumorales à l'apoptose induite par les CTL par la voie apoptotique Fas/FasL (Thiery et al., 2003). En outre, toujours dans ce modèle de cancer bronchique, l'effet de wtp53 sur l'apoptose induite par Fas, implique également l'inhibition de l'expression de l'isoforme courte de cFLIP entraînant une activation efficace de la pro-caspase 8 dans les cellules cibles après une co-culture avec des CTL (Thiery et al., 2005).

Quelques études ont également établi un lien entre p53 et la susceptibilité des cellules tumorales à la mort cellulaire induite par les Gzms. En effet, il a été décrit que p53 constitue une cible physiologique du GzmK (Hua et al., 2009). La protéine suppresseur de tumeurs peut être clivée au niveau de deux sites potentiels par ce Gzm, générant ainsi trois fragments (p40, p35 et p13) possédant une activité pro-apoptotique. De plus, l'expression de p53 semble être importante pour la mort cellulaire dépendante du GzmK et des cellules NK, comme le montre la susceptibilité différentielle des lignées cellulaires HCT116 p53<sup>+/+</sup> et HCT116 p53<sup>-/-</sup> à la mort induite par le GzmK et NK. Une autre étude dans notre laboratoire a mis en évidence le rôle crucial de p53 dans la destruction des cellules tumorales induites par les lymphocytes T



cytotoxiques à travers la voie PFN/GzmB (Meslin et al., 2007). D'une part, cette étude a mis en évidence une induction rapide de p53 dans des cellules cibles après un stress induit par les CTL et par le GzmB, et d'autre part, elle a démontré que cette accumulation de p53 était essentielle à l'apoptose induite par le GzmB ou par les CTL/cellules NK. De plus, il a été montré que le GzmB déclenche la translocation rapide d'une petite fraction de l'endonucléase CAD vers le noyau d'une manière indépendante de Bid et de la caspase 3, induisant des dommages précoces à l'ADN responsables de l'activation rapide de p53. En effet, suite au stress génotoxique induit par le GzmB, une kinase de la famille des PIKK ((PI3-kinase)-related kinases), appelée hSMG-1 (Brumbaugh et al., 2004), est rapidement activée et serait, au moins en partie, responsable d'une phosphorylation, d'une stabilisation et d'une activation rapide de p53 dans les cellules cibles (Meslin et al., 2011). Ces travaux ont ainsi mis en évidence un nouveau rôle de p53 comme un élément déterminant dans la régulation dynamique de la voie principale de mort cellulaire induite par les CTL et les cellules NK (Thiery et al., 2015).

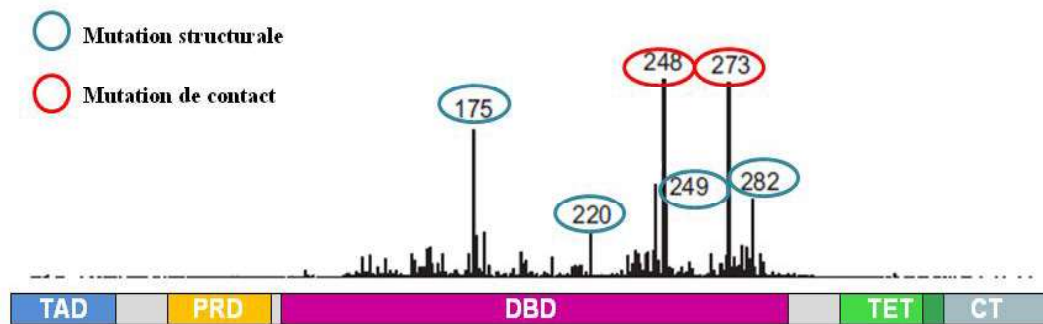
## **7. P53 : une cible thérapeutique**

Étant donné le rôle crucial de p53 dans la prévention et la suppression des cancers, son inactivation a été observée dans la grande majorité des cancers humains soit par mutation du gène *TP53* lui-même, donnant naissance à une protéine non fonctionnelle, soit par inactivation indirecte de protéine. Cela renforce l'intérêt de cibler thérapeutiquement p53 afin de réactiver son rôle de suppresseur de tumeurs.

### **7.1. Inactivation par mutations**

On distingue deux classes de mutations. La première concerne essentiellement des mutants "de contact", c'est à dire des mutations au niveau de résidus entrant directement en contact avec l'ADN, au niveau de son DBD, comme les résidus 248 et 273. La seconde classe concerne des mutants dits "de structure". Ces mutants concernent des résidus impliqués dans le repliement conformationnel correct de la protéine. Parmi ces résidus on trouve notamment les acides aminés 175, 245, 249 ou 282 (Figure 19). Ce type de mutations conduit à

l'inactivation fonctionnelle de la p53 et à une incapacité de se lier à l'ADN (Olivier et al., 2010).



**Figure 20 : Mutations de p53 les plus fréquentes** Les barres au-dessus de la séquence protéique indiquent la fréquence relative des mutations selon la base de données des mutations *TP53* du Centre International de Recherche sur le Cancer (<http://www-p53.iarc.fr>). L'inactivation de p53 dans des tumeurs humaines se produit le plus souvent par des mutations faux sens au niveau du DBD de la protéine. Six mutations communes de p53 'hot-spot' sont classées comme des mutants de structure ou de contact p53, qui perturbent l'interaction protéine-ADN et la transactivation de gènes cibles de p53

Plus précisément, les mutations structurales influent sur la stabilité thermodynamique de la protéine p53 à divers degrés (Koulgi et al., 2013). Les mutations affectant la structure tridimensionnelle de p53 altèrent également la translocation de p53 dans le noyau conduisant à la perte de ses fonctions suite à une rétention cytoplasmique ou à une mauvaise localisation. Les mutations de contact donnent naissance à des protéines qui présentent les mêmes propriétés thermodynamiques que la protéine sauvage, mais sont incapables de lier l'ADN ou d'interagir avec les partenaires protéiques de p53 sauvage (Hagn et al., 2010). Des études cristallographiques ont montré que les mutations de contact R273H et R273C substituent simplement un résidu arginine impliqué dans le contact avec l'ADN sans induire de perturbations structurelles au niveau des résidus voisins et que dans ces mutants l'architecture globale de la surface de liaison à l'ADN de p53 est préservée (Joerger and Fersht, 2007). Finalement, lorsqu'un mutant de p53 s'accumule excessivement dans les tumeurs, cela pourrait entraîner un effet dominant négatif sur la forme sauvage de p53. En effet, comme mentionné précédemment, p53 se lie à l'ADN sous forme de tétramères et les formes sauvages et mutantes de p53 forment des hétéro-oligomères transcriptionnellement inactifs.

D'autre part, certaines p53 mutées peuvent aussi acquérir des nouvelles propriétés oncogéniques. On parle de mutants « gain de fonction » notamment au niveau de la suppression de la fonction des protéines p63 et p73, ou au niveau de la coopération avec l'oncogène Ras dans la transformation cellulaire (Xu et al., 2011).

## 7.2. Inactivation de p53 par d'autres mécanismes

Un sous ensemble de tumeurs humaines présente une p53 sauvage mais son activité demeure atténuée par différents mécanismes notamment du fait de la surexpression de régulateurs négatifs de p53, de l'existence de défauts de signalisation en amont de p53 ou encore de l'interaction de p53 avec des protéines virales. En effet, dans de nombreuses tumeurs, y compris dans les sarcomes, les tumeurs solides et les leucémies, la protéine régulatrice majeure de p53, MDM2, est anormalement surexprimée. Cette surexpression de MDM2 peut réduire la quantité de p53 endogène et provoque ainsi son inactivation dans les cellules suite à sa dégradation dans le protéasome (Rayburn et al., 2005). De plus MDM2 peut être directement inhibée par le suppresseur de tumeur p14<sup>ARF</sup>. La délétion du locus de p14<sup>ARF</sup> constitue ainsi une voie d'inactivation de p53 retrouvée dans différents lymphomes (Lindstrom et al., 2001). L'inactivation de p53 dans les cancers peut également résulter de la surexpression ou de l'amplification d'un autre inhibiteur spécifique de la protéine suppresseur de tumeurs, MDM4 (également connu sous le nom de MDMX) (Toledo and Wahl, 2006). Malgré les similitudes structurales partagées entre les deux protéines, MDM2 et MDM4 inhibent p53 de manière distincte et complémentaire. En effet, MDM4 régule négativement l'activité transcriptionnelle de p53, tandis que MDM2 agit principalement sur sa stabilité (Francoz et al., 2006). D'autre part, la surexpression de l'oncogène iASPP (inhibitory member of the apoptosis-stimulating proteins of the p53 family), une protéine inhibitrice de p53, p63 et p73 a été retrouvée dans de nombreux carcinomes mammaires exprimant une p53 sauvage (Dong et al., 2015). Des défauts de signalisations en amont de p53 ont également été détectés chez des patients atteints d'ataxie-télangiectasie présentant un déficit immunitaire sévère et un risque très élevé de développer un cancer. Chez ces patients, le gène ATM est muté et code pour une protéine non fonctionnelle incapable d'activer p53 suite à des lésions de l'ADN (Austen et al., 2005). P53 peut être également inactivée par l'interaction avec des protéines

virales notamment, comme l'oncoprotéine E6 du papillomavirus humains à risque élevé (HPV). Cette dernière se lie à p53 et induit sa dégradation (Scheffner et al., 1990). En outre, l'antigène T codé par le virus SV40 interagit directement avec le domaine de liaison à l'ADN de p53 qui devient incapable de se fixer sur les séquences spécifiques de l'ADN et ne peut donc plus induire la transcription de ses gènes cibles (Drayman et al., 2016).

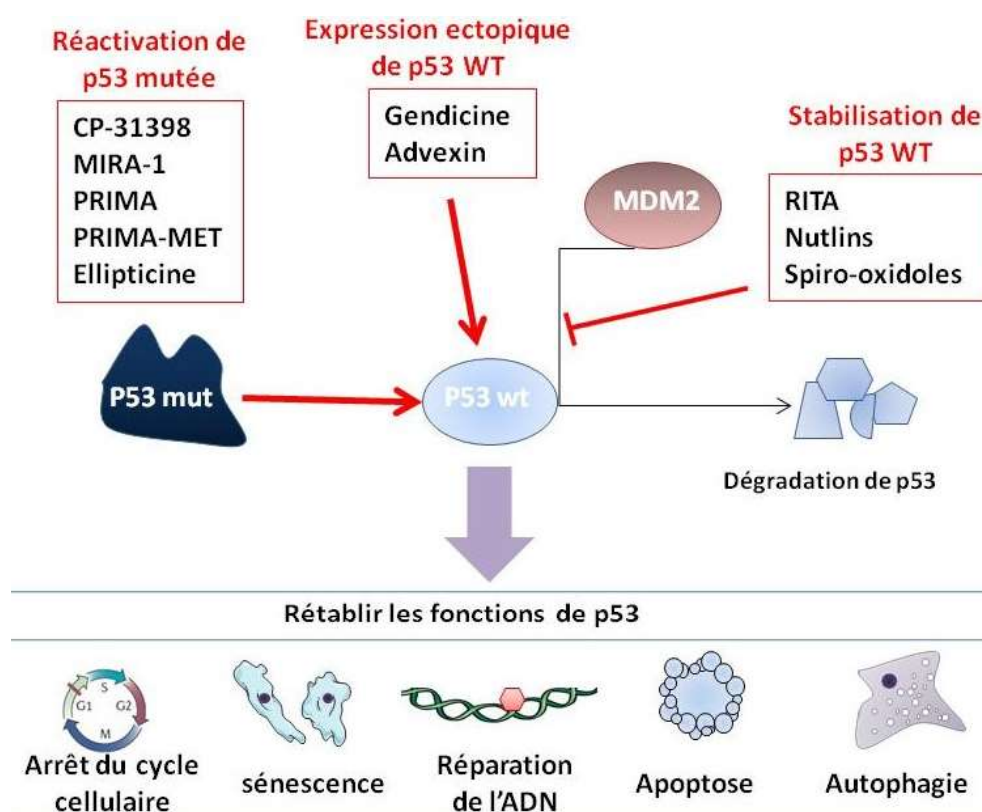
### **7.3. Stratégies de réactivation**

Etant donné que les stress oncogéniques peuvent persister après l'inactivation de p53, la perte de la fonction p53 peut non seulement jouer un rôle dans les premiers stades du développement de la tumeur, mais peut également être nécessaire pour la prolifération ou la survie d'une tumeur établie. Cela a donc suscité le développement de plusieurs stratégies thérapeutiques qui ont pour ambition de réactiver p53 dans le but de ralentir voir arrêter la progression tumorale.

#### **7.3.1. Stratégie Génétique**

Cette stratégie consiste à introduire le gène sauvage *TP53* grâce à utilisation de vecteurs viraux, et notamment d'adénovirus : l'Ad5CMV-p53 qui est en usage clinique en Chine depuis 2003 sous le nom de Gendicine (Pearson et al., 2004). Le même produit appelé Advexin, est en phase 1 à 3 essais cliniques aux États-Unis, respectivement (Vazquez et al., 2008). Les résultats ont montré que l'administration de Gendicine ou d'Advexin est bien tolérée chez les patients et efficace dans le traitement de nombreux cancers, en particulier le cancer de la tête et du cou et le cancer du poumon, en monothérapie ou en combinaison avec une chimiothérapie ou une radiothérapie pour le cancer avancé de la bouche (Li et al., 2014 ; Liu et al., 2013). Une autre « thérapie génique » liée à p53 utilise l'adénovirus ONYX-015, où le gène E1B a été supprimé, permettant au virus de se répliquer et de lyser sélectivement des cellules cancéreuses déficientes en p53 (Bischoff et al., 1996). Les études précliniques ont aussi montré que ONYX-015 possède une activité antitumorale *in vitro* et *in vivo*, en particulier en combinaison avec la chimiothérapie ou la radiothérapie. Les essais cliniques ont

ainsi révélé que l'ONYX-015 présentait un effet significatif lorsqu'il était associé à des chimiothérapies standard dans un certain nombre de cancers humains (Heise et al., 2000; Rogulski et al., 2000 ). Cependant, la controverse sur le mécanisme d'action de l'ONYX-015 et l'acquisition par Pfizer du partenaire de développement d'Onyx, Warner-Lambert, ont conduit à l'abandon du produit en 2003 avant un essai de phase III planifié (Dolgin, 2015). Enfin, ce genre de traitement peut s'avérer coûteux, sans oublier la dangerosité potentielle de ces vecteurs adénovirus.



**Figure 21: stratégies actuelles les plus connues pour la réactivation de p53**

Lorsqu'elle est activée, p53 joue un rôle central dans la suppression tumorale en induisant l'arrêt de croissance, la sénescence, la réparation de l'ADN, l'apoptose, l'autophagie et bien d'autres fonctions. Ainsi, p53 est devenue une cible thérapeutique attrayante pour la découverte de médicaments anticancéreux. Comme illustré sur la figure, il existe différentes stratégies pour la réactivation des fonctions de p53 qui ont été identifiées et caractérisées: Lorsque p53 est absente ou mutée (p53 mut) dans les tumeurs, la stratégie de réintroduction de p53 sauvage par thérapie génique (Gendicine, Advexin) ou celle de la restauration d'une conformation sauvage de p53 par CP-31398, PRIMA-1, PRIMA<sup>MET</sup> etc... peuvent être envisagées. Dans les tumeurs possédant une p53 sauvage (p53 wt) mais que sa stabilité ou son activité sont altérées, le plus souvent à cause de la surexpression de l'oncogène MDM2, l'utilisation des Nutlins ou des spiro-oxindoles peut être efficace pour bloquer les interactions MDM2-p53.

### 7.3.2. Stratégie pharmacologique

Des stratégies pharmacologiques visant soit à stimuler les fonctions de la forme sauvage de p53, soit à rétablir certaines des fonctions normales de p53 en ciblant et réactivant les formes mutantes de la protéine suppresseur de tumeurs ont été développées.

- *Petites molécules qui stabilisent/activent p53 sauvage*

**RITA** (Reactivation of p53 and induction of tumor cell apoptosis) est capable de se lier à p53 au niveau de son domaine N-terminal avec une haute affinité. Bien qu'une étude initiale ait montré que RITA pourrait bloquer la liaison de p53-MDM2 (Issaeva et al., 2004), il a été montré par résonance magnétique nucléaire qu'elle n'est pas capable de perturber la liaison p53-MDM2 (Krajewski et al., 2005). Biologiquement, RITA supprime la croissance des cellules tumorales *in vitro* et *in vivo* en induisant une apoptose massive d'une manière p53-dépendante dans de multiples modèles de cellules cancéreuses (Issaeva et al., 2004). Ainsi, p53 activée par RITA réprime la transcription des protéines anti-apoptotiques Mcl-1, Bcl-2 et survivine. RITA bloque également la voie Akt à plusieurs niveaux et inhibe l'expression de certains oncogènes, notamment c-Myc, la cycline E et la  $\beta$ -caténine. (Grinkevich et al., 2009). Cependant de plus récentes études ont montré que RITA est aussi capable d'induire la mort de cellules tumorales qui possèdent une p53 sauvage ou encore celle qui sont déficientes en p53 via la voie p38 et JNK/SAPK. RITA semble donc être une molécule ne ciblant pas spécifiquement p53 (Weilbacher et al., 2014).

**Les nutlins** sont un groupe de cis-imidazoline, identifiées grâce à leur capacité à inhiber la liaison de MDM2-p53. En effet les nutlins se fixent avec une haute affinité à MDM2 empêchant cette dernière de se lier à p53 (Vassilev et al., 2004) en gardant une sélectivité élevée pour MDM2 par rapport à MDM4 (Shangary et al., 2008), permettant ainsi la stabilisation de p53. La Nutlin-3 est la petite molécule la plus utilisées du groupe, induit une augmentation du niveau de p53 dans la cellule, active son activité transcriptionnelle à la fois *in vitro* et *in vivo*, et ce dans des cellules possédant une p53 sauvage ou mutée (Vassilev et al., 2004). En outre, les Nutlins ont montré une activité anti-angiogénique directe qui peut avoir une application pour les tumeurs exprimant une p53 mutante (Secchiero et al., 2008).

**Les spiro-oxindoles et leurs dérivés** : MI-43, MI-63, MI-219, MI-319, MI-888 et MI-77301, se lient à MDM2 de la même façon que les Nutlins. MI-77301 (SAR405838), la plus récente et la plus puissante molécule du groupe se lie à MDM2 avec une  $K_i = 0.88$  nM . Cette dernière est capable d'augmenter l'expression de p21 et PUMA, induisant ainsi l'arrêt du cycle cellulaire et/ou l'apoptose de plusieurs types de lignées tumorales et conduisant à une régression totale des tumeurs *in vivo* (Wang et al., 2014). Ce composé est actuellement en essai de phase I en monothérapie sous l'identifiant NCT01636479 ou en combinaison avec le Pimasertib (un inhibiteur de la kinase MEK), chez des patients qui présentent des néoplasmes malins sous l'identifiant de NCT01985191. Ces petites molécules inhibitrices décrites ci-dessus ciblent essentiellement MDM2 et montrent une affinité très faible pour la liaison de MDM4, qui se lie à p53 grâce à une poche hydrophobe différente de celle présente à la surface de MDM2 (Toledo and Wahl, 2006). Ces inhibiteurs sont donc très peu efficaces contre l'activité de MDM4, sauf lorsqu'elle cette dernière est surexprimée à des niveaux très élevés (Patton et al., 2006). Néanmoins, étant donné l'importance de MDM4 dans l'inhibition de p53 et sa présence à des niveaux élevés dans une variété de tumeurs humaines telles que les rétinoblastomes et les mélanomes, des efforts ont été consacrés plus récemment au développement d'inhibiteurs de MDM4. Parmi ces inhibiteurs, une petite molécule nommée **SJ-172550** cible la liaison p53-MDM4 (Reed et al., 2010). De la même manière un dérivé de benzofuroxane, le **XI-006**, supprime la transcription de MDM4 (Wang et al., 2011). Ces deux molécules induisent l'apoptose p53-dépendante, et agissent de manière additive avec Nutlin-3a dans les lignées cellulaires cancéreuses humaines, qui sur-expriment MDM4 et MDM2 (Reed et al., 2010 ; Wang et al., 2011). Ces observations suggèrent qu'une combinaison d'inhibiteurs contre MDM2 et MDM4 peut promettre un plus grand potentiel pour des activités antitumorales.

- *Petites molécules qui réactivent une p53 mutée*

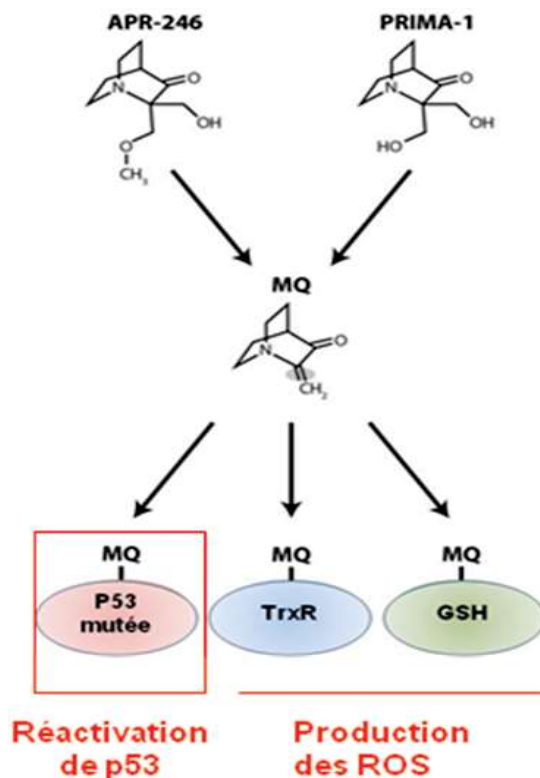
Puisqu'un grand nombre de mutations de p53 perturbent la structure de la protéine, réduisant ainsi son efficacité à lier l'ADN et à activer la transcription de ses gènes cibles, une approche consiste à tenter de corriger la conformation de la protéine p53 mutante (Bykov and Wiman, 2014). Ainsi plusieurs molécules corrigeant la structure de p53 mutante ont été

identifiées. Parmi elles, la molécule **CP-31398** a été identifiée comme prometteuse suite au criblage d'une banque de 100000 molécules réalisée de façon aléatoire afin de tester la capacité de ces composés à stabiliser la conformation native du domaine central de p53 sauvage après une dénaturation thermique. CP-31398 a été la première petite molécule qui a montré une activité restaurant la conformation sauvage de p53 mutante. Il a été ainsi montré que CP-31398 intervient dans le repliement correct des protéines p53 nouvellement synthétisée, la stabilise sur son p53-RE (Demma et al., 2004) et augmente son activité transcriptionnelle dans des cellules vivantes (Foster et al., 1999). CP-31398 possède également une activité antitumorale *in vivo* dans un modèle de souris transgéniques développant un carcinome de vessie (UPII-SV40T) (Madka et al., 2013). En outre, ce composé a montré une forte capacité antitumorale dans des modèles murins de cancer du poumon induit par un carcinogène présent dans le tabac, le NNK (Nicotine-derived nitrosamine ketone) (Rao et al., 2013). Cependant, le mécanisme d'action détaillé de CP-31398 reste encore mal connu. Des études de résonance magnétique nucléaire n'ont pas permis de détecter une liaison de CP-31398 au domaine de liaison à l'ADN de p53 (Rippin et al., 2002). CP-31398 n'a pas d'effet sur la liaison de p53-MDM2, n'induit pas de réactions de dommage à l'ADN ou de phosphorylation de p53 sur la Serine 15 ou 20. Cependant, ce composé est capable d'augmenter les niveaux de p53 en réduisant sa poly-ubiquitination (Wang et al., 2003). Biologiquement, CP-31398 induit l'arrêt de la croissance et l'apoptose dans un certain nombre de lignées cellulaires cancéreuses humaines à la fois *in vitro* et *in vivo* (Foster et al., 1999; Takimoto et al., 2002 ).

De la même manière, **PRIMA-1** (p53 reactivation and induction of massive apoptosis) et **MIRA-1** (mutant p53 reactivation and induction of rapid apoptosis), sont deux composés avec des structures chimiques différentes qui ont été identifiées par criblage d'une banque de molécules sur la base de leur capacité à restaurer les propriétés sauvages de p53 (liaison spécifique à l'ADN et l'induction de l'apoptose). Ces composés sont capables de modifier la conformation de p53 mutante et de rétablir sa liaison au niveau de sa séquence spécifique d'ADN conduisant à la transactivation de ses gènes cibles (Bykov et al., 2002 ; Bykov et al., 2005). Biologiquement, les deux composés ont montré une activité antitumorale dans de multiples lignées cellulaires cancéreuses et de tumeurs xénotreffées hébergeant une p53



mutante, et ce sans toxicité apparente (Bykov et al., 2002 ; Lambert et al., 2009). Cependant, la spécificité de PRIMA-1 a été remise en cause puisqu'elle a montré une activité contre des lignées tumorales déficientes en p53 à travers un mécanisme impliquant la voie JNK et la protéine Hsp90 (Li et al., 2005 ; Rehman et al., 2005). **PRIMA-1<sup>MET</sup>** (aussi connu sous le nom de APR-246), est un dérivé méthylé de PRIMA-1 qui s'est révélé être un inducteur d'apoptose plus puissant que le composé parental et présente une activité anticancéreuse contre un certains nombre de tumeurs possédant une p53 mutée (Liu et al., 2015 ; Mohell et al., 2015; Zandi et al., 2011 ). Au niveau cellulaire, PRIMA-1 et PRIMA-1<sup>MET</sup> partage le même mode d'action. En effet, ces molécules sont rapidement converties en méthylène quinuclidinone (MQ) qui peut se lier de manière covalente aux résidus cystéines du domaine central des mutants p53 (Lambert et al., 2009) voir (Figure 21). De manière importante, la modification par MQ d'une p53 mutante transfectée dans des cellules p53<sup>NULL</sup> induit l'apoptose de ces cellules. Cela indique que la liaison covalente de MQ et la modification d'un ou plusieurs résidus cystéines (alkylation du groupement thiol) au niveau du domaine central de p53 est suffisante pour réactiver ces mutants et l'induction d'une réponse biologique dépendante de p53 (Lambert et al., 2009). En outre, APR-246 a été décrite comme un puissant inhibiteur de la thiorédoxine réductase (TrxR1), une enzyme qui catalyse la réduction de la thiorédoxine (Peng et al., 2013). La liaison MQ convertit TrxR1 en une NADPH oxydase qui contribue à la production de ROS et à la mort cellulaire induite par APR-246 (Peng et al., 2013). De même, le MQ est capable de se lier aux cystéines du glutathion (GSH), entraînant une diminution des concentrations de glutathion intracellulaire libre et une augmentation conséquente du taux des ROS (Mohell et al., 2015 ; Tessoulin et al., 2014).



**Figure 22: Structures chimiques et fonctions de PRIMA-1 et de APR-246 (PRIMA-1Met).**

Les deux composés forment une fraction active de MQ (méthylène quinuclidinone). MQ se lie de façon covalente à des groupement thiols sur la forme mutée p53. MQ induit également la production de ROS en ciblant la thiorédoxine réductase (TrxR) et le glutathion (GSH). La liaison de MQ à TrxR convertit l'enzyme en une oxydase active, qui génère des ROS, et la liaison de MQ au glutathion épuise le glutathion libre intracellulaire, qui induit également des ROS. Adapté de (Bykov et al., 2016).

Récemment, PRIMA-1<sup>MET</sup> a été utilisée dans un essai clinique de phase I et déclarée non toxique et capable d'induire des effets biologiques dépendants de p53 dans des cellules tumorales *in vivo* (Lehmann et al., 2012). Etant donné que le glutathion peut servir de médiateur dans la résistance de certains médicaments dérivé du platine, et que le MQ est capable d'épuiser le glutathion libre intracellulaire de MQ, l'idée de combiner l'APR-246 et des sels de platine a pris place dans les essais clinique. En effet, un essai clinique de phase IB/II utilisant une combinaison de PRIMA-1<sup>MET</sup> et de carboplatine est en cours de réalisation chez des patientes atteintes d'un cancer de l'ovaire de haut-grade (identifiant de l'essai: NCT02098343).

Enfin, une autre petite molécule pharmacologique, l'**Ellipticine**, est capable de modifier la conformation mutante de p53 vers une conformation sauvage, restaurant sa liaison

à l'ADN et induisant les gènes cibles p53, p21 et MDM2, dans des xénogreffes de tissus tumoraux chez la souris (Peng et al., 2003). De plus, il a été récemment montré que l'ellipticine augmente la localisation nucléaire de p53 sauvage (Xu et al., 2008). Cependant, étant donné que l'ellipticine et ses dérivés présentent de nombreux effets non spécifiques, notamment la dégradation de la protéine inhibitrice des kinases cycline-dépendantes, p27 (Pamarthy et al., 2007), il est peu probable qu'elle soit davantage développée pour l'utilisation clinique.

En conclusion, l'ensemble de ces stratégies qui tentent de réactiver p53 dans les tumeurs montrent qu'elles ont tendance à induire une régression tumorale tissu dépendante. Cependant ces stratégies doivent être optimisées avec l'élucidation des mécanismes moléculaires liés à cette réactivation de p53. De plus, l'utilisation potentielle de ces petites molécules qui rétablissent la fonction du mutant p53 en combinaison avec d'autres thérapies tels que la chimiothérapie classique ou l'immunothérapie constitue un objectif important dans la recherche antitumorale.

## **Objectifs:**



Comme mentionné dans l'introduction, une meilleure connaissance des mécanismes moléculaires de l'apoptose induite par les CTL et les cellules NK, notamment par la voie PFN/GzmB, est d'une importance majeure pour identifier les mécanismes de résistance tumorale à la mort induite par le système immunitaire. Dans ce cadre, la protéine suppresseur de tumeurs p53, qui possède plusieurs fonctions biologiques importantes dans la suppression tumorale, est une cible particulièrement relevante. En effet, plusieurs travaux récents ont mis d'une part en évidence son implication dans différentes étapes de la réponse immune antitumorale et d'autre part ont clairement identifié son rôle clé dans la réponse tumorale à l'apoptose induite par différents types de stress ou induite par la chimio- ou la radiothérapie. Des travaux de notre équipe ont donc été entrepris afin de déterminer si p53 pouvait également être impliquée dans la réponse tumorale à la mort cellulaire induite par les CTL et les cellules NK. Ces travaux ont aboutit à la mise en évidence que le GzmB, un des principaux inducteurs de l'apoptose induite par les effecteurs cytotoxiques, induit une accumulation rapide de la protéine p53 sauvage au niveau des cellules cibles tumorales, et semble être impliquée dans la modulation de la signalisation apoptotique induite par la voie PFN/GzmB, par un mécanisme restant à élucider (Meslin et al., 2011; Meslin et al., 2007 ). Ainsi, dans le but de définir le rôle de p53 dans la cascade moléculaire conduisant à la mort cellulaire induite par les effecteurs cytotoxiques, **le premier objectif de ma thèse consiste à déterminer le rôle exact de p53 dans la voie de signalisation apoptotique de la voie PFN/GzmB au niveau des cellules tumorales.**

De plus, étant donnée la fréquence élevée des mutations du gène *TP53* au niveau des tumeurs humaines et sur la base de résultats obtenus dans notre laboratoire suggérant que les lignées cellulaires tumorales portant une p53 mutée sont moins sensibles à la lyse induite par la voie PFN/GzmB, nous avons également pour objectif d'étudier l'effet de la réactivation d'une fonction p53 sauvage sur la susceptibilité des cellules tumorales, mutées en p53, à la lyse induite par les effecteurs cytotoxiques. **Le second objectif de ma thèse est double : d'une part déterminer si la réactivation de p53 dans des cellules tumorales portant une p53 non fonctionnelle, grâce à une approche pharmacologique, peut potentialiser la réponse cytotoxique antitumorale et d'autre part étudier les mécanismes moléculaires associés à une telle potentialisation.**



## **Résultats:**





**Partie 1: Mise en évidence du rôle non transcriptionnel de la protéine suppresseur de tumeur p53 dans l'apoptose induite par les lymphocytes cytotoxiques *via* la voie Perforine/Granzyme B.**

**Article 1:**

**"Granzyme B-Activated p53 Interacts with Bcl-2 To Promote Cytotoxic Lymphocyte-Mediated Apoptosis"**

Thouraya Ben Safta, Linda Ziani, Loetitia Favre, Lucille Lamendour, Gwendoline Gros, Fathia Mami-Chouaib, Denis Martinvalet, Salem Chouaib, and Jerome Thiery  
The Journal of Immunology, 2015 January 1, 2015, 194 (1) 418-428

## Résumé:

Les lymphocytes T cytotoxiques (CTL) et les Natural Killer (NK) sont les cellules effectrices clés de la réponse immune antitumorale, elles éliminent leurs cellules cibles principalement par la voie d'exocytose des granules cytotoxiques contenant la perforine (PFN) et une famille de serine-protéases induisant la mort cellulaire, notamment le granzyme B (GzmB).

Le GzmB humain induit préférentiellement l'apoptose des cellules cibles par le clivage de Bid, une protéine pro-apoptotique de la famille Bcl-2. La forme tronquée de Bid (t-Bid), en collaboration avec Bax, induit la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe conduisant *in fine* à l'apoptose de la cellule cible. Des travaux dans l'équipe ont en outre montré que la protéine suppresseur de tumeur p53 est impliquée dans la voie de lyse induite par le GzmB. Dans la continuité de ces travaux, et afin d'élucider le rôle de p53 dans la voie de l'apoptose induite par la voie PFN/GzmB, nous avons analysé la cascade moléculaire apoptotique induite par le GzmB et déterminé comment p53 pouvait la réguler. En utilisant un modèle d'adénocarcinome mammaire (p53 wt), des effecteurs cytotoxiques (CTL et NK) et de la PFN/GzmB purifiés, nous avons montré que l'activité non-transcriptionnelle de p53 contrôle la susceptibilité tumorale à la lyse par les effecteurs cytotoxiques via la voie PFN/GzmB. En effet, nos travaux montrent que le GzmB induit une accumulation rapide de p53 au niveau des mitochondries des cellules cibles qui semble être impliquée dans l'apoptose induite par GzmB. Au niveau des mitochondries, p53 interagit avec Bcl-2, bloquant l'activité inhibitrice qu'exerce Bcl-2 sur Bax et t-bid et favorisant ainsi la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe induite par le GzmB. Par conséquent, le blocage de l'interaction p53/Bcl-2 par la PFT- $\mu$  (un inhibiteur de l'activité mitochondriale de p53) diminue l'activation de Bax, la libération de cytochrome c des mitochondries vers le cytosol et l'activation subséquente des caspases effectrices, conduisant à une résistance des cellules cibles à la fois au GzmB et à la mort cellulaire induite par les CTL et les NK. Ces résultats montrent donc que par son interaction avec Bcl-2 au niveau de la mitochondrie, p53 joue un rôle clé dans le contrôle de la sensibilité des cellules tumorales à l'apoptose induite par les CTL et les NK.

# Granzyme B–Activated p53 Interacts with Bcl-2 To Promote Cytotoxic Lymphocyte–Mediated Apoptosis

Thouraya Ben Safta,<sup>\*,†,‡</sup> Linda Ziani,<sup>\*,†,‡</sup> Loetitia Favre,<sup>\*,†,‡</sup> Lucille Lamendour,<sup>\*,†,‡</sup>  
Gwendoline Gros,<sup>\*,†,‡</sup> Fathia Mami-Chouaib,<sup>\*,†,‡</sup> Denis Martinvalet,<sup>§</sup> Salem Chouaib,<sup>\*,†,‡</sup>  
and Jerome Thiery<sup>\*,†,‡</sup>

Granzyme B (GzmB) plays a major role in CTLs and NK cell–mediated elimination of virus-infected cells and tumors. Human GzmB preferentially induces target cell apoptosis by cleaving the proapoptotic Bcl-2 family member Bid, which, together with Bax, induces mitochondrial outer membrane permeabilization. We previously showed that GzmB also induces a rapid accumulation of the tumor-suppressor protein p53 within target cells, which seems to be involved in GzmB-induced apoptosis. In this article, we show that GzmB-activated p53 accumulates on target cell mitochondria and interacts with Bcl-2. This interaction prevents Bcl-2 inhibitory effect on both Bax and GzmB-truncated Bid, and promotes GzmB-induced mitochondrial outer membrane permeabilization. Consequently, blocking p53–Bcl-2 interaction decreases GzmB-induced Bax activation, cytochrome *c* release from mitochondria, and subsequent effector caspases activation leading to a decreased sensitivity of target cells to both GzmB and CTL/NK-mediated cell death. Together, our results define p53 as a new important player in the GzmB apoptotic signaling pathway and in CTL/NK-induced apoptosis. *The Journal of Immunology*, 2015, 194: 418–428.

Cytotoxic T lymphocytes and NK cells eliminate virus-infected or malignantly transformed cells principally by releasing the contents of cytotoxic granules into the immune synapse formed with their target cell (1). The granule mediators of target cell lysis are serine proteases, known as granzymes (Gzms), which induce programmed cell death (2–4) after they are delivered into the target cell cytoplasm by the pore-forming protein perforin (PFN) (5–7).

Granzyme B (GzmB), one of the main mediators of cell death by the cytotoxic granules pathway, is the most extensively studied Gzm. Human GzmB (hGzmB) preferentially induces target cell apoptosis in a mitochondria-dependent manner, which is a highly regulated process involving the Bcl-2 family proteins. hGzmB cleaves the proapoptotic Bcl-2 family member, BH3-only protein, Bid (8, 9). Truncated Bid (tBid) disrupts the mitochondrial outer

membrane (MOM) to cause the release of the proapoptotic factors cytochrome *c* and Smac leading to caspase 3 activation and target cell apoptosis (10). Moreover, hGzmB induces cell death in a Bax or Bak-dependent manner (8, 11), while this pathway is blocked by overexpression of important prosurvival Bcl-2 family proteins, including Bcl-2 or Bcl-X<sub>L</sub> (12). It has also been suggested that GzmB may induce target cell death in absence of Bid, Bax, and Bak (13), by directly activating caspase 3 (8, 14), cleaving the inhibitor of caspase-activated DNase (CAD) to free CAD (15, 16), and/or by cleaving several caspases (17) or noncaspase substrates (18, 19).

Our previous studies also suggested the existence of a relationship between the tumor suppressor p53 and hGzmB-induced apoptosis. Indeed, we demonstrated that hGzmB induces a rapid activation of the endonuclease CAD in a Bid- and caspase 3–independent manner that triggers early DNA damages. An ATM-related genotoxic stress-activated kinase, hSMG-1, is then rapidly activated in response to hGzmB-induced early DNA damage (20) and would be, at least in part, responsible for a rapid wild type p53 (wtp53) stabilization and activation in a melanoma target model after interaction with autologous CTL clones or after hGzmB treatment (21). Furthermore, RNA interference-mediated inhibition of p53 significantly decreased target cell killing induced by CTLs or hGzmB (21). Taken together, these results indicate that wtp53 is involved, by an unknown mechanism, in the modulation of the PFN/hGzmB-dependent apoptotic pathways during the killing of target cells by immune effector cells.

It is well established that wtp53 acts as a stress-activated transcription factor that activates transcription of genes involved in apoptosis induction or regulation (22, 23), although some effects of p53 are independent of transcription (24). In this regard, compelling evidences show that the transcription-independent function of p53 relies on its interaction with several members of the Bcl-2 family (25, 26). Indeed, it has been reported that wtp53 protein can promote the permeabilization of the MOM by forming complexes with the protective Bcl-X<sub>L</sub> or Bcl-2 proteins, hence inhibiting their anti-apoptotic effects (27). It was also demonstrated that p53 can accumulate in the cytoplasm, where it directly activates the cytosolic

\*U753 INSERM, 94805 Villejuif, France; †Gustave Roussy Cancer Campus, 94805 Villejuif, France; ‡University Paris Sud, Faculty of Medicine, 94270 Le Kremlin Bicêtre, France; and §Department of Cell Physiology and Metabolism, University of Geneva, 1211 Geneva, Switzerland

Received for publication August 4, 2014. Accepted for publication October 21, 2014.

This work was supported by INSERM, by the Association pour la Recherche sur le Cancer (2012–2013; Grant SF120121205624), and by fellowships from the French Ligue Nationale Contre Le Cancer (to L.Z. and J.T.).

T.B.S. and L.Z. performed experiments and analyzed data. L.F. and L.L. also performed and helped analyze some experiments. G.G. provided technical assistance with CTL culture. F.M.-C. provided the H33 CTL clone. D.M. purified human GzmB and participated in helpful discussion. J.T. conceived and supervised the project, designed and performed experiments, analyzed data, and wrote the manuscript. S.C. edited the manuscript.

Address correspondence and reprint requests to Dr. Jerome Thiery, U753 INSERM, Gustave Roussy Cancer Campus, 114 Rue Edouard Vaillant, F-94805 Villejuif Cedex, France. E-mail address: jerome.thiery@gustaveroussy.fr

The online version of this article contains supplemental material.

Abbreviations used in this article: CAD, caspase-activated DNase; CMA, concanamycin A; Gzm, granzyme; GzmB, Granzyme B; hGzmB, human GzmB; MOM, mitochondrial outer membrane; MOMP, MOM permeabilization; pAb, polyclonal Ab; PFN, perforin; PFT, pifithrin; RT, room temperature; siRNA, small interfering RNA; tBid, truncated Bid; wtp53, wild type p53.

Copyright © 2014 by The American Association of Immunologists, Inc. 0022-1767/14/\$16.00

proapoptotic protein Bax (28) or mitochondrial Bak (29) to induce the mitochondrial release of apoptogenic factors.

Thus, the aim of this study was to investigate the mechanisms of p53-dependent regulation of the hGzmB signaling pathway leading to apoptotic cell death. We demonstrate that after PFN/hGzmB treatment, p53 quickly accumulates on target cell mitochondria and interacts with Bcl-2. This p53–Bcl-2 interaction prevents the inhibitory interaction of hGzmB-activated tBid with Bcl-2 and also favors the release of Bax from Bax–Bcl-2 complexes. Consequently, p53–Bcl-2 interaction is of major importance in hGzmB apoptotic signaling pathway as shown by the pharmacological inhibition of this interaction leading to hGzmB cell death signaling blockage at the mitochondria level and to a decrease of both hGzmB- and CTL/NK-induced apoptosis.

## Materials and Methods

### Cell lines

MCF7/Caspase3 (30), T1, and A549 cells were grown in RPMI 1640/GlutaMAX supplemented with 10% FCS, 100 U/ml penicillin, 100 mg/ml streptomycin, and 1% sodium pyruvate (Life Technologies). The T1 tumor cell line was established from the primary lesion of a patient suffering from a melanoma (31). The LT12 CTL clone was isolated from T1 autologous tumor-infiltrating lymphocytes, recognized a peptide derived from the MelanA/MART-1 Ag, and was maintained in culture as described previously (20, 31). The NK92 cell line and NK cells isolated from healthy donors with human CD56<sup>+</sup> selection kit (Stemcell) were cultured in RPMI 1640/GlutaMAX supplemented with 10% of FCS and 300 U/ml recombinant human IL-2. The H33 CTL clone was maintained in culture as described previously and recognizes the allogeneic MCF7 cell line in an HLA-A2–restricted manner (32).

### Pifithrin treatment

Target cells were pretreated 15 h with 5–10  $\mu$ M pifithrin (PFT)- $\mu$ , 20  $\mu$ M PFT- $\alpha$  (Sigma-Aldrich), or DMSO before incubation with cytotoxic cells, buffer, sublytic native rat PFN, and/or hGzmB in presence of PFT or DMSO.

### Treatment with PFN and GzmB

Native rat PFN was purified from RNK16 cells, and native hGzmB was purified from YT-Indy cells as described previously (33). Target cells were diluted in HBSS with 10 mM Hepes pH 7.5, 4 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.4% BSA before adding sublytic PFN  $\pm$  100 nM hGzmB, diluted in PFN buffer (HBSS, 10 mM Hepes pH 7.5). The PFN sublytic concentration that delivers Gzms to induce apoptosis without excessive necrosis was determined independently for each experiment by flow cytometry (BD Accuri C6) as described previously (33).

### Inhibition of GzmB activity

The GzmB inhibitor Z-AAD-CH2Cl (a synthetic peptide that irreversibly inhibits GzmB activity; Biovision) (34) was used at 100  $\mu$ M to preincubate effector cells for 2 h before incubation with target cells (concentration of inhibitor during incubation: 50  $\mu$ M).

### Western blot

Total cellular extracts were prepared by lysing cells in RIPA buffer (Pierce) containing a mixture of protease inhibitors (Roche) and 2 mM sodium orthovanadate before denaturation by boiling in Laemmli buffer and SDS-PAGE separation. Blots were probed with the following Abs: anti-p53 mouse mAb (clone DO-1), anti-Bcl-2 mouse mAb (clone 100), and anti-Bax mouse mAb (clone N20) from Santa Cruz Biotechnology; anti-phospho-p53(Ser<sup>37</sup>) rabbit polyclonal Ab (pAb), anti-caspase 3 mAb (clone 3G2), anti-cleaved caspase 3 (p19/p17) rabbit pAb (clone 5A1E), anti-caspase 9 rabbit pAb, anti-PARP rabbit pAb, anti-Bcl-X<sub>L</sub> mouse mAb (clone 54H6), and anti-Bid rabbit pAb from Cell Signaling; anti-tBid (p15) rabbit pAb from Invitrogen; and HRP-conjugated anti-actin mouse mAb from Sigma-Aldrich. Western blot quantification was performed using the ImageJ densitometry software.

### Formation of E:T cell conjugates

Target cells were incubated with NK92 or H33 effector cells in Ca<sup>2+</sup> free medium during 20 min at 37°C to allow conjugate formation. Synchronized exocytosis of the cytotoxic granules contents was triggered by

adding 4 mM CaCl<sub>2</sub> before analysis by microscopy, flow cytometry, or cell fractionation at the indicated time.

### Microscopy

Target cells were grown on collagen-coated glass coverslips (Sigma-Aldrich), incubated with Cy5-CytoPainter mitochondrial staining solution (Abcam), and treated with sublytic PFN  $\pm$  100 nM hGzmB, NK92, or H33 effector cells (E:T ratio 3:1). After 30 min, cells were fixed and stained with an anti-p53 mouse mAb (clone DO-1) followed by incubation with a goat Alexa Fluor 488–conjugated secondary Ab (Life Technologies) as described previously (5). Coverslips were then washed three times in PBS and mounted in Vectashield mounting medium containing DAPI (Vector Laboratories) before imaging (IX83 microscope; Olympus) and analysis (CellSense Dimension software; Olympus).

### Cytosol-mitochondria-nucleus fractionation

After pretreatment with DMSO or 10  $\mu$ M PFT- $\mu$  and 30 min treatment with PFN  $\pm$  100 nM hGzmB or NK92 cells (E:T ratio 3:1),  $5 \times 10^6$  target cells per condition were fractionated into cytosolic and high-purity mitochondrial fraction using a Qproteome mitochondria isolation kit (Qiagen) or into cytosolic, mitochondrial, and nuclear fractions using a standard cell fractionation kit (Abcam) following manufacturer's protocol. Cytosolic, mitochondrial, and/or nuclear extracts from the same number of cells were denatured in Laemmli buffer before immunoblotting with anti-p53 (clone DO-1) or anti-cytochrome *c* (clone 7H8.2C12; BD Pharmingen) mouse mAbs. Anti-vinculin (clone Vin-11-5; Sigma-Aldrich), anti-mitochondrial Hsp70 (Mthsp70/Grp75; clone JG1; Abcam), and anti-PCNA (clone PC10; Cell Signaling) or anti-topoisomerase II  $\alpha$  (clone Ki-S1; Millipore) mouse mAbs were used to verify the purity of cytosolic and mitochondrial fractions and the absence of nuclear contamination.

### Bcl-2 immunoprecipitation

After pretreatment with PFT- $\mu$  or DMSO and PFN  $\pm$  hGzmB loading, Bcl-2 immunoprecipitation was performed using a classical immunoprecipitation kit (Pierce) and an anti-Bcl-2 mouse mAb (clone 100) overnight at 4°C. Immune complexes were eluted and washed before boiling in Laemmli buffer. Immunoprecipitates and 1% of the cell lysates (input) were run in 4–20% precast SDS-PAGE gel and immunoblotted with HRP-conjugated anti-Bcl-2 mouse mAb (clone 100), anti-p53 rabbit pAb (clone FL-393; Santa Cruz Biotechnology), HRP-conjugated anti-Bax rabbit pAb (clone N20), or anti-tBid (p15) rabbit pAb (Invitrogen).

### Bid and p53 small interfering RNA transfection

Silencer select validated Bid, p53, and control small interfering RNAs (siRNAs) were purchased from Life Technologies. Subconfluent cells were transfected with siRNA using Lipofectamine RNAiMAX (Life Technologies) in Opti-MEM according to the manufacturer's instructions.

### Apoptosis assays

To assess apoptosis, we analyzed cells incubated for 2 h at 37°C with buffer or sublytic PFN  $\pm$  100 nM hGzmB for caspase activation by flow cytometry using M30-FITC mAb staining according to the manufacturer's protocol (M30 CytoDEATH; Roche) to detect an effector caspase-cleavage product of cytokeratin 18 (35).

### Mitochondrial outer membrane permeabilization assay

MOM permeabilization (MOMP) was evaluated by 3,3'-dihexyloxycarbocyanine iodide DioC6 (3) labeling (Life Technologies). After sublytic PFN  $\pm$  100 nM hGzmB treatment or incubation with NK92 (E:T ratio 5:1), cells were incubated 10–15 min at 37°C with 40 nM DioC6 (3) in prewarmed HBSS. The stained cells were then separated from the staining solution by centrifugation, resuspended in PBS, and immediately analyzed by flow cytometry (BD Accuri C6). For experiments with NK cell treatment, MCF7-Casp3 cells were prestained with 1 nM Vybrant DiD (Life Technologies) to exclude NK cells and to allow analysis of the target cells.

### Chromium release assay

Cytotoxicity was measured by a 4 h chromium release assay as previously described (21). Inhibition of PFN/Gzm-mediated cytotoxic pathway was performed by using effector cell preincubation for 2 h with 100 nM concanamycin A (CMA; Sigma-Aldrich) (concentration of CMA during lysis: 50 nM) or with the GzmB inhibitor Z-AAD-CH2Cl before incubation with target cells. Experiments were performed in triplicate. Data were expressed as the percentage of specific <sup>51</sup>Cr release from target cells, calculated



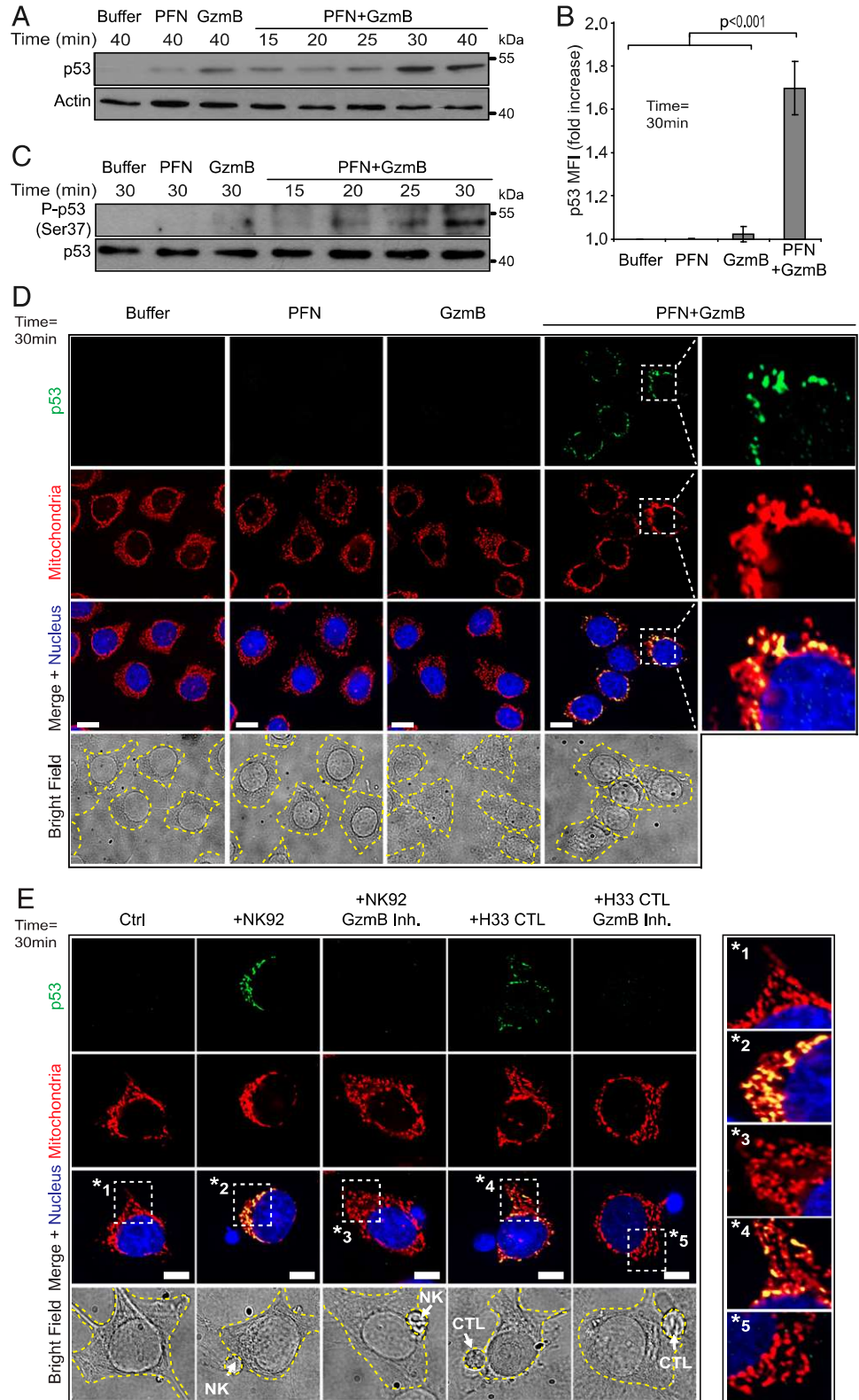
as (experimental release - spontaneous release)/(maximum release - spontaneous release) × 100.

*Measurement of Bax activation and detection of p53 intensity by flow cytometry*

After 30 min treatment with PFN ± 100 nM hGzmB, cells were washed with ice-cold PBS and fixed for 5 min in PBS/0.25% PFA at room temperature (RT). Cells were then washed with PBS and incubated 30 min at

RT with an anti-Bax mAb (clone 6A7; Santa Cruz Biotechnology) diluted in PBS/200 µg/ml digitonin (Sigma-Aldrich). Cells were then washed with PBS, incubated 30 min at RT with a goat anti-mouse FITC-conjugated secondary Ab (Beckman Coulter) in PBS, and washed twice with PBS before flow cytometry analysis (BD Accuri C6). For the detection of p53 intensity, cells were fixed and permeabilized with Cytotfix/Cytoperm (BD Biosciences) 30 min after PFN/GzmB treatment, then incubated with an anti-p53 mouse mAb (clone DO-1) and an Alexa 488-conjugated

**FIGURE 1.** GzmB induces p53 accumulation in target cell. **(A and B)** Within 30 min of treatment with sublytic PFN and hGzmB, p53 accumulates in MCF7-Casp3 target cells. A representative Western blot analysis of three independent experiments is shown in (A). Actin was used as loading control. p53 mean fluorescence intensity (MFI) fold increase analyzed by flow cytometry analysis from three independent experiments is displayed in (B). The *p* values were determined by unpaired two-tailed Student *t* test. **(C)** Within 20 min of treatment with sublytic PFN and hGzmB, p53 is phosphorylated (Ser<sup>37</sup>). An equal amount of total p53 protein was loaded in each well and served as loading control. **(D and E)** p53, mitochondria, and nucleus staining of MCF7-Casp3 target cells treated for 30 min with PFN ± hGzmB (D) or with the NK92 cell line or the H33 CTL CTL clone preincubated or not with an irreversible GzmB inhibitor (E:T ratio 3:1) (E). Scale bars, 10 µM (D), 5 µM (E). Dashed lines represent plasma membrane.



secondary Ab before analysis of the mean fluorescence intensity by flow cytometry (BD Accuri C6).

#### Statistical analysis

Data are expressed as mean  $\pm$  SD. The *p* values were determined by unpaired two-tailed Student *t* tests.

## Results

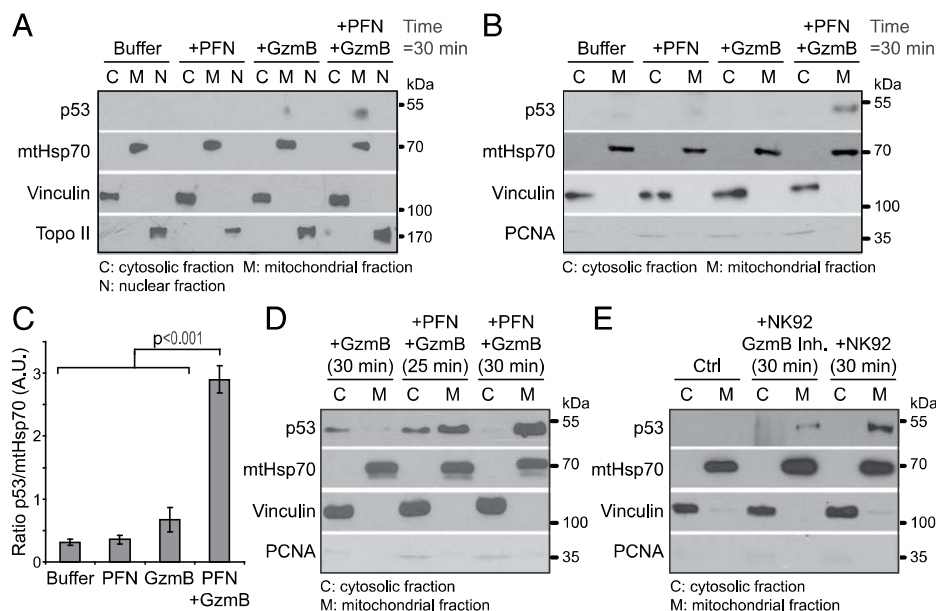
### *hGzmB induces wtp53 accumulation on target cell mitochondria*

To study the role of p53 in the regulation of hGzmB apoptotic signaling pathway and in hGzmB-mediated cell death, we used the wtp53 breast carcinoma cell line MCF7. Because MCF7 are deficient for procaspase 3, which is important for hGzmB-induced cell death, we used cells stably expressing physiological level of procaspase 3 (MCF7-Casp3; Supplemental Fig. 1A). p53 can be activated by gamma irradiation in these cells, and hGzmB activates the mitochondrial pathway of apoptosis in this cell line, with Bid cleavage, Bax activation, procaspase 3, and PARP cleavages leading to apoptosis (Supplemental Fig. 1B–F). As previously reported in melanoma cells (20, 21), the treatment of MCF7-Casp3 cells with 100 nM hGzmB in the presence of sublytic concentration of PFN results in a significant wtp53 accumulation within  $\sim$ 30 min (Fig. 1A, 1B) and a wtp53 phosphorylation (Ser<sup>37</sup>; one of the key events in DNA damage-induced stabilization and activation) within  $\sim$ 20 min after PFN/hGzmB treatment (Fig. 1C). Moreover, fluorescence microscopy analysis of p53 subcellular localization after 30 min target cell loading with PFN/hGzmB or incubation with the NK cell line NK92 or the allogeneic CTL clone H33 showed a mainly mitochondrial p53 accumulation within target cells, which can be abrogated by preincubating effector cells with the irreversible GzmB inhibitor Z-AAD-CH2Cl

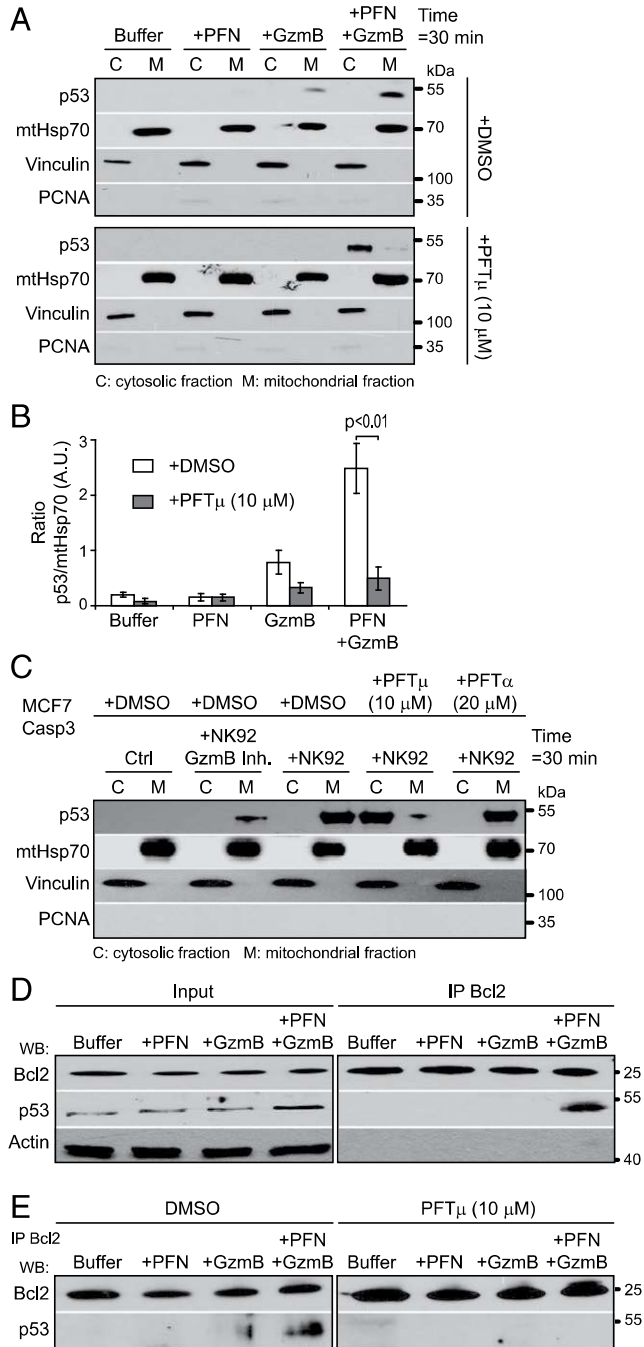
(Fig. 1D, 1E). Similarly, after a classical cytosol/mitochondria/nucleus or a high-purity fractionation of mitochondria, p53 accumulates in the MCF7-Casp3 target cell mitochondrial fraction after 30 min treatment with PFN/hGzmB (Fig. 2A–C), but this accumulation can also be detected earlier (Fig. 2D). Of note, similar results were obtained using the Casp3<sup>-</sup> parental MCF7 cell line (data not shown). Moreover, we also detected p53 in the mitochondrial fraction after target cell incubation with the NK92 cell line in the absence of the irreversible GzmB inhibitor (Fig. 2E). Together, these observations demonstrate that hGzmB induces a rapid p53 accumulation in the mitochondrial compartment of treated cells. We also concluded that p53 might control hGzmB-induced cell death through its nontranscriptional activity at the mitochondria level. We thus hypothesized that p53 regulates hGzmB-induced cell death by interacting with Bcl-2 to facilitate tBid-dependent Bax activation, MOMP, apoptogenic factors release, and effector caspases activation.

### *hGzmB-activated p53 interacts with Bcl-2*

To demonstrate the possible p53–Bcl-2 interaction in target cells after PFN/hGzmB treatment, we used the cell-permeable sulfonamide PFT- $\mu$  that blocks p53 interaction with Bcl-X<sub>L</sub> and Bcl-2 proteins, and selectively inhibits p53 translocation to mitochondria without affecting the transactivation function of p53 (36). We first verified that PFT- $\mu$  did not affect p53 stabilization in response to PFN/hGzmB treatment (Supplemental Fig. 2A, 2B). We then performed a cytosol/mitochondria fractionation of DMSO or 10  $\mu$ M PFT- $\mu$ -pretreated MCF7-Casp3 cells, loaded with PFN  $\pm$  hGzmB. DMSO-pretreated cells showed an accumulation of p53 in the mitochondrial fraction after 30 min treatment with PFN/hGzmB, which can be blocked by PFT- $\mu$  (Fig. 3A, 3B). Similarly, PFT- $\mu$  pretreatment decreased p53 mitochondrial accumulation in



**FIGURE 2.** GzmB-induced p53 accumulates on target cell mitochondria. (A–C) After classical cytosol/mitochondria/nucleus (A) or high-purity cytosol/mitochondria (B) fractionation experiments of target cells after 30 min treatment with PFN/hGzmB, p53 is detectable in the mitochondrial fraction of treated cells. Representative immunoblots are shown. Immunoblotting with anti-vinculin, anti-mitochondrial Hsp70, and anti-PCNA or Topoisomerase II mAb was used to verify the purity of cytosolic (C), mitochondrial (M) fraction, and nuclear (N), and the absence of nuclear contamination in mitochondrial extract, respectively. Blot exposure was titrated down to the point where p53 is almost undetectable in control conditions (buffer, PFN alone, and GzmB alone) to show increased mitochondrial accumulation in PFN/hGzmB-treated cells. The p53/mtHsp70 ratio from (B) was calculated by densitometry and display in (C) (mean  $\pm$  SD from three independent experiments). The *p* values were determined by unpaired two-tailed Student *t* test. (D) Mitochondrial and cytosolic fractions were isolated as in (B) after 25 to 30 min treatment with hGzmB or PFN/hGzmB treatment. (E) MCF7-Casp3 target cell incubation for 30 min with the NK92 cell line (E:T ratio 3:1) also induces p53 mitochondrial translocation, which can be strongly decreased after NK cell preincubation with an irreversible GzmB inhibitor.



**FIGURE 3.** p53 interacts with Bcl-2 in response to GzmB. **(A and B)** PFT- $\mu$ , a cell-permeable sulfonamide that blocks p53 interaction with Bcl-2, inhibits p53 accumulation on mitochondria of PFN/hGzmB-loaded cells. A representative immunoblot is shown in (A). The p53/mitochondrial Hsp70 ratio was calculated by densitometry and display in (B) (mean  $\pm$  SD from three independent experiments). The  $p$  values were determined by unpaired two-tailed Student  $t$  test. **(C)** PFT- $\mu$  also blocks p53 mitochondrial accumulation in target cells after MCF7-Casp3 interaction with NK92 cells (E:T ratio 3:1). NK92 preincubated with an irreversible GzmB inhibitor or MCF7-Casp3 target cells pretreated with PFT- $\alpha$ , which blocks p53 transcriptional activity, were used as controls. Blot exposure (A and C) was titrated down to the point where p53 is almost undetectable in control conditions (buffer or without NK treatment) to show the increased or decreased mitochondrial accumulation in PFN/hGzmB or NK-treated cells. **(D)** p53 interacts with Bcl-2 after 30 min PFN/hGzmB treatment. Bcl-2 was immunoprecipitated before immunoblotting for Bcl-2, p53, and actin as a negative control. Whole-cell lysate (input) used for the immunoprecipitation was also immunoblotted. The experiment was performed twice. **(E)** PFT $\mu$  pretreatment inhibits p53–Bcl-2 interaction after PFN/hGzmB

target cells after incubation with the NK92 cell line, whereas PFT- $\alpha$ , which mainly blocks p53 transcriptional activity (37), has no effect (Fig. 3C). Furthermore, Bcl-2–p53 complexes were detected by immunoprecipitating Bcl-2 30 min after PFN/hGzmB loading (Fig. 3D). Moreover, Bcl-2–p53 complexes were detected in control cells pretreated with DMSO after PFN/hGzmB loading, but not in PFT- $\mu$  pretreated cells (Fig. 3E). Together, these results indicate that hGzmB-activated p53 interacts with Bcl-2, which constitutively resides at MOM.

#### *p53–Bcl-2 interaction regulates GzmB-induced Bax activation and MOMP*

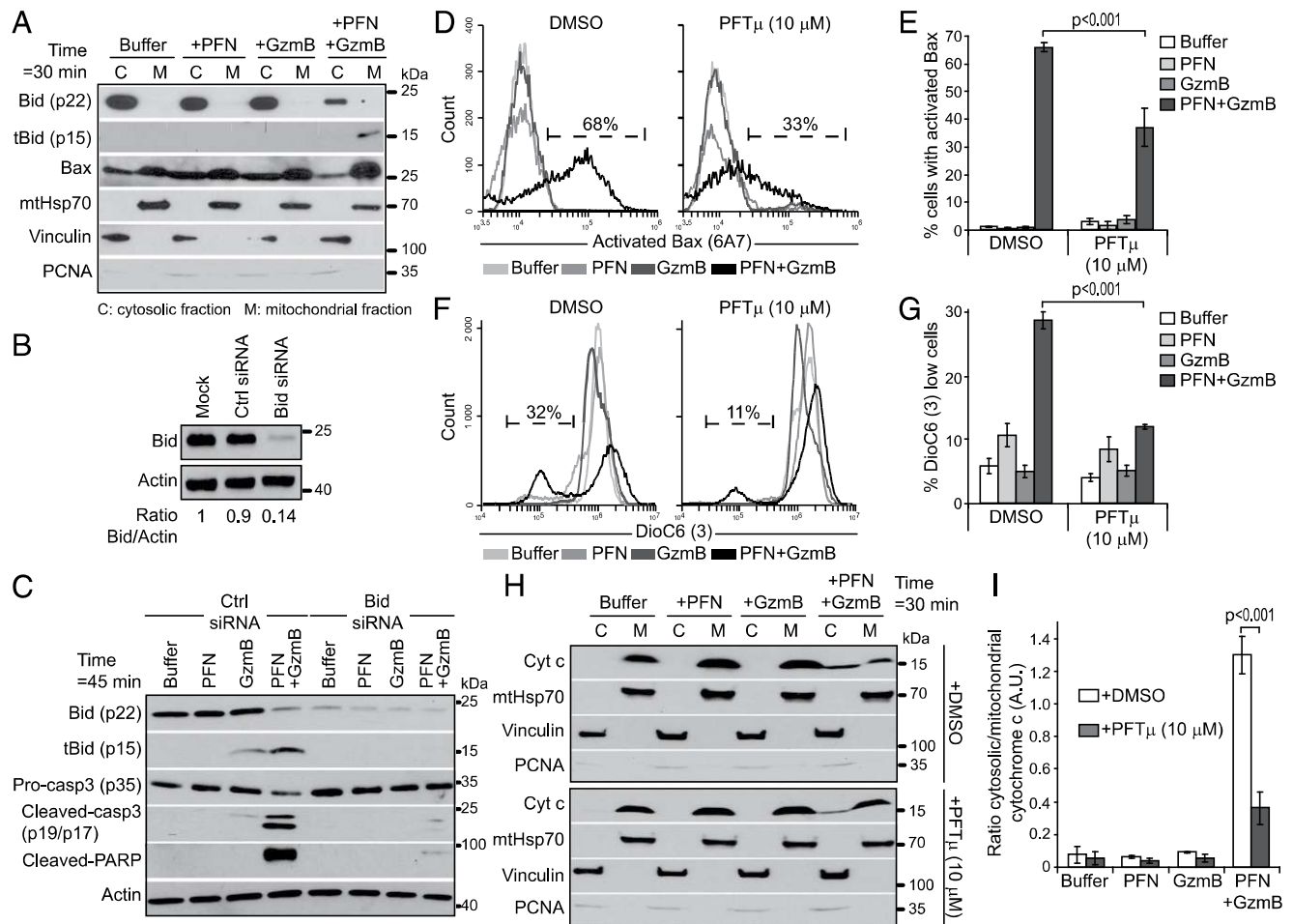
We next investigated whether p53–Bcl-2 interaction plays a role in tBid and Bax-dependent GzmB-induced MOMP. As previously described, MCF7-Casp3 target cell treatment with PFN/GzmB generated a significant amount of tBid (p15), which is mainly localized in the mitochondrial fraction. We also detected a significant amount of Bax in both cytosolic and mitochondrial compartments in PFN or hGzmB alone-treated cells, but Bax became enriched at the mitochondria after PFN/GzmB treatment (Fig. 4A). Moreover, Bid inhibition by siRNAs strongly inhibits PFN/GzmB-induced caspase 3 activation (Fig. 4B, 4C), confirming that Bid is crucial for hGzmB-induced cell death in our model. These results demonstrate that GzmB-induced mitochondrial p53 cannot lead to cell death by itself but more likely regulates tBid-dependent Bax activation, a key step in hGzmB-induced MOMP and apoptosis (10). It is known that Bax changes conformation before oligomerization in the MOM. The conformational change of Bax exposes its N terminus and can be specifically detected by an anti-Bax Ab (clone 6A7) that binds to this region (38). Flow cytometry experiments using the 6A7 Bax mAb show an  $\sim$ 50% decrease of Bax activation after PFN/GzmB loading after PFT- $\mu$  pretreatment (Fig. 4D, 4E). Moreover, this decrease of Bax activation correlates with a decrease of PFN/hGzmB-induced MOMP after PFT- $\mu$  preincubation, as measured by DioC6 (3) staining (Fig. 4F, 4G). Similar results were also obtained after NK92 effector cell incubation with PFT- $\mu$ -pretreated or p53 siRNA-transfected target cells (Supplemental Fig. 2C, 2D). Finally, PFN/hGzmB-induced cytochrome  $c$  release from the mitochondria to the cytosol is also significantly decreased by a PFT- $\mu$  pretreatment (Fig. 4H, 4I). These results suggest that hGzmB-induced p53–Bcl-2 interaction promotes tBid-dependent Bax activation, MOMP, and cytochrome  $c$  release.

#### *GzmB-induced p53–Bcl-2 complexes regulate Bax and tBid interaction with Bcl-2*

We next investigated the mechanisms involved in p53-dependent regulation of Bax activation in response to hGzmB after its interaction with Bcl-2. It has been shown that the mitochondrial pathway is blocked by prosurvival Bcl-2, which binds and blocks the active form of Bid or Bax by different mechanisms, depending of the nature of the apoptotic stimulus (39–41). The “activator” model (or mode 1) postulates that some BH3-only proteins (e.g., tBid) transiently bind to Bax and induce conformational changes required for stable membrane insertion. In this model, Bcl-2 proteins sequester the activator BH3-only proteins and neutralize them (42). In contrast, the “inactivator” model (or mode 2) proposes that the primary function of antiapoptotic protein Bcl-2 is to neutralize the proapoptotic effector proteins Bax by forming heterodimeric complexes (28, 43), limiting their capacity to form

loading. Bcl-2 was immunoprecipitated before immunoblotting for Bcl-2, p53, and actin as in (C). The experiment was performed twice.



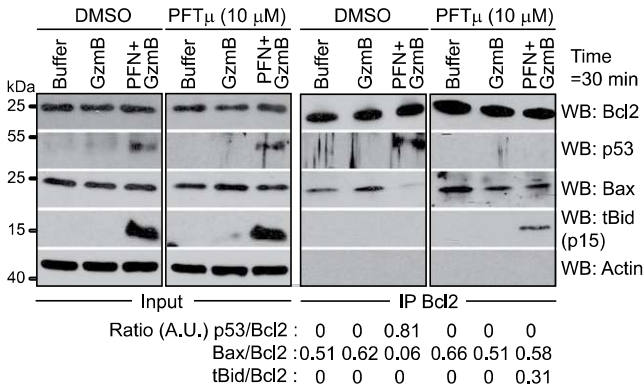


**FIGURE 4.** Inhibition of p53–Bcl-2 interaction decreases GzmB-induced Bax activation and MOMP. (A) Bax and tBid accumulate in mitochondria of PFN/hGzmB-loaded cells. A representative immunoblot of two independent experiments is shown. (B and C) Bid is essential for GzmB-induced caspase 3 activation. MCF7-Casp3 target cells were transfected with control (Ctrl) or Bid siRNAs (B) before loading with PFN ± hGzmB for 45 min (C). Bid siRNAs inhibit caspase 3 and PARP cleavage. (D and E) PFT-μ pretreatment decreases Bax activation after 30 min PFN/hGzmB loading, assessed by flow cytometry using anti-Bax 6A7 mAb. Representative flow cytometry histograms are shown in (D) and mean ± SD of three independent experiments in (E). (F and G) PFT-μ pretreatment decreases MOMP after 30 min PFN/hGzmB loading, assessed by flow cytometry using DioC6 (3) staining. Representative flow cytometry histograms are shown in (F) and mean ± SD of three independent experiments in (G). (H and I) PFT-μ pretreatment decreases cytochrome c release from the mitochondrial (m) to the cytosolic fraction (c) of PFN/hGzmB-loaded cells. A representative immunoblot is shown in (H). The ratio of cytosolic/mitochondrial cytochrome c was calculated by densitometry and display in (I) (mean ± SD from three independent experiments). The *p* values were determined by unpaired two-tailed Student *t* test.

pores in the MOM. Based on these models, the earliest step in the process of hGzmB-induced cell death leading to MOMP that could be modulated by p53–Bcl-2 interaction is binding of tBid or Bax to Bcl-2. To answer this question, we immunoprecipitated Bcl-2 after PFN/hGzmB loading in DMSO- or PFT-μ-pretreated cells before immunoblotting with Bcl-2, p53, Bax, and tBid mAbs (Fig. 5). Bcl-2–p53 complexes were only detected in DMSO-pretreated cells after PFN/hGzmB loading and inhibited by PFT-μ. Bax did coprecipitate with Bcl-2 in control DMSO-pretreated cells and was released from Bcl-2 after PFN/hGzmB treatment. Importantly, the inhibition of p53–Bcl-2 interaction by PFT-μ inhibits the release of Bax from Bcl-2 after PFN/hGzmB treatment. With respect to tBid, we did not detect Bcl-2–tBid interaction in DMSO-pretreated cells after PFN/hGzmB loading. However, Bcl-2–tBid complexes were detected after PFN/GzmB treatment when Bcl-2–p53 interaction was inhibited by PFT-μ. Together, these data suggest that p53–Bcl-2 interaction in response to PFN/hGzmB treatment favors the release of Bax from its inhibitor Bcl-2 and also prevents tBid interaction with Bcl-2.

*p53–Bcl-2 regulation of GzmB-induced MOMP promotes subsequent effector caspase activation*

To further demonstrate that p53–Bcl-2 interaction regulates hGzmB apoptotic signaling pathway at the mitochondrial level, we then performed immunoblotting analysis of key proteins involved in this pathway upstream and downstream of mitochondria. Bid (p22) cleavage into tBid (p15) and cleavage of procaspases 9 and 3 were thus detected 15–30 min after PFN/hGzmB loading of DMSO-pretreated target cells, as expected. In contrast, PFT-μ pretreatment did not interfere with hGzmB-mediated Bid cleavage but inhibits the cleavage of procaspases 9 and 3 (Fig. 6A). Nevertheless, a first cleavage of procaspase 3 (p19) is still observed in PFT-μ-pretreated cells after 20 min treatment with PFN/hGzmB, which might reflect a direct but incomplete cleavage of procaspase 3 by hGzmB. In this regard, it has been proposed that GzmB can initiate effector caspases activation but cannot fully process procaspase 3 without disruption of the mitochondrial membrane and the release of second mitochondrial activator of caspases/Diablo and HtrA2/Omi that facilitate caspase 3 full activation by blocking the inhibitory action of inhibitor of apoptosis proteins (10). Sim-



**FIGURE 5.** p53–Bcl-2 interaction favors the release of Bax from Bcl-2 and prevents tBid interaction with Bcl-2 in response to GzmB. p53–Bcl-2 interaction in response to hGzmB promotes the release of Bax from Bcl-2 and inhibits tBid interaction with Bcl-2. DMSO or 10  $\mu$ M PFT- $\mu$ -pretreated MCF7-Casp3 cells were loaded with hGzmB alone (negative control) or PFN/GzmB for 30 min before Bcl-2 immunoprecipitation and immunoblotting with anti-Bcl-2, anti-p53, and anti-Bax and anti-tBid (p15) mAb. Representative immunoblots from two independent experiments are shown. p53/Bcl2, Bax/Bcl2, and tBid/Bcl2 ratios were calculated by densitometry. A.U., arbitrary unit.

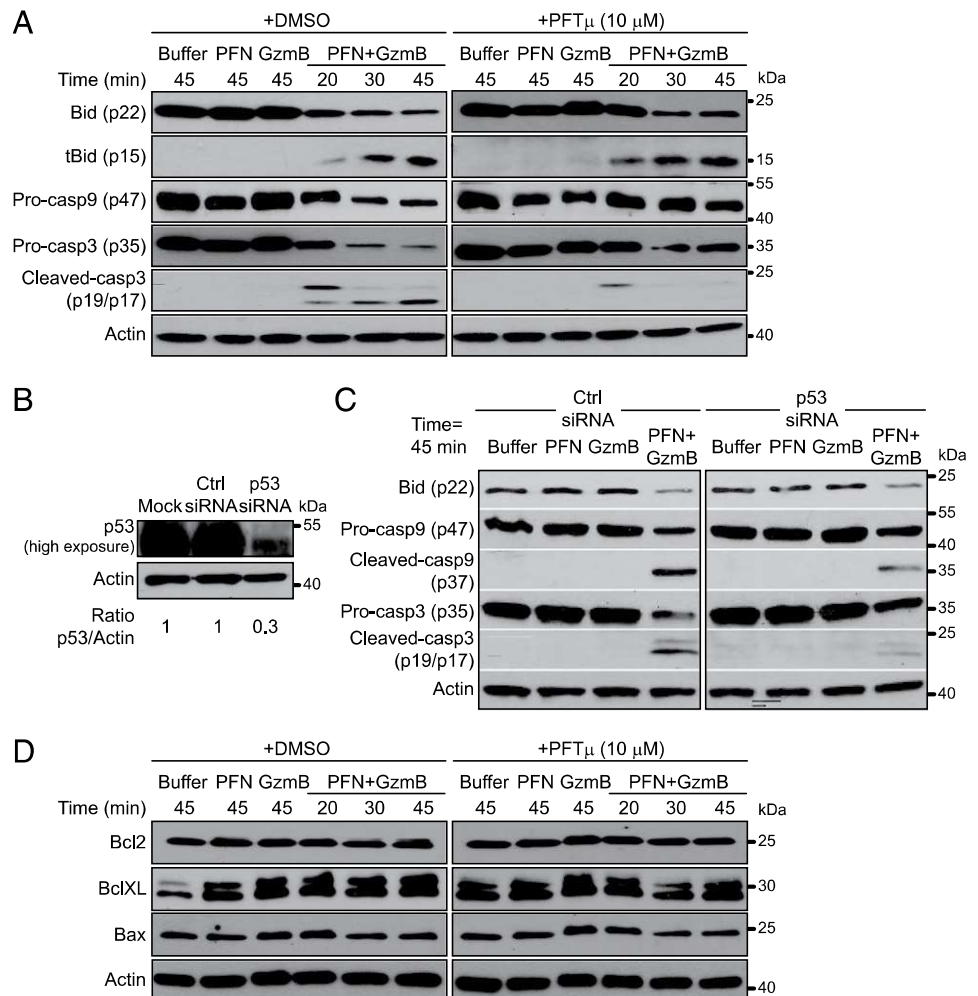
ilarly, the reduction of p53 expression by siRNAs strongly decreased PFN/hGzmB-induced procaspases 9 and 3 activation but did not interfere with Bid cleavage (Fig. 6B, 6C). Finally, neither DMSO nor PFT- $\mu$  pretreatment interfered with Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>,

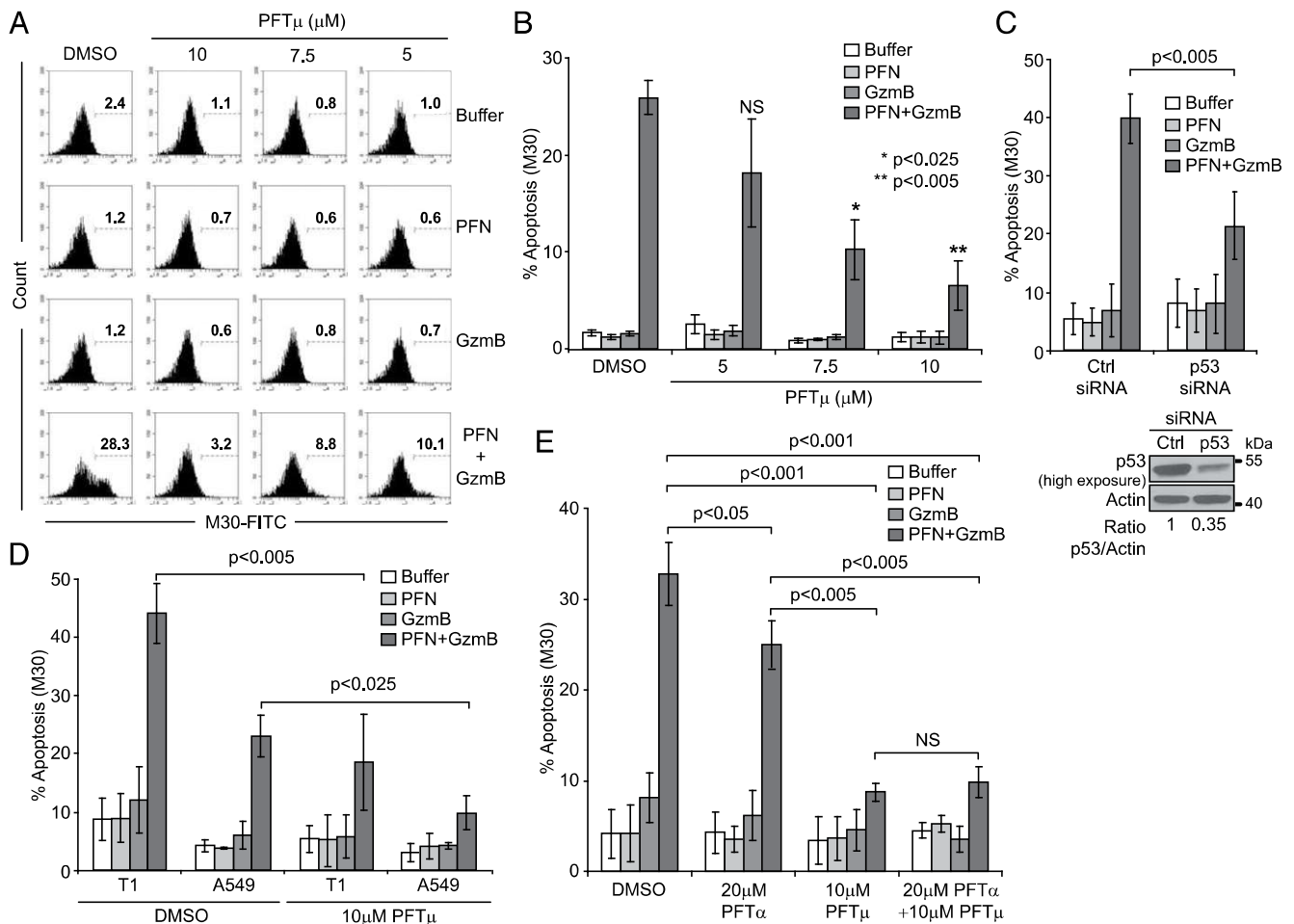
or Bax expression (Fig. 6D). Overall, these data demonstrate that inhibiting p53–Bcl-2 interaction after PFN/GzmB treatment blocks MOMP, leading to the inhibition of effector caspases activation.

#### Blocking p53–Bcl-2 interaction inhibits GzmB-induced apoptosis

Our results suggest that blocking p53–Bcl-2 interaction after PFN/hGzmB treatment inhibits hGzmB-induced MOMP and hGzmB apoptotic signaling pathway downstream of mitochondria, leading to a resistance to GzmB-induced cell death. To confirm this finding, we compared PFN/hGzmB-induced apoptosis by measuring effector caspases activation in either DMSO or 5–10  $\mu$ M PFT- $\mu$ -pretreated cells. For effector caspase activation, we used a flow cytometry-based assay using the M30-FITC mAb to detect a caspase 3 cleavage product of cytokeratin 18 (35). Pretreatment of MCF7-Casp3 cells with 7.5 or 10  $\mu$ M PFT- $\mu$  before PFN/hGzmB loading results in a significant dose-dependent inhibition of hGzmB-mediated apoptosis (Fig. 7A, 7B). Similar results were also obtained in MCF7-Casp3 cells transfected with p53 siRNA (Fig. 7C) or using the wtp53 melanoma and lung carcinoma cell lines T1 and A549 pretreated with PFT- $\mu$  (Fig. 7D). Moreover, the pretreatment of target cells with PFT- $\mu$ , which mainly blocks p53 transcriptional activity (37), only slightly decreases PFN/hGzmB-induced apoptosis compared with PFT- $\mu$  (Fig. 7E), suggesting that p53 function on hGzmB-induced cell death is mainly mediated by its nontranscriptional activity. Together, these data demonstrate that hGzmB-induced wtp53 accumulation to mitochondria and

**FIGURE 6.** Inhibition of p53–Bcl-2 interaction blocks GzmB signaling pathway downstream of mitochondria. (A) Analysis of hGzmB signaling pathway in MCF7-Casp3 cells pretreated with DMSO or 10  $\mu$ M PFT- $\mu$  and loaded with PFN  $\pm$  hGzmB for 20–45 min. Bid (p22), tBid (p15), procaspase 9 (p47), procaspase-3 (p35), and cleaved caspases-3 (p19/p17) were analyzed by immunoblot. PFT- $\mu$  does not interfere with GzmB-mediated Bid cleavage but inhibits the cleavage of procaspases 9 and 3. (B and C) p53 knockdown decreases GzmB-induced caspase 9 and 3 activation but does not affect Bid cleavage. MCF7-Casp3 target cells were transfected with control (Ctrl) or p53 siRNAs (B) before loading with PFN  $\pm$  hGzmB for 45 min (C). The p53/actin ratio from (B) was calculated by densitometry and normalized to “1” in untreated (mock) cells. (D) PFT- $\mu$  pretreatment does not interfere with Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>, or Bax expression. Actin was a loading control. Data (A–D) are representative of three independent experiments.





**FIGURE 7.** Inhibition of p53–Bcl-2 interaction alters GzmB-induced apoptosis. **(A and B)** PFT- $\mu$  decreases PFN/GzmB-induced apoptosis in a dose-dependent manner. MCF7-Casp3 cells were pretreated with 5–10  $\mu$ M PFT- $\mu$  before PFN  $\pm$  hGzmB loading. Apoptosis was measured by flow cytometry using M30 mAb staining (which recognizes a cytokeratin 18 epitope, revealed after effector caspase cleavage). Representative flow cytometry histograms (A) and mean  $\pm$  SD of percentage M30<sup>+</sup> cells from four independent experiments (B) are shown. **(C)** MCF7-Casp3 transfection with control (ctrl) or p53 siRNAs (leading to  $\sim$ 65% p53 inhibition compared with p53 basal level, measured by Western blot) also decreases PFN/GzmB-induced apoptosis. **(D)** PFT- $\mu$  (10  $\mu$ M) also decreases PFN/hGzmB-induced apoptosis of wtp53 T1 melanoma and A549 lung carcinoma cell lines. **(E)** PFT- $\mu$  is more efficient than PFT- $\alpha$  to decrease PFN/hGzmB-induced apoptosis. MCF7-Casp3 cells were pretreated with 10  $\mu$ M PFT- $\mu$  and/or 20  $\mu$ M PFT- $\alpha$  before PFN/hGzmB loading. Apoptosis in (C)–(E) was measured as in (A) and shown as means  $\pm$  SD of percentage M30<sup>+</sup> cells from three independent experiments. The *p* values were determined by unpaired two-tailed Student *t* test.

interaction with Bcl-2 is an important modulator of hGzmB-induced apoptosis.

*p53–Bcl-2 interaction is an important modulator of CTL/NK-mediated cell death through the PFN/GzmB pathway*

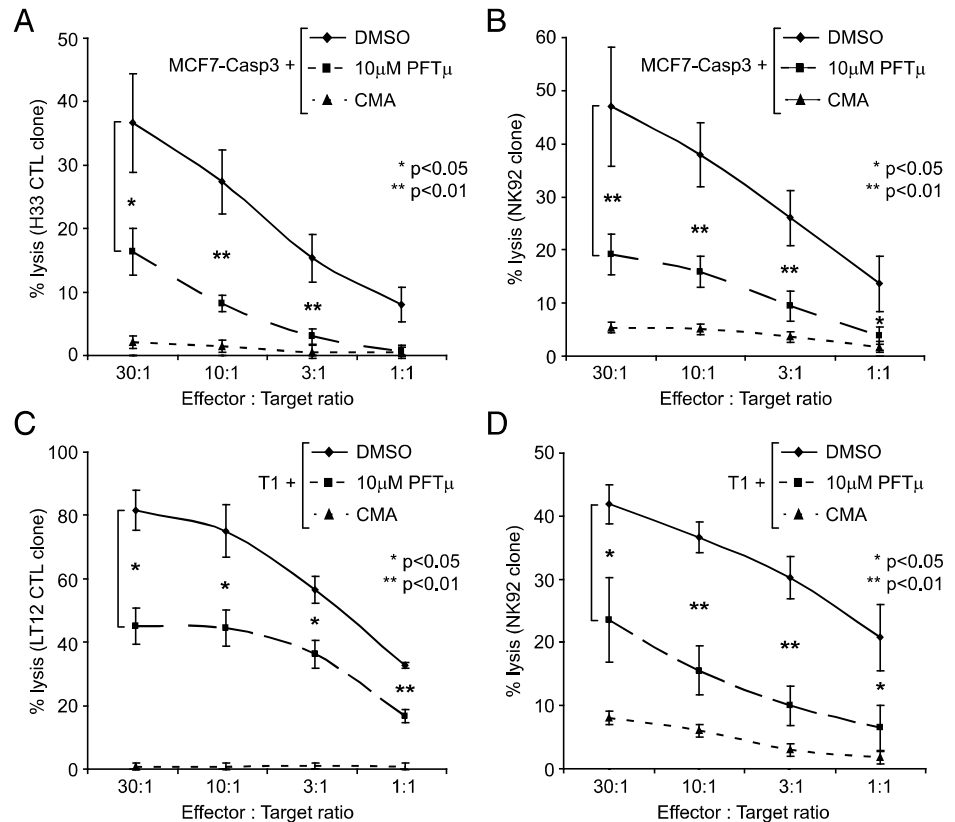
To confirm the physiological relevance of the GzmB-induced p53–Bcl-2 interaction, we then tested whether blocking hGzmB-induced p53–Bcl-2 interaction with PFT- $\mu$  can interfere with CTL and NK cell-mediated killing of wtp53 target cells. The lysis of MCF7-Casp3 target cells by the allogeneic H33 CTL clone and by the NK92 cell line was thus strongly decreased by PFT- $\mu$  pretreatment (Fig. 8A, 8B) in a dose-dependent manner (Supplemental Fig. 3A). Similarly, the lysis of wtp53 T1 target cells by the autologous LT12 CTL clone and by the NK92 cell line was strongly decreased after PFT- $\mu$  pretreatment (Fig. 8C, 8D). Similar results were also obtained after p53 inhibition using siRNA or with NK cells obtained from two healthy donors (Supplemental Fig. 3B–F). Moreover, the inhibition of exocytosis-mediated pathway by CMA resulted in the abrogation of H33, LT12, NK92, and NK cells isolated from healthy donors' cytotoxicity, indicating that their observed killing is mostly mediated

by the PFN/Gzms pathway (Fig. 8A–D and Supplemental Fig. 3B–E) and particularly by GzmB, as confirmed using the GzmB inhibitor Z-AAD-CH2Cl (34) (Supplemental Fig. 4). Together, these data demonstrate that hGzmB-induced p53 accumulation to mitochondria and interaction with Bcl-2 is an important regulator of the CTL/NK-mediated killing of wtp53 target cells (Fig. 9).

## Discussion

Based on our previous results showing that p53 is involved in PFN/GzmB-dependent cell death during the killing of target cells by immune effector cells, this study was intended to provide insight into the functional relationship between hGzmB and p53 during CTL and NK-mediated killing. In this study, we demonstrated that the death signal induced by hGzmB and mitochondrial pathway are interconnected through p53 and tBid during the CTL/NK-induced killing of target cells. We showed that hGzmB-activated p53 translocates to target cell mitochondria. Because PFT- $\mu$ , which targets only the mitochondrial branch of the p53 pathway without affecting the important transcriptional functions of p53, decreases both hGzmB- and CTL/NK-mediated cell death, we concluded that p53 nontranscriptional activity is an important determinant in

**FIGURE 8.** Inhibition of p53–Bcl-2 interaction decreases CTL/NK-mediated cell death. PFT- $\mu$ -pretreated cells are less susceptible to the CTL/NK-mediated cell death. MCF7-Casp3 lysis by the H33 CTL clone (A) or by the NK92 cell line (B) and T1 lysis by the autologous CTL clone LT12 (C) or by the NK92 cell line (D) after preincubation with 10  $\mu$ M PFT- $\mu$  or DMSO and cocultured at different E:T ratios are shown (mean  $\pm$  SD of at least three independent experiments). CMA, which inhibits calcium-dependent exocytosis of cytotoxic granules, was used as an inhibitor of PFN/Gzm-dependent lysis (positive control). The *p* values were determined by unpaired two-tailed Student *t* test.

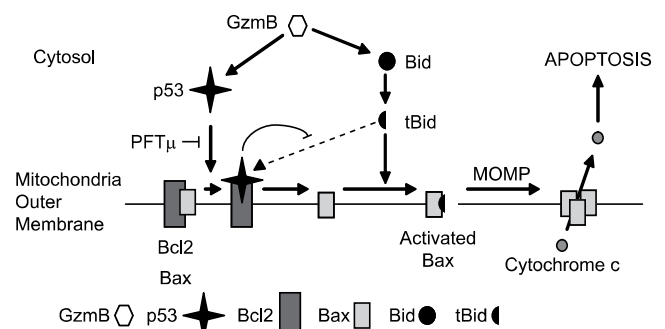


the hGzmB apoptotic signaling pathway. Of note, PFT- $\alpha$  also has, to some extent, an effect on hGzmB-induced cell death, even if PFT- $\mu$  inhibition is much more potent. PFT- $\alpha$  was shown to block p53 leading to inhibition of p53-dependent transactivation of its target genes (37). Thus, we cannot exclude that p53-controlled transactivation might be, at least in part, an important feature for hGzmB-mediated apoptosis. However, recent evidence demonstrated that PFT- $\alpha$  can also block the apoptosome-mediated processing and activation of caspases 9 and 3, independently of p53 (44). Moreover, cDNA microarrays analysis of p53 direct target genes expression (including Bax, Bcl-2, Bid, Puma, Noxa) after PFN/hGzmB treatment did not emphasize significant upregulation or downregulation (data not shown and Ref. 20), suggesting that p53 transcriptional activity is not essential for the control of hGzmB-induced cell death.

As shown in this article and by others (8, 9), tBid is crucial for hGzmB-induced Bax activation, MOMP, effector caspases cleavage, and apoptosis induction, but Bcl-2 and Bcl-X<sub>L</sub> were shown to prevent Bax activation and MOMP in response to different stress via the sequestration of tBid (mode 1) (40, 41). Similarly, we found that p53 participates to hGzmB-induced apoptosis by interacting with the antiapoptotic protein Bcl-2. This interaction prevents hGzmB-generated tBid to interact with Bcl-2 as shown by the Bcl-2–tBid complexes observed in PFN/hGzmB-treated cells after PFT- $\mu$  preincubation. Consequently, we suggested that p53 indirectly allows tBid-mediated Bax activation, probably by preventing Bcl-2–tBid inhibitory interaction. Accordingly, we observed that blocking p53–Bcl-2 interaction with PFT- $\mu$  strongly decreases Bax activation and MOMP. Of note, we confirmed that PFN/hGzmB-activated tBid mainly localized to mitochondria, and that PFN/hGzmB treatment increased mitochondrial Bax level. These results suggest that hGzmB-activated tBid interacts and activates Bax at the mitochondrial membrane. In this scenario, by

blocking Bcl-2–tBid interaction, p53 might also favor tBid-mediated Bax translocation to mitochondria, where it can be activated. In this regard, a critical role of tBid in the regulation of MOMP has been demonstrated (45). In this model, Bax and tBid seem to only interact when a membrane is present: tBid rapidly binds to mitochondrial membranes and its BH3 domain facilitates the insertion of cytosolic Bax into the membrane, leading to its activation/oligomerization, and subsequently to membrane permeabilization (45).

We also observed a perhaps surprising significant amount of Bax in mitochondrial fraction of untreated cells interacting with Bcl-2. However, recent studies indicated that Bax localizes to both the



**FIGURE 9.** Proposed model for the role of p53 in GzmB-induced apoptotic signaling pathway. hGzmB-induced p53 accumulates on target cell mitochondria where it interacts with the prosurvival protein Bcl-2. This interaction allows the release of the proapoptotic protein Bax from its inhibitory interaction with Bcl-2 and prevents hGzmB-activated tBid sequestration by Bcl-2. In this case, free tBid activates free Bax to induce MOMP, cytochrome *c* release, and apoptosis. Blocking p53–Bcl-2 interaction with PFT- $\mu$  inhibits Bax release from Bcl-2, favors tBid–Bcl-2 binding, and consequently inhibits MOMP.



cytosol and to mitochondria in healthy cells, and that transient Bax–Bcl-X<sub>L</sub> or Bax–Bcl-2 interaction stimulates retrotranslocation of Bax from the mitochondria into the cytoplasm, thereby sustaining Bax in its cytosolic inactive form (46, 47). In stressed cells, transient interaction with direct activators induces extensive conformational changes of Bax, resulting in the formation of more stable, membrane-embedded Bax. As such, antiapoptotic Bcl-2 proteins were shown to prevent Bax activation and MOMP not only via the sequestration of tBid (mode 1), but also by binding Bax (mode 2), thereby preventing Bax activation (40, 41). In particular, Bcl-X<sub>L</sub> was shown to tie up both tBid and Bax in nonproductive interactions inhibiting Bax binding to membranes (48). Interestingly, we observed that GzmB-activated p53 interaction with Bcl-2 not only prevents tBid interaction with Bcl-2, but also releases Bax from Bax–Bcl-2 complexes. Moreover, in the absence of p53 binding to Bcl-2 after PFT- $\mu$  pretreatment, a ternary complex including Bcl-2, Bax, and tBid is observed in response to PFN/hGzmB treatment, but Bax is not activated. These results suggest that tBid binding to Bcl-2 is not enough to free and to activate Bax, and that p53 is important to break this ternary complex. Consistently, recent studies have identified the region of interaction between Bcl-2–Bcl-X<sub>L</sub> proteins and p53 to its DNA-binding domain (49–51). Moreover, it has been demonstrated that Bcl-X<sub>L</sub> conformational change upon binding to wtp53 might facilitate the dissociation of Bcl-X<sub>L</sub>–Bax complexes (49, 52). Thus, we can envision that p53–Bcl-2 interaction in response to PFN/hGzmB treatment also blocks “mode 2” inhibition and favors Bax activation by hGzmB-activated tBid. In particular, p53 might release mitochondrial nonactivated Bax from Bcl-2 interaction, promoting its activation by tBid, but might also facilitate the dissociation of Bcl-2–activated Bax complex, promoting both Bax activation and oligomerization. In this scenario, hGzmB-stabilized p53 would operate as a BH3-only protein of the de-repressor type freeing proapoptotic tBid and Bax from Bcl-2–mediated inhibition (Fig. 9). Similarly, ABT-737, a small molecule that acts as a selective inhibitor of Bcl-2, was shown to increase the levels of both tBid and Bax at the MOM that are free to interact, thereby promoting Bax activation (53), and to block hGzmB-activated tBid inhibition by Bcl-2 in Bcl-2–over-expressing cells (54).

In conclusion, this study emphasizes that the coordinated action of hGzmB-activated p53 and GzmB-cleaved Bid is important for GzmB-induced cell death and for CTL/NK-mediated killing of target cells. Nevertheless, it has been demonstrated that wtp53, but not tumor-derived p53 mutants, binds to Bcl-2 via this DNA-binding domain and can trigger MOMP (52). Because our results point out the importance of Bcl-2/wtp53 interaction in hGzmB-induced apoptosis, further studies will be required to determine whether such p53 mutants can be associated with tumor cell resistance to PFN/hGzmB- and CTL/NK-mediated cell death.

## Acknowledgments

We thank J.L. Perfettini for helpful discussion and A.C. Jonckheere for technical assistance.

## Disclosures

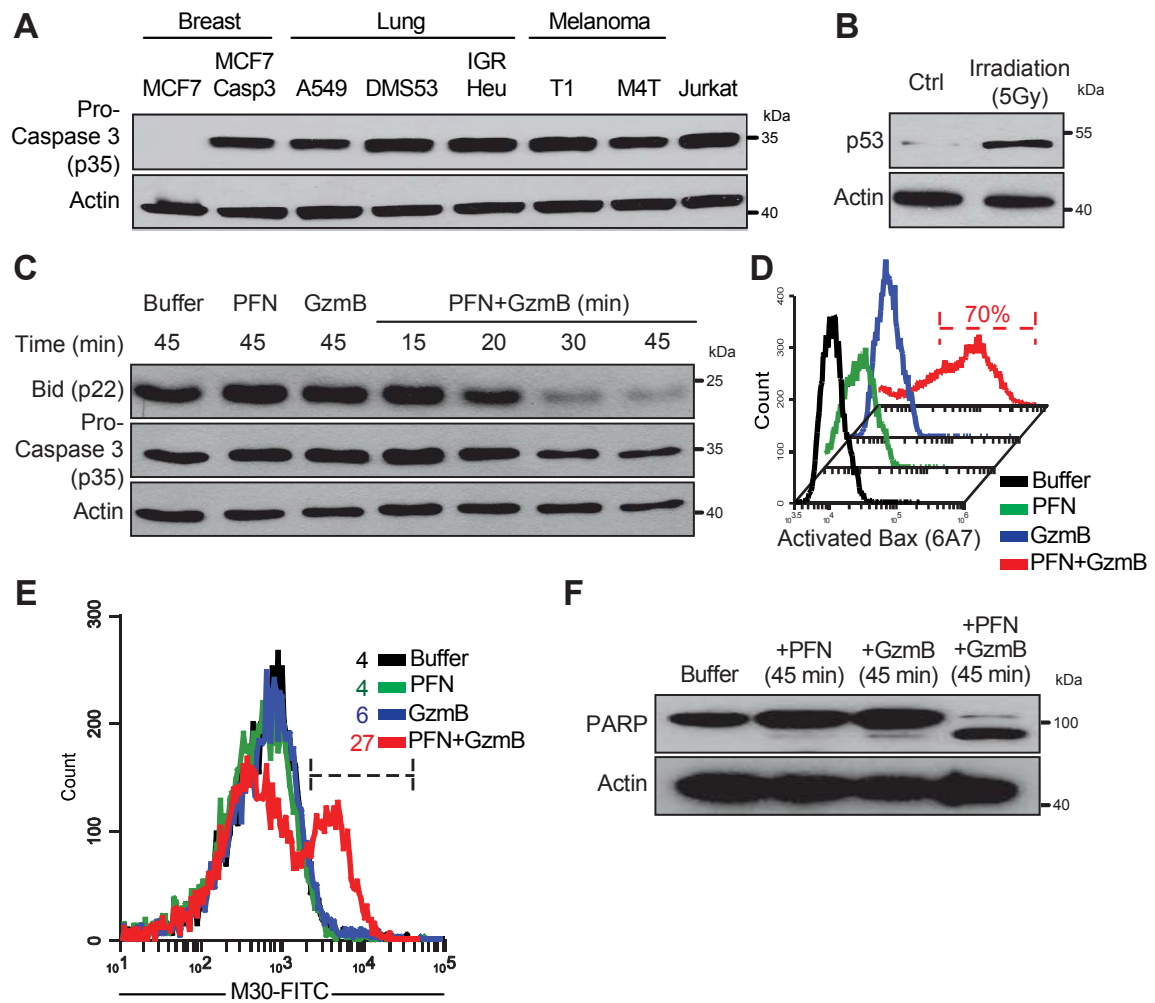
The authors have no financial conflicts of interest.

## References

- Lieberman, J. 2003. The ABCs of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal. *Nat. Rev. Immunol.* 3: 361–370.
- Chowdhury, D., and J. Lieberman. 2008. Death by a thousand cuts: granzyme pathways of programmed cell death. *Annu. Rev. Immunol.* 26: 389–420.

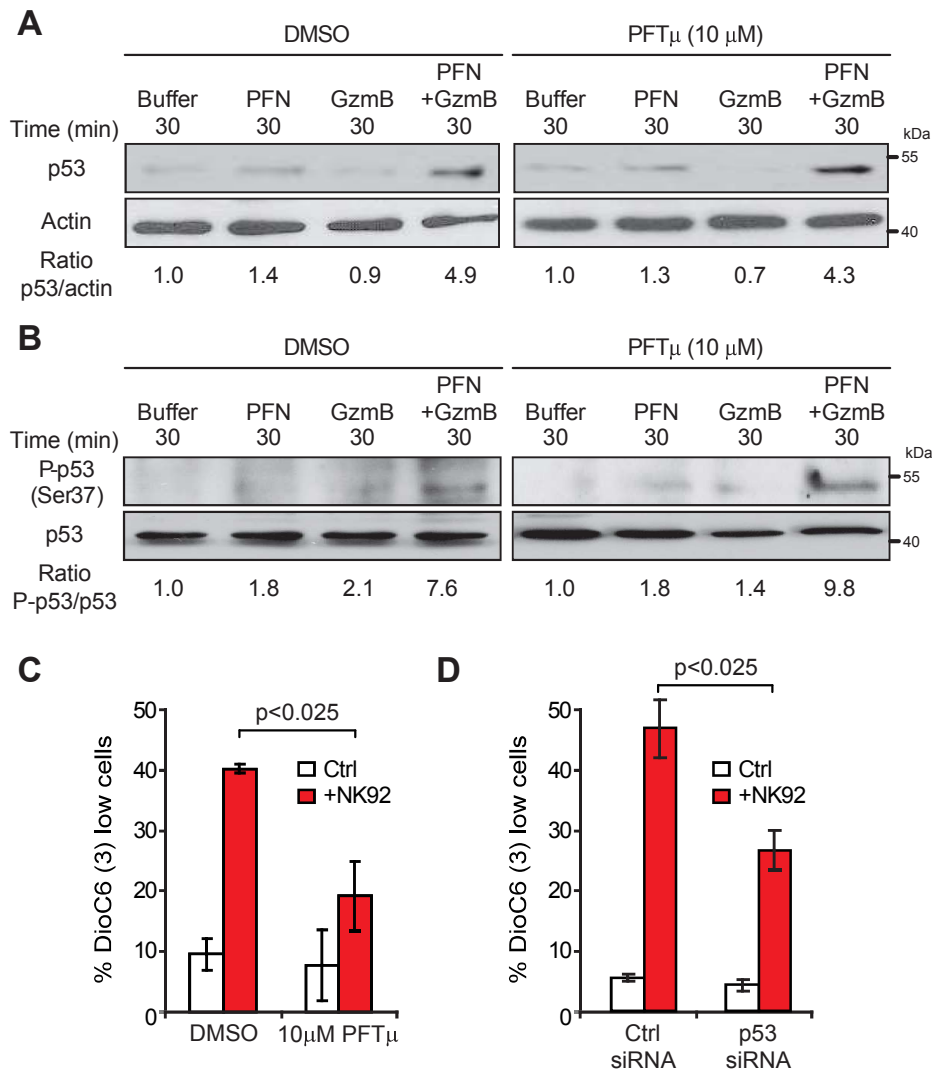
- Anthony, D. A., D. M. Andrews, S. V. Watt, J. A. Trapani, and M. J. Smyth. 2010. Functional dissection of the granzyme family: cell death and inflammation. *Immunol. Rev.* 235: 73–92.
- Ewen, C. L., K. P. Kane, and R. C. Bleackley. 2012. A quarter century of granzymes. *Cell Death Differ.* 19: 28–35.
- Thiery, J., D. Keefe, S. Boulant, E. Boucrot, M. Walch, D. Martinvalet, I. S. Goping, R. C. Bleackley, T. Kirchhausen, and J. Lieberman. 2011. Perforin pores in the endosomal membrane trigger the release of endocytosed granzyme B into the cytosol of target cells. *Nat. Immunol.* 12: 770–777.
- Thiery, J., D. Keefe, S. Saffarian, D. Martinvalet, M. Walch, E. Boucrot, T. Kirchhausen, and J. Lieberman. 2010. Perforin activates clathrin- and dynamin-dependent endocytosis, which is required for plasma membrane repair and delivery of granzyme B for granzyme-mediated apoptosis. *Blood* 115: 1582–1593.
- Thiery, J., and J. Lieberman. 2014. Perforin: a key pore-forming protein for immune control of viruses and cancer. *Subcell. Biochem.* 80: 197–220.
- Heibin, J. A., I. S. Goping, M. Barry, M. J. Pinkoski, G. C. Shore, D. R. Green, and R. C. Bleackley. 2000. Granzyme B-mediated cytochrome c release is regulated by the Bcl-2 family members bid and Bax. *J. Exp. Med.* 192: 1391–1402.
- Sutton, V. R., J. E. Davis, M. Cancilla, R. W. Johnstone, A. A. Ruefli, K. Sedelies, K. A. Browne, and J. A. Trapani. 2000. Initiation of apoptosis by granzyme B requires direct cleavage of bid, but not direct granzyme B-mediated caspase activation. *J. Exp. Med.* 192: 1403–1414.
- Sutton, V. R., M. E. Wolk, M. Cancilla, and J. A. Trapani. 2003. Caspase activation by granzyme B is indirect, and caspase autoprocessing requires the release of proapoptotic mitochondrial factors. *Immunity* 18: 319–329.
- Wang, G. Q., E. Wiecekowski, L. A. Goldstein, B. R. Gastman, A. Rabinovitz, A. Gambotto, S. Li, B. Fang, X. M. Yin, and H. Rabinowich. 2001. Resistance to granzyme B-mediated cytochrome c release in Bak-deficient cells. *J. Exp. Med.* 194: 1325–1337.
- Pinkoski, M. J., N. J. Waterhouse, J. A. Heibin, B. B. Wolf, T. Kuwana, J. C. Goldstein, D. D. Newmeyer, R. C. Bleackley, and D. R. Green. 2001. Granzyme B-mediated apoptosis proceeds predominantly through a Bcl-2-inhibitable mitochondrial pathway. *J. Biol. Chem.* 276: 12060–12067.
- Thomas, D. A., L. Scorrano, G. V. Putecha, S. J. Korsmeyer, and T. J. Ley. 2001. Granzyme B can cause mitochondrial depolarization and cell death in the absence of BID, BAX, and BAK. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 14985–14990.
- Darmon, A. J., D. W. Nicholson, and R. C. Bleackley. 1995. Activation of the apoptotic protease CPP32 by cytotoxic T-cell-derived granzyme B. *Nature* 377: 446–448.
- Sharif-Askari, E., A. Alam, E. Rheaume, P. J. Beresford, C. Scotto, K. Sharma, D. Lee, W. E. DeWolf, M. E. Nuttall, J. Lieberman, and R. P. Sékaly. 2001. Direct cleavage of the human DNA fragmentation factor-45 by granzyme B induces caspase-activated DNase release and DNA fragmentation. *EMBO J.* 20: 3101–3113.
- Thomas, D. A., C. Du, M. Xu, X. Wang, and T. J. Ley. 2000. DFF45/ICAD can be directly processed by granzyme B during the induction of apoptosis. *Immunity* 12: 621–632.
- Andrade, F., S. Roy, D. Nicholson, N. Thornberry, A. Rosen, and L. Casciola-Rosen. 1998. Granzyme B directly and efficiently cleaves several downstream caspase substrates: implications for CTL-induced apoptosis. *Immunity* 8: 451–460.
- Zhang, D., P. J. Beresford, A. H. Greenberg, and J. Lieberman. 2001. Granzymes A and B directly cleave lamins and disrupt the nuclear lamina during granule-mediated cytotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 5746–5751.
- Goping, I. S., T. Sawchuk, D. A. Underhill, and R. C. Bleackley. 2006. Identification of alpha-tubulin as a granzyme B substrate during CTL-mediated apoptosis. *J. Cell Sci.* 119: 858–865.
- Meslin, F., A. Hamaï, B. Mlecnik, F. Rosselli, C. Richon, A. Jalil, G. Wemhoff, J. Thiery, J. Galon, and S. Chouaib. 2011. hSMG-1 is a granzyme B-associated stress-responsive protein kinase. *J. Mol. Med.* 89: 411–421.
- Meslin, F., J. Thiery, C. Richon, A. Jalil, and S. Chouaib. 2007. Granzyme B-induced cell death involves induction of p53 tumor suppressor gene and its activation in tumor target cells. *J. Biol. Chem.* 282: 32991–32999.
- el-Deiry, W. S., S. E. Kern, J. A. Pietenpol, K. W. Kinzler, and B. Vogelstein. 1992. Definition of a consensus binding site for p53. *Nat. Genet.* 1: 45–49.
- Junttila, M. R., and G. I. Evan. 2009. p53—a Jack of all trades but master of none. *Nat. Rev. Cancer* 9: 821–829.
- Moll, U. M., S. Wolff, D. Speidel, and W. Deppert. 2005. Transcription-independent pro-apoptotic functions of p53. *Curr. Opin. Cell Biol.* 17: 631–636.
- Galluzzi, L., E. Morselli, O. Kepp, I. Vitale, M. Pinti, and G. Kroemer. 2011. Mitochondrial liaisons of p53. *Antioxid. Redox Signal.* 15: 1691–1714.
- Speidel, D. 2010. Transcription-independent p53 apoptosis: an alternative route to death. *Trends Cell Biol.* 20: 14–24.
- Mihara, M., S. Erster, A. Zaika, O. Petrenko, T. Chittenden, P. Pancoska, and U. M. Moll. 2003. p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. *Mol. Cell* 11: 577–590.
- Chipuk, J. E., T. Kuwana, L. Bouchier-Hayes, N. M. Droin, D. D. Newmeyer, M. Schuler, and D. R. Green. 2004. Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. *Science* 303: 1010–1014.
- Leu, J. I., P. Dumont, M. Hafey, M. E. Murphy, and D. L. George. 2004. Mitochondrial p53 activates Bak and causes disruption of a Bak-Mcl1 complex. *Nat. Cell Biol.* 6: 443–450.

30. Yang, X. H., T. L. Sladek, X. Liu, B. R. Butler, C. J. Froelich, and A. D. Thor. 2001. Reconstitution of caspase 3 sensitizes MCF-7 breast cancer cells to doxorubicin- and etoposide-induced apoptosis. *Cancer Res.* 61: 348–354.
31. Dufour, E., G. Carcelain, C. Gaudin, C. Flament, M. F. Avril, and F. Faure. 1997. Diversity of the cytotoxic melanoma-specific immune response: some CTL clones recognize autologous fresh tumor cells and not tumor cell lines. *J. Immunol.* 158: 3787–3795.
32. Dorothée, G., H. Echchakir, B. Le Maux Chansac, I. Vergnon, F. El Hage, A. Moretta, A. Bensussan, S. Chouaib, and F. Mami-Chouaib. 2003. Functional and molecular characterization of a KIR3DL2/p140 expressing tumor-specific cytotoxic T lymphocyte clone infiltrating a human lung carcinoma. *Oncogene* 22: 7192–7198.
33. Thiery, J., M. Walch, D. K. Jensen, D. Martinvalet, and J. Lieberman. 2010. Isolation of cytotoxic T cell and NK granules and purification of their effector proteins. *Curr. Protoc. Cell Biol.* Chapter 3: Unit 3.37.
34. Kam, C. M., D. Hudig, and J. C. Powers. 2000. Granzymes (lymphocyte serine proteases): characterization with natural and synthetic substrates and inhibitors. *Biochim. Biophys. Acta* 1477: 307–323.
35. Leers, M. P., W. Kölgen, V. Björklund, T. Bergman, G. Tribbick, B. Persson, P. Björklund, F. C. Ramaekers, B. Björklund, M. Nap, et al. 1999. Immunocytochemical detection and mapping of a cytokeratin 18 neo-epitope exposed during early apoptosis. *J. Pathol.* 187: 567–572.
36. Strom, E., S. Sathé, P. G. Komarov, O. B. Chernova, I. Pavlovskaya, I. Shyshynova, D. A. Bositykh, L. G. Burdelya, R. M. Macklis, R. Skaliter, et al. 2006. Small-molecule inhibitor of p53 binding to mitochondria protects mice from gamma radiation. *Nat. Chem. Biol.* 2: 474–479.
37. Gudkov, A. V., and E. A. Komarova. 2005. Prospective therapeutic applications of p53 inhibitors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 331: 726–736.
38. Hsu, Y. T., and R. J. Youle. 1997. Nonionic detergents induce dimerization among members of the Bcl-2 family. *J. Biol. Chem.* 272: 13829–13834.
39. Llambi, F., T. Moldoveanu, S. W. Tait, L. Bouchier-Hayes, J. Temirov, L. L. McCormick, C. P. Dillon, and D. R. Green. 2011. A unified model of mammalian BCL-2 protein family interactions at the mitochondria. *Mol. Cell* 44: 517–531.
40. Volkmann, N., F. M. Marassi, D. D. Newmeyer, and D. Hanein. 2014. The rheostat in the membrane: BCL-2 family proteins and apoptosis. *Cell Death Differ.* 21: 206–215.
41. Westphal, D., R. M. Kluck, and G. Dewson. 2014. Building blocks of the apoptotic pore: how Bax and Bak are activated and oligomerize during apoptosis. *Cell Death Differ.* 21: 196–205.
42. Cheng, E. H., M. C. Wei, S. Weiler, R. A. Flavell, T. W. Mak, T. Lindsten, and S. J. Korsmeyer. 2001. BCL-2, BCL-X(L) sequester BH3 domain-only molecules preventing BAX- and BAK-mediated mitochondrial apoptosis. *Mol. Cell* 8: 705–711.
43. Willis, S. N., L. Chen, G. Dewson, A. Wei, E. Naik, J. I. Fletcher, J. M. Adams, and D. C. Huang. 2005. Proapoptotic Bak is sequestered by Mcl-1 and Bcl-xL, but not Bcl-2, until displaced by BH3-only proteins. *Genes Dev.* 19: 1294–1305.
44. Sohn, D., V. Graupner, D. Neise, F. Essmann, K. Schulze-Osthoff, and R. U. Jänicke. 2009. Pifithrin-alpha protects against DNA damage-induced apoptosis downstream of mitochondria independent of p53. *Cell Death Differ.* 16: 869–878.
45. Lovell, J. F., L. P. Billen, S. Bindner, A. Shamas-Din, C. Fradin, B. Leber, and D. W. Andrews. 2008. Membrane binding by tBid initiates an ordered series of events culminating in membrane permeabilization by Bax. *Cell* 135: 1074–1084.
46. Edlich, F., S. Banerjee, M. Suzuki, M. M. Cleland, D. Arnoult, C. Wang, A. Neutzner, N. Tjandra, and R. J. Youle. 2011. Bcl-x(L) retrotranslocates Bax from the mitochondria into the cytosol. *Cell* 145: 104–116.
47. Schellenberg, B., P. Wang, J. A. Keeble, R. Rodriguez-Enriquez, S. Walker, T. W. Owens, F. Foster, J. Tanianis-Hughes, K. Brennan, C. H. Streuli, and A. P. Gilmore. 2013. Bax exists in a dynamic equilibrium between the cytosol and mitochondria to control apoptotic priming. *Mol. Cell* 49: 959–971.
48. Billen, L. P., C. L. Kokoski, J. F. Lovell, B. Leber, and D. W. Andrews. 2008. Bcl-XL inhibits membrane permeabilization by competing with Bax. *PLoS Biol.* 6: e147.
49. Hagn, F., C. Klein, O. Demmer, N. Marchenko, A. Vaseva, U. M. Moll, and H. Kessler. 2010. BclxL changes conformation upon binding to wild-type but not mutant p53 DNA binding domain. *J. Biol. Chem.* 285: 3439–3450.
50. Sot, B., S. M. Freund, and A. R. Fersht. 2007. Comparative biophysical characterization of p53 with the pro-apoptotic BAK and the anti-apoptotic BCL-xL. *J. Biol. Chem.* 282: 29193–29200.
51. Petros, A. M., A. Gunasekera, N. Xu, E. T. Olejniczak, and S. W. Fesik. 2004. Defining the p53 DNA-binding domain/Bcl-x(L)-binding interface using NMR. *FEBS Lett.* 559: 171–174.
52. Tomita, Y., N. Marchenko, S. Erster, A. Nemajero, A. Dehner, C. Klein, H. Pan, H. Kessler, P. Pancoska, and U. M. Moll. 2006. WT p53, but not tumor-derived mutants, bind to Bcl2 via the DNA binding domain and induce mitochondrial permeabilization. *J. Biol. Chem.* 281: 8600–8606.
53. Cristofanon, S., and S. Fulda. 2012. ABT-737 promotes tBid mitochondrial accumulation to enhance TRAIL-induced apoptosis in glioblastoma cells. *Cell Death Dis.* 3: e432.
54. Sutton, V. R., K. Sedelies, G. Dewson, M. E. Christensen, P. I. Bird, R. W. Johnstone, R. M. Kluck, J. A. Trapani, and N. J. Waterhouse. 2012. Granzyme B triggers a prolonged pressure to die in Bcl-2 overexpressing cells, defining a window of opportunity for effective treatment with ABT-737. *Cell Death Dis.* 3: e344.



**Figure S1. Granzyme B induces apoptosis of MCF7-Casp3 cells through the mitochondrial pathway.**

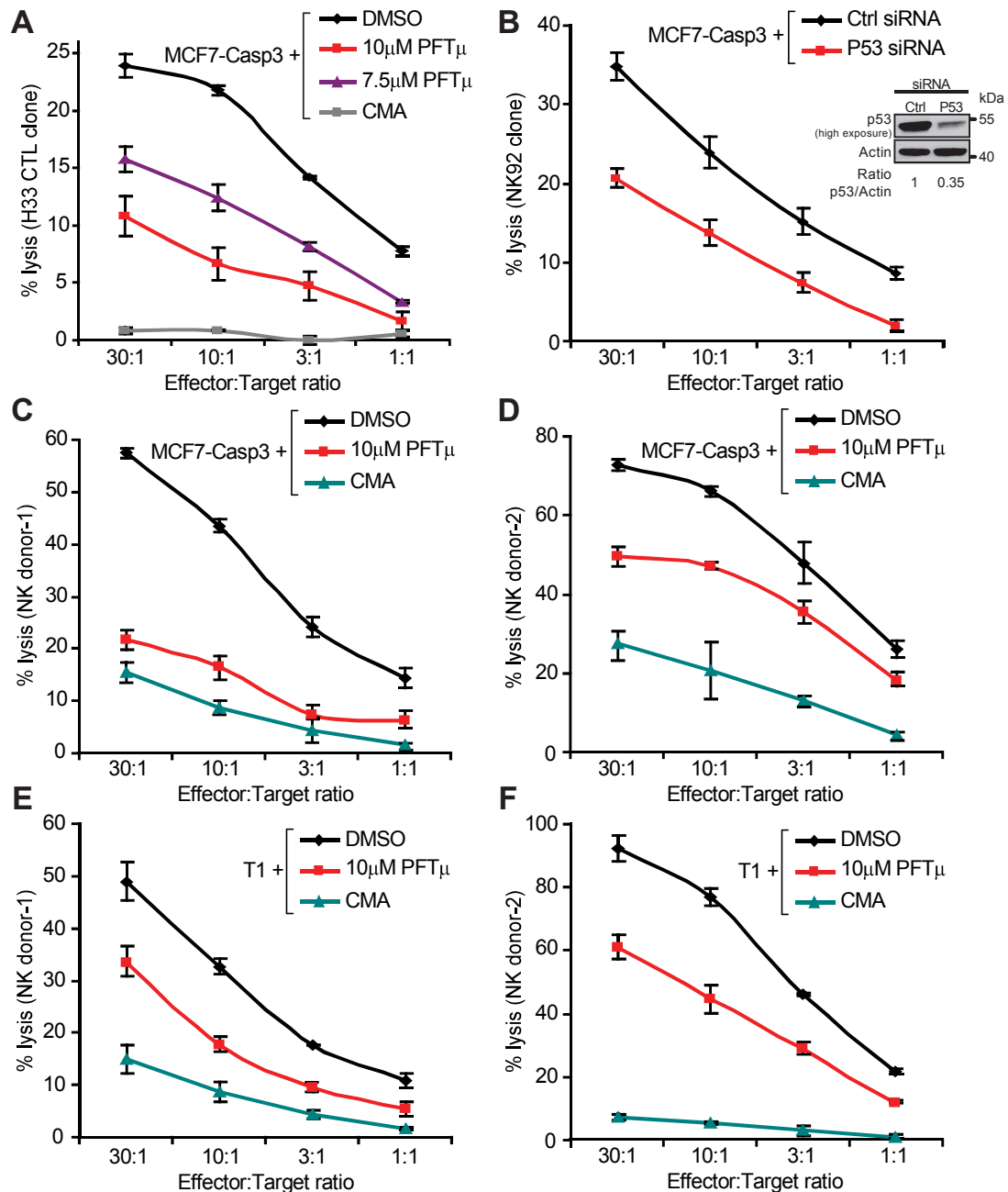
(A) MCF7 cells transfected with pro-caspase 3 (MCF7-Casp3) display similar amount of pro-caspase3 than A549, DMS53, IGR-Heu, T1, M4T, Jurkat cells, while MCF7 cells are pro-caspase 3 deficient. (B) P53 accumulation in MCF7-Casp3 cells 5 hr after  $\gamma$ -irradiation (5Gy). (C) PFN/GzmB loading (15-45 min) of MCF7-Casp3 results in Bid and pro-caspase 3 cleavages. (D) Bax is activated after 30 min PFN/GzmB loading, assessed by flow cytometry using anti-Bax 6A7 mAb. A representative flow cytometry histogram is shown. (E-F) PFN/GzmB loading results in MCF7-Casp3 apoptosis, as revealed by flow cytometry analysis using M30 mAb staining (which recognizes a cytokeratin-18 epitope, revealed after effector caspase cleavage) (E) or by western-blot analysis of PARP cleavage (F). Representative flow cytometry histogram (E) and immunoblot (F) of a least three independent experiments are shown.



**Figure S2. PFT- $\mu$  does not affect p53 stabilization in response to PFN/GzmB treatment but decreases target cells MOMP in response to NK cells**

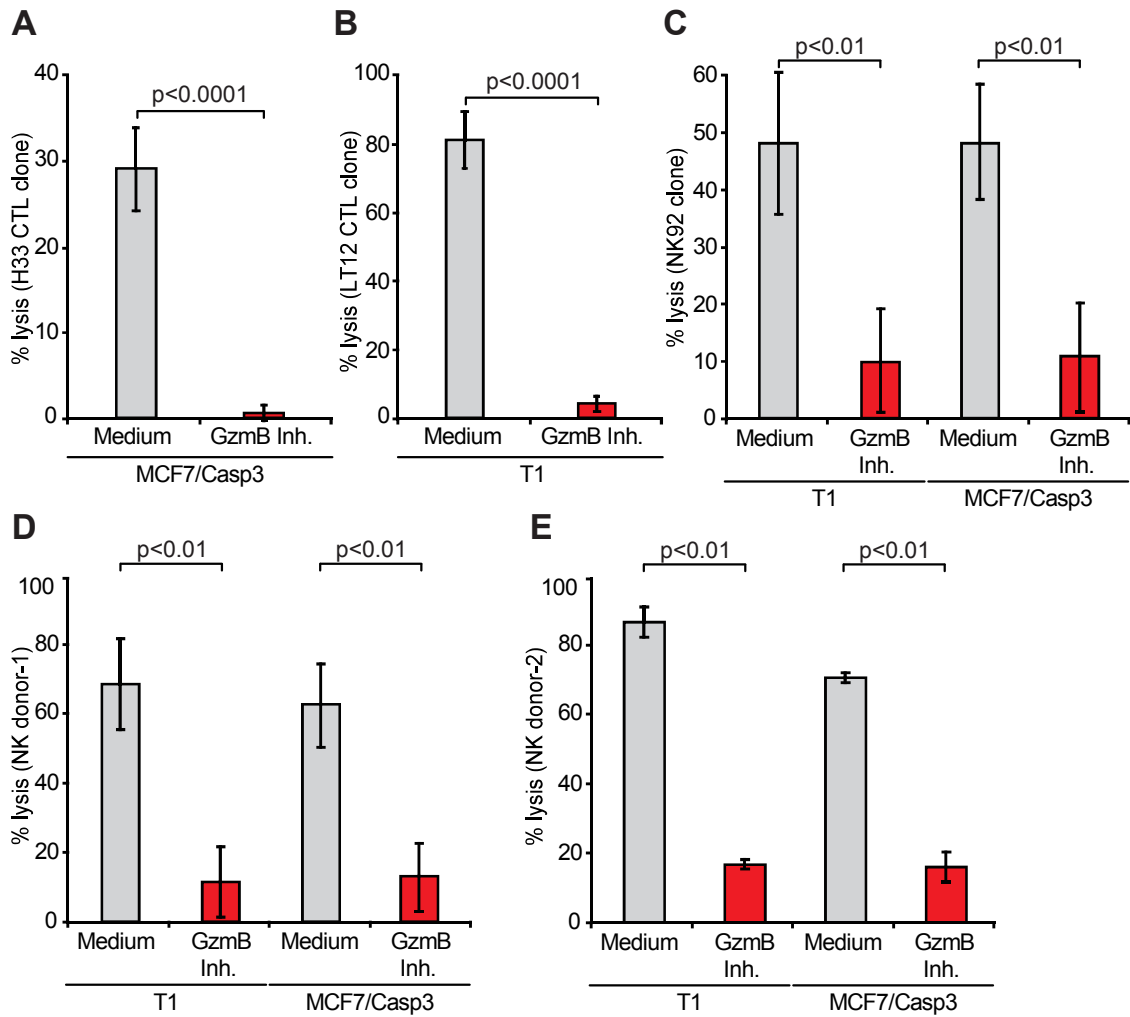
(A) Within 30 min of treatment with sublytic PFN and human GzmB, p53 accumulates in both DMSO and PFT $\mu$ -pre-treated MCF7-Casp3 target cells. Actin was used as loading control. (B) P53 is phosphorylated (Ser37) after treatment with sublytic PFN and human GzmB in both DMSO and PFT- $\mu$ -pre-treated MCF7-Casp3 cells. An equal amount of total p53 protein was loaded in each well and served as loading control. Representative western blot analyses of two independent experiments are shown. The p53/actin and P-p53/p53 ratios were calculated by densitometry and normalized to "1" in buffer-treated cells. (C-D) PFT- $\mu$ -pre-treatment and p53 siRNA transfection of Vybrant DiD-labelled MCF7-Casp3 cells decrease MOMP after 30 min incubation with the NK92 (Effector:Target ratio 5:1), assessed by flow cytometry using DioC6(3) staining and gating on Vybrant DiD<sup>+</sup> cells. Means  $\pm$  s.d. of three independent experiments are shown. P values were determined by unpaired two-tailed student's t-test.





**Figure S3. PFT- $\mu$  decreases CTL-mediated killing in a dose dependent manner and alters NK cell-dependent cell death**

(A) MCF7-Casp3 lysis by the H33 CTL clone after pre-incubation with 10 or 7.5  $\mu$ M PFT- $\mu$  or DMSO and cocultured at different effector:target ratios is shown. (B) MCF7-Casp3 lysis by the NK92 clone after transfection with control (ctrl) or p53 siRNAs (leading to ~65% p53 inhibition compared to p53 basal level, measured by western blot) (C-E) PFT- $\mu$ -pre-treated cells are less susceptible to NK-mediated cell death, isolated from two healthy donors (NKd). MCF7-Casp3 lysis by NKd1 (A) or NKd2 cell line (C) and T1 lysis by NKd1 (D) or by NKd2 (E) after pre-incubation with 10 mM PFT- $\mu$  or DMSO and cocultured at different effector:target ratios are shown. CMA, which inhibits calcium-dependent exocytosis of cytotoxic granules, was used as an inhibitor of PFN/Gzm-dependent lysis (positive control). All data are representative of two independent experiments performed in triplicate.



**Figure S4. H33, LT12 CTL clones, NK92 and NKd-mediated cytotoxicity is mainly mediated by the PFN/GzmB pathway.**

MCF7-Casp3 lysis by the H33 CTL clone (A), by NK92 (C) or by NK isolated from two healthy donors (D,E) and T1 lysis by the autologous CTL clone LT12 (B) by NK92 (C) or by NK isolated from two healthy donors (D,E) after cytotoxic effector cells pretreatment with the GzmB inhibitor Z-AAD-CH2Cl is strongly decreased. Cytotoxicity experiments were performed at the effector:target ratio of 30:1. Means  $\pm$  s.d. of three independent experiments are shown. *P* values were determined by unpaired two-tailed student's *t*-test.



**Partie 2: Etude de l'effet de la restauration pharmacologique d'une fonction p53 sauvage sur la sensibilité des cellules tumorales p53 mutées à la lyse induite par les cellules NK : implication de l'autophagie**

**Article 2 (en preparation):**

**"The pharmacological reactivation of mutant p53 improves breast tumor cell lysis by NK cells through an autophagic process"**

Thouraya Ben Safta, Linda Ziani, Guillaume Meurice, Bassam Janji, Salem Chouaib, and Jerome Thiery

## Objectif des travaux et résumé des résultats

Les lymphocytes cytotoxiques éliminent les cellules tumorales ou infectées par un pathogène grâce à la voie de l'exocytose du contenu des granules cytotoxiques et/ou à la voie des récepteurs à domaines de mort. Cependant, les cellules tumorales sont capables d'échapper au contrôle immunitaire par plusieurs mécanismes. Parmi ces mécanismes d'échappement, la résistance à l'apoptose induites par les effecteurs cytotoxiques constitue un élément déterminant dans l'altération de l'efficacité de la réponse immune antitumorale.

La protéine p53 activée, joue un rôle important dans la suppression des tumeurs en induisant diverses réponses cellulaires, notamment l'arrêt du cycle cellulaire, la sénescence, l'apoptose et la réparation de l'ADN. Plusieurs travaux attribuent des rôles émergents à p53 qui sont tout aussi pertinents que les précédents pour la suppression tumorale, y compris la suppression de la transition épithélio-mésenchymateuse, la reprogrammation métabolique ou l'activation de l'autophagie. De plus, des résultats obtenus dans notre laboratoire ont impliqué la protéine suppresseur de tumeurs p53 dans la sensibilité des cellules tumorales à l'apoptose induite par les lymphocytes T cytotoxiques (Ben Safta et al., 2015 ; Meslin et al., 2011 ; Meslin et al., 2007 ; Muret et al., 2012 ; Thiery et al., 2005; Thiery et al., 2003 ). Ces travaux ont ainsi pu montrer qu'une fonction p53 sauvage est essentielle à la mort cellulaire tumorale induite par les voies PFN/GzmB, Fas/FasL et TNF- $\alpha$ . Néanmoins, il est crucial de noter que le gène *TP53*, codant pour la protéine p53, est fréquemment muté au niveau des tumeurs humaines, aboutissant à une protéine non fonctionnelle. Sur la base de ces différents éléments, il a été émis l'hypothèse dans le laboratoire que ces mutations de p53 pourraient représenter un mécanisme permettant aux cellules tumorales d'échapper à la lyse induite par les CTL et les cellules NK, particulièrement via la voie PFN/GzmB. Dans ce cadre, des résultats non publiés de notre équipe ont mis en évidence que des clones de tumeurs mammaires portant une p53 mutée sont moins sensibles à l'apoptose induite par la voie PFN/GzmB que les cellules tumorales parentales portant une p53 sauvage. Sur la base de ces différents travaux, nous avons donc voulu déterminer si la réactivation de p53 dans des cellules tumorales portant une p53 non fonctionnelle peut potentialiser la réponse cytotoxique antitumorale.

Au cours de ces dernières années, de nombreuses petites molécules pharmacologiques qui ciblent et restaurent l'activité sauvage des mutants de p53, ont été développées dans un but thérapeutique (Yu et al., 2014). Les travaux présentés au cours des pages suivantes ont donc pour but de déterminer si une approche de restauration pharmacologique d'une fonction p53 sauvage dans des cellules tumorales présentant une p53 mutée peut augmenter leur susceptibilité à la lyse par les effecteurs cytotoxiques et de définir les mécanismes moléculaires qui y seraient associés.

Nous avons ainsi utilisé une stratégie pharmacologique pour réactiver la fonction transcriptionnelle de p53 dans des lignées d'adénocarcinomes mammaires possédant une p53 mutée. Nos résultats montrent que la réactivation de p53, notamment grâce à la petite molécule CP-31398, permet de sensibiliser ces cellules tumorales à la lyse induite par les cellules NK. De plus, nos résultats actuels ont démontré que cette sensibilisation fait intervenir un processus d'autophagie permettant la séquestration de la protéine anti-apoptotique Bcl-xL dans des autophagosomes. En effet, cette séquestration de Bcl-xL dans des autophagosomes induits par la réactivation de p53 semble augmenter la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe des cellules cibles induite par les cellules NK via la voie GzmB. Ces résultats suggèrent donc que le rétablissement pharmacologique de l'activité transcriptionnelle de p53 dans des cellules tumorales portant une p53 mutée permet d'augmenter leur susceptibilité à la lyse par les effecteurs cytotoxiques *via* l'induction de l'autophagie.

## Matériel et méthodes

### • Culture cellulaire et traitement

Les lignées d'adénocarcinome mammaire MDA-MB231 et T47D ont été cultivées dans du milieu RPMI 1640/Glutamax (Gibco) contenant 10% de sérum de veau foetal (SVF), 1% de pyruvate de sodium (Gibco) et 1% de pénicilline/streptomycine (Gibco). Le même milieu supplémenté de 300U/mL d'IL-2 recombinante a été utilisé pour maintenir en culture la lignée NK92 et les cellules NK isolées par sélection positive (CD56 Positive Selection Kit ; Stem Cell) à partir du sang périphérique de donneurs sains (NKd). Toutes les cellules ont été maintenues en culture dans un incubateur à 37°C sous atmosphère humide contenant 5% de CO<sub>2</sub>. Pour la réactivation de p53, les cellules tumorales ont été prétraitées 24 h ou 48 h avec 7,5µg/mL de CP-31389 (Sigma-Aldrich). Dans certains cas, les cellules cibles ont été traitées avec 20 µM de pifithrine-α (PFT-α) (Sigma-Aldrich) ou du DMSO de manière simultanée avec le traitement par CP-31398.

### • Western blot

Les extraits cellulaires totaux ont été préparés en lysant des cellules dans un tampon RIPA (Thermo-Fisher Scientific) contenant un mélange d'inhibiteurs de protéase et de phosphatase (Thermo-Fisher Scientific). Dans certains cas, les cellules MDA-MB231 traitées ou non avec CP-31398 et les cellules NKd ont été co-incubées au rapport effecteur: cible de 3:1 en milieu complet pendant 30 min à 37°C. Les cellules ont été ensuite lavées et des extraits protéiques totaux ont été préparés pour analyse. La concentration protéique des échantillons a été déterminée par spectrophotométrie selon la technique BCA (BioRad protein assay, Biorad). Les protéines (10 à 30 µg) ont été dénaturées avec du tampon Laemmli 1X (0.06M Tris HCl pH 6.8, 2% SDS, 10% glycérol, 1% β-mercaptoethanol, bleu de bromophénol, eau) puis chauffées pendant 5 minutes à 95°C. Les protéines ont été ensuite séparées par électrophorèse sur des gels d'acrylamide (SDS PAGE) (BioRad) puis ont été transférées sur une membrane de nitrocellulose (Thermo-Fisher Scientific). Les membranes ont été saturées 1 heure à température ambiante dans un tampon de saturation (TBS, 0,1% Tween-20, 5% lait). Les membranes ont été ensuite incubées toute la nuit à 4°C avec l'anticorps primaire, dilué selon

les recommandations du fournisseur, dans le tampon de saturation. Après lavages, les membranes ont été incubées 1 heure à température ambiante avec l'anticorps secondaire approprié dilué dans le tampon de saturation, couplé à la HRP. Après lavages, les membranes ont été révélées par chimioluminescence grâce à un substrat de la HRP (BioRad). Les anticorps utilisés sont les suivants: anti-p53 (clone DO-1), anti-Bcl-2 (clone 100), anti-Bcl-XL (H-5) (Santa Cruz Bio.), anti-caspase 3 (clone 3G2), anti-Becclin1 (clone G-11), anti-caspase 3 clivée (p19/p17) (#9664S), anti-PARP (#9542P), anti-Bid ((#2002S), anti-LC3B (#2775), et anti-Atg5 (#12994) (Cell Signaling), anti-tBid (p15) (Invitrogen) et anti-actine conjugué à HRP (Sigma-Aldrich).

La quantification des niveaux d'expression en western blot a été effectuée en utilisant le logiciel de densitométrie ImageJ.

#### • Quantification de l'apoptose

Les cellules MDA-MB231, traitées ou non avec CP-31398 durant 48 hrs ont été resuspendues dans 50 µl de tampon annexine (150 mM de NaCl, 5 mM de KCl, 1 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1.8 mM de CaCl<sub>2</sub>, 10 mM Hepes pH 7.4,) contenant de l'annexine V-APC (ThermoFisher scientific). Après 10 minutes d'incubation à température ambiante, 100 µL de tampon Annexine contenant 10 µg/ml d'iodure de propidium (IP, Sigma-Aldrich) ont été ajoutés. L'apoptose a ensuite été estimée en analysant les cellules par cytométrie en flux (C6 Accuri, BD Biosciences).

#### • RT-qPCR

Les cellules cibles ont été lysées et les ARN ont été purifiés en utilisant une solution de TRIzol (Invitrogen). Les ARN ont été dosés à l'aide d'un spectrophotomètre Bio Spec-nano (Shimadzu Biotech). La synthèse d'ADNc a ensuite été réalisée à partir d'un volume correspondant à 1 µg d'ARN auquel a été ajouté un mélange contenant de la transcriptase inverse (Revert Aid H Minus Reverse transcriptase, 200 U/µL, Thermo-Fisher Scientific), un tampon 5X Reaction Buffer (Thermo-Fisher Scientific), des dNTP (Thermo-Fisher Scientific) et un inhibiteur de RNase (RiboLock RNase inhibitor, 40 U/µL, Thermo-Fisher Scientific). La réaction de polymérisation a été réalisée dans un thermocycleur Gene Amp PCR system 9700,



pendant 10 minutes à 25°C, puis 1 heure à 42 °C et enfin 10 minutes à 70°C. La PCR quantitative a été réalisée à partir de 6 ng d'ADNc, auxquels ont été ajoutés le couple d'amorces sens et anti-sens (0,4 pmol/μL) du gène d'intérêt, et le mix SYBR Green contenant la Taq Polymérase, le tampon de réaction, les nucléotides et le SYBR Green (FastStart Universal SYBR Green Master, Roche Diagnostics). La PCR a été réalisée grâce à l'appareil StepOne plus Real Time PCR system (Applied Biosystems) et les résultats ont été analysés à partir du logiciel StepOne software en utilisant la méthode de comparaison de CT (2-ΔCT). Les séquences d'amorces utilisées (5'--> 3') sont les suivantes:

<b>Gène</b>	<b>P<sub>fw</sub> (5'--&gt;3')</b>	<b>P<sub>rv</sub> (5'--&gt;3')</b>
CDKN1A (p21)	CTGCCGAAGTCAGTTCCTTGT	CATGGGTTCTGACGGACATC
ULK1	GTCACACGCCACATAACAG	TCTTCTAAGTCCAAGCACA
ULK2	TTTAAATACAGAACGACCAATGGA	GGAGGTGCCAGAACACCA
ATG5	CAACTTGTTTCACGCTATATCAGG	CACTTTGTCAGTTACCAACGTCA
GABARAPL2	CCGTCGTTGTTGTTGTGCT	CTCCACGCATCTGTGTTC
ZFYVE1	ATCCCCGATGACCAGATG	TCATGCTTTTCTTACATCCAACC
ATG12	CATAAAAACACTTAGAGCAAACACTACCA	CAGATAAAAACCAGAATAACTGGACA
DRAM-1	TGATACGGGAACAACACCTC	GACAATGCCCATTCGAAAC
SESN-1	TGGACTCTGCAGCAGAGATT	CTGATGGACGATGAGGTGTT

### Test de cytotoxicité

L'activité cytotoxique des cellules NK a été mesurée par un test conventionnel de libération de <sup>51</sup>CrNa2O4 (<sup>51</sup>Cr) (Amersham-Biosciences). Brièvement, un million de cellules cibles (tumoraux) ont été marquées avec 100μCi de chrome radioactif pendant 1h à 37°C. Après lavage, 2000 cellules cibles ont été déposées dans chaque puits de plaques 96 puits à fond rond. Les cellules effectrices (NK) ont alors ajoutées à différents rapports effecteur/cible. Après 4h d'incubation, les surnageants de coculture ont été ensuite transférés sur une plaque LumaPlate™-96 puits. Celles-ci ont été placées 18h à 56°C. La mesure de la radioactivité présente a été réalisées grâce à un TopCount NXT. Le pourcentage de lyse spécifique a alors été calculé de manière comme décrit précédemment (Meslin et al., 2007). L'inhibition de la voie cytotoxique induit par PFN/Gzm a été effectuée en utilisant une préincubation de cellules effectrices pendant 2 h avec de la concanamycine A 100 nM (CMA Sigma-Aldrich) (concentration de CMA pendant la lyse: 50 nM). Les expériences ont été effectuées en triplicats.

#### • Cytométrie en flux

L'analyse des cellules tumorales a été réalisée par immunofluorescence directe ou indirecte. Brièvement, pour l'immunofluorescence direct  $5 \times 10^5$  cellules ont été incubées pendant 30 min à 4°C en présence du contrôle isotopique approprié ou de l'un des anticorps spécifiques suivant: anti-Fas-FITC (UB2, Beckman Coulter); anti-DR4-PE (DJR1, Bio Legend); anti-DR5-PE (DJR2-4 (7-8), Bio Legend); anti-ULBP-1-PE (clone 170818); anti-ULBP-2/5/6-APC (clone 165903); anti-ULBP-3-PE (clone 166510); anti-ULBP-4-PE (clone 709116) (R&D System). Les anticorps de souris anti-ICAM-1 et anti-HLA-A2.1 (MA2.1) proviennent d'ascites générées au laboratoire. Les cellules ont ensuite été lavées avec du PBS IX. Dans le cas d'une immunofluorescence indirecte, les cellules ont ensuite été incubées pendant 20 min avec l'Ac secondaire approprié couplé à de l'Alexa Fluor®488 (Life Technologies), puis lavées. Les cellules ont été fixées dans du PBS 1X contenant 2% de formaldéhyde (Sigma-Aldrich). Les acquisitions ont été effectuées à l'aide d'un cytomètre de flux Accuri™ C6 (BD Biosciences) et les données ont été traitées à l'aide du programme FlowJo.

#### • Quantification de la formation de conjugués

Les cellules MDA-MB231 prétraitées ou non avec CP-31398 et les cellules NK92 ont été respectivement marquées pendant 10 min avec les colorants lipophiles DiO ou DiD (Molecular Probes) selon les instructions du fabricant et lavées 3 fois avec du PBS préchauffé à 37°C. Les cellules cibles MDA-MB231 ont ensuite été incubées avec des cellules effectrices NK92 au rapport effecteur: cible de 3:1 en milieu sans  $\text{Ca}^{2+}$  (HBSS contenant 10 mM d'Hepes pH 7,5 et 0.4% de BSA) pendant 30 min à 37°C pour permettre la formation de conjugué avant l'analyse par cytométrie en flux (Accuri™ C6 ; BD Biosciences). Le pourcentage de cellules MDA-MB231  $\text{DiO}^+$  couplée à des cellules NK  $\text{DiD}^+$ , représentant les conjugués immuns, a été quantifié à l'aide du programme FlowJo

#### • Analyse du profil d'expression génique (transcriptome)

Les ARNs totaux des cellules MDA-MB 231 traitée ou non avec CP-31398 pendant différents temps (24 ou 48 heures) ont été purifiés en utilisant une solution de TRIzol (Invitrogen) selon les recommandations du fournisseur. Ces ARNs ont été hybridés en «Dual Color» sur des

puces Agilent Human GE 8X60K (AgilentTechnologies, 039494). Les données ont été extraites des images ainsi obtenues par le logiciel « Feature Extraction 10.7.3.1» (Agilent) . Ces données ont été transformées en logarithme de base 2 et ont subies une normalisation intra-array (lowess) et inter array (quantiles). Plusieurs analyses statistiques ont ensuite été réalisées par la plateforme bioinformatique de l'Institut Gustave Roussy (UGF) afin de ne garder que les gènes dont l'expression est significativement modifiée en réponse au traitement par CP-31398.

#### • Microscopie

Les cellules MDA-MB231 ont été transfectées de manière stable avec un vecteur codant pour la protéine LC3-tomato par du FuGENE® HD Transfection Reagent (Promega). Les cellules ont ensuite été cultivées sur lamelles de verre recouverte de collagène (Sigma-Aldrich). Après 48h de traitement avec CP-31398, les cellules ont été fixées, perméabilisées et marquées avec un anticorps anti-Bcl-xL (H-5) , puis incubées avec un anticorps secondaire anti-souris conjugué à de l'Alexa Fluor 488 (Life Technologies) comme décrit précédemment (Thiery et al., 2011). Les lamelles ont été ensuite lavées 3 fois dans du PBS et ont été montées grâce à du Vectashield contenant du DAPI (Vector Laboratories). L'analyse a été effectuée grâce à un microscope à épifluorescence (microscope IX83, Olympus) et au logiciel CellSense Dimension. (Olympus).

#### • Mesure de l'autophagie par cytométrie en flux

Des cellules MDA-MB231 traitées ou non pendant 48h heures avec 7.5 µg/mL de CP-31398 ont été lavées avec du PBS puis incubées pendant 30 minutes à 37°C à l'abri de la lumière avec du Cyto-ID-green (Cyto-ID Autophagy Detection Kit ; Enzo Life Science) qui marque spécifiquement les préautophagosomes, les autophagosomes, les autolysosomes mais pas les lysosomes. Les cellules ont été de nouveau lavées avec le tampon de dilution et la fluorescence a été mesurée par cytométrie en flux (BD-Accuri C6).

#### • Inhibition de l'autophagie par interférence ARN

L'inhibition de l'autophagie par interférence ARN dans les MDA-MB231 a été réalisée en utilisant des siRNA contrôles (Ambion Silencer Select ID:4390843) ou ciblant spécifiquement Beclin-1 (BECN-1) (Ambion Silencer Select ID: S16537) et ATG5 (Qiagen APG5L\_6 FlexiTube siRNA SI02655310). Les cellules ont été transfectées par ces siRNAs à l'aide de la Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen). Une deuxième transfection a été réalisée 24h après la première transfection et les cellules ont été incubées 48h avec +/- CP-31398 avant analyse.

• Mesure de la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe (MOMP)

La MOMP a été évaluée par un marquage avec du 3,3'-dihexyloxycarbocyanine iodide (DioC6 (3)) (Life Technologies). Des cellules MDA-MB231 pré-marquée avec 1 pM de Vybrant DiD (Life Technologies) ont été incubées avec des NKd (rapport Effecteur:cible = 5:1) pendant 30mn. Les cellules ont ensuite été incubées 15 min à 37 ° C avec 40 nM de DioC6 (3). Les cellules marquées ont ensuite été lavées et remises en suspension dans du PBS et analysées immédiatement par cytométrie en flux (BD Accuri C6). L'analyse du marquage DioC6 (3) a été effectuée sur les cellules cibles positive pour le marquage Vybrant DiD.

• Traitement par PFN et GzmB

$0,5 \times 10^6$  cellules MDA-MB231 +/- CP-31398 ont été lavées et resuspendues dans un tampon HBSS (Gibco) contenant 10 mM d'Hepes pH 7,5, 4 mM de CaCl<sub>2</sub> et 0,4% de BSA. La PFN à dose sublytique et le GzmB recombinant humain (100 nM) ont été dilués dans un tampon HBSS contenant 10 mM d'Hepes pH 7,5 avant d'être ajoutés aux cellules qui ont été incubées pendant 30 mn à 37°C. Les cellules ont été ensuite lavées et leurs extraits protéiques pour le western blot ont été préparés comme décrit plus haut.

## Résultats

### La réactivation de p53 par CP-31398 sensibilise les cellules tumorales à la lyse par les cellules NK

Dans le but d'étudier l'effet de la réactivation de p53 mutée (mutp53) sur la mort cellulaire induite par les effecteurs cytotoxiques, nous avons utilisé la lignée cellulaire d'adénocarcinome mammaire MDA-MB231 possédant une p53 mutée au niveau de son domaine de liaison à l'ADN en position 280 (R280K). Cette mutation aboutit à la synthèse d'une protéine de conformation stable mais présentant une structure tridimensionnelle différente par rapport à la protéine sauvage, ce qui altère sa capacité à fixer à l'ADN et donc ses fonctions transcriptionnelles. En effet, cette mutation entraîne une accumulation de la protéine p53 mutante et une incapacité à induire la transcription de ses gènes cibles comme p21 en réponse aux radiations ionisantes (Figure 1A). Afin de rétablir une fonction p53 sauvage, nous avons traité ces cellules MDA-MB231 durant 48 hrs par la petite molécule CP-31398, une styrilquinazoline décrite pour son aptitude à induire un repliement correct des protéines p53 nouvellement synthétisées, entraînant leur stabilisation au niveau de leur site de liaison à l'ADN et donc réactivant leurs fonctions transcriptionnelles (Demma et al., 2004). Le traitement des cellules MDA-MB231 par CP-31398 a ainsi permis de restaurer l'activité transcriptionnelle de p53, comme le montre l'induction de l'expression de p21 tant au niveau transcriptionnel que protéique après 24h et 48h de traitement (Figure 1B-C). Par ailleurs, la dose de CP-31398 utilisée pour ces traitements n'induit qu'un faible niveau d'apoptose des cellules MDA-MB231 de l'ordre de 15% (Figure S1). De plus, et de manière importante, la réactivation de l'activité transcriptionnelle de p53 mutée par CP-31398 augmente la sensibilité des cellules tumorales MDA-MB231 à la lyse induite par les cellules NK92 ainsi que par des cellules NK issues du sang périphérique de donneurs sains (NK donor) (figure 1D-E). Des résultats similaires ont été obtenus en utilisant la lignée d'adénocarcinome mammaire T47D, possédant également une mutation conformationnelle de p53 (L194F) (Figure S2). De plus, le traitement concomitant des cellules MDA-MB231 avec CP-31398 et de la pifithrine- $\alpha$  (PFT- $\alpha$  ; un inhibiteur de l'activité transcriptionnelle de p53 (Gudkov and Komarova, 2005)) altère l'effet de CP-31398 sur la lyse induite par les cellules NK (Figure 1F-G), suggérant que CP-

31398 potentialise la lyse des cellules MDA-MB231 par un mécanisme dépendant de l'activité transcriptionnelle de p53.

Afin d'identifier les mécanismes impliqués dans la sensibilisation aux cellules NK des cellules MDA-MB231 traitées par CP-31398, nous avons par la suite mesuré la formation de conjugués entre les cellules MDA-MB231 contrôles ou traitées par CP-31398 et les cellules NK. Le traitement par CP-31398 n'induit néanmoins pas d'augmentation significative du nombre de conjugués formés (Figure S3A-B) démontrant que la réactivation de p53 dans ces cellules MDA-MB231 n'augmente par leur reconnaissance par les cellules NK. Etant donné que l'activité transcriptionnelle de p53 semble être cruciale dans la potentialisation de la lyse par les cellules NK des cellules MDA-MB231 traitées par CP-31398, nous avons également testé par cytométrie en flux si ce traitement modifie l'expression des gènes cibles de p53 bien connus pour être impliqués dans la mort des cellules cibles induite par les cellules NK, comme les récepteurs à domaine de mort Fas, DR4 et DR5, les molécules du CMH-I, les ULBPs (des ligands du récepteur activateur des cellules NK, NKG2D) ou ICAM-I (impliqués dans l'adhésion NK-cellule cible). Néanmoins, l'expression de ces différentes protéines ne semble pas être modifiée de manière significative par le traitement des cellules MDA-MB231 par CP-31398 (Figure S3C-G). L'ensemble de ces résultats démontre ainsi que CP-31398 potentialise la lyse des cellules MDA-MB231 par un mécanisme dépendant de la réactivation transcriptionnelle de p53 mais indépendant de la reconnaissance ou de l'activation des cellules NK, et également indépendant de la voie des récepteurs à domaine de mort.

### **La réactivation de p53 par CP-31398 active un processus d'autophagie**

Compte tenu des résultats précédemment décrits, nous avons réalisés une analyse globale du profil transcriptomique (cDNA microarray) des cellules MDA-MB231 traitées par CP-31398 durant 24 et 48 hrs afin d'identifier les gènes dont l'expression est modifiée par la réactivation de p53 dans les cellules MDA-MB231 et qui pourraient expliquer la potentialisation de leur lyse par les cellules NK. Les résultats obtenus montrent que l'expression de 500 et 2608 gènes est modulée après 24 et 48 hrs des cellules MDA-MB231 par CP-31398, respectivement (Figure 1H). De plus, une analyse ciblée de ces résultats a mis en évidence un enrichissement des gènes appartenant aux « hallmark\_P53\_pathway » (issu de

la base de données MSigDB) après traitement par CP-31398 (Figure 1I) confirmant la réactivation de p53 par CP-31398. Enfin, et de manière intéressante, une analyse ciblée de ces résultats, grâce à une liste de gènes clés responsables de la formation des autophagosomes chez les mammifères (préétablie par Mizushima *et al.* (Itakura and Mizushima, 2010)), nous a permis de mettre en évidence une surexpression d'un certain nombre de ces gènes après traitement des cellules MDA-M231 par CP-31398 (Figure 2A). De plus, nous avons validé ces résultats par qRT-PCR pour certains de ces gènes, et notamment pour les gènes codant pour des protéines impliquées dans la nucléation de la membrane d'isolation (*ULK1*, *ULK2* et *ZFYVE1*) et dans l'élongation et la maturation du phagophore (*ATG12*, *ATG5* et *GABARAPL2* (un des sept orthologues de LC3 chez les mammifères)). Les résultats obtenus montrent une augmentation significative de l'expression de l'ensemble de ces gènes à l'exception de *ULK2* après 24h et 48h de traitement par CP-31398 (Figure 2B). Enfin, nous avons également testé l'expression de deux gènes cibles de p53, *DRAM-1* et *SESN-1*, codant pour des protéines impliquées dans l'induction de l'autophagie, mais absents de la liste initialement utilisée pour l'analyse ciblée (figure 2C). L'expression de ces deux gènes est également augmentée après 24 hr de traitement par CP-31398, puis semble diminuer après 48 hr.

L'ensemble de ces résultats suggèrent l'induction d'un processus autophagique dans les cellules MDA-MB231 après réactivation de p53 grâce au traitement par CP-31398, nous avons par la suite validé la présence d'autophagosomes dans ces cellules. Des cellules MDA-MB231 transfectées avec un plasmide codant pour la protéine de fusion LC3-Tomato ont été traitées par CP-31398 durant 48 hrs puis analysées par microscopie. Les résultats obtenus montrent un marquage LC3 ponctiforme dans les cellules MDA-MB231 après traitement par CP-31398, typique de la présence d'autophagosomes (Tang et al., 2016), similaire à celui observé après traitement de ces cellules par de la chloroquine (CQ) (utilisée comme contrôle positif) (Figure 3A). Ces résultats ont d'autre part été confirmés par cytométrie en flux en utilisant du Cyto-ID-green qui marque spécifiquement les pré-autophagosomes, les autophagosomes, les autolysosomes mais pas les lysosomes (Figure 3B) et en mesurant la lipidation de LC3 (LC3 passant de la forme LC3-I à LC3-II) par western blot (Figure 3C-D). L'ensemble de ces résultats démontrent donc que la réactivation de p53 par CP-31398 induit la formation d'autophagosomes dans les cellules MDA-MB231.

### **L'autophagie induite par la réactivation de p53 est impliquée dans la sensibilisation des cellules tumorales à la lyse induite par les NK**

Dans le but de déterminer si l'autophagie induite par la réactivation de p53 est impliquée dans la sensibilisation des cellules tumorales à la lyse induite par les cellules NK, les cellules MDA-MB231 ont été transfectées par deux siRNAs ciblant ATG5 et Beclin-1 (deux protéines essentielles à la biogenèse des autophagosomes) (Figure 4A). Ces cellules ont ensuite été traitées par CP-31398 durant 48 hr avant d'évaluer leur sensibilité à la lyse induite par des cellules NK de donneur sain. Les résultats obtenus montrent que comme précédemment, les cellules MDA-MB231 transfectées par un siRNA contrôle puis traitées par CP-31398 sont plus sensibles à la lyse induite par les cellules NK que les cellules non traitées. De plus, et de manière importante, l'inhibition de l'expression de ATG5 et Beclin-1 abroge l'effet potentialisateur de CP-31398 sur la lyse des cellules MDA-MB231 induite par les cellules NK (Figure 4B). Ces résultats démontrent donc que la réactivation de p53 par CP-31398 sensibilise les cellules tumorales à la lyse NK par l'activation d'un processus autophagique.

### **L'autophagie induite par la réactivation de p53 permet la séquestration de Bcl-xL**

Les résultats précédents suggèrent un rôle pro-apoptotique de l'autophagie dans les cellules MDA-MB231 traitées par CP-31398, lui permettant en particulier d'augmenter la sensibilité de ces cellules à la lyse induite par les cellules NK. Etant donné que la lyse des cellules MDA-MB231 induite par les cellules NK est dépendante de la voie PFN/Gzms (Figure S4), nous avons émis l'hypothèse que la formation d'autophagosomes suite à la réactivation de p53 dans les cellules MDA-MB231 pourrait rendre ces cellules moins résistantes à la mort induite par les cellules NK en séquestrant et/ou en dégradant des protéines anti-apoptotiques normalement impliquées dans le contrôle de la signalisation apoptotique induite par la voie PFN/Gzms. Des résultats préliminaires utilisant une approche de fractionnement pour isoler les autophagosomes après traitement des cellules MDA-MB231 par CP-31398 (qui restent néanmoins à confirmer et à compléter) ont notamment suggéré que ces autophagosomes pourraient contenir la protéine anti-apoptotique Bcl-xL (collaboration B.



Janjji, Luxembourg ; data not shown). Nous avons donc validé ce résultat en utilisant une approche de microscopie en utilisant des cellules MDA-MB231 transfectées avec le plasmide codant pour la protéine de fusion LC3-Tomato traitées par CP-31398 puis marquées avec un anticorps anti-Bcl-xL. Les résultats obtenus montrent clairement une colocalisation entre autophagosomes marqués par LC3 et Bcl-xL après traitement par CP-31398 (Figure 5A).

Puisque l'autophagie est un processus catabolique qui induit la dégradation de certaines protéines dans les vésicules autophagiques, nous avons également évalué si Bcl-xL, ou d'autres protéines anti-apoptotiques comme Bcl-2, cIAP-1 et cIAP-2 étaient dégradées après traitement des cellules MDA-MB231 par CP-31398. L'analyse de l'expression de ces protéines par western blot a cependant montré que CP-31398 n'induit pas de diminution du niveau d'expression de ces protéines anti-apoptotiques (Figure 5B). Néanmoins, nous avons pu observer que le flux autophagique est bloqué dans les cellules MDA-MB231 après traitement par CP-31398, ce qui pourrait expliquer ces résultats contradictoires. En effet, l'existence d'un flux autophagique fonctionnel se traduit normalement par une accumulation plus importante de LC3-II au niveau des autophagosomes en présence d'inhibiteurs de l'autophagie qui provoquent une accumulation continue des autophagosomes qui ne sont plus transformés en autolysosomes où LC3-II est théoriquement dégradé. En particulier, la chloroquine (CQ) augmente le pH lysosomal, et inhibe le flux autophagique en inhibant la fusion autophagosome-lysosome et la dégradation protéique au niveau des autolysosomes (Yang et al., 2013). Nous avons ainsi mesuré le flux autophagique induit par CP-31398 par western-blot par analyse du niveau d'expression de la protéine LC3-II au niveau des autophagosomes en présence et en absence de CQ. Ainsi, en présence de CP-31398 seul, et comme décrit précédemment, on note une augmentation du niveau d'expression de LC3-II par rapport aux cellules contrôles. Cependant, en présence de CP-31398 et de CQ, ce niveau d'expression de LC3-II n'est pas supérieur à celui des cellules traitées par CP-31398 seul (Figure 5C). Ces résultats suggèrent donc que le flux autophagique induit par la réactivation de p53 via CP-31398 est bloqué au stade autophagosome (sans fusion avec les lysosomes), et que la protéine Bcl-xL est simplement séquestrée dans ces structures sans y être dégradée, l'empêchant potentiellement de jouer son rôle de protéine anti-apoptotique.

## **La séquestration de Bcl-xL dans les autophagosomes induits par la réactivation de p53 semble potentialiser la voie apoptotique induite par le granzyme B**

Le rôle principal des protéines anti-apoptotiques de la famille de Bcl-2, en particulier Bcl-xL, est de protéger la cellule contre les stimuli apoptotiques en préservant l'intégrité de la membrane mitochondriale externe (MOM). Etant donné que la voie principale de lyse employée par les cellules NK pour détruire leurs cellules cibles est la voie de PFN/Gzms (Figure S4) dépendante en particulier du GzmB (data not shown) et que ce Gzm provoque la mort de la cellule cible en induisant une perméabilisation de la MOM (MOMP), nous avons émis l'hypothèse que dans les cellules cibles, la séquestration de Bcl-xL dans les autophagosomes induits par la réactivation de p53 pourrait potentialiser la MOMP induite par les cellules NK. Nous avons donc mesuré le potentiel transmembranaire mitochondrial ( $\Delta\Psi_M$ ) des cellules MDA-MB231 traitées ou non par CP-31398 après une co-culture avec des cellules NK. Les résultats obtenus par cytométrie en flux après un marquage par du DioC6 (3) montrent que la perte du  $\Delta\Psi_M$  est augmentée dans les cellules cibles traitées par CP-31398 en réponse aux cellules NK par rapport aux cellules cibles non traitées par CP-31398 (Figure 6A-B). Ces résultats suggèrent donc que, dans les cellules cibles, la séquestration de Bcl-xL dans les autophagosomes induits par la réactivation de p53 potentialise effectivement la MOMP induite par les cellules NK. Afin de renforcer ces résultats, nous avons également évalué le clivage des protéines impliquées dans la voie apoptotique du GzmB en aval de la perméabilisation des mitochondries. En particulier, nous avons mesuré le clivage de la pro-caspase 3 et de PARP dans les cellules MDA-MB231 en réponse aux cellules NK (Figure 6C) et en réponse à PFN/GzmB (Figure 6D). De la même manière que pour la perte du  $\Delta\Psi_M$ , le clivage de la pro-caspase 3 et de PARP sont augmentées dans les cellules MDA-MB231 traitées par CP-31398 en réponse aux cellules NK ou au traitement par PFN/GzmB, et ce par rapport aux cellules cibles contrôles. De plus, il est important de noter que le clivage de Bid en réponse au traitement par PFN/GzmB (situé en amont des mitochondries) ne semble pas être affecté par le traitement par CP-31398. Dans l'ensemble, ces résultats démontrent qu'en réponse au GzmB ou aux cellules NK, la réactivation de p53 dans les cellules MDA-MB231 potentialise essentiellement la MOMP et les événements de la cascade apoptotique du GzmB situés en aval des mitochondries.

## Conclusion

Au cours de ce travail, nous avons déterminé l'impact de la restauration pharmacologique d'une fonction p53 sauvage sur la susceptibilité tumorale à la lyse par les effecteurs cytotoxiques, en utilisant principalement le modèle de cancer mammaire MDA-MB231 (exprimant une p53 mutée (R280K)) et la petite molécule CP-31398 décrite précédemment. Les résultats obtenus à l'heure actuelle montrent que le traitement des cellules MDA-MB231 par CP-31398 permet de réactiver la fonction transcriptionnelle de p53 comme le montre l'induction de son gène cible p21 et/ou l'analyse transcriptomique effectuée. De plus, le traitement par CP-31398 s'accompagne d'une potentialisation de la lyse des cellules MDA-MB231 par des cellules NK isolées à partir du sang périphérique de donneurs sains ou par le clone NK92. Ces résultats semblent donc indiquer que la restauration pharmacologique d'une fonction p53 sauvage dans des cellules portant une p53 mutée influence effectivement leur susceptibilité à la lyse par les effecteurs cytotoxiques.

En parallèle, nous avons pu observer une induction d'autophagie dans les cellules MDA-MB231 après traitement par CP-31398. Il est ainsi important de noter que dans certains contextes de stress, le processus d'autophagie peut fonctionner comme un mécanisme suppresseur de tumeurs (Boya et al., 2013) au cours duquel p53 active des gènes cibles qui codent pour des protéines impliquées dans diverses étapes de l'autophagie, notamment la biogenèse des autophagosomes (Gao et al., 2011; Kenzelmann Broz et al., 2013). Dans ce cadre, nous avons observé une sur-expression de plusieurs gènes codant pour des protéines impliquées dans l'autophagie après réactivation de p53 par la molécule CP-31398. En particulier, des gènes codant pour des protéines faisant partie intégrante du complexe ULK (*ULK1*, *ATG13*, *ATG101* et *FIP200*) ainsi que *DRAM-1* et *SENS-1* semblent être sur-exprimés après traitement par CP-31398. L'induction de ces gènes, et des protéines qui en résultent, pourrait donc participer à l'induction du processus autophagique induit par CP-31398. Néanmoins, des travaux supplémentaires seront nécessaires afin de valider d'une part l'importance de l'induction de ces gènes dans l'induction d'autophagie dépendante de la réactivation de p53 par CP-31398, notamment par une approche de siRNAs, et d'autre part pour déterminer si certains de ces gènes peuvent être des cibles directes encore non identifiées de p53.

Au cours de ce travail, nous avons également pu montrer que l'induction d'autophagie dans les cellules MDA-MB231 après traitement par CP-31398 est importante pour l'effet de la réactivation de p53 sur la potentialisation de la lyse induite par les cellules NK. Des travaux préliminaires de purification des autophagosomes et une analyse par microscopie nous ont par ailleurs permis de démontrer que ces autophagosomes contiennent la protéine anti-apoptotique Bcl-xL, qui semble être séquestrée dans ces structures mais pas dégradée. Dans ce cadre, il est important de noter que l'autophagie est un processus conservé au cours de l'évolution qui permet la dégradation dans les autophagosomes de certains composants du cytosol, organelles ou protéines. Les autophagosomes fusionnent normalement avec les lysosomes, leur contenu est ainsi dégradé puis recyclé sous la forme de molécules « basiques » pouvant être réutilisées. Le processus d'autophagie joue ainsi un rôle crucial dans le maintien de l'homéostasie cellulaire et contribue également à la survie cellulaire durant une période de stress. Dans ce contexte, l'autophagie possède une activité cytoprotectrice en prévenant ou en retardant la mort cellulaire (ou autophagie anti-apoptotique). Néanmoins, dans certains contextes, l'autophagie peut également faciliter certains événements liés au processus d'apoptose (ou autophagie pro-apoptotique). Nous avons donc montré au cours de ce travail que la formation d'autophagosomes suite au traitement par CP-31398 (réactivant p53) participe à la sensibilisation des cellules tumorales à la lyse induite par les cellules NK via une autophagie que l'on pourrait qualifier de pro-apoptotique. Néanmoins, des travaux supplémentaires seront clairement nécessaires afin de comprendre pourquoi le flux autophagique induit par CP-31398 reste bloqué, sans dégradation claire du contenu des autophagosomes (et notamment de Bcl-xL). De plus, des travaux sont actuellement en cours afin de déterminer si d'autres protéines anti-apoptotiques (comme Bcl-2, Mcl-1, Survivine, XIAP...) pourraient également être séquestrées dans les autophagosomes observées après traitement par CP-31398.

Finalement, nos travaux suggèrent que la séquestration de Bcl-xL dans les autophagosomes induits par la réactivation de p53 via la molécule CP-31398 permet de potentialiser la lyse des cellules tumorales par les cellules NK en favorisant la MOMP induite par le GzmB, et par conséquent favorise le clivage des substrats situés en aval des

mitochondries, comme par exemple la pro-caspase 3. Néanmoins, la séquestration d'autres protéines anti-apoptotiques citées ci-dessus pourrait également participer à ce processus.

En conclusion, nos travaux *in vitro* ont montré que la réactivation pharmacologique d'une fonction p53 sauvage potentialise la susceptibilité de cellules tumorales p53 mutée à la lyse induite par les cellules NK. Ces travaux seront d'autre part étendus afin de déterminer si cette réactivation par CP-31398 peut également potentialiser la lyse induite par les CTLs et si d'autres « réactivateurs » de p53 (notamment PRIMA-1<sup>MET</sup>) peuvent avoir le même effet. D'autre part, des travaux vont être menés afin de valider *in vivo* l'effet de la réactivation de p53 sur la croissance de xénogreffes de tumeurs humaines exprimant une p53 mutée chez des souris immunodéficientes avec ou sans injection de cellules NK ou CTL spécifiques de ces tumeurs, ceci dans le but de déterminer si la réactivation de p53 pourrait représenter une approche « adjuvante » utilisable dans le cadre de l'immunothérapie antitumorale, en combinaison avec d'autres traitements.

## Légendes des figures

### **Figure 1: La réactivation de p53 par CP-31398 sensibilise les cellules MDA-MB231 à la lyse induite par les cellules NK**

(A) Les cellules MDA-MB231 expriment une p53 mutée (R280K) conduisant à l'accumulation d'une protéine p53 non fonctionnelle transcriptionnellement incapable d'induire l'expression de sa cible p21 en réponse à l'irradiation (5Gy). (B-C) Le traitement des cellules MDA-MB231 par la molécule CP-31398 (7.5 µg/mL) durant 24 ou 48 hrs permet de restaurer l'activité transcriptionnelle de p53 et induit l'expression de p21 au niveau ARNm et protéique. Les résultats représentés en (B) sont représentatifs de trois expériences indépendantes. (D-E) La réactivation de p53 par CP-31398 (7.5 µg/mL ; 48 hrs) potentialise la lyse des cellules MDA-MB231 induite par le clone NK92 (D) ou par des cellules NK isolées à partir du sang périphérique d'un donneurs sain (NKd) (E). La cytotoxicité induite par ces cellules NK été mesurée à différents ratio effecteur : cible (E : T ratio) par un test de libération de <sup>51</sup>Cr. (F-G) La potentialisation de la lyse des cellules MDA-MB231 traitées par CP-31398 par les cellules NK est dépendante de l'activité transcriptionnelle de p53. Les cellules cibles ont été traitées par CP-31398 et de la PFT-α (un inhibiteur de l'activité transcriptionnelle de p53) avant de mesurer la lyse des cellules MDA-MB231 induite par le clone NK92 (F) ou par des cellules NKd (G). La cytotoxicité induite par ces cellules NK été mesurée au ratio effecteur : cible de 30 : 1 par un test de libération de <sup>51</sup>Cr. Les moyennes +/- écart type de trois expériences indépendantes (D-G) sont représentées. Les p-value (C-G) ont été calculées par un test de student (\*p<0.05, \*\*p<0.01) (H) Le traitement des cellules MDA-MB231 par CP-31398 modifie l'expression de nombreux gènes. Un volcano-plot est représenté pour chaque condition correspondant à l'analyse du transcriptome des cellules après 24 et 48 hrs de traitement. L'analyse a été basée sur un fold change >2 et une p value < 0.05. (I) Une analyse ciblée des gènes impliqués dans le « hallmark\_P53\_pathway » à partir des résultats obtenus en (H) a été réalisée et montrent un enrichissement de cette voie dans les cellules traitées par CP-31398.

### **Figure 2: La réactivation de p53 par CP-31398 induit l'expression de plusieurs gènes liés au processus de l'autophagie**

(A) Une analyse différentielle de l'expression de gènes clés responsables de la formation des autophagosomes a été réalisée à partir des résultats de l'analyse transcriptomique des cellules MDA-MB231 traitées durant 24 ou 48 hrs par 7.5 µg/mL de CP-31398 à 24 et 48hrs. Une augmentation significative de l'expression de ces gènes a été observée. (B) L'expression de certains de ces gènes identifiés en (A) (*ATG12*, *ATG5*, *GABARAPL2*, *ULK1*, *ULK2* et *ZFYVE*) a été vérifiée par qRT-PCR. (C) L'expression de deux gènes cibles direct de p53 (*DRAM-1* et *SESN-1*) a été testée par qRT-PCR 24 et 48 hrs après traitement des cellules MDA-MB231 par CP-31398. Les p-values (B-C) ont été calculées par un test de student.

**Figure 3: Le traitement par CP-31398 induit la formation d'autophagosomes dans les cellules MDA-MB231**

(A) La formation d'autophagosomes a été évaluée par microscopie à fluorescence dans des cellules MDA-MB231 exprimant la protéine de fusion LC3-tomato traitées ou non par CP-31398 pendant 48hrs. Le marquage ponctiforme pour LC3 dénote la présence d'autophagosomes. Ces images sont représentatives de trois expériences indépendantes. Barre d'échelle : 20 µm (B) La formation d'autophagosomes a été validée par cytométrie en flux à partir de cellules MDA-MB231 traitées ou non par CP-31398 pendant 48hrs puis marquées par la molécule Cyto-ID green permettant de mettre en évidence la présence d'autophagosomes. Un histogramme représentatif est présenté ainsi que le pourcentage de cellules positives +/- écart type de trois expériences indépendantes (entre parenthèses). (C-D) La formation d'autophagosomes dans les cellules MDA-MB231 traitées CP-31398 pendant 48hrs se traduit également par la lipidation de LC3 (passage de la forme LC3-I à LC3-II) évaluée par western blot (C). L'analyse du ratio LC3-II/LC3-I de trois Western Blot indépendants, mesurée par analyse densitométrique grâce au logiciel ImageJ, est représentée en (D). Un traitement par de la chloroquine (CQ) durant 16 hrs a été utilisé comme contrôle positif pour l'induction d'autophagie (A-D). Les p-values en (D) ont été calculées par un test de student.

**Figure 4: L'autophagie induite par la réactivation de p53 est impliquée dans la sensibilisation des cellules tumorales à la lyse induite par les cellules NK**

(A) Les cellules MDA-MB 231 ont été traitées par des siRNA contrôles (ctrl) ou dirigés contre Beclin-1 et/ou ATG5 durant 72 hrs. L'efficacité de l'inhibition de l'expression de Beclin-1 et ATG5 a été évaluée par western blot et en analysant les ratios ATG5/Actin et Becli/Actin par analyse densitométrique grâce au logiciel ImageJ. (B) Le traitement par CP-31398 ne potentialise pas la lyse par les cellules NKd des cellules MDA-MB231 dont l'expression de ATG5 et Beclin-1 (deux protéines clés pour la formation des autophagosomes) est inhibée. La cytotoxicité induite par ces cellules NKd été mesuré à différents ratio effecteur:cible (E:T ratio) par un test de libération de <sup>51</sup>Cr. Les moyennes +/- écart type de trois expériences indépendantes sont représentées. (\*p<0.05, \*\*p<0.005 ; calculées par un test de Student).

**Figure 5: Le traitement par CP-31398 induit la séquestration de Bcl-xL dans les autophagosomes**

(A) Suite au traitement durant 48 hrs avec CP-31398 des cellules MDA-MB231-LC3-tomato, la protéine Bcl-xL colocalise avec les autophagosomes. Des images de microscopie à fluorescence représentatives de deux expériences indépendantes sont présentées. Barre d'échelle : 20 µm. (B) L'expression des protéines anti-apoptotiques Bcl-xL, Bcl-2, cIAP-1 et cIAP-2 n'est pas modifiée dans les cellules MDA-MB231 traitées par CP-31398. Des western blot représentatifs sont présentés. (C) Le flux autophagique des cellules traitées ou non par CP-31398 durant 48hrs a été étudié en présence ou absence de chloroquine (HCQ) durant les 2,16 ou 24hrs précédents l'analyse. La présence de HCQ n'augmente pas l'accumulation de LC3-II en réponse à CP-31398, suggérant un blocage du flux autophagique au stade autophagosome et l'absence de fusion avec les lysosomes permettant de générer des autolysosomes. Un western blot représentatif est présenté

**Figure 6: La séquestration de Bcl-xL dans les autophagosomes après traitement par CP-31398 potentialise l'activation de la voie apoptotique mitochondriale induite par les cellules NK et le granzyme B**

(A-B) La séquestration de Bcl-xL dans les autophagosomes après traitement des cellules cibles par CP-31398 potentialise la dépolarisation mitochondriale induite par les cellules NK. Les cellules MDA-MB231 ont été prétraitées ou non durant 48 hrs avec CP-31398 avant



d'être incubées durant 30 min avec des cellules NKd. La perméabilisation de la membrane mitochondriale externe des cellules cibles a été évaluée en mesurant la perte du potentiel transmembranaire mitochondrial ( $\Delta\Psi_M$ ) par un marquage avec du DioC6 (3). L'analyse par cytométrie en flux montre une dépolarisation mitochondriale augmentée en réponse aux cellules NK dans les cellules cibles traitées par CP-31398 par rapport aux cellules cibles contrôle. Une expérience représentative est présentée en (A) et la moyenne +/- écart type du pourcentage de cellules DioC6 (3)<sup>low</sup> de trois expériences indépendantes est représentée en (B). Les p-values ont été calculées par un test de student. (C-D) La séquestration de Bcl-xL dans les autophagosomes après traitement des cellules MDA-MB231 par CP-31398 potentialise le clivage de la pro-caspase 3 et de PARP évalués par western blot après 30 min de traitement avec des cellules NKd (ratio effecteur :cible de 3 :1) (C) ou de la PFN et du GzmB recombinant (D). Les ratios pro-caspase3, caspase 3 clivée ou PARP clivée/Actin (C) ont été obtenus par analyse densitométrique grâce au logiciel ImageJ

**Figure S1: Le traitement par CP-31398 des cellules MDA-MB231 induit un faible taux d'apoptose**

Le taux d'apoptose des cellules MDA-MB231 traitée ou non durant 48 hrs par CP-31398 a été évaluée par un double marquage annexine-V et iodure de propidium (IP). Les cellules ont été analysées par cytométrie en flux. Des histogrammes représentatifs sont présentés en (A) et la moyenne +/- écarts type du pourcentage de cellules Annexin V<sup>+</sup> (apoptotiques) de trois expériences indépendantes est affichée en (B). La p-value a été calculée par un test de Student.

**Figure S2: La réactivation de p53 par CP-31398 sensibilise les cellules T47D à la lyse induite par les cellules NK**

(A) Les cellules T47D expriment une p53 mutée (L194F) conduisant à l'accumulation d'une protéine p53 non fonctionnelle transcriptionnellement incapable d'induire l'expression de sa cible p21 en réponse à l'irradiation (5Gy). (B-C) Le traitement des cellules T47D par la molécule CP-31398 (7.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) durant 24 ou 48 hrs permet de restaurer l'activité transcriptionnelle de p53 et induit l'expression de p21 au niveau ARNm et protéique. Les résultats représentés en (B) sont représentatifs de trois expériences indépendantes. (D) La

réactivation de p53 par CP-31398 (7.5 µg/mL ; 48 hrs) potentialise la lyse des cellules T47D induite par des cellules NK isolées à partir du sang périphérique d'un donneur sain (NKd). La cytotoxicité induite par ces cellules NK été mesurée à différents ratio effecteur:cible (E:T ratio) par un test de libération de <sup>51</sup>Cr. Les moyennes +/- écart type de trois expériences indépendantes sont représentées. (\*p<0.05, calculées par un test de Student).

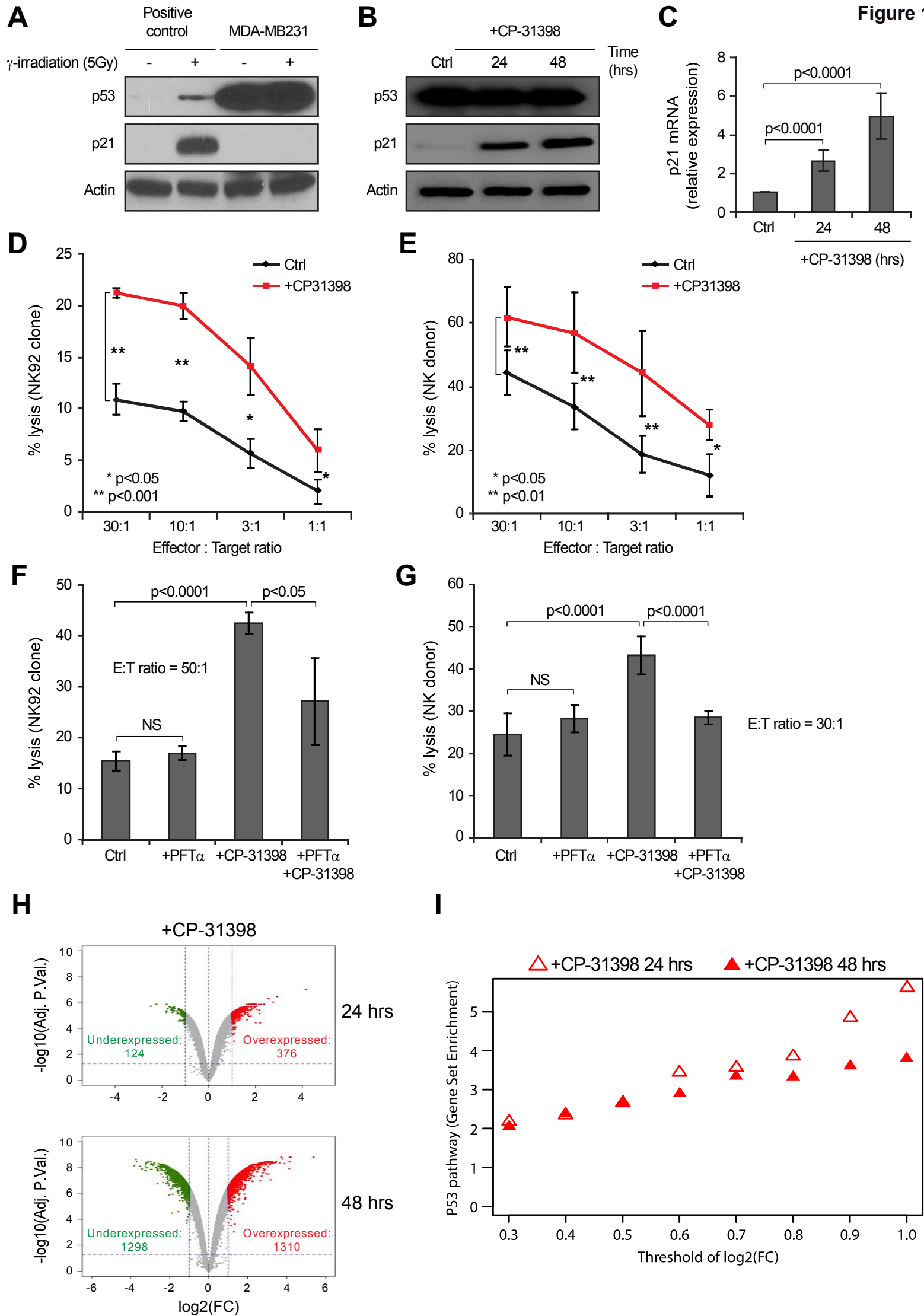
**Figure S3: La sensibilisation des cellules MDA-MB231 traitées par CP-31398 à la lyse induite par les cellules NK n'implique pas une augmentation de leur reconnaissance ou de leur expression des récepteurs à domaine de mort**

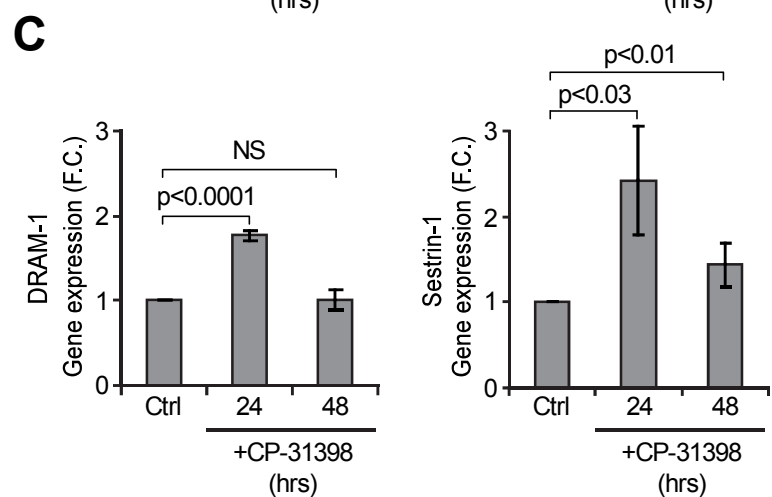
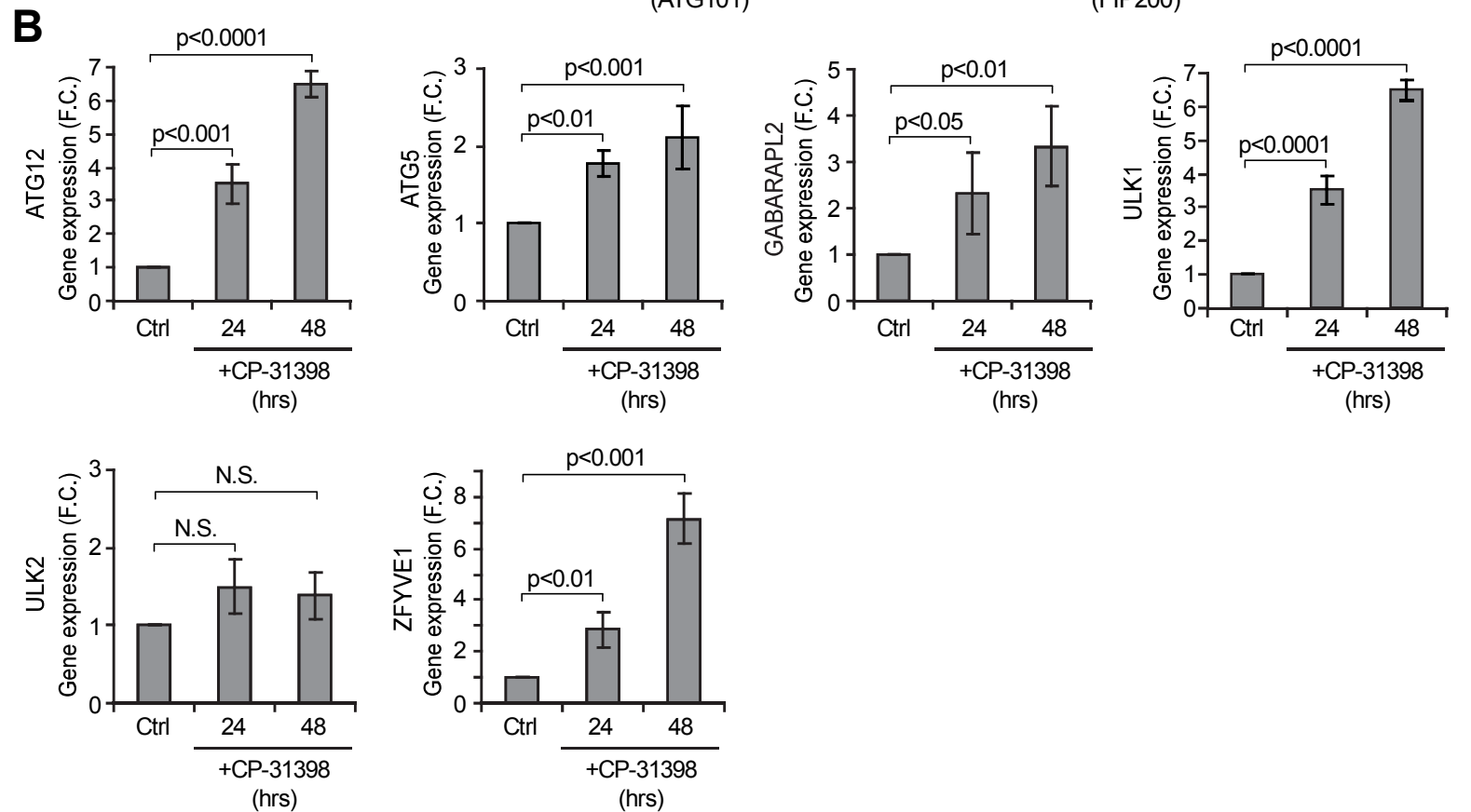
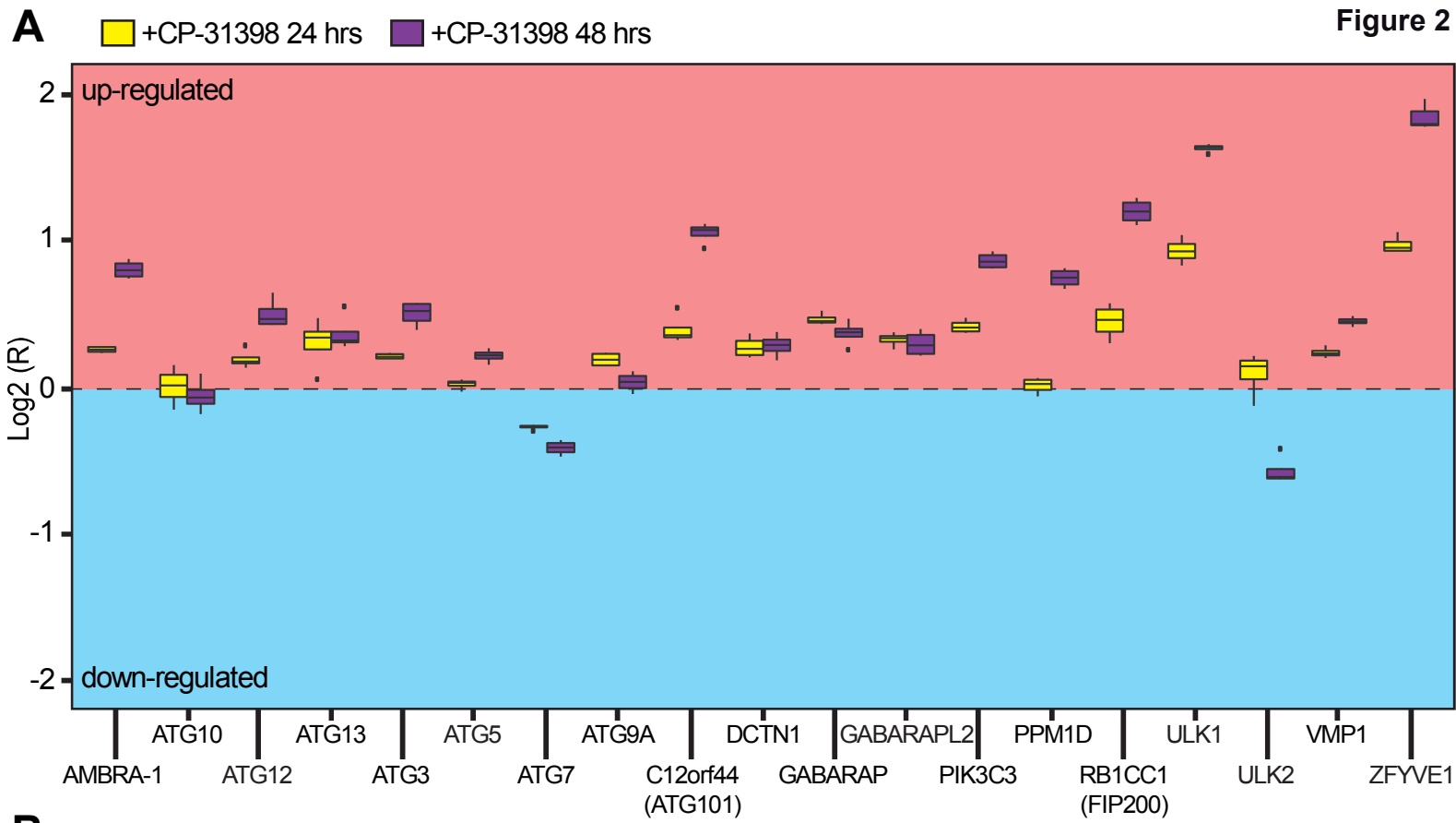
**(A-B)** Le traitement des cellules MDA-MB231 par CP31398 n'augmente pas la formation de conjugués entre les cellules NKd et les cellules tumorales cibles. Après 48h de traitement avec CP-31398, les cellules MDA-MB231 ont été marquées par la molécule fluorescente DiO, et incubées durant 30 min avec des cellules NK, préalablement marquées par la molécule fluorescente DiD (rapport effecteur :cible de 3:1). La formation de conjugués a été évaluée par cytométrie en flux en mesurant le pourcentage des cellules MDA-MB231 DiO<sup>+</sup> couplées à des cellules NK DiD<sup>+</sup>, représentant les conjugués immuns. Une expérience représentative et la stratégie de « gating » sont représentées en **(A)**. La moyenne ± écart type du pourcentage de cellules MDA-MB231 conjugués à des cellules NK provenant de trois expériences indépendantes est représentée en **(B)**. **(C-G)** Le traitement des cellules MDA-MB231 par CP-31398 ne modifie pas ou peu le niveau d'expression membranaire des récepteurs à domaine de mort Fas **(C)**, DR5 et DR4 **(D)**, des molécules du CMH-I **(E)**, des ligands activateurs des cellules NK (ULBP1, ULBP2/5/6, ULBP3) **(F)** et de la molécule d'adhésion ICAM-I. Les résultats obtenus par cytométrie en flux sont présentés sous forme de moyennes ± écarts types du pourcentage de cellules positives de trois expériences indépendantes. Les p-values ont été déterminées par un test de Student (N.S: non significatif).

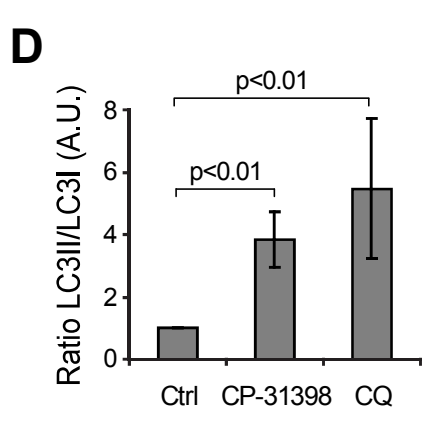
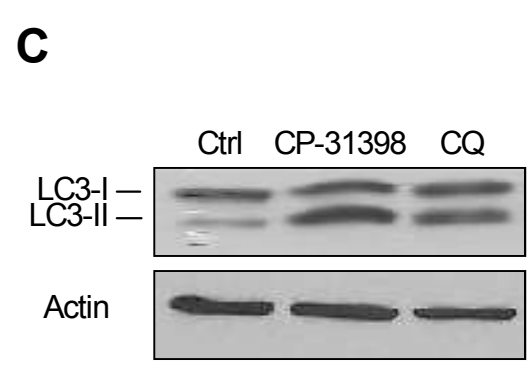
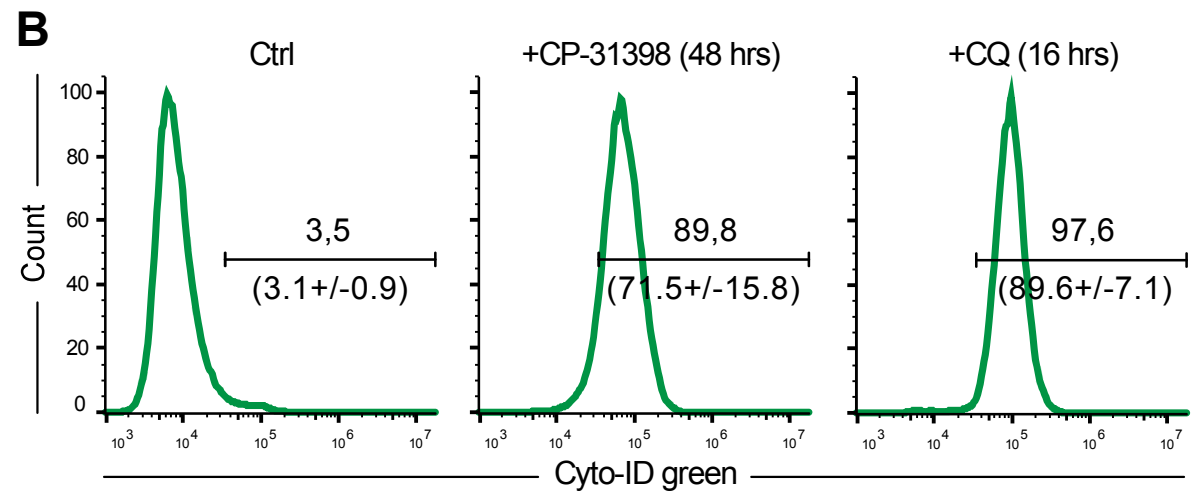
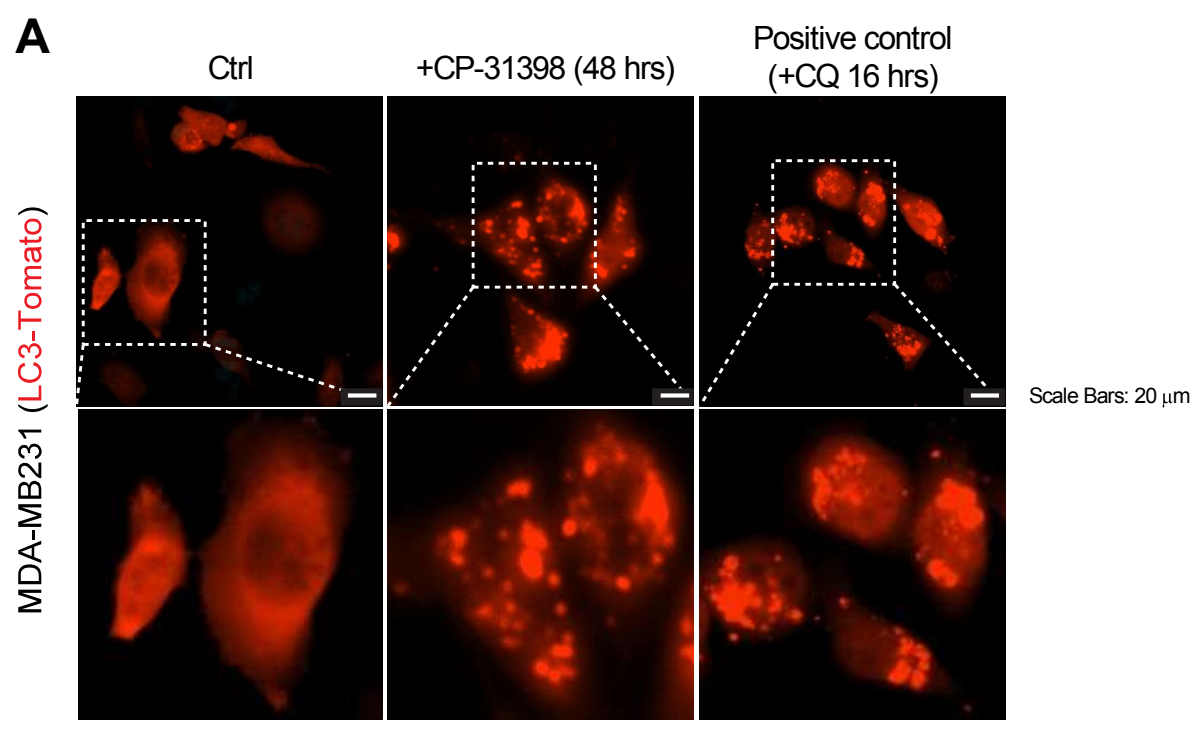
**Figure S4: La lyse des cellules MDA-M231 induite par les cellules NK est dépendante de la voie PFN/Gzms**

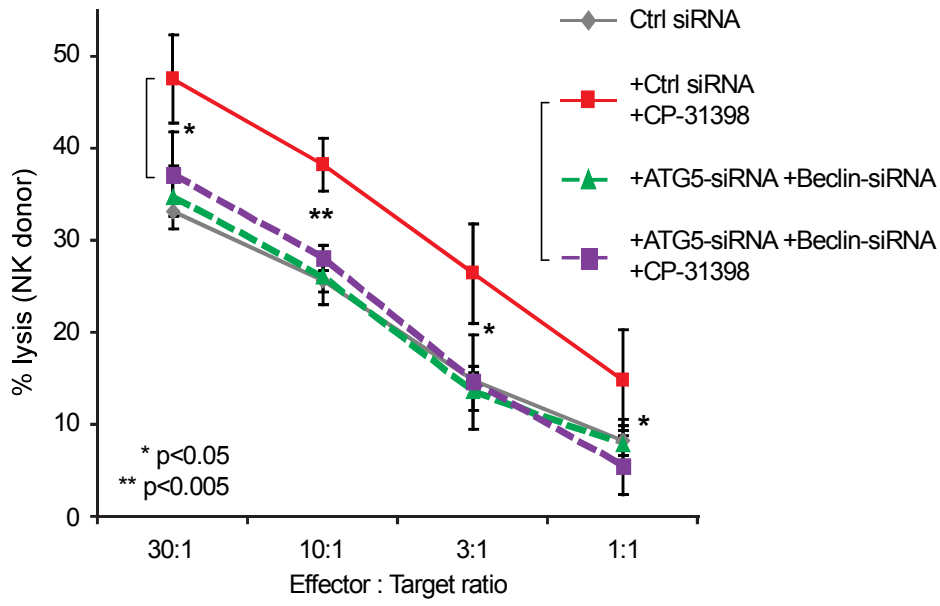
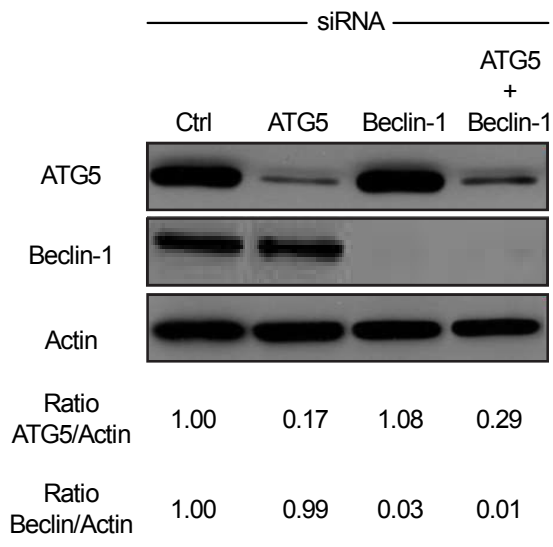
Le prétraitement du clone NK92 **(A)** ou des cellules NK isolées d'un donneur sain **(B)** par la concanamycin-A (CMA), un chélateur de calcium bloquant l'exocytose du contenu des granules cytotoxiques, abolie totalement le potentiel lytique des cellules NK vis-à-vis des

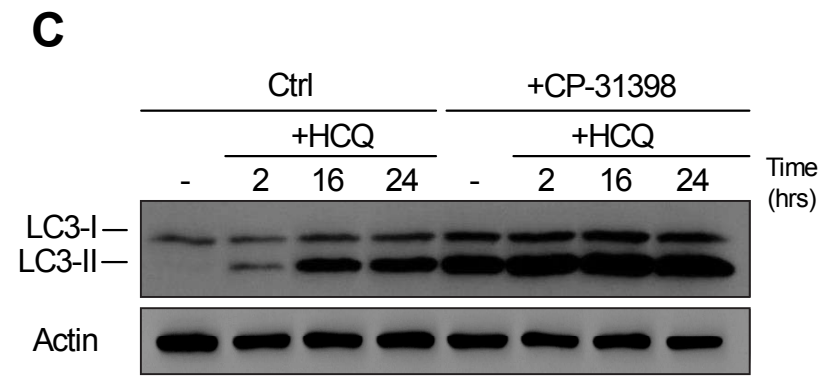
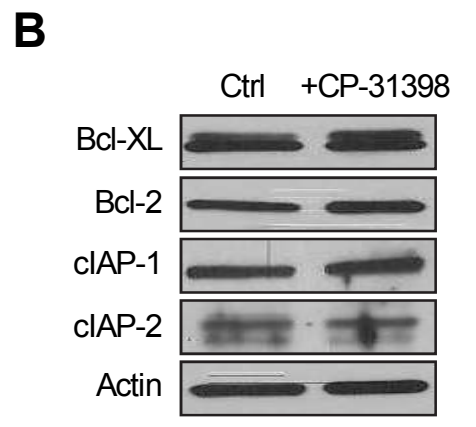
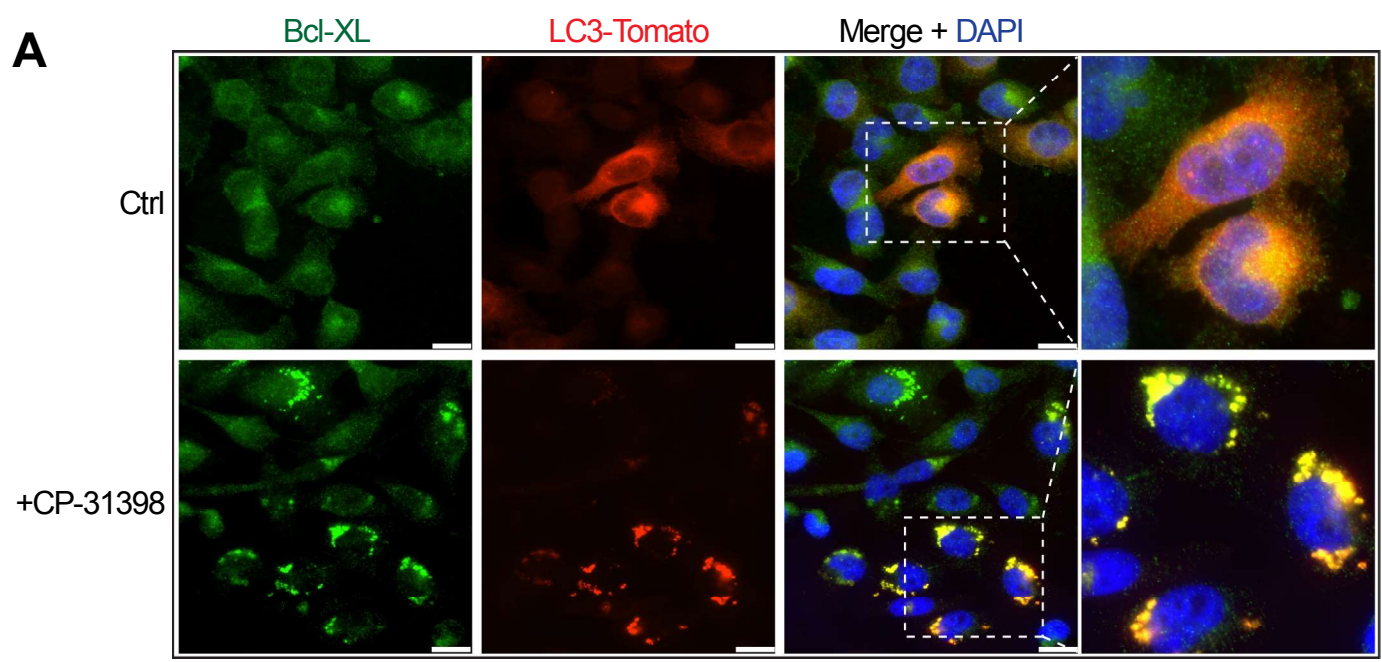
cellules MDA-MB231, démontrant que leur lyse est principalement médiée par la voie PFN/Gzms



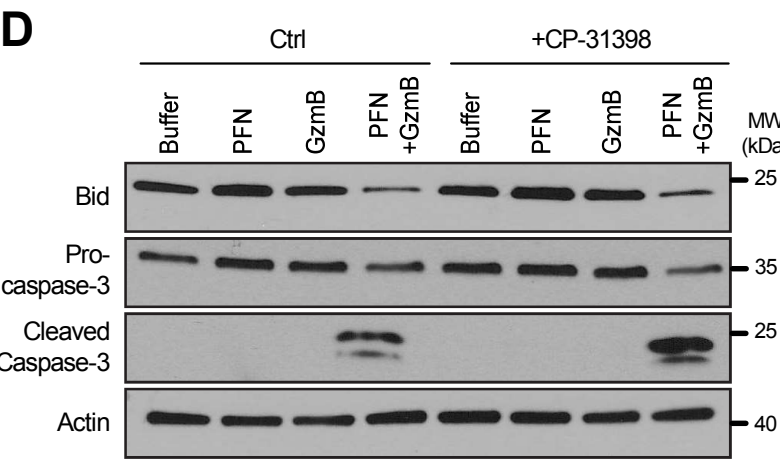
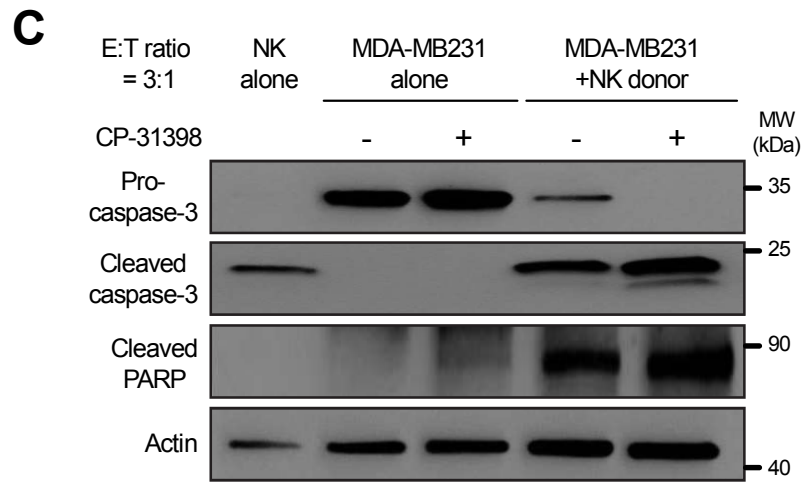
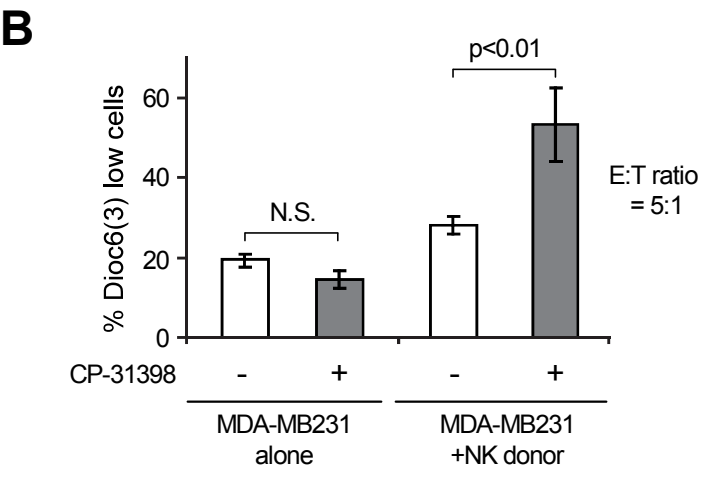
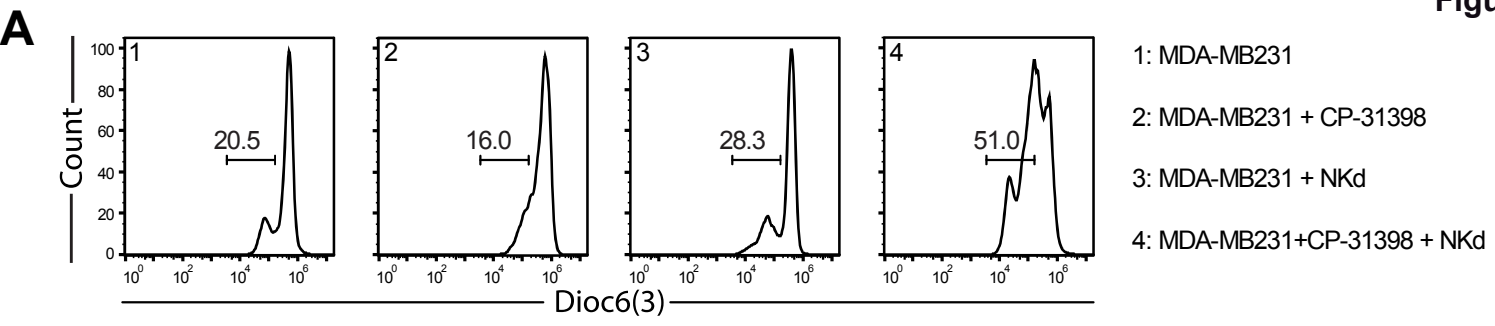




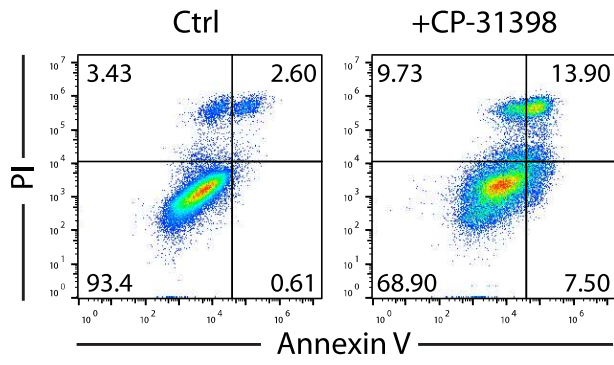
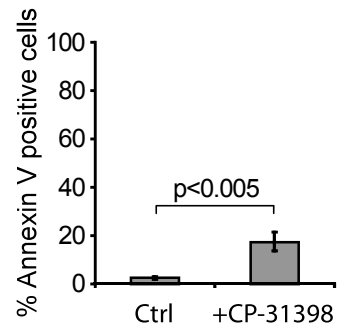




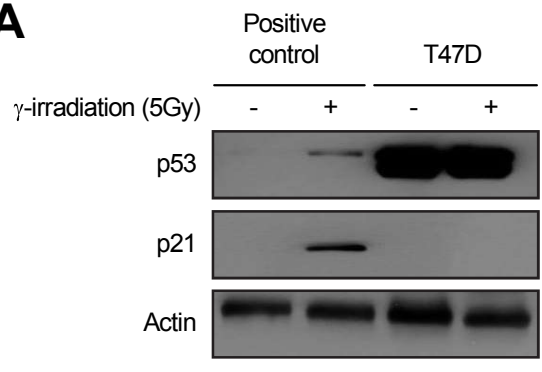




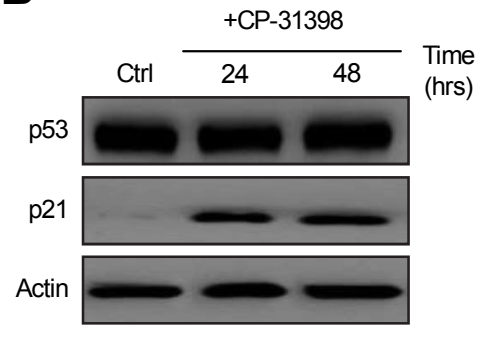
Ratio (A.U.)	Pro-caspase-3/Actin			
	1	1	0.25	0
Cleaved caspase-3/Actin	0	0	16.9	26.9
Cleaved PARP/Actin	0	1.6	12.1	22.7

**A****B**

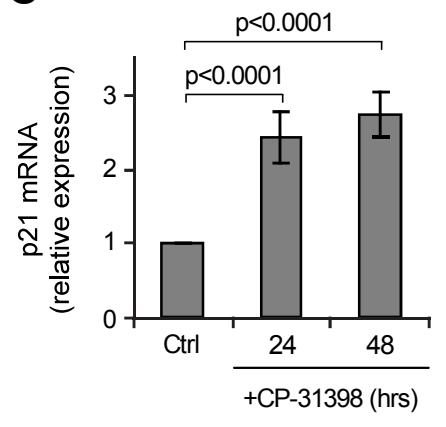
**A**



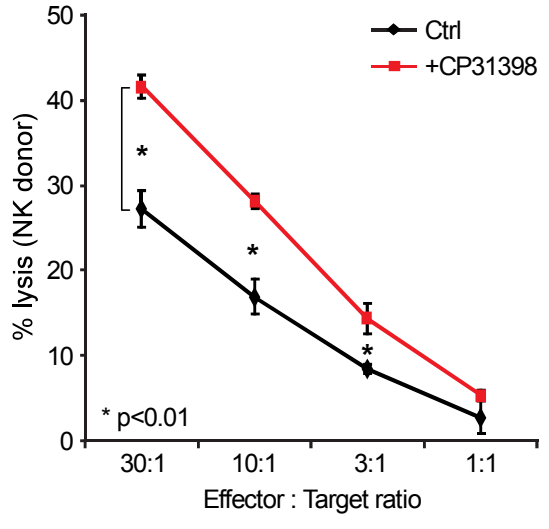
**B**

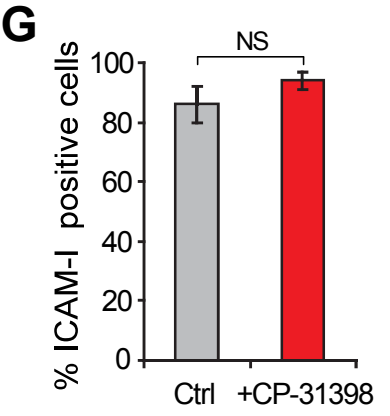
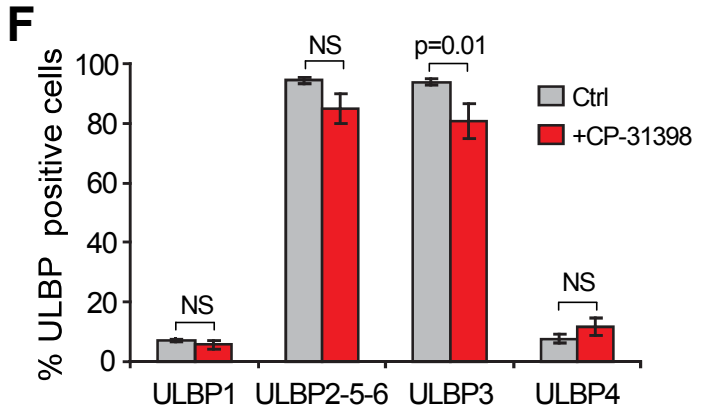
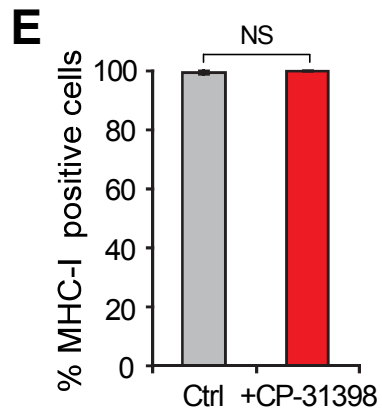
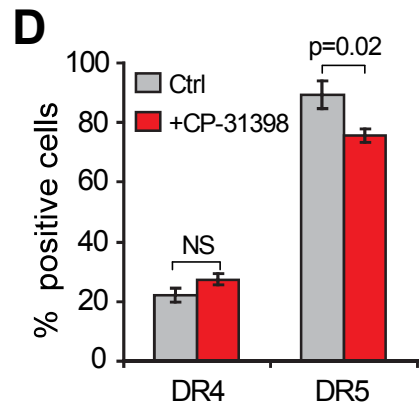
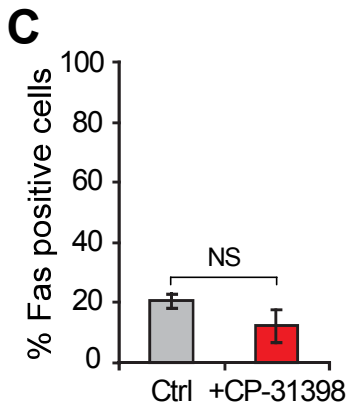
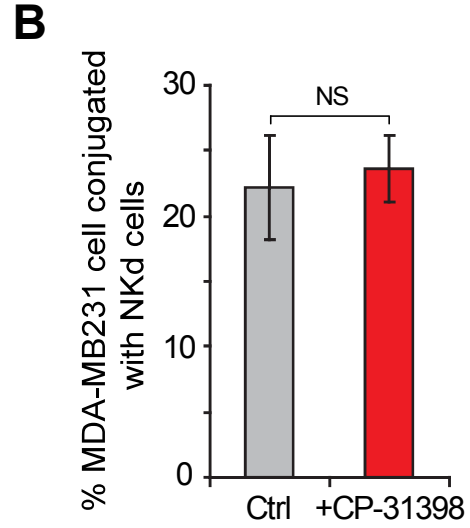
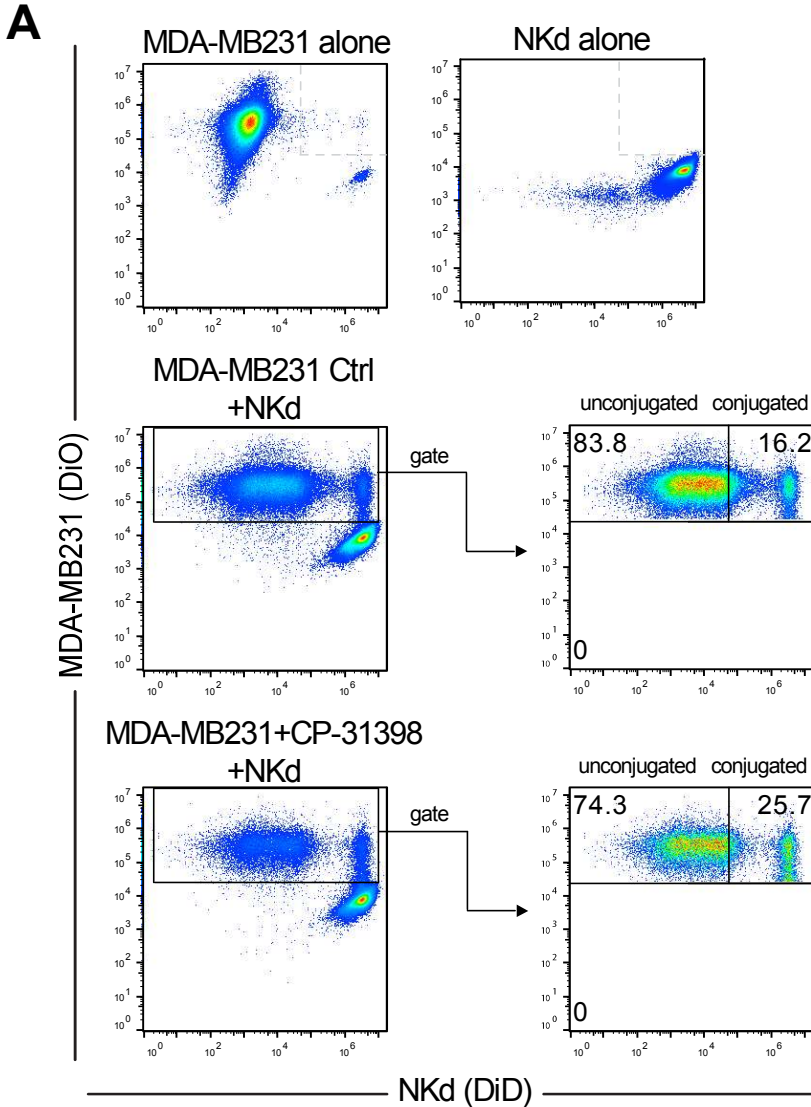


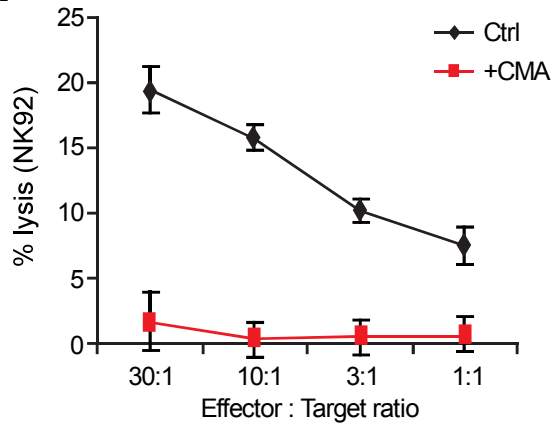
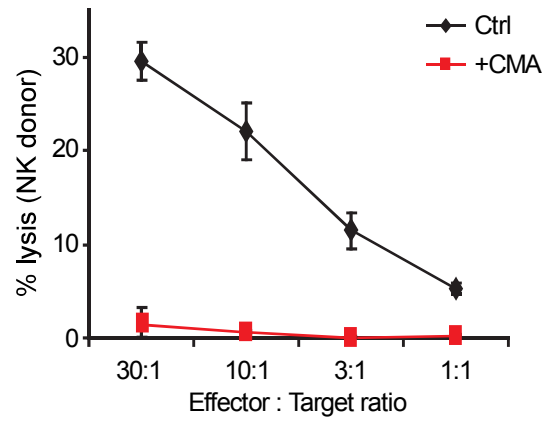
**C**



**D**





**A****B**

# Discussion



L'inefficacité, chez certains patients et pour certains types de cancers, des thérapies anticancéreuses conventionnelles y compris la chimiothérapie ou la radiothérapie justifie le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques antitumorales. Les progrès récents dans le domaine de l'immunologie des tumeurs ont conduit à l'élaboration d'approches immunologiques conduisant à la génération de cellules T effectrices capables de mieux reconnaître et éliminer la tumeur notamment, le transfert adoptif de lymphocytes T spécifiques, la vaccination ou les thérapies utilisant des antagonistes de l'antigène CTLA4 ou du ligand PDL-1, collectivement appelés inhibiteurs des "check-point" immunitaires. Cette dernière stratégie immunothérapeutique est largement la plus efficace à ce jour, permettant des réponses cliniques durables dans diverses tumeurs solides et hématologiques. Néanmoins, ces thérapies restent encore insuffisantes pour contrôler la progression tumorale chez certains patients. En effet, étant donné que les tumeurs malignes peuvent se développer chez des patients immuno-compétents, les lymphocytes cytotoxiques éliminent les cellules tumorales à forte immunogénicité et sélectionnant les variants tumoraux d'immunogénicité réduite, ceci favorise la génération de tumeurs très peu reconnues par le système immunitaire et ayant acquis différents mécanismes susceptibles de résister aux différentes fonctions des effecteurs cytotoxiques antitumoraux. Parmi ces mécanismes mis en place par la tumeur pour échapper au système immunitaire, la résistance tumorale à l'apoptose induite par ces cellules effectrices cytotoxiques représente un obstacle important qui s'oppose à l'efficacité de la réponse immune antitumorale. Une meilleure connaissance des mécanismes moléculaires des voies apoptotiques induites par les lymphocytes cytotoxiques, notamment par la voie PFN/GzmB qui est la voie cytotoxique principale, est ainsi cruciale afin d'identifier les altérations au niveau des cellules cancéreuses susceptibles de bloquer ces voies. En d'autres termes, la description des voies de signalisation apoptotiques induites par les CTL/NK pour détruire leurs cellules cibles, notamment tumorales, représente un élément majeur d'un point de vue fondamental mais également un enjeu majeur pour le développement de nouvelles thérapies ciblant ces mécanismes de résistance aux fonctions cytotoxiques des CTL/NK.

La progression tumorale est étroitement liée au caractère génétiquement instable des cellules cancéreuses. Cette instabilité génétique s'accompagne très souvent de mutations ponctuelles, et de gains ou de pertes de portions entières du génome (qui peuvent être des



chromosomes entiers), altérant l'expression des gènes clés responsables du maintien de l'intégrité cellulaire. Parmi ces altérations génétiques, la dérégulation de p53 est la plus commune et survient dans plus de 50% de toutes les tumeurs malignes humaines, qui présentent une mutation et une expression aberrante de p53. Depuis sa découverte au début des années 1980, un nombre croissant de fonctions moléculaires a été attribué à p53, demeurant ainsi une vedette dans la recherche en biologie cellulaire. P53 a progressivement été émancipée de son rôle réducteur de «gardienne du génome» et est aujourd'hui reconnu comme un régulateur pléiotropique de multiples processus physiologiques en réponse au stress. Néanmoins, notre compréhension des rôles de p53 dans tous les aspects de ces processus physiologiques est loin d'être complète. D'un point de vue immunologique, notre connaissance quant à sa participation à la surveillance immunitaire de l'hôte et à l'échappement tumoral aux effecteurs cytotoxiques immunitaires, lorsqu'elle est non fonctionnelle, est encore limitée. Néanmoins, des preuves convaincantes soulignent des conséquences immunologiques cruciales du dysfonctionnement de p53 dans la tumorigénèse et la progression tumorale. Il serait donc important d'incorporer le ciblage de la voie p53 dans une approche d'immunothérapie active pour des bénéfices thérapeutiques optimaux, ce qui repose certainement sur une meilleure compréhension des mécanismes/voies spécifiques par lesquels p53 régule activement la réponse immunitaire antitumorale. C'est dans ce cadre que s'insèrent mes travaux de thèse qui ont eu pour but de fournir un aperçu de la relation fonctionnelle entre la voie apoptotique du GzmB et p53, en se basant sur des résultats antérieurs réalisés dans notre équipe montrant que la protéine suppresseur de tumeur p53 est impliquée dans la mort cellulaire des cellules tumorales cibles par des cellules effectrices immunitaires *via* la voie PFN/GzmB (Meslin et al., 2011; Meslin et al., 2007 ).

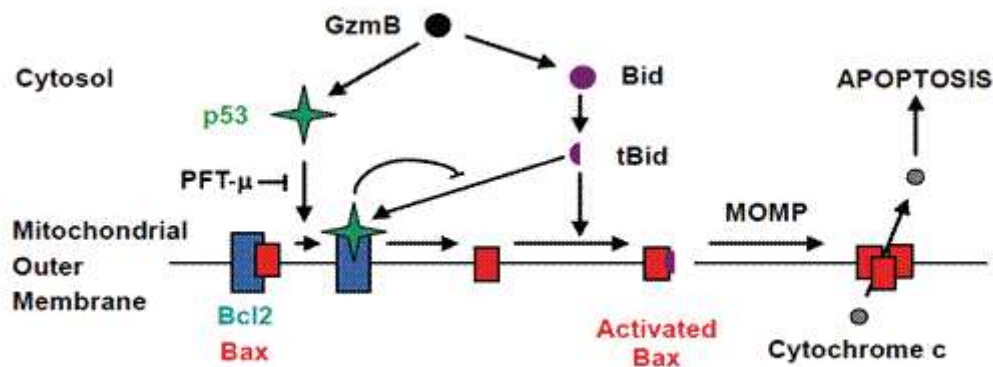
Étant donné que la mitochondrie constitue un régulateur central de la mort induite par les Gzms et joue également un rôle critique pour la mort cellulaire dépendante de p53, il nous a semblé crucial de déterminer comment le signal de mort induit par le GzmB, la voie mitochondriale ainsi que p53 sont interconnectés pendant l'induction de la mort des cellules cibles par les lymphocytes cytotoxiques. Dans ce contexte, mes travaux de thèse ont mis en évidence le rôle de p53 et de tBid dans l'établissement d'une connexion entre le signal apoptotique induit par GzmB et la voie de mort mitochondriale dans les cellules cibles lors de

la mort cellulaire induite par les CTL et les NK. Nous avons pu montrer que p53, activée par le GzmB, se localise au niveau des mitochondries des cellules cibles. De plus, l'inhibition de l'activité mitochondriale de p53 par la PFT $\mu$  (qui n'affecte pas son activité transcriptionnelle), diminue à la fois la mort cellulaire induite par le GzmB et les CTL/NK. Cela nous a permis de conclure que l'activité non transcriptionnelle de p53 est importante dans la cascade apoptotique induite par le hGzmB. De plus, comme le montrent nos résultats ainsi que d'autres travaux, tBid généré par le GzmB est crucial pour l'activation de Bax, l'induction de la MOMP, l'activation des caspases effectrices et l'induction d'apoptose par les lymphocytes cytotoxiques (Heibein et al., 2000 ; Sutton et al., 2000). Des mécanismes de contrôle ont été proposés pour décrire les différents modes d'action des différents membres pro- ou anti-apoptotiques de la famille Bcl-2. Parmi ces mécanismes, le MODE1 suppose que les protéines anti-apoptotiques telles que Bcl-xL ou Bcl-2 séquestrent des protéines BH3-only comme tBid pour les empêcher d'activer Bax et Bak entravant ainsi l'induction de la MOMP en réponse à des différents types de stress (Volkman et al., 2014; Westphal et al., 2014 ). Dans ce cadre, nos travaux montrent que l'activation de p53 par le GzmB participe à l'apoptose induite par ce dernier en interagissant avec la protéine anti-apoptotique Bcl-2 au niveau des mitochondries, cette interaction prévenant l'interaction de tBid avec Bcl-2. Par conséquent, nous avons suggéré qu'indirectement, p53 permet l'activation de Bax induite par tBid, probablement en empêchant l'interaction inhibitrice de Bcl-2 avec tBid.

De plus, nous avons également observé une accumulation de Bax dans la fraction mitochondriale des cellules non traitées interagissant avec Bcl-2, que le traitement par PFN/GzmB augmentait le niveau de Bax mitochondrial. Ces résultats suggèrent que p53 pourrait donc également favoriser la translocation vers les mitochondries et l'activation de Bax induite par tBid, en empêchant son interaction avec Bcl-2. En effet, certaines études ont montré que Bax se localise à la fois dans le cytosol et dans les mitochondries des cellules saines, et que l'interaction transitoire de Bax avec Bcl-xL ou de Bax avec Bcl-2 stimule la rétrotranslocation de Bax des mitochondries vers le cytoplasme, inactivant ainsi cette protéine effectrice (Edlich et al., 2011 ; Schellenberg et al., 2013).

Les protéines anti-apoptotiques sont également capables d'inhiber l'activation de la protéine effectrice Bax en se liant directement à elle (MODE 2). Nous avons montré qu'en

réponse au GzmB, l'interaction de p53 avec Bcl-2 prévient à la fois l'interaction de tBid avec Bcl-2 mais permet également la libération de Bax du complexe inhibiteur Bax-Bcl-2. De plus, en l'absence de liaison de p53 à Bcl-2 après le traitement avec la PFT- $\mu$ , un complexe ternaire comprenant Bcl-2, Bax et tBid est potentiellement observé en réponse au traitement par PFN/GzmB, et dans ce complexe Bax n'est pas activé. Ces résultats suggèrent donc que la liaison de tBid à Bcl-2 n'est pas suffisante pour la libération et l'activation de Bax, et que p53 joue un rôle clé dans la dissociation de ce complexe ternaire et l'activation conséquente de Bax *via* tBid. En effet, grâce à des études structurales, nous savons maintenant que p53 interagit avec les domaines BH3 des protéines anti-apoptotiques Bcl-xL/Bcl-2 par son domaine de liaison à l'ADN (Hagn et al., 2010). De plus, il a été démontré qu'un changement de conformation de la protéine Bcl-xL est observé lors d'une interaction avec p53 sauvage alors que les formes mutées de p53 ne parviennent pas à induire de tels effets du fait d'une affinité de liaison avec la protéine anti-apoptotique réduite (Hagn et al., 2010). Cela souligne l'importance de la présence d'une conformation sauvage de la protéine p53 pour l'activation de la voie apoptotique mitochondriale *via* la dissociation des complexes Bcl-xL-Bax (Hagn et al., 2010 ; Tomita et al., 2006). Nous pensons donc que, de la même manière, l'interaction p53-Bcl-2 en réponse au traitement par PFN/GzmB favorise l'activation de Bax par tBid généré par GzmB. Plus précisément, p53 pourrait ainsi induire la libération de Bax mitochondrial non activé de son interaction inhibitrice avec Bcl-2, favorisant son activation par tBid. Dans ce scénario, p53 stabilisée par le GzmB fonctionnerait comme une protéine BH3-only de type « dé-répresseur », libérant tBid et Bax de leur liaison inhibitrice avec la protéine Bcl-2 (Figure 23).



**Figure 23: Modèle proposé pour le rôle de p53 dans la voie de signalisation apoptotique induite par GzmB.**

En réponse au hGzmB p53 s'accumule au niveau des mitochondries des cellules cibles où elle interagit avec la protéine anti-apoptotique Bcl-2. Cette interaction permet la libération de la protéine pro-apoptotique effectrice Bax de son interaction inhibitrice avec Bcl-2 et empêche la séquestration de tBid, lui-même activé par le hGzmB, par Bcl-2. Dans ce cas où les deux protéines pro-apoptotiques sont libres, tBid est capable désormais d'activer Bax pour induire la MOMP, la libération du cytochrome c et l'apoptose de la cellule cible. Le blocage de l'interaction p53-Bcl-2 avec PFT- $\mu$  inhibe la libération de Bax de son interaction avec Bcl-2, favorise la liaison de tBid-Bcl-2 et inhibe par conséquent la MOMP induite par GzmB. D'après (Ben Safta et al., 2015).

Dans ce modèle que nous proposons, p53 agirait donc comme l'agent anticancéreux ABT-737, une molécule appartenant aux BH3 mimétiques, qui se fixe au niveau du sillon de liaison au domaine BH3 des membres anti-apoptotiques, rompt l'interaction Bcl-2/Bax ce qui libère Bax, augmente les niveaux de Bax au niveau de la membrane mitochondriale externe favorisant ainsi son activation de Bax, l'induction de la MOMP et l'apoptose (Cristofanon and Fulda, 2012). De plus, il a été montré que la molécule ABT-737 bloque l'inhibition exercée par Bcl-2 sur de tBid (clivée par hGzmB) dans des cellules sur-exprimant Bcl-2 (Sutton et al., 2012).

En résumé, cette première partie de mes travaux de thèse souligne l'importance de l'action coordonnée de p53 et de tBid activés tous les deux par le hGzmB dans la mort cellulaire induite par GzmB et pour la lyse induite par les lymphocytes cytotoxiques, marquant ainsi la contribution de cette protéine suppresseur de tumeurs dans la régulation de la réponse immune antitumorale.

Néanmoins il est également important de noter qu'une inactivation de p53 a été observée dans la grande majorité des cancers humains, soit par mutation du gène *TP53* lui

même (50% des cas) donnant naissance à une protéine non fonctionnelle, soit par inactivation indirecte en augmentant l'expression d'inhibiteurs ou en diminuant l'expression d'activateurs de la voie p53. De plus, il a été démontré qu'uniquement la forme sauvage de p53 et non pas les mutants dérivés de tumeurs, était capables de se lier à Bcl-2 via son domaine de liaison à l'ADN et peut déclencher ou réguler la MOMP (Tomita et al., 2006). Parce que nos résultats soulignent l'importance de p53 sauvage dans l'apoptose induite par hGzmB, il nous a semblé important de continuer notre étude afin de déterminer si ces mutants de p53 pouvaient être associés à une résistance des cellules tumorales à la mort cellulaire induite par les lymphocytes cytotoxiques notamment *via* la voie PFN/GzmB et si la restauration d'une p53 sauvage dans les cellules mutées ou déficientes en p53 pourrait permettre d'augmenter l'efficacité de la réponse immune anti-tumorale. Ainsi, plusieurs travaux dans notre laboratoire ont montré que l'inactivation de p53 affecte également sa fonction nucléaire comme facteur de transcription et pourrait être associée à une résistance tumorale à l'apoptose induite par les voies FasL, TNF- $\alpha$  (Muret et al., 2012; Thiery et al., 2005 ; Thiery et al., 2003 ) et GzmB (résultats non publiés). Dans ce cas, une stratégie de réactivation de p53 pourrait représenter une approche adjuvante intéressante en immunothérapie antitumorale afin d'optimiser le potentiel lytique des effecteurs cytotoxiques. Le second objectif de ma thèse s'est donc inscrit dans cette optique et consiste à déterminer si la réactivation de p53 dans des cellules tumorales portant une p53 non fonctionnelle, grâce à une approche pharmacologique, pourrait potentialiser la réponse cytotoxique antitumorale dépendante de la voie PFN/GzmB et à étudier les mécanismes moléculaires associés à une telle potentialisation.

Les résultats obtenus à l'heure actuelle montrent que la restauration pharmacologique d'une fonction p53 sauvage par la petite molécule CP-31398 dans des modèles de cancer mammaire mutés pour p53 influence la susceptibilité tumorale à la lyse par les effecteurs cytotoxiques. En effet, nos travaux, principalement réalisés avec le modèle de cancer mammaire MDA-MB231 exprimant une p53 mutée (R280K), ont montré que le traitement par CP-31398 permet de réactiver la fonction transcriptionnelle de p53 dans ces cellules, et que cette réactivation transcriptionnelle de p53 s'accompagne d'une potentialisation de la lyse des cellules tumorales MDA-MB231 par les cellules NK. En parallèle, nous avons observé

une induction d'un processus d'autophagie dans les cellules MDA-MB231 après le traitement par CP-31398 qui semble expliquer la potentialisation de la lyse observée.

Il est essentiel de noter l'importance de l'autophagie dans de nombreux aspects de la physiologie allant de l'adaptation au stress nutritionnel, à la différenciation des cellules, à la dégradation des structures aberrantes, au renouvellement des organites superflus ou endommagés, à l'immunité innée et adaptative, à la mort cellulaire et à la suppression des tumeurs (Deretic and Levine, 2009 ; Levine and Kroemer, 2008; Mizushima et al., 2008 ). Comme indiqué dans l'introduction de ce manuscrit, p53 joue un rôle critique dans la régulation de l'autophagie. Par son activité transcriptionnelle, p53 est responsable de la régulation de plusieurs gènes qui codent pour des protéines indispensables dans le processus d'autophagie (Gao et al., 2011; Kenzelmann Broz et al., 2013 ), il est légitime de penser que l'activation de l'autophagie nécessite une p53 fonctionnelle capable d'activer ces gènes cibles. Plusieurs gènes cibles de p53 stimulent le flux autophagique, un effet qui résulte souvent de l'inhibition des cascades moléculaires convergeant vers la protéine mTOR. Ainsi, dans certaines conditions, p53 répond au stress en transactivant les gènes codant pour les sous-unités  $\beta 1$  et  $\beta 2$  de l'AMPK, la protéine TSC2, PTEN, Sestrine 1 et 2 qui inhibent tous les fonctions anti-autophagiques de mTOR (Feng et al., 2007; Maiuri et al., 2009 ). Dans ce cadre, nos résultats montrent que la réactivation de l'activité transcriptionnelle de p53 dans les cellules MDA-MB231 permet effectivement une sur-expression de différents gènes codant pour des protéines impliquées dans l'autophagie. En particulier, suite à la réactivation de p53, nous avons noté dans notre modèle expérimental une augmentation de l'expression de *SESN-1* codant pour la protéine Sestrin-1 qui pourrait être responsable de l'induction de l'autophagie dépendante de p53. En effet, il a été montré que Sestrin-1 seraient capable de former un complexe avec la protéine kinase AMPK et TSC1:TSC2 dans lequel AMPK s'auto-activerait. AMPK activée phosphorylerait alors TSC2 (Inoki et al., 2003) ce qui stimulerait l'activité GAP (GTPase-Activating Protein) de TSC1 : TSC2 conduisant à l'inactivation de Rheb et donc à l'inhibition de l'activité de mTOR déclenchant ainsi le processus de l'autophagie (Budanov and Karin, 2008). Cette hypothèse doit être vérifiée dans notre modèle expérimental en étudiant soigneusement cette voie de signalisation notamment, en évaluant

l'état de phosphorylation de AMPK et de mTOR ainsi que l'accumulation du complexe ULK après réactivation de p53.

De plus nous avons pu observer dans les cellules MDA-MB231 après traitement par CP-31398 une surexpression des gènes codant pour des protéines faisant partie intégrante du complexe ULK comme *ULK1*, *ULK2*. Il a été auparavant démontré que ULK1 et ULK2 sont des cibles transcriptionnelles directes de la protéine p53 et que la régulation positive du complexe ULK par p53 est nécessaire pour une activité autophagique soutenue. Dans ce contexte, une forte activité autophagique contribue à la mort cellulaire induite par les dommages à l'ADN, suggérant que ULK1 et ULK2 peuvent contribuer à l'activité de suppression tumorale de p53 dans des cellules de mammifères et contribuer à l'efficacité des molécules de chimiothérapie possédant une activité génotoxique (Gao et al., 2011).

En outre, il a été montré que l'autophagie peut être également induite par voie pharmacologique en inhibant ses régulateurs négatifs tels que TOR (avec la rapamycin) (Rubinsztein et al., 2007) ou en ciblant les protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-xL qui se lient à Beclin-1 (avec ABT-737) (Maiuri et al., 2007b). En effet il a été décrit que les protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-xL inhibent Beclin-1 grâce à une interaction inhibitrice impliquant un domaine BH3 dans Beclin-1. L'interaction physique entre Beclin-1 et Bcl-xL peut être rompu lorsque le domaine BH3 de Beclin-1 ou le domaine récepteur BH3 de Bcl-xL est muté, mais également lorsque, le mimétique de BH3, ABT-737 rentre en compétition pour l'interaction entre Beclin-1 et Bcl-2 ou Bcl-xL stimulant ainsi l'induction de autophagie. Ces résultats ont révélé une nouvelle fonction des protéines BH3-only au-delà de leur rôle établi en tant qu'indicateurs d'apoptose. En considérant ces travaux et d'après le modèle que nous avons proposé stipulant que p53 agirait comme une molécule similaire à ABT-737 dans l'apoptose induite par le hGzmB, on peut imaginer que p53 est aussi capable d'activer l'autophagie dans le cytoplasme de la même manière. En effet, bien que plusieurs études aient montré que dans certains contextes le pool cytoplasmique de p53 inhibe l'autophagie, il est envisageable que dans notre contexte expérimental, p53 réactivée par CP-31398 pourrait agir dans le cytoplasme comme une protéine BH3-only ou une molécule ABT-737 qui se fixe au niveau du site de liaison au domaine BH3 des protéines anti-apoptotiques induisant ainsi l'autophagie en perturbant de manière compétitive l'interaction entre Beclin-1

et Bcl-2 ou Bcl-xL. Dans ce scénario, p53 activerait l'autophagie à la fois par ses activités cytoplasmiques et par ses activités comme facteur de transcription dans le noyau. De plus, des rôles pro-autophagiques ont également été attribués à plusieurs membres pro-apoptotiques de la famille de protéines Bcl-2, y compris Bax (Yee et al., 2009), Bad (Maiuri et al., 2007a), Bnip3 (Zhang and Ney, 2009) et Puma (Yee et al., 2009), qui sont toutes des cibles transcriptionnelles de p53. Ces protéines fonctionnent également comme les mimétiques de BH3 et induisent une autophagie (au moins en partie) en déstabilisant les interactions inhibitrices entre Bcl-2/Bcl-xL et Beclin-1 (Lomonosova and Chinnadurai, 2008). Cependant, des travaux supplémentaires seront nécessaires afin de valider cette hypothèse de régulation de l'autophagie suite à la réactivation de p53 par CP-31398, notamment en validant l'existence d'une véritable interaction entre p53 réactivée par CP-31398 (ou ces cibles possédant le domaine BH3) et les protéines Bcl-2/Bcl-xL dans le cytoplasme, notamment par une approche de co-immuno-précipitation. Néanmoins, il est à noter qu'étant donné la localisation nucléaire de p53 dans les cellules MDA-MB 231 même après sa réactivation par CP-31398, la régulation de l'autophagie dans notre modèle semblerait plutôt liée à l'activité transcriptionnelle de p53 et à l'axe Sestrin-AMPK-mTORC1-complexe ULK. Nous avons également observé dans les cellules MDA-MB231 traitée par CP-31398 une augmentation de l'expression des gènes codant pour des protéines nécessaires à l'élongation et à la maturation du phagophore notamment, *ATG12*, *ATG5*, *GABARAPL2* ainsi que *DRAM*. Cette dernière est une cible directe de p53 qui fonctionne au croisement entre l'autophagie et la mort cellulaire induite par p53 (Crighton et al., 2006). Bien que la surexpression DRAM seule cause une mort cellulaire minimale, dans plusieurs contextes expérimentaux, il a été décrit que DRAM est essentielle pour un processus complet d'apoptose et d'autophagie induite par p53 (Crighton et al., 2006 ; Zhang et al., 2009)

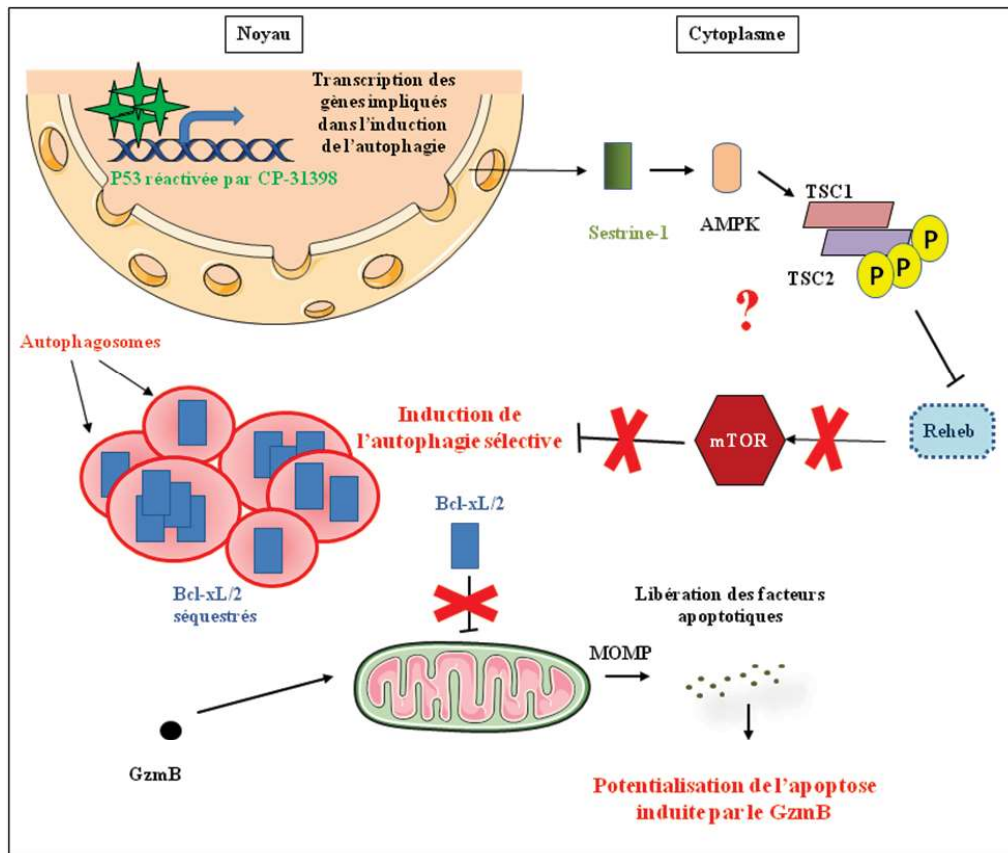
Dans tous les cas, nos résultats montrent l'importance de l'induction de l'autophagie dans les cellules MDA-MB231 après traitement par CP-31398 dans l'effet de la réactivation de p53 sur la potentialisation de la lyse induite par les cellules NK. En effet, le traitement par CP-31398 des cellules MDA-MB231, après l'inhibition de l'autophagie par siRNA dirigés contre ATG5 et Beclin-1, s'est avéré inefficace dans la potentialisation de la mort des cellules tumorales à la lyse induite par les NK. Ces résultats montrent que l'inhibition de l'autophagie



annule l'effet de la réactivation de p53, montrant que la sensibilisation des cellules tumorales à la lyse NK induite par la réactivation de p53 fait intervenir un processus autophagique. Puisque l'autophagie est un processus catabolique qui induit la dégradation de certaines protéines dans des vésicules autophagiques, nous avons émis l'hypothèse que la formation des autophagosomes suite à la réactivation de p53 dans les MDA-MB231 pourrait participer à rendre ces cellules moins résistantes à la mort induite par les cellules NK en ciblant des protéines anti-apoptotiques. Il est vrai que l'autophagie a longtemps été considérée comme un procédé non sélectif pour la dégradation "en vrac" de protéines à longue durée de vie ou de composants cytoplasmiques pendant le stress nutritionnel. De nos jours, de nombreux types d'autophagies sélectives ont été récemment mises en évidence (Reggiori et al., 2012). Selon des conditions de stress spécifiques, les autophagosomes peuvent ainsi séquestrer et dégrader exclusivement certaines organelles telles que les mitochondries, les peroxysomes, le réticulum endoplasmique, les endosomes, les lysosomes, les gouttelettes lipidiques, les granules sécrétoires, les agrégats cytoplasmiques, les ribosomes ainsi que des agents pathogènes. Des protéines et des complexes protéiques impliqués dans les cascades de signalisation telles que l'inflammasome qui peuvent également être ciblés par autophagie sélective (Shi et al., 2012). Nos résultats préliminaires de purification d'autophagosomes et d'une analyse par microscopie nous ont permis de démontrer que ces autophagosomes contiennent la protéine anti-apoptotique Bcl-xL, qui semble être séquestrée dans ces structures mais pas dégradée certainement à cause d'un flux autophagique bloqué. Finalement, nos travaux suggèrent que la séquestration de Bcl-xL dans les autophagosomes induits par la réactivation de p53, via la molécule CP-31398, permet de potentialiser la lyse des cellules tumorales par les cellules NK en favorisant la MOMP induite par le GzmB, et par conséquent favorise le clivage de substrats situés en aval des mitochondries, comme par exemple la pro-caspase 3 (Figure 24). Néanmoins, des travaux supplémentaires seront clairement nécessaires afin de comprendre pourquoi le flux autophagique induit par CP-31398 reste bloqué, sans dégradation clair du contenu des autophagosomes (et notamment de Bcl-xL). Nos travaux actuellement en cours visent à déterminer si d'autres protéines anti-apoptotiques comme Bcl-2, Mcl-1, Survivine, XIAP... pourraient également être séquestrées dans les autophagosomes après traitement par CP-31398.

Enfin, il a été décrit que l'autophagie sélective ne nécessite pas toujours une stimulation de l'autophagie en soi, mais plutôt une induction de leur ciblage dans les autophagosomes formés par un processus autophagique basale. L'autophagie sélective s'appuie sur des récepteurs d'autophagie ou protéines "cargo", comme la protéine p62, qui facilite la séquestration spécifique de l'élément à dégrader dans les autophagosomes. Les récepteurs d'autophagie interagissent directement avec la structure qui doit être éliminée spécifiquement par autophagie, ainsi que la protéine (et tous ces orthologues) LC3 présents au niveau de la surface interne des autophagosomes en croissance (Johansen and Lamark, 2011; Reggiori et al., 2012 ). Dans ce contexte nous envisageons également de déterminer si Bcl-xL ou d'autres protéines anti-apoptotiques sont ciblées spécifiquement dans les autophagosomes. Des expériences de co-immuno-précipitation de ces protéines potentiellement ciblées par l'autophagie induite par CP-31398 seront ainsi réalisées afin de déterminer si une telle interaction avec les protéines cargo, plus particulièrement avec la protéine p62 est réellement existante. L'importance de ces protéines sélectivement ciblées par l'autophagie dans la réactivation de p53 induite par CP-31398 sera ensuite validée par une approche de siRNAs.

En résumé, la deuxième partie de mes travaux de thèse a été consacrée à la réactivation pharmacologique d'une fonction p53 sauvage dans les cellules tumorales qui en sont mutées. Au cours de ces travaux, j'ai pu mettre en évidence l'effet de cette réactivation dans l'induction d'un processus d'autophagie permettant la séquestration de la protéine anti-apoptotique Bcl-xL dans des autophagosomes. Cette séquestration semble augmenter la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe des cellules cibles induite par les cellules NK via la voie PFN/GzmB (Figure 24).



**Figure 24: Représentation schématique des mécanismes d'action potentiels par lesquels p53 réactivée par CP-31398 potentialise l'apoptose induite par le GzmB.**

Dans le noyau, p53 réactivée par CP-31398 active la transcription des gènes inducteurs de l'autophagie dont la protéine Sestrin-1 qui activerait la voie de signalisation (SESN/AMPK/mTOR) aboutissant à l'inhibition de mTOR, et à l'induction de l'autophagie. L'autophagie induite par p53 induit la séquestration de Bcl-xL dans les autophagosomes. Bcl-xL séquestré est incapable d'exercer son activité anti-apoptotique au niveau de la mitochondrie. Ceci conduit à une potentialisation de l'apoptose induite par les effecteurs cytotoxiques notamment par le GzmB.

Pour terminer, et compte tenu de la diversité des petites molécules qui sont capables de restaurer la fonction p53, il est serait intéressant d'étudier si ces « réactivateurs » de p53 notamment PRIMA-1<sup>MET</sup> peuvent avoir le même effet que CP-31398. Les études antérieures sur les effets antitumoraux de ces petites molécules ont principalement porté sur les aspects non immunologiques. Grâce à une meilleure compréhension de la composante immunologique des effets antitumoraux de l'activation de p53, ces petites molécules seront peut être des outils précieux pour évaluer l'impact immunologique de cette réactivation notamment sur la réponse immune antitumorale. Pour cela, nous envisageons de valider nos

travaux *in vivo* et d'étudier l'effet de la réactivation de p53 sur la croissance de xénogreffes de tumeurs humaines exprimant une p53 mutée chez des souris immunodéficientes avec ou sans injection de cellules NK ou CTL spécifiques de ces tumeurs. Ainsi, ces molécules nous permettront d'examiner si la réactivation de p53 dans les tumeurs est suffisante pour inverser l'immunosuppression induite par le dysfonctionnement p53 et surmonter la tolérance immunitaire induite par cette tumeur. De plus, les données recueillies à partir des différents essais cliniques suggèrent qu'une monothérapie ne permet pas d'obtenir un résultat thérapeutique satisfaisant, alors que les approches combinatoires qui visent non seulement à sensibiliser les tumeurs, mais aussi à stimuler une forte réponse immune antitumorale améliore l'efficacité thérapeutique (Formenti and Demaria, 2013 ; Kroemer et al., 2013 ; Zitvogel et al., 2008). Compte tenu de la propriété immuno-stimulatrice de la radiothérapie, de certaines chimiothérapies ainsi que du potentiel de ces réactivateurs pharmacologiques de p53 dans la potentialisation de la mort des cellules tumorales induite par les cellules NK, nous pensons que la combinaison de ces thérapies conventionnelles avec cette approche qui potentialise l'action des lymphocytes cytotoxiques pourrait améliorer encore l'immunité antitumorale.

Plus important encore, l'utilisation de la réactivation de p53 comme un "adjuvant" d'une approche immunologique active pourrait maximiser l'efficacité de la réponse immune antitumorale. En effet, nos travaux soulignent l'importance de la présence d'une p53 sauvage et fonctionnelle dans la modulation de la sensibilité aux voies de lyse induites par les effecteurs cytotoxiques. On peut alors imaginer que dans des tumeurs possédant une p53 non fonctionnelle, la vaccination par un antigène capable d'initier ou de stimuler une réponse immunitaire spécifique est susceptible d'être inefficace à cause de la résistance de ces cellules tumorales aux voies lysées.

Cela soulève la question de l'inefficacité des stratégies de vaccination ciblant p53. En effet des preuves expérimentales et cliniques suggèrent que les cellules tumorales mutées en p53 expriment à leurs surfaces des peptides, sauvages et/ou mutés provenant de la protéine suppresseur de tumeurs, qui sont immunogènes car des anticorps anti-p53 et des lymphocytes T spécifiques de l'antigène p53 ont été détectés chez les patients atteints de tumeurs (Shimada et al., 2000 ; Tang et al., 2009 ; Tilkin et al., 1995). Sur la base de ces résultats précliniques,

qui indiquent l'apparition de réponses immunitaires dirigées par p53 chez des patients cancéreux, plusieurs essais cliniques ont été effectués avec des vaccins ciblant p53. Cependant, ces études n'ont pas montré d'efficacité clinique cohérente et convaincante et n'ont généralement pas évolué après les études de phase I / II (Vermeij et al., 2011). On peut alors penser que suite à ce type de vaccinations, les CTL sont effectivement capables de mieux reconnaître leurs cellules tumorales cibles présentant les antigènes associés à p53, mais sont dans l'incapacité de les lyser de manière efficace du fait de la perte de la fonctionnalité de p53. La restauration de la fonctionnalité de p53 par les petites molécules pharmacologiques dans ce contexte, pourrait alors améliorer l'efficacité des voies de lyse des effecteurs cytotoxiques et permettre ainsi de potentialiser l'efficacité clinique de ce type d'approche vaccinale.

# Bibliographie



Abegglen, L.M., Caulin, A.F., Chan, A., Lee, K., Robinson, R., Campbell, M.S., Kiso, W.K., Schmitt, D.L., Waddell, P.J., Bhaskara, S., *et al.* (2015). Potential Mechanisms for Cancer Resistance in Elephants and Comparative Cellular Response to DNA Damage in Humans. *Jama* *314*, 1850-1860.

Agarwal, M.L., Agarwal, A., Taylor, W.R., and Stark, G.R. (1995). p53 controls both the G2/M and the G1 cell cycle checkpoints and mediates reversible growth arrest in human fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *92*, 8493-8497.

Aguilar-Lemarroy, A., Gariglio, P., Whitaker, N.J., Eichhorst, S.T., zur Hausen, H., Krammer, P.H., and Rosl, F. (2002). Restoration of p53 expression sensitizes human papillomavirus type 16 immortalized human keratinocytes to CD95-mediated apoptosis. *Oncogene* *21*, 165-175.

Albert, M.L., Sauter, B., and Bhardwaj, N. (1998). Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. *Nature* *392*, 86-89.

Algarra, I., Cabrera, T., and Garrido, F. (2000). The HLA crossroad in tumor immunology. *Human immunology* *61*, 65-73.

Andrade, F. (2010). Non-cytotoxic antiviral activities of granzymes in the context of the immune antiviral state. *Immunological reviews* *235*, 128-146.

Arima, Y., Nitta, M., Kuninaka, S., Zhang, D., Fujiwara, T., Taya, Y., Nakao, M., and Saya, H. (2005). Transcriptional blockade induces p53-dependent apoptosis associated with translocation of p53 to mitochondria. *The Journal of biological chemistry* *280*, 19166-19176.

Ashcroft, M., Kubbutat, M.H., and Vousden, K.H. (1999). Regulation of p53 function and stability by phosphorylation. *Molecular and cellular biology* *19*, 1751-1758.

Ashkenazi, A., and Salvesen, G. (2014). Regulated cell death: signaling and mechanisms. *Annual review of cell and developmental biology* *30*, 337-356.

Austen, B., Powell, J.E., Alvi, A., Edwards, I., Hooper, L., Starczynski, J., Taylor, A.M., Fegan, C., Moss, P., and Stankovic, T. (2005). Mutations in the ATM gene lead to impaired overall and treatment-free survival that is independent of IGVH mutation status in patients with B-CLL. *Blood* *106*, 3175-3182.

Bakalkin, G., Yakovleva, T., Selivanova, G., Magnusson, K.P., Szekely, L., Kiseleva, E., Klein, G., Terenius, L., and Wiman, K.G. (1994). p53 binds single-stranded DNA ends and catalyzes DNA renaturation and strand transfer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *91*, 413-417.

Balaji, K.N., Schaschke, N., Machleidt, W., Catalfamo, M., and Henkart, P.A. (2002). Surface cathepsin B protects cytotoxic lymphocytes from self-destruction after degranulation. *The Journal of experimental medicine* *196*, 493-503.

Baran, K., Dunstone, M., Chia, J., Ciccone, A., Browne, K.A., Clarke, C.J., Lukyanova, N., Saibil, H., Whisstock, J.C., Voskoboinik, I., and Trapani, J.A. (2009). The molecular basis for perforin oligomerization and transmembrane pore assembly. *Immunity* *30*, 684-695.

Barckhausen, C., Roos, W.P., Naumann, S.C., and Kaina, B. (2014). Malignant melanoma cells acquire resistance to DNA interstrand cross-linking chemotherapeutics by p53-triggered upregulation of DDB2/XPC-mediated DNA repair. *Oncogene* *33*, 1964-1974.

Ben Safta, T., Ziani, L., Favre, L., Lamendour, L., Gros, G., Mami-Chouaib, F., Martinvalet, D., Chouaib, S., and Thiery, J. (2015). Granzyme B-activated p53 interacts with Bcl-2 to promote cytotoxic lymphocyte-mediated apoptosis. *Journal of immunology* *194*, 418-428.



- Bennett, S.R., Carbone, F.R., Karamalis, F., Miller, J.F., and Heath, W.R. (1997). Induction of a CD8<sup>+</sup> cytotoxic T lymphocyte response by cross-priming requires cognate CD4<sup>+</sup> T cell help. *The Journal of experimental medicine* *186*, 65-70.
- Beresford, P.J., Zhang, D., Oh, D.Y., Fan, Z., Greer, E.L., Russo, M.L., Jaju, M., and Lieberman, J. (2001). Granzyme A activates an endoplasmic reticulum-associated caspase-independent nuclease to induce single-stranded DNA nicks. *The Journal of biological chemistry* *276*, 43285-43293.
- Bi, L.L., Pan, G., Atkinson, T.P., Zheng, L., Dale, J.K., Makris, C., Reddy, V., McDonald, J.M., Siegel, R.M., Puck, J.M., *et al.* (2007). Dominant inhibition of Fas ligand-mediated apoptosis due to a heterozygous mutation associated with autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS) Type Ib. *BMC medical genetics* *8*, 41.
- Biegging, K.T., Mello, S.S., and Attardi, L.D. (2014). Unravelling mechanisms of p53-mediated tumour suppression. *Nature reviews. Cancer* *14*, 359-370.
- Bischoff, J.R., Kirn, D.H., Williams, A., Heise, C., Horn, S., Muna, M., Ng, L., Nye, J.A., Sampson-Johannes, A., Fattaey, A., and McCormick, F. (1996). An adenovirus mutant that replicates selectively in p53-deficient human tumor cells. *Science* *274*, 373-376.
- Bode, A.M., and Dong, Z. (2004). Post-translational modification of p53 in tumorigenesis. *Nature reviews. Cancer* *4*, 793-805.
- Bouvard, V., Zaitchouk, T., Vacher, M., Duthu, A., Canivet, M., Choisy-Rossi, C., Nieruchalski, M., and May, E. (2000). Tissue and cell-specific expression of the p53-target genes: bax, fas, mdm2 and waf1/p21, before and following ionising irradiation in mice. *Oncogene* *19*, 649-660.
- Bovenschen, N., de Koning, P.J., Quadir, R., Broekhuizen, R., Damen, J.M., Froelich, C.J., Slijper, M., and Kummer, J.A. (2008). NK cell protease granzyme M targets alpha-tubulin and disorganizes the microtubule network. *Journal of immunology* *180*, 8184-8191.
- Boya, P., Reggiori, F., and Codogno, P. (2013). Emerging regulation and functions of autophagy. *Nature cell biology* *15*, 713-720.
- Brady, C.A., and Attardi, L.D. (2010). p53 at a glance. *Journal of cell science* *123*, 2527-2532.
- Brennan, A.J., Chia, J., Trapani, J.A., and Voskoboinik, I. (2010). Perforin deficiency and susceptibility to cancer. *Cell death and differentiation* *17*, 607-615.
- Brenner, M.K. (2010). Clinical success of complex biological therapies: be careful what you wish for. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* *18*, 1737-1738.
- Bronte, V., Serafini, P., De Santo, C., Marigo, I., Tosello, V., Mazzoni, A., Segal, D.M., Staib, C., Lowel, M., Sutter, G., *et al.* (2003). IL-4-induced arginase 1 suppresses alloreactive T cells in tumor-bearing mice. *Journal of immunology* *170*, 270-278.
- Bronte, V., and Zanovello, P. (2005). Regulation of immune responses by L-arginine metabolism. *Nature reviews. Immunology* *5*, 641-654.
- Brumbaugh, K.M., Otterness, D.M., Geisen, C., Oliveira, V., Brognard, J., Li, X., Lejeune, F., Tibbetts, R.S., Maquat, L.E., and Abraham, R.T. (2004). The mRNA surveillance protein hSMG-1 functions in genotoxic stress response pathways in mammalian cells. *Molecular cell* *14*, 585-598.

- Bryant, S.S., Briggs, S., Smithgall, T.E., Martin, G.A., McCormick, F., Chang, J.H., Parsons, S.J., and Jove, R. (1995). Two SH2 domains of p120 Ras GTPase-activating protein bind synergistically to tyrosine phosphorylated p190 Rho GTPase-activating protein. *The Journal of biological chemistry* 270, 17947-17952.
- Budanov, A.V., and Karin, M. (2008). p53 target genes sestrin1 and sestrin2 connect genotoxic stress and mTOR signaling. *Cell* 134, 451-460.
- Burnet, F.M. (1970). The concept of immunological surveillance. *Progress in experimental tumor research* 13, 1-27.
- Bykov, V.J., Issaeva, N., Shilov, A., Hultcrantz, M., Pugacheva, E., Chumakov, P., Bergman, J., Wiman, K.G., and Selivanova, G. (2002). Restoration of the tumor suppressor function to mutant p53 by a low-molecular-weight compound. *Nature medicine* 8, 282-288.
- Bykov, V.J., Issaeva, N., Zache, N., Shilov, A., Hultcrantz, M., Bergman, J., Selivanova, G., and Wiman, K.G. (2005). Reactivation of mutant p53 and induction of apoptosis in human tumor cells by maleimide analogs. *The Journal of biological chemistry* 280, 30384-30391.
- Bykov, V.J., and Wiman, K.G. (2014). Mutant p53 reactivation by small molecules makes its way to the clinic. *FEBS letters* 588, 2622-2627.
- Bykov, V.J., Zhang, Q., Zhang, M., Ceder, S., Abrahmsen, L., and Wiman, K.G. (2016). Targeting of Mutant p53 and the Cellular Redox Balance by APR-246 as a Strategy for Efficient Cancer Therapy. *Frontiers in oncology* 6, 21.
- Campos, C., Pera, A., Lopez-Fernandez, I., Alonso, C., Tarazona, R., and Solana, R. (2014). Proinflammatory status influences NK cells subsets in the elderly. *Immunology letters* 162, 298-302.
- Cannella, S., Santoro, A., Bruno, G., Pillon, M., Mussolin, L., Mangili, G., Rosolen, A., and Arico, M. (2007). Germline mutations of the perforin gene are a frequent occurrence in childhood anaplastic large cell lymphoma. *Cancer* 109, 2566-2571.
- Carrington, P.E., Sandu, C., Wei, Y., Hill, J.M., Morisawa, G., Huang, T., Gavathiotis, E., Wei, Y., and Werner, M.H. (2006). The structure of FADD and its mode of interaction with procaspase-8. *Molecular cell* 22, 599-610.
- Chang, J., Kim, D.H., Lee, S.W., Choi, K.Y., and Sung, Y.C. (1995). Transactivation ability of p53 transcriptional activation domain is directly related to the binding affinity to TATA-binding protein. *The Journal of biological chemistry* 270, 25014-25019.
- Chao, C.C. (2015). Mechanisms of p53 degradation. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 438, 139-147.
- Chen, L., and Flies, D.B. (2013). Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nature reviews. Immunology* 13, 227-242.
- Chen, P.L., Chen, Y.M., Bookstein, R., and Lee, W.H. (1990). Genetic mechanisms of tumor suppression by the human p53 gene. *Science* 250, 1576-1580.
- Chinnasamy, D., Yu, Z., Theoret, M.R., Zhao, Y., Shrimali, R.K., Morgan, R.A., Feldman, S.A., Restifo, N.P., and Rosenberg, S.A. (2010). Gene therapy using genetically modified lymphocytes targeting VEGFR-2 inhibits the growth of vascularized syngenic tumors in mice. *The Journal of clinical investigation* 120, 3953-3968.
- Chipuk, J.E., Bouchier-Hayes, L., Kuwana, T., Newmeyer, D.D., and Green, D.R. (2005). PUMA couples the nuclear and cytoplasmic proapoptotic function of p53. *Science* 309, 1732-1735.

- Chipuk, J.E., and Green, D.R. (2008). How do BCL-2 proteins induce mitochondrial outer membrane permeabilization? *Trends in cell biology* 18, 157-164.
- Chipuk, J.E., Kuwana, T., Bouchier-Hayes, L., Droin, N.M., Newmeyer, D.D., Schuler, M., and Green, D.R. (2004). Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. *Science* 303, 1010-1014.
- Chipuk, J.E., Maurer, U., Green, D.R., and Schuler, M. (2003). Pharmacologic activation of p53 elicits Bax-dependent apoptosis in the absence of transcription. *Cancer cell* 4, 371-381.
- Chowdhury, D., Beresford, P.J., Zhu, P., Zhang, D., Sung, J.S., Demple, B., Perrino, F.W., and Lieberman, J. (2006). The exonuclease TREX1 is in the SET complex and acts in concert with NM23-H1 to degrade DNA during granzyme A-mediated cell death. *Molecular cell* 23, 133-142.
- Chowdhury, D., and Lieberman, J. (2008). Death by a thousand cuts: granzyme pathways of programmed cell death. *Annual review of immunology* 26, 389-420.
- Christiansen, A.J., Dieterich, L.C., Ohs, I., Bachmann, S.B., Bianchi, R., Proulx, S.T., Hollmen, M., Aebischer, D., and Detmar, M. (2016). Lymphatic endothelial cells attenuate inflammation via suppression of dendritic cell maturation. *Oncotarget* 7, 39421-39435.
- Classen, C.F., Falk, C.S., Friesen, C., Fulda, S., Herr, I., and Debatin, K.M. (2003). Natural killer resistance of a drug-resistant leukemia cell line, mediated by up-regulation of HLA class I expression. *Haematologica* 88, 509-521.
- Clore, G.M., Ernst, J., Clubb, R., Omichinski, J.G., Kennedy, W.M., Sakaguchi, K., Appella, E., and Gronenborn, A.M. (1995). Refined solution structure of the oligomerization domain of the tumour suppressor p53. *Nature structural biology* 2, 321-333.
- Clynes, R.A., Towers, T.L., Presta, L.G., and Ravetch, J.V. (2000). Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nature medicine* 6, 443-446.
- Cortez, M.A., Ivan, C., Valdecanas, D., Wang, X., Peltier, H.J., Ye, Y., Araujo, L., Carbone, D.P., Shilo, K., Giri, D.K., *et al.* (2016). PDL1 Regulation by p53 via miR-34. *Journal of the National Cancer Institute* 108.
- Cote, M., Menager, M.M., Burgess, A., Mahlaoui, N., Picard, C., Schaffner, C., Al-Manjomi, F., Al-Harbi, M., Alangari, A., Le Deist, F., *et al.* (2009). Munc18-2 deficiency causes familial hemophagocytic lymphohistiocytosis type 5 and impairs cytotoxic granule exocytosis in patient NK cells. *The Journal of clinical investigation* 119, 3765-3773.
- Crighton, D., Wilkinson, S., O'Prey, J., Syed, N., Smith, P., Harrison, P.R., Gasco, M., Garrone, O., Crook, T., and Ryan, K.M. (2006). DRAM, a p53-induced modulator of autophagy, is critical for apoptosis. *Cell* 126, 121-134.
- Crighton, D., Wilkinson, S., and Ryan, K.M. (2007). DRAM links autophagy to p53 and programmed cell death. *Autophagy* 3, 72-74.
- Cristofanon, S., and Fulda, S. (2012). ABT-737 promotes tBid mitochondrial accumulation to enhance TRAIL-induced apoptosis in glioblastoma cells. *Cell death & disease* 3, e432.
- Cullen, S.P., Afonina, I.S., Donadini, R., Luthi, A.U., Medema, J.P., Bird, P.I., and Martin, S.J. (2009). Nucleophosmin is cleaved and inactivated by the cytotoxic granule protease granzyme M during natural killer cell-mediated killing. *The Journal of biological chemistry* 284, 5137-5147.

- Daniel, J.A., Pray-Grant, M.G., and Grant, P.A. (2005). Effector proteins for methylated histones: an expanding family. *Cell cycle* 4, 919-926.
- Davies, M.A., and Samuels, Y. (2010). Analysis of the genome to personalize therapy for melanoma. *Oncogene* 29, 5545-5555.
- Davis, J.E., Smyth, M.J., and Trapani, J.A. (2001). Granzyme A and B-deficient killer lymphocytes are defective in eliciting DNA fragmentation but retain potent in vivo anti-tumor capacity. *European journal of immunology* 31, 39-47.
- Dawson, R., Muller, L., Dehner, A., Klein, C., Kessler, H., and Buchner, J. (2003). The N-terminal domain of p53 is natively unfolded. *Journal of molecular biology* 332, 1131-1141.
- de Saint Basile, G., Menasche, G., and Fischer, A. (2010). Molecular mechanisms of biogenesis and exocytosis of cytotoxic granules. *Nature reviews. Immunology* 10, 568-579.
- Del Bufalo, D., Biroccio, A., Leonetti, C., and Zupi, G. (1997). Bcl-2 overexpression enhances the metastatic potential of a human breast cancer line. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 11, 947-953.
- DeLeo, A.B., Jay, G., Appella, E., Dubois, G.C., Law, L.W., and Old, L.J. (1979). Detection of a transformation-related antigen in chemically induced sarcomas and other transformed cells of the mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76, 2420-2424.
- Demma, M.J., Wong, S., Maxwell, E., and Dasmahapatra, B. (2004). CP-31398 restores DNA-binding activity to mutant p53 in vitro but does not affect p53 homologs p63 and p73. *The Journal of biological chemistry* 279, 45887-45896.
- Demotte, N., Stroobant, V., Courtoy, P.J., Van Der Smissen, P., Colau, D., Luescher, I.F., Hivroz, C., Nicaise, J., Squifflet, J.L., Mourad, M., *et al.* (2008). Restoring the association of the T cell receptor with CD8 reverses anergy in human tumor-infiltrating lymphocytes. *Immunity* 28, 414-424.
- den Haan, J.M., Lehar, S.M., and Bevan, M.J. (2000). CD8(+) but not CD8(-) dendritic cells cross-prime cytotoxic T cells in vivo. *The Journal of experimental medicine* 192, 1685-1696.
- Deng, X., Gao, F., Flagg, T., Anderson, J., and May, W.S. (2006). Bcl2's flexible loop domain regulates p53 binding and survival. *Molecular and cellular biology* 26, 4421-4434.
- Derbyshire, D.J., Basu, B.P., Serpell, L.C., Joo, W.S., Date, T., Iwabuchi, K., and Doherty, A.J. (2002). Crystal structure of human 53BP1 BRCT domains bound to p53 tumour suppressor. *The EMBO journal* 21, 3863-3872.
- Deretic, V., and Levine, B. (2009). Autophagy, immunity, and microbial adaptations. *Cell host & microbe* 5, 527-549.
- Di Stefano, V., Soddu, S., Sacchi, A., and D'Orazi, G. (2005). HIPK2 contributes to PCAF-mediated p53 acetylation and selective transactivation of p21Waf1 after nonapoptotic DNA damage. *Oncogene* 24, 5431-5442.
- Dolgin, E. (2015). Oncolytic viruses get a boost with first FDA-approval recommendation. *Nature reviews. Drug discovery* 14, 369-371.
- Dong, H., Strome, S.E., Salomao, D.R., Tamura, H., Hirano, F., Flies, D.B., Roche, P.C., Lu, J., Zhu, G., Tamada, K., *et al.* (2002). Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nature medicine* 8, 793-800.

- Dong, P., Ihira, K., Hamada, J., Watari, H., Yamada, T., Hosaka, M., Hanley, S.J., Kudo, M., and Sakuragi, N. (2015). Reactivating p53 functions by suppressing its novel inhibitor iASPP: a potential therapeutic opportunity in p53 wild-type tumors. *Oncotarget* 6, 19968-19975.
- Dooley, H.C., Razi, M., Polson, H.E., Girardin, S.E., Wilson, M.I., and Tooze, S.A. (2014). WIPI2 links LC3 conjugation with PI3P, autophagosome formation, and pathogen clearance by recruiting Atg12-5-16L1. *Molecular cell* 55, 238-252.
- Dotiwala, F., Mulik, S., Polidoro, R.B., Ansara, J.A., Burleigh, B.A., Walch, M., Gazzinelli, R.T., and Lieberman, J. (2016). Killer lymphocytes use granzysin, perforin and granzymes to kill intracellular parasites. *Nature medicine* 22, 210-216.
- Drake, C.G. (2006). Basic overview of current immunotherapy approaches in urologic malignancy. *Urologic oncology* 24, 413-418.
- Drayman, N., Ben-Nun-Shaul, O., Butin-Israeli, V., Srivastava, R., Rubinstein, A.M., Mock, C.S., Elyada, E., Ben-Neriah, Y., Lahav, G., and Oppenheim, A. (2016). p53 elevation in human cells halt SV40 infection by inhibiting T-ag expression. *Oncotarget* 7, 52643-52660.
- Dressel, R., Raja, S.M., Honing, S., Seidler, T., Froelich, C.J., von Figura, K., and Gunther, E. (2004). Granzyme-mediated cytotoxicity does not involve the mannose 6-phosphate receptors on target cells. *The Journal of biological chemistry* 279, 20200-20210.
- Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L., and Wang, X. (2000). Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* 102, 33-42.
- Dunn, G.P., Old, L.J., and Schreiber, R.D. (2004). The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity* 21, 137-148.
- Edlich, F., Banerjee, S., Suzuki, M., Cleland, M.M., Arnoult, D., Wang, C., Neutzner, A., Tjandra, N., and Youle, R.J. (2011). Bcl-x(L) retrotranslocates Bax from the mitochondria into the cytosol. *Cell* 145, 104-116.
- Eliyahu, D., Raz, A., Gruss, P., Givol, D., and Oren, M. (1984). Participation of p53 cellular tumour antigen in transformation of normal embryonic cells. *Nature* 312, 646-649.
- Engels, B., Rowley, D.A., and Schreiber, H. (2012). Targeting stroma to treat cancers. *Seminars in cancer biology* 22, 41-49.
- Everett, R.D., Meredith, M., Orr, A., Cross, A., Kathoria, M., and Parkinson, J. (1997). A novel ubiquitin-specific protease is dynamically associated with the PML nuclear domain and binds to a herpesvirus regulatory protein. *The EMBO journal* 16, 1519-1530.
- Fader, C.M., Sanchez, D., Furlan, M., and Colombo, M.I. (2008). Induction of autophagy promotes fusion of multivesicular bodies with autophagic vacuoles in k562 cells. *Traffic* 9, 230-250.
- Fan, Z., Beresford, P.J., Zhang, D., Xu, Z., Novina, C.D., Yoshida, A., Pommier, Y., and Lieberman, J. (2003). Cleaving the oxidative repair protein Ape1 enhances cell death mediated by granzyme A. *Nature immunology* 4, 145-153.
- Fehniger, T.A., Shah, M.H., Turner, M.J., VanDeusen, J.B., Whitman, S.P., Cooper, M.A., Suzuki, K., Wechser, M., Goodsaid, F., and Caligiuri, M.A. (1999). Differential cytokine and chemokine gene expression by human NK cells following activation with IL-18 or IL-15 in combination with IL-12: implications for the innate immune response. *Journal of immunology* 162, 4511-4520.

- Feldmann, J., Callebaut, I., Raposo, G., Certain, S., Bacq, D., Dumont, C., Lambert, N., Ouachee-Chardin, M., Chedeville, G., Tamary, H., *et al.* (2003). Munc13-4 is essential for cytolytic granules fusion and is mutated in a form of familial hemophagocytic lymphohistiocytosis (FHL3). *Cell* *115*, 461-473.
- Fellows, E., Gil-Parrado, S., Jenne, D.E., and Kurschus, F.C. (2007). Natural killer cell-derived human granzyme H induces an alternative, caspase-independent cell-death program. *Blood* *110*, 544-552.
- Feng, Z., Hu, W., de Stanchina, E., Teresky, A.K., Jin, S., Lowe, S., and Levine, A.J. (2007). The regulation of AMPK beta1, TSC2, and PTEN expression by p53: stress, cell and tissue specificity, and the role of these gene products in modulating the IGF-1-AKT-mTOR pathways. *Cancer research* *67*, 3043-3053.
- Feng, Z., Zhang, H., Levine, A.J., and Jin, S. (2005). The coordinate regulation of the p53 and mTOR pathways in cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *102*, 8204-8209.
- Fernandez-Messina, L., Reyburn, H.T., and Vales-Gomez, M. (2012). Human NKG2D-ligands: cell biology strategies to ensure immune recognition. *Frontiers in immunology* *3*, 299.
- Flores, E.R., Tsai, K.Y., Crowley, D., Sengupta, S., Yang, A., McKeon, F., and Jacks, T. (2002). p63 and p73 are required for p53-dependent apoptosis in response to DNA damage. *Nature* *416*, 560-564.
- Formenti, S.C., and Demaria, S. (2013). Combining radiotherapy and cancer immunotherapy: a paradigm shift. *Journal of the National Cancer Institute* *105*, 256-265.
- Foster, B.A., Coffey, H.A., Morin, M.J., and Rastinejad, F. (1999). Pharmacological rescue of mutant p53 conformation and function. *Science* *286*, 2507-2510.
- Franco, O.E., Shaw, A.K., Strand, D.W., and Hayward, S.W. (2010). Cancer associated fibroblasts in cancer pathogenesis. *Seminars in cell & developmental biology* *21*, 33-39.
- Francoz, S., Froment, P., Bogaerts, S., De Clercq, S., Maetens, M., Doumont, G., Bellefroid, E., and Marine, J.C. (2006). Mdm4 and Mdm2 cooperate to inhibit p53 activity in proliferating and quiescent cells in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *103*, 3232-3237.
- Fridman, W.H., Remark, R., Goc, J., Giraldo, N.A., Becht, E., Hammond, S.A., Damotte, D., Dieu-Nosjean, M.C., and Sautes-Fridman, C. (2014). The immune microenvironment: a major player in human cancers. *International archives of allergy and immunology* *164*, 13-26.
- Fujita, N., Hayashi-Nishino, M., Fukumoto, H., Omori, H., Yamamoto, A., Noda, T., and Yoshimori, T. (2008a). An Atg4B mutant hampers the lipidation of LC3 paralogues and causes defects in autophagosome closure. *Molecular biology of the cell* *19*, 4651-4659.
- Fujita, N., Itoh, T., Omori, H., Fukuda, M., Noda, T., and Yoshimori, T. (2008b). The Atg16L complex specifies the site of LC3 lipidation for membrane biogenesis in autophagy. *Molecular biology of the cell* *19*, 2092-2100.
- Fukuda, M. (2013). Rab27 effectors, pleiotropic regulators in secretory pathways. *Traffic* *14*, 949-963.
- Funderburk, S.F., Wang, Q.J., and Yue, Z. (2010). The Beclin 1-VPS34 complex--at the crossroads of autophagy and beyond. *Trends in cell biology* *20*, 355-362.
- Gabrilovich, D. (2004). Mechanisms and functional significance of tumour-induced dendritic-cell defects. *Nature reviews. Immunology* *4*, 941-952.

- Gao, W., Shen, Z., Shang, L., and Wang, X. (2011). Upregulation of human autophagy-initiation kinase ULK1 by tumor suppressor p53 contributes to DNA-damage-induced cell death. *Cell death and differentiation* 18, 1598-1607.
- Glimcher, L.H., Townsend, M.J., Sullivan, B.M., and Lord, G.M. (2004). Recent developments in the transcriptional regulation of cytolytic effector cells. *Nature reviews. Immunology* 4, 900-911.
- Golgher, D., Jones, E., Powrie, F., Elliott, T., and Gallimore, A. (2002). Depletion of CD25+ regulatory cells uncovers immune responses to shared murine tumor rejection antigens. *European journal of immunology* 32, 3267-3275.
- Gorgoulis, V.G., Zacharatos, P., Kotsinas, A., Kletsas, D., Mariatos, G., Zoumpourlis, V., Ryan, K.M., Kittas, C., and Papavassiliou, A.G. (2003). p53 activates ICAM-1 (CD54) expression in an NF-kappaB-independent manner. *The EMBO journal* 22, 1567-1578.
- Gozuacik, D., and Kimchi, A. (2006). DAPk protein family and cancer. *Autophagy* 2, 74-79.
- Green, D.R., and Kroemer, G. (2005). Pharmacological manipulation of cell death: clinical applications in sight? *The Journal of clinical investigation* 115, 2610-2617.
- Grinkevich, V.V., Nikulenkov, F., Shi, Y., Enge, M., Bao, W., Maljukova, A., Gluch, A., Kel, A., Sangfelt, O., and Selivanova, G. (2009). Ablation of key oncogenic pathways by RITA-reactivated p53 is required for efficient apoptosis. *Cancer cell* 15, 441-453.
- Gu, W., Shi, X.L., and Roeder, R.G. (1997). Synergistic activation of transcription by CBP and p53. *Nature* 387, 819-823.
- Gudkov, A.V., and Komarova, E.A. (2005). Prospective therapeutic applications of p53 inhibitors. *Biochemical and biophysical research communications* 331, 726-736.
- Hagn, F., Klein, C., Demmer, O., Marchenko, N., Vaseva, A., Moll, U.M., and Kessler, H. (2010). BclxL changes conformation upon binding to wild-type but not mutant p53 DNA binding domain. *The Journal of biological chemistry* 285, 3439-3450.
- Hamann, D., Baars, P.A., Rep, M.H., Hooibrink, B., Kerkhof-Garde, S.R., Klein, M.R., and van Lier, R.A. (1997). Phenotypic and functional separation of memory and effector human CD8+ T cells. *The Journal of experimental medicine* 186, 1407-1418.
- Hamasaki, M., Furuta, N., Matsuda, A., Nezu, A., Yamamoto, A., Fujita, N., Oomori, H., Noda, T., Haraguchi, T., Hiraoka, Y., *et al.* (2013). Autophagosomes form at ER-mitochondria contact sites. *Nature* 495, 389-393.
- Hardie, D.G. (2007). AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy. *Nature reviews. Molecular cell biology* 8, 774-785.
- Harizi, H. (2013). Reciprocal crosstalk between dendritic cells and natural killer cells under the effects of PGE2 in immunity and immunopathology. *Cellular & molecular immunology* 10, 213-221.
- Harper, J., and Sainson, R.C. (2014). Regulation of the anti-tumour immune response by cancer-associated fibroblasts. *Seminars in cancer biology* 25, 69-77.
- Harrison, B., Kraus, M., Burch, L., Stevens, C., Craig, A., Gordon-Weeks, P., and Hupp, T.R. (2008). DAPK-1 binding to a linear peptide motif in MAP1B stimulates autophagy and membrane blebbing. *The Journal of biological chemistry* 283, 9999-10014.

- Hashimoto, D., Miller, J., and Merad, M. (2011). Dendritic cell and macrophage heterogeneity in vivo. *Immunity* *35*, 323-335.
- Heibein, J.A., Goping, I.S., Barry, M., Pinkoski, M.J., Shore, G.C., Green, D.R., and Bleackley, R.C. (2000). Granzyme B-mediated cytochrome c release is regulated by the Bcl-2 family members bid and Bax. *The Journal of experimental medicine* *192*, 1391-1402.
- Heise, C., Lemmon, M., and Kirn, D. (2000). Efficacy with a replication-selective adenovirus plus cisplatin-based chemotherapy: dependence on sequencing but not p53 functional status or route of administration. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* *6*, 4908-4914.
- Hermeking, H., Lengauer, C., Polyak, K., He, T.C., Zhang, L., Thiagalingam, S., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (1997). 14-3-3sigma is a p53-regulated inhibitor of G2/M progression. *Molecular cell* *1*, 3-11.
- Hinz, S., Trauzold, A., Boenicke, L., Sandberg, C., Beckmann, S., Bayer, E., Walczak, H., Kalthoff, H., and Ungefroren, H. (2000). Bcl-XL protects pancreatic adenocarcinoma cells against CD95- and TRAIL-receptor-mediated apoptosis. *Oncogene* *19*, 5477-5486.
- Hofmann, O., Caballero, O.L., Stevenson, B.J., Chen, Y.T., Cohen, T., Chua, R., Maher, C.A., Panji, S., Schaefer, U., Kruger, A., *et al.* (2008). Genome-wide analysis of cancer/testis gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *105*, 20422-20427.
- Hollander, M.C., Sheikh, M.S., Bulavin, D.V., Lundgren, K., Augeri-Henmueller, L., Shehee, R., Molinaro, T.A., Kim, K.E., Tolosa, E., Ashwell, J.D., *et al.* (1999). Genomic instability in Gadd45a-deficient mice. *Nature genetics* *23*, 176-184.
- Hopkins-Donaldson, S., Ziegler, A., Kurtz, S., Bigosch, C., Kandioler, D., Ludwig, C., Zangemeister-Wittke, U., and Stahel, R. (2003). Silencing of death receptor and caspase-8 expression in small cell lung carcinoma cell lines and tumors by DNA methylation. *Cell death and differentiation* *10*, 356-364.
- Hua, G., Wang, S., Zhong, C., Xue, P., and Fan, Z. (2009). Ignition of p53 bomb sensitizes tumor cells to granzyme K-mediated cytotoxicity. *Journal of immunology* *182*, 2152-2159.
- Huyen, Y., Jeffrey, P.D., Derry, W.B., Rothman, J.H., Pavletich, N.P., Stavridi, E.S., and Halazonetis, T.D. (2004). Structural differences in the DNA binding domains of human p53 and its *C. elegans* ortholog Cep-1. *Structure* *12*, 1237-1243.
- Inoki, K., and Guan, K.L. (2006). Complexity of the TOR signaling network. *Trends in cell biology* *16*, 206-212.
- Inoki, K., Zhu, T., and Guan, K.L. (2003). TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell* *115*, 577-590.
- Irmeler, M., Thome, M., Hahne, M., Schneider, P., Hofmann, K., Steiner, V., Bodmer, J.L., Schroter, M., Burns, K., Mattmann, C., *et al.* (1997). Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature* *388*, 190-195.
- Issaeva, N., Bozko, P., Enge, M., Protopopova, M., Verhoef, L.G., Masucci, M., Pramanik, A., and Selivanova, G. (2004). Small molecule RITA binds to p53, blocks p53-HDM-2 interaction and activates p53 function in tumors. *Nature medicine* *10*, 1321-1328.
- Itakura, E., and Mizushima, N. (2010). Characterization of autophagosome formation site by a hierarchical analysis of mammalian Atg proteins. *Autophagy* *6*, 764-776.



- Iwai, Y., Ishida, M., Tanaka, Y., Okazaki, T., Honjo, T., and Minato, N. (2002). Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *99*, 12293-12297.
- Jacobs, R., Hintzen, G., Kemper, A., Beul, K., Kempf, S., Behrens, G., Sykora, K.W., and Schmidt, R.E. (2001). CD56bright cells differ in their KIR repertoire and cytotoxic features from CD56dim NK cells. *European journal of immunology* *31*, 3121-3127.
- Jacquemin, G., Margiotta, D., Kasahara, A., Bassoy, E.Y., Walch, M., Thiery, J., Lieberman, J., and Martinvalet, D. (2015). Granzyme B-induced mitochondrial ROS are required for apoptosis. *Cell death and differentiation* *22*, 862-874.
- Jahreiss, L., Menzies, F.M., and Rubinsztein, D.C. (2008). The itinerary of autophagosomes: from peripheral formation to kiss-and-run fusion with lysosomes. *Traffic* *9*, 574-587.
- Janka, G.E. (2012). Familial and acquired hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Annual review of medicine* *63*, 233-246.
- Jeffrey, P.D., Gorina, S., and Pavletich, N.P. (1995). Crystal structure of the tetramerization domain of the p53 tumor suppressor at 1.7 angstroms. *Science* *267*, 1498-1502.
- Jenkins, J.R., Rudge, K., and Currie, G.A. (1984). Cellular immortalization by a cDNA clone encoding the transformation-associated phosphoprotein p53. *Nature* *312*, 651-654.
- Joerger, A.C., and Fersht, A.R. (2007). Structure-function-rescue: the diverse nature of common p53 cancer mutants. *Oncogene* *26*, 2226-2242.
- Johansen, T., and Lamark, T. (2011). Selective autophagy mediated by autophagic adapter proteins. *Autophagy* *7*, 279-296.
- Kaech, S.M., Wherry, E.J., and Ahmed, R. (2002). Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development. *Nature reviews. Immunology* *2*, 251-262.
- Kageyama, S., Omori, H., Saitoh, T., Sone, T., Guan, J.L., Akira, S., Imamoto, F., Noda, T., and Yoshimori, T. (2011). The LC3 recruitment mechanism is separate from Atg9L1-dependent membrane formation in the autophagic response against Salmonella. *Molecular biology of the cell* *22*, 2290-2300.
- Kaghad, M., Bonnet, H., Yang, A., Creancier, L., Biscan, J.C., Valent, A., Minty, A., Chalon, P., Lelias, J.M., Dumont, X., *et al.* (1997). Monoallelically expressed gene related to p53 at 1p36, a region frequently deleted in neuroblastoma and other human cancers. *Cell* *90*, 809-819.
- Kaiserman, D., Bird, C.H., Sun, J., Matthews, A., Ung, K., Whisstock, J.C., Thompson, P.E., Trapani, J.A., and Bird, P.I. (2006). The major human and mouse granzymes are structurally and functionally divergent. *The Journal of cell biology* *175*, 619-630.
- Kandoth, C., McLellan, M.D., Vandin, F., Ye, K., Niu, B., Lu, C., Xie, M., Zhang, Q., McMichael, J.F., Wyczalkowski, M.A., *et al.* (2013). Mutational landscape and significance across 12 major cancer types. *Nature* *502*, 333-339.
- Kannan-Thulasiraman, P., and Shapiro, D.J. (2002). Modulators of inflammation use nuclear factor-kappa B and activator protein-1 sites to induce the caspase-1 and granzyme B inhibitor, proteinase inhibitor 9. *The Journal of biological chemistry* *277*, 41230-41239.

- Kanzler, H., Kuppers, R., Hansmann, M.L., and Rajewsky, K. (1996). Hodgkin and Reed-Sternberg cells in Hodgkin's disease represent the outgrowth of a dominant tumor clone derived from (crippled) germinal center B cells. *The Journal of experimental medicine* *184*, 1495-1505.
- Kataoka, T., Schroter, M., Hahne, M., Schneider, P., Irmeler, M., Thome, M., Froelich, C.J., and Tschopp, J. (1998). FLIP prevents apoptosis induced by death receptors but not by perforin/granzyme B, chemotherapeutic drugs, and gamma irradiation. *Journal of immunology* *161*, 3936-3942.
- Kawasaki, Y., Saito, T., Shirota-Someya, Y., Ikegami, Y., Komano, H., Lee, M.H., Froelich, C.J., Shinohara, N., and Takayama, H. (2000). Cell death-associated translocation of plasma membrane components induced by CTL. *Journal of immunology* *164*, 4641-4648.
- Keefe, D., Shi, L., Feske, S., Massol, R., Navarro, F., Kirchhausen, T., and Lieberman, J. (2005). Perforin triggers a plasma membrane-repair response that facilitates CTL induction of apoptosis. *Immunity* *23*, 249-262.
- Kelly, J.M., Waterhouse, N.J., Cretney, E., Browne, K.A., Ellis, S., Trapani, J.A., and Smyth, M.J. (2004). Granzyme M mediates a novel form of perforin-dependent cell death. *The Journal of biological chemistry* *279*, 22236-22242.
- Kenter, G.G., Welters, M.J., Valentijn, A.R., Lowik, M.J., Berends-van der Meer, D.M., Vloon, A.P., Essahsah, F., Fathers, L.M., Offringa, R., Drijfhout, J.W., *et al.* (2009). Vaccination against HPV-16 oncoproteins for vulvar intraepithelial neoplasia. *The New England journal of medicine* *361*, 1838-1847.
- Kenzelmann Broz, D., Spano Mello, S., Bieging, K.T., Jiang, D., Dusek, R.L., Brady, C.A., Sidow, A., and Attardi, L.D. (2013). Global genomic profiling reveals an extensive p53-regulated autophagy program contributing to key p53 responses. *Genes & development* *27*, 1016-1031.
- Khoury, M.P., and Bourdon, J.C. (2010). The isoforms of the p53 protein. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* *2*, a000927.
- Kiessling, R., Klein, E., and Wigzell, H. (1975). "Natural" killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype. *European journal of immunology* *5*, 112-117.
- Kimura, S., Noda, T., and Yoshimori, T. (2008). Dynein-dependent movement of autophagosomes mediates efficient encounters with lysosomes. *Cell structure and function* *33*, 109-122.
- Knights, C.D., Catania, J., Di Giovanni, S., Muratoglu, S., Perez, R., Swartzbeck, A., Quong, A.A., Zhang, X., Beerman, T., Pestell, R.G., and Avantaggiati, M.L. (2006). Distinct p53 acetylation cassettes differentially influence gene-expression patterns and cell fate. *The Journal of cell biology* *173*, 533-544.
- Kochl, R., Hu, X.W., Chan, E.Y., and Tooze, S.A. (2006). Microtubules facilitate autophagosome formation and fusion of autophagosomes with endosomes. *Traffic* *7*, 129-145.
- Korkolopoulou, P., Kaklamanis, L., Pezzella, F., Harris, A.L., and Gatter, K.C. (1996). Loss of antigen-presenting molecules (MHC class I and TAP-1) in lung cancer. *British journal of cancer* *73*, 148-153.
- Koulgi, S., Achalere, A., Sharma, N., Sonavane, U., and Joshi, R. (2013). QM-MM simulations on p53-DNA complex: a study of hot spot and rescue mutants. *Journal of molecular modeling* *19*, 5545-5559.
- Krajewski, M., Ozdowy, P., D'Silva, L., Rothweiler, U., and Holak, T.A. (2005). NMR indicates that the small molecule RITA does not block p53-MDM2 binding in vitro. *Nature medicine* *11*, 1135-1136; author reply 1136-1137.

- Kraman, M., Bambrough, P.J., Arnold, J.N., Roberts, E.W., Magiera, L., Jones, J.O., Gopinathan, A., Tuveson, D.A., and Fearon, D.T. (2010). Suppression of antitumor immunity by stromal cells expressing fibroblast activation protein- $\alpha$ . *Science* *330*, 827-830.
- Kress, M., May, E., Cassingena, R., and May, P. (1979). Simian virus 40-transformed cells express new species of proteins precipitable by anti-simian virus 40 tumor serum. *Journal of virology* *31*, 472-483.
- Kroemer, G., Galluzzi, L., Kepp, O., and Zitvogel, L. (2013). Immunogenic cell death in cancer therapy. *Annual review of immunology* *31*, 51-72.
- Krzewski, K., Gil-Krzewska, A., Watts, J., Stern, J.N., and Strominger, J.L. (2011). VAMP4- and VAMP7-expressing vesicles are both required for cytotoxic granule exocytosis in NK cells. *European journal of immunology* *41*, 3323-3329.
- Kurschus, F.C., Bruno, R., Fellows, E., Falk, C.S., and Jenne, D.E. (2005). Membrane receptors are not required to deliver granzyme B during killer cell attack. *Blood* *105*, 2049-2058.
- Lamb, C.A., Yoshimori, T., and Tooze, S.A. (2013). The autophagosome: origins unknown, biogenesis complex. *Nature reviews. Molecular cell biology* *14*, 759-774.
- Lamb, P., and Crawford, L. (1986). Characterization of the human p53 gene. *Molecular and cellular biology* *6*, 1379-1385.
- Lambert, J.M., Gorzov, P., Veprintsev, D.B., Soderqvist, M., Segerback, D., Bergman, J., Fersht, A.R., Hainaut, P., Wiman, K.G., and Bykov, V.J. (2009). PRIMA-1 reactivates mutant p53 by covalent binding to the core domain. *Cancer cell* *15*, 376-388.
- Lane, D.P. (1992). Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* *358*, 15-16.
- Lane, D.P., and Crawford, L.V. (1979). T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature* *278*, 261-263.
- Law, R.H., Lukoyanova, N., Voskoboinik, I., Caradoc-Davies, T.T., Baran, K., Dunstone, M.A., D'Angelo, M.E., Orlova, E.V., Coulibaly, F., Verschoor, S., *et al.* (2010). The structural basis for membrane binding and pore formation by lymphocyte perforin. *Nature* *468*, 447-451.
- Le Cam, L., Linares, L.K., Paul, C., Julien, E., Lacroix, M., Hatchi, E., Triboulet, R., Bossis, G., Shmueli, A., Rodriguez, M.S., *et al.* (2006). E4F1 is an atypical ubiquitin ligase that modulates p53 effector functions independently of degradation. *Cell* *127*, 775-788.
- Le Mercier, I., Lines, J.L., and Noelle, R.J. (2015). Beyond CTLA-4 and PD-1, the Generation Z of Negative Checkpoint Regulators. *Frontiers in immunology* *6*, 418.
- Lehmann, S., Bykov, V.J., Ali, D., Andren, O., Cherif, H., Tidefelt, U., Uggla, B., Yachnin, J., Juliusson, G., Moshfegh, A., *et al.* (2012). Targeting p53 in vivo: a first-in-human study with p53-targeting compound APR-246 in refractory hematologic malignancies and prostate cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* *30*, 3633-3639.
- Leu, J.I., Dumont, P., Hafey, M., Murphy, M.E., and George, D.L. (2004). Mitochondrial p53 activates Bak and causes disruption of a Bak-Mcl1 complex. *Nature cell biology* *6*, 443-450.
- Levine, B., and Kroemer, G. (2008). Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell* *132*, 27-42.

- Levine, B., Sinha, S., and Kroemer, G. (2008). Bcl-2 family members: dual regulators of apoptosis and autophagy. *Autophagy* 4, 600-606.
- Leverro, M., De Laurenzi, V., Costanzo, A., Gong, J., Melino, G., and Wang, J.Y. (1999). Structure, function and regulation of p63 and p73. *Cell death and differentiation* 6, 1146-1153.
- Li, Y., Li, L.J., Wang, L.J., Zhang, Z., Gao, N., Liang, C.Y., Huang, Y.D., and Han, B. (2014). Selective intra-arterial infusion of rAd-p53 with chemotherapy for advanced oral cancer: a randomized clinical trial. *BMC Med* 12, 16.
- Li, Y., Mao, Y., Brandt-Rauf, P.W., Williams, A.C., and Fine, R.L. (2005). Selective induction of apoptosis in mutant p53 premalignant and malignant cancer cells by PRIMA-1 through the c-Jun-NH2-kinase pathway. *Molecular cancer therapeutics* 4, 901-909.
- Liang, S.H., and Clarke, M.F. (1999). A bipartite nuclear localization signal is required for p53 nuclear import regulated by a carboxyl-terminal domain. *The Journal of biological chemistry* 274, 32699-32703.
- Lieberman, J. (2003). The ABCs of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal. *Nature reviews. Immunology* 3, 361-370.
- Lindsten, T., Ross, A.J., King, A., Zong, W.X., Rathmell, J.C., Shiels, H.A., Ulrich, E., Waymire, K.G., Mahar, P., Frauwirth, K., *et al.* (2000). The combined functions of proapoptotic Bcl-2 family members bak and bax are essential for normal development of multiple tissues. *Molecular cell* 6, 1389-1399.
- Lindstrom, M.S., Klangby, U., and Wiman, K.G. (2001). p14ARF homozygous deletion or MDM2 overexpression in Burkitt lymphoma lines carrying wild type p53. *Oncogene* 20, 2171-2177.
- Linzer, D.I., and Levine, A.J. (1979). Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell* 17, 43-52.
- Liu, D.S., Read, M., Cullinane, C., Azar, W.J., Fennell, C.M., Montgomery, K.G., Haupt, S., Haupt, Y., Wiman, K.G., Duong, C.P., *et al.* (2015). APR-246 potently inhibits tumour growth and overcomes chemoresistance in preclinical models of oesophageal adenocarcinoma. *Gut* 64, 1506-1516.
- Liu, S., Chen, P., Hu, M., Tao, Y., Chen, L., Liu, H., Wang, J., Luo, J., and Gao, G. (2013). Randomized, controlled phase II study of post-surgery radiotherapy combined with recombinant adenoviral human p53 gene therapy in treatment of oral cancer. *Cancer gene therapy* 20, 375-378.
- Liu, X., Kim, C.N., Yang, J., Jemmerson, R., and Wang, X. (1996). Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* 86, 147-157.
- Liu, X., Yue, P., Khuri, F.R., and Sun, S.Y. (2004). p53 upregulates death receptor 4 expression through an intronic p53 binding site. *Cancer research* 64, 5078-5083.
- Ljunggren, H.G., and Karre, K. (1985). Host resistance directed selectively against H-2-deficient lymphoma variants. Analysis of the mechanism. *The Journal of experimental medicine* 162, 1745-1759.
- Llambi, F., Moldoveanu, T., Tait, S.W., Bouchier-Hayes, L., Temirov, J., McCormick, L.L., Dillon, C.P., and Green, D.R. (2011). A unified model of mammalian BCL-2 protein family interactions at the mitochondria. *Molecular cell* 44, 517-531.
- Lomonosova, E., and Chinnadurai, G. (2008). BH3-only proteins in apoptosis and beyond: an overview. *Oncogene* 27 *Suppl 1*, S2-19.

- Loo, L.S., Hwang, L.A., Ong, Y.M., Tay, H.S., Wang, C.C., and Hong, W. (2009). A role for endobrevin/VAMP8 in CTL lytic granule exocytosis. *European journal of immunology* 39, 3520-3528.
- Lorin, S., Pierron, G., Ryan, K.M., Codogno, P., and Djavaheri-Mergny, M. (2010). Evidence for the interplay between JNK and p53-DRAM signalling pathways in the regulation of autophagy. *Autophagy* 6, 153-154.
- Lu, H., Hou, Q., Zhao, T., Zhang, H., Zhang, Q., Wu, L., and Fan, Z. (2006). Granzyme M directly cleaves inhibitor of caspase-activated DNase (CAD) to unleash CAD leading to DNA fragmentation. *Journal of immunology* 177, 1171-1178.
- Lu, H., and Levine, A.J. (1995). Human TAFII31 protein is a transcriptional coactivator of the p53 protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 5154-5158.
- Lum, J.J., Bauer, D.E., Kong, M., Harris, M.H., Li, C., Lindsten, T., and Thompson, C.B. (2005). Growth factor regulation of autophagy and cell survival in the absence of apoptosis. *Cell* 120, 237-248.
- Madka, V., Zhang, Y., Li, Q., Mohammed, A., Sindhvani, P., Lightfoot, S., Wu, X.R., Kopelovich, L., and Rao, C.V. (2013). p53-stabilizing agent CP-31398 prevents growth and invasion of urothelial cancer of the bladder in transgenic UPII-SV40T mice. *Neoplasia* 15, 966-974.
- Magnusson, S., Gisselsson, D., Wiebe, T., Kristoffersson, U., Borg, A., and Olsson, H. (2012). Prevalence of germline TP53 mutations and history of Li-Fraumeni syndrome in families with childhood adrenocortical tumors, choroid plexus tumors, and rhabdomyosarcoma: a population-based survey. *Pediatric blood & cancer* 59, 846-853.
- Mah, L.Y., O'Prey, J., Baudot, A.D., Hoekstra, A., and Ryan, K.M. (2012). DRAM-1 encodes multiple isoforms that regulate autophagy. *Autophagy* 8, 18-28.
- Maiuri, M.C., Criollo, A., Tasdemir, E., Vicencio, J.M., Tajeddine, N., Hickman, J.A., Geneste, O., and Kroemer, G. (2007a). BH3-only proteins and BH3 mimetics induce autophagy by competitively disrupting the interaction between Beclin 1 and Bcl-2/Bcl-X(L). *Autophagy* 3, 374-376.
- Maiuri, M.C., Galluzzi, L., Morselli, E., Kepp, O., Malik, S.A., and Kroemer, G. (2010). Autophagy regulation by p53. *Current opinion in cell biology* 22, 181-185.
- Maiuri, M.C., Le Toumelin, G., Criollo, A., Rain, J.C., Gautier, F., Juin, P., Tasdemir, E., Pierron, G., Troulinaki, K., Tavernarakis, N., *et al.* (2007b). Functional and physical interaction between Bcl-X(L) and a BH3-like domain in Beclin-1. *The EMBO journal* 26, 2527-2539.
- Maiuri, M.C., Malik, S.A., Morselli, E., Kepp, O., Criollo, A., Mouchel, P.L., Carnuccio, R., and Kroemer, G. (2009). Stimulation of autophagy by the p53 target gene Sestrin2. *Cell cycle* 8, 1571-1576.
- Maki, C.G., and Howley, P.M. (1997). Ubiquitination of p53 and p21 is differentially affected by ionizing and UV radiation. *Molecular and cellular biology* 17, 355-363.
- Mapara, M.Y., and Sykes, M. (2004). Tolerance and cancer: mechanisms of tumor evasion and strategies for breaking tolerance. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 22, 1136-1151.
- Marchenko, N.D., Wolff, S., Erster, S., Becker, K., and Moll, U.M. (2007). Monoubiquitylation promotes mitochondrial p53 translocation. *The EMBO journal* 26, 923-934.
- Marincola, F.M., Jaffee, E.M., Hicklin, D.J., and Ferrone, S. (2000). Escape of human solid tumors from T-cell recognition: molecular mechanisms and functional significance. *Advances in immunology* 74, 181-273.

- Martin-Caballero, J., Flores, J.M., Garcia-Palencia, P., and Serrano, M. (2001). Tumor susceptibility of p21(Waf1/Cip1)-deficient mice. *Cancer research* *61*, 6234-6238.
- Martinvalet, D., Dykxhoorn, D.M., Ferrini, R., and Lieberman, J. (2008). Granzyme A cleaves a mitochondrial complex I protein to initiate caspase-independent cell death. *Cell* *133*, 681-692.
- Martinvalet, D., Zhu, P., and Lieberman, J. (2005). Granzyme A induces caspase-independent mitochondrial damage, a required first step for apoptosis. *Immunity* *22*, 355-370.
- Masson, D., and Tschopp, J. (1987). A family of serine esterases in lytic granules of cytolytic T lymphocytes. *Cell* *49*, 679-685.
- Mathew, R., and White, E. (2011). Autophagy, stress, and cancer metabolism: what doesn't kill you makes you stronger. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* *76*, 389-396.
- Mazzoni, A., Bronte, V., Visintin, A., Spitzer, J.H., Apolloni, E., Serafini, P., Zanovello, P., and Segal, D.M. (2002). Myeloid suppressor lines inhibit T cell responses by an NO-dependent mechanism. *Journal of immunology* *168*, 689-695.
- McNeil, P.L., and Kirchhausen, T. (2005). An emergency response team for membrane repair. *Nature reviews. Molecular cell biology* *6*, 499-505.
- Meijer, A., Kruyt, F.A., van der Zee, A.G., Hollema, H., Le, P., ten Hoor, K.A., Groothuis, G.M., Quax, W.J., de Vries, E.G., and de Jong, S. (2013). Nutlin-3 preferentially sensitises wild-type p53-expressing cancer cells to DR5-selective TRAIL over rhTRAIL. *British journal of cancer* *109*, 2685-2695.
- Meijerink, J.P., Mensink, E.J., Wang, K., Sedlak, T.W., Sloetjes, A.W., de Witte, T., Waksman, G., and Korsmeyer, S.J. (1998). Hematopoietic malignancies demonstrate loss-of-function mutations of BAX. *Blood* *91*, 2991-2997.
- Mentlik, A.N., Sanborn, K.B., Holzbaur, E.L., and Orange, J.S. (2010). Rapid lytic granule convergence to the MTOC in natural killer cells is dependent on dynein but not cytolytic commitment. *Molecular biology of the cell* *21*, 2241-2256.
- Meslin, F., Hamai, A., Mlecnik, B., Rosselli, F., Richon, C., Jalil, A., Wemhoff, G., Thiery, J., Galon, J., and Chouaib, S. (2011). hSMG-1 is a granzyme B-associated stress-responsive protein kinase. *Journal of molecular medicine* *89*, 411-421.
- Meslin, F., Thiery, J., Richon, C., Jalil, A., and Chouaib, S. (2007). Granzyme B-induced cell death involves induction of p53 tumor suppressor gene and its activation in tumor target cells. *The Journal of biological chemistry* *282*, 32991-32999.
- Metelitsa, L.S., Naidenko, O.V., Kant, A., Wu, H.W., Loza, M.J., Perussia, B., Kronenberg, M., and Seeger, R.C. (2001). Human NKT cells mediate antitumor cytotoxicity directly by recognizing target cell CD1d with bound ligand or indirectly by producing IL-2 to activate NK cells. *Journal of immunology* *167*, 3114-3122.
- Metkar, S.S., Wang, B., Aguilar-Santelises, M., Raja, S.M., Uhlin-Hansen, L., Podack, E., Trapani, J.A., and Froelich, C.J. (2002). Cytotoxic cell granule-mediated apoptosis: perforin delivers granzyme B-serglycin complexes into target cells without plasma membrane pore formation. *Immunity* *16*, 417-428.
- Mihara, M., Erster, S., Zaika, A., Petrenko, O., Chittenden, T., Pancoska, P., and Moll, U.M. (2003). p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. *Molecular cell* *11*, 577-590.

- Mirza, N., Fishman, M., Fricke, I., Dunn, M., Neuger, A.M., Frost, T.J., Lush, R.M., Antonia, S., and Gabrilovich, D.I. (2006). All-trans-retinoic acid improves differentiation of myeloid cells and immune response in cancer patients. *Cancer research* *66*, 9299-9307.
- Mittal, D., Gubin, M.M., Schreiber, R.D., and Smyth, M.J. (2014). New insights into cancer immunoediting and its three component phases--elimination, equilibrium and escape. *Current opinion in immunology* *27*, 16-25.
- Mizushima, N., Kuma, A., Kobayashi, Y., Yamamoto, A., Matsubae, M., Takao, T., Natsume, T., Ohsumi, Y., and Yoshimori, T. (2003). Mouse Apg16L, a novel WD-repeat protein, targets to the autophagic isolation membrane with the Apg12-Apg5 conjugate. *Journal of cell science* *116*, 1679-1688.
- Mizushima, N., Levine, B., Cuervo, A.M., and Klionsky, D.J. (2008). Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature* *451*, 1069-1075.
- Mizushima, N., Yamamoto, A., Hatano, M., Kobayashi, Y., Kabeya, Y., Suzuki, K., Tokuhi, T., Ohsumi, Y., and Yoshimori, T. (2001). Dissection of autophagosome formation using Apg5-deficient mouse embryonic stem cells. *The Journal of cell biology* *152*, 657-668.
- Mizushima, N., Yoshimori, T., and Ohsumi, Y. (2011). The role of Atg proteins in autophagosome formation. *Annual review of cell and developmental biology* *27*, 107-132.
- Mohell, N., Alfredsson, J., Fransson, A., Uustalu, M., Bystrom, S., Gullbo, J., Hallberg, A., Bykov, V.J., Bjorklund, U., and Wiman, K.G. (2015). APR-246 overcomes resistance to cisplatin and doxorubicin in ovarian cancer cells. *Cell death & disease* *6*, e1794.
- Moll, U.M., Marchenko, N., and Zhang, X.K. (2006). p53 and Nur77/TR3 - transcription factors that directly target mitochondria for cell death induction. *Oncogene* *25*, 4725-4743.
- Morselli, E., Shen, S., Ruckenstein, C., Bauer, M.A., Marino, G., Galluzzi, L., Criollo, A., Michaud, M., Maiuri, M.C., Chano, T., *et al.* (2011). p53 inhibits autophagy by interacting with the human ortholog of yeast Atg17, RB1CC1/FIP200. *Cell cycle* *10*, 2763-2769.
- Mosmann, T.R., Cherwinski, H., Bond, M.W., Giedlin, M.A., and Coffman, R.L. (1986). Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *Journal of immunology* *136*, 2348-2357.
- Motyka, B., Korbitt, G., Pinkoski, M.J., Heibein, J.A., Caputo, A., Hobman, M., Barry, M., Shostak, I., Sawchuk, T., Holmes, C.F., *et al.* (2000). Mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor is a death receptor for granzyme B during cytotoxic T cell-induced apoptosis. *Cell* *103*, 491-500.
- Munn, D.H., and Mellor, A.L. (2013). Indoleamine 2,3 dioxygenase and metabolic control of immune responses. *Trends in immunology* *34*, 137-143.
- Muranski, P., and Restifo, N.P. (2013). Essentials of Th17 cell commitment and plasticity. *Blood* *121*, 2402-2414.
- Muret, J., Hasmim, M., Stasik, I., Jalil, A., Mallavialle, A., Nanbakhsh, A., Lacroix, L., Billot, K., Baud, V., Thiery, J., *et al.* (2012). Attenuation of soft-tissue sarcomas resistance to the cytotoxic action of TNF-alpha by restoring p53 function. *PLoS one* *7*, e38808.
- Murray-Zmijewski, F., Lane, D.P., and Bourdon, J.C. (2006). p53/p63/p73 isoforms: an orchestra of isoforms to harmonise cell differentiation and response to stress. *Cell death and differentiation* *13*, 962-972.

- Nakagawa, I., Amano, A., Mizushima, N., Yamamoto, A., Yamaguchi, H., Kamimoto, T., Nara, A., Funao, J., Nakata, M., Tsuda, K., *et al.* (2004). Autophagy defends cells against invading group A *Streptococcus*. *Science* *306*, 1037-1040.
- Nakatogawa, H., Ichimura, Y., and Ohsumi, Y. (2007). Atg8, a ubiquitin-like protein required for autophagosome formation, mediates membrane tethering and hemifusion. *Cell* *130*, 165-178.
- Nakatogawa, H., Suzuki, K., Kamada, Y., and Ohsumi, Y. (2009). Dynamics and diversity in autophagy mechanisms: lessons from yeast. *Nature reviews. Molecular cell biology* *10*, 458-467.
- Narayanan, A., and Jacobson, M.P. (2009). Computational studies of protein regulation by post-translational phosphorylation. *Current opinion in structural biology* *19*, 156-163.
- Naumov, Y.N., Bahjat, K.S., Gausling, R., Abraham, R., Exley, M.A., Koezuka, Y., Balk, S.B., Strominger, J.L., Clare-Salzer, M., and Wilson, S.B. (2001). Activation of CD1d-restricted T cells protects NOD mice from developing diabetes by regulating dendritic cell subsets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *98*, 13838-13843.
- Neumann, L., Pforr, C., Beaudouin, J., Pappa, A., Fricker, N., Krammer, P.H., Lavrik, I.N., and Eils, R. (2010). Dynamics within the CD95 death-inducing signaling complex decide life and death of cells. *Molecular systems biology* *6*, 352.
- Newton, K., and Strasser, A. (2000). Ionizing radiation and chemotherapeutic drugs induce apoptosis in lymphocytes in the absence of Fas or FADD/MORT1 signaling. Implications for cancer therapy. *The Journal of experimental medicine* *191*, 195-200.
- Ngiow, S.F., Teng, M.W., and Smyth, M.J. (2011). Prospects for TIM3-Targeted Antitumor Immunotherapy. *Cancer research* *71*, 6567-6571.
- Nguyen, L.T., and Ohashi, P.S. (2015). Clinical blockade of PD1 and LAG3--potential mechanisms of action. *Nature reviews. Immunology* *15*, 45-56.
- Olivier, M., Hollstein, M., and Hainaut, P. (2010). TP53 mutations in human cancers: origins, consequences, and clinical use. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* *2*, a001008.
- Orange, J.S. (2007). The lytic NK cell immunological synapse and sequential steps in its formation. *Advances in experimental medicine and biology* *601*, 225-233.
- Overwijk, W.W., and Restifo, N.P. (2000). Autoimmunity and the immunotherapy of cancer: targeting the "self" to destroy the "other". *Critical reviews in immunology* *20*, 433-450.
- Owen-Schaub, L.B., Zhang, W., Cusack, J.C., Angelo, L.S., Santee, S.M., Fujiwara, T., Roth, J.A., Deisseroth, A.B., Zhang, W.W., Kruzel, E., and *et al.* (1995). Wild-type human p53 and a temperature-sensitive mutant induce Fas/APO-1 expression. *Molecular and cellular biology* *15*, 3032-3040.
- Ozturk, S., Schleich, K., and Lavrik, I.N. (2012). Cellular FLICE-like inhibitory proteins (c-FLIPs): fine-tuners of life and death decisions. *Experimental cell research* *318*, 1324-1331.
- Palmer, D.C., Chan, C.C., Gattinoni, L., Wrzesinski, C., Paulos, C.M., Hinrichs, C.S., Powell, D.J., Jr., Klebanoff, C.A., Finkelstein, S.E., Fariss, R.N., *et al.* (2008). Effective tumor treatment targeting a melanoma/melanocyte-associated antigen triggers severe ocular autoimmunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *105*, 8061-8066.



- Pamarthy, D., Tan, M., Wu, M., Chen, J., Yang, D., Wang, S., Zhang, H., and Sun, Y. (2007). p27 degradation by an ellipticinium series of compound via ubiquitin-proteasome pathway. *Cancer biology & therapy* 6, 360-366.
- Pao, L.I., Sumaria, N., Kelly, J.M., van Dommelen, S., Cretney, E., Wallace, M.E., Anthony, D.A., Uldrich, A.P., Godfrey, D.I., Papadimitriou, J.M., *et al.* (2005). Functional analysis of granzyme M and its role in immunity to infection. *Journal of immunology* 175, 3235-3243.
- Parzych, K.R., and Klionsky, D.J. (2014). An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation. *Antioxidants & redox signaling* 20, 460-473.
- Patton, J.T., Mayo, L.D., Singhi, A.D., Gudkov, A.V., Stark, G.R., and Jackson, M.W. (2006). Levels of HdmX expression dictate the sensitivity of normal and transformed cells to Nutlin-3. *Cancer research* 66, 3169-3176.
- Pearce, E.J., Caspar, P., Grzych, J.M., Lewis, F.A., and Sher, A. (2012). Pillars article: downregulation of Th1 cytokine production accompanies induction of Th2 responses by a parasitic helminth, *Schistosoma mansoni*. *J. Exp. Med.* 199. 173: 159-166. *Journal of immunology* 189, 1104-1111.
- Pearce, E.L., Mullen, A.C., Martins, G.A., Krawczyk, C.M., Hutchins, A.S., Zediak, V.P., Banica, M., DiCioccio, C.B., Gross, D.A., Mao, C.A., *et al.* (2003). Control of effector CD8<sup>+</sup> T cell function by the transcription factor Eomesodermin. *Science* 302, 1041-1043.
- Pearson, S., Jia, H., and Kandachi, K. (2004). China approves first gene therapy. *Nature biotechnology* 22, 3-4.
- Peng, X., Zhang, M.Q., Conserva, F., Hosny, G., Selivanova, G., Bykov, V.J., Arner, E.S., and Wiman, K.G. (2013). APR-246/PRIMA-1MET inhibits thioredoxin reductase 1 and converts the enzyme to a dedicated NADPH oxidase. *Cell death & disease* 4, e881.
- Peng, Y., Li, C., Chen, L., Sebt, S., and Chen, J. (2003). Rescue of mutant p53 transcription function by ellipticine. *Oncogene* 22, 4478-4487.
- Petros, A.M., Gunasekera, A., Xu, N., Olejniczak, E.T., and Fesik, S.W. (2004). Defining the p53 DNA-binding domain/Bcl-x(L)-binding interface using NMR. *FEBS letters* 559, 171-174.
- Pham, C.T., Ivanovich, J.L., Raptis, S.Z., Zehnbauser, B., and Ley, T.J. (2004). Papillon-Lefevre syndrome: correlating the molecular, cellular, and clinical consequences of cathepsin C/dipeptidyl peptidase I deficiency in humans. *Journal of immunology* 173, 7277-7281.
- Praper, T., Sonnen, A., Viero, G., Kladnik, A., Froelich, C.J., Anderluh, G., Dalla Serra, M., and Gilbert, R.J. (2011). Human perforin employs different avenues to damage membranes. *The Journal of biological chemistry* 286, 2946-2955.
- Quann, E.J., Merino, E., Furuta, T., and Huse, M. (2009). Localized diacylglycerol drives the polarization of the microtubule-organizing center in T cells. *Nature immunology* 10, 627-635.
- Radoja, S., Saio, M., and Frey, A.B. (2001). CD8<sup>+</sup> tumor-infiltrating lymphocytes are primed for Fas-mediated activation-induced cell death but are not apoptotic in situ. *Journal of immunology* 166, 6074-6083.
- Ramachandran, R., Tweten, R.K., and Johnson, A.E. (2004). Membrane-dependent conformational changes initiate cholesterol-dependent cytolysin oligomerization and intersubunit beta-strand alignment. *Nature structural & molecular biology* 11, 697-705.
- Rao, C.V., Patlolla, J.M., Qian, L., Zhang, Y., Brewer, M., Mohammed, A., Desai, D., Amin, S., Lightfoot, S., and Kopelovich, L. (2013). Chemopreventive effects of the p53-modulating agents CP-31398 and Prima-1 in tobacco carcinogen-induced lung tumorigenesis in A/J mice. *Neoplasia* 15, 1018-1027.

- Raulet, D.H. (2003). Roles of the NKG2D immunoreceptor and its ligands. *Nature reviews. Immunology* 3, 781-790.
- Rayburn, E., Zhang, R., He, J., and Wang, H. (2005). MDM2 and human malignancies: expression, clinical pathology, prognostic markers, and implications for chemotherapy. *Current cancer drug targets* 5, 27-41.
- Razi, M., Chan, E.Y., and Tooze, S.A. (2009). Early endosomes and endosomal coatome are required for autophagy. *The Journal of cell biology* 185, 305-321.
- Reddy, A., Caler, E.V., and Andrews, N.W. (2001). Plasma membrane repair is mediated by Ca(2+)-regulated exocytosis of lysosomes. *Cell* 106, 157-169.
- Reed, D., Shen, Y., Shelat, A.A., Arnold, L.A., Ferreira, A.M., Zhu, F., Mills, N., Smithson, D.C., Regni, C.A., Bashford, D., *et al.* (2010). Identification and characterization of the first small molecule inhibitor of MDMX. *The Journal of biological chemistry* 285, 10786-10796.
- Reefman, E., Kay, J.G., Wood, S.M., Offenhauser, C., Brown, D.L., Roy, S., Stanley, A.C., Low, P.C., Manderson, A.P., and Stow, J.L. (2010). Cytokine secretion is distinct from secretion of cytotoxic granules in NK cells. *Journal of immunology* 184, 4852-4862.
- Reggiori, F., Komatsu, M., Finley, K., and Simonsen, A. (2012). Autophagy: more than a nonselective pathway. *Int J Cell Biol* 2012, 219625.
- Rehman, A., Chahal, M.S., Tang, X., Bruce, J.E., Pommier, Y., and Daoud, S.S. (2005). Proteomic identification of heat shock protein 90 as a candidate target for p53 mutation reactivation by PRIMA-1 in breast cancer cells. *Breast cancer research : BCR* 7, R765-774.
- Reiman, J.M., Kmiecik, M., Manjili, M.H., and Knutson, K.L. (2007). Tumor immunoeediting and immunosculpting pathways to cancer progression. *Seminars in cancer biology* 17, 275-287.
- Restifo, N.P., Dudley, M.E., and Rosenberg, S.A. (2012). Adoptive immunotherapy for cancer: harnessing the T cell response. *Nature reviews. Immunology* 12, 269-281.
- Restifo, N.P., Marincola, F.M., Kawakami, Y., Taubenberger, J., Yannelli, J.R., and Rosenberg, S.A. (1996). Loss of functional beta 2-microglobulin in metastatic melanomas from five patients receiving immunotherapy. *Journal of the National Cancer Institute* 88, 100-108.
- Rippin, T.M., Bykov, V.J., Freund, S.M., Selivanova, G., Wiman, K.G., and Fersht, A.R. (2002). Characterization of the p53-rescue drug CP-31398 in vitro and in living cells. *Oncogene* 21, 2119-2129.
- Rodriguez, M.S., Desterro, J.M., Lain, S., Lane, D.P., and Hay, R.T. (2000). Multiple C-terminal lysine residues target p53 for ubiquitin-proteasome-mediated degradation. *Molecular and cellular biology* 20, 8458-8467.
- Rogulski, K.R., Freytag, S.O., Zhang, K., Gilbert, J.D., Paielli, D.L., Kim, J.H., Heise, C.C., and Kirn, D.H. (2000). In vivo antitumor activity of ONYX-015 is influenced by p53 status and is augmented by radiotherapy. *Cancer research* 60, 1193-1196.
- Romero, P., Zippelius, A., Kurth, I., Pittet, M.J., Touvrey, C., Iancu, E.M., Cortesy, P., Devevre, E., Speiser, D.E., and Rufer, N. (2007). Four functionally distinct populations of human effector-memory CD8+ T lymphocytes. *Journal of immunology* 178, 4112-4119.
- Romero, V., Fellows, E., Jenne, D.E., and Andrade, F. (2009). Cleavage of La protein by granzyme H induces cytoplasmic translocation and interferes with La-mediated HCV-IRES translational activity. *Cell death and differentiation* 16, 340-348.

Rosado, C.J., Buckle, A.M., Law, R.H., Butcher, R.E., Kan, W.T., Bird, C.H., Ung, K., Browne, K.A., Baran, K., Bashtannyk-Puhalovich, T.A., *et al.* (2007). A common fold mediates vertebrate defense and bacterial attack. *Science* *317*, 1548-1551.

Rotter, V., Witte, O.N., Coffman, R., and Baltimore, D. (1980). Abelson murine leukemia virus-induced tumors elicit antibodies against a host cell protein, P50. *Journal of virology* *36*, 547-555.

Rouas-Freiss, N., Moreau, P., Ferrone, S., and Carosella, E.D. (2005). HLA-G proteins in cancer: do they provide tumor cells with an escape mechanism? *Cancer research* *65*, 10139-10144.

Rubinsztein, D.C., Gestwicki, J.E., Murphy, L.O., and Klionsky, D.J. (2007). Potential therapeutic applications of autophagy. *Nature reviews. Drug discovery* *6*, 304-312.

Ruiz de Almodovar, C., Ruiz-Ruiz, C., Rodriguez, A., Ortiz-Ferron, G., Redondo, J.M., and Lopez-Rivas, A. (2004). Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) decoy receptor TRAIL-R3 is up-regulated by p53 in breast tumor cells through a mechanism involving an intronic p53-binding site. *The Journal of biological chemistry* *279*, 4093-4101.

Sachdeva, M., Zhu, S., Wu, F., Wu, H., Walia, V., Kumar, S., Elble, R., Watabe, K., and Mo, Y.Y. (2009). p53 represses c-Myc through induction of the tumor suppressor miR-145. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *106*, 3207-3212.

Saha, T., Kar, R.K., and Sa, G. (2015). Structural and sequential context of p53: A review of experimental and theoretical evidence. *Progress in biophysics and molecular biology* *117*, 250-263.

Sakaguchi, S., Vignali, D.A., Rudensky, A.Y., Niec, R.E., and Waldmann, H. (2013). The plasticity and stability of regulatory T cells. *Nature reviews. Immunology* *13*, 461-467.

Sansome, C., Zaika, A., Marchenko, N.D., and Moll, U.M. (2001). Hypoxia death stimulus induces translocation of p53 protein to mitochondria. Detection by immunofluorescence on whole cells. *FEBS letters* *488*, 110-115.

Sauer, H., Pratsch, L., Tschopp, J., Bhakdi, S., and Peters, R. (1991). Functional size of complement and perforin pores compared by confocal laser scanning microscopy and fluorescence microphotolysis. *Biochimica et biophysica acta* *1063*, 137-146.

Scaffidi, C., Fulda, S., Srinivasan, A., Friesen, C., Li, F., Tomaselli, K.J., Debatin, K.M., Krammer, P.H., and Peter, M.E. (1998). Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *The EMBO journal* *17*, 1675-1687.

Scaffidi, C., Schmitz, I., Zha, J., Korsmeyer, S.J., Krammer, P.H., and Peter, M.E. (1999). Differential modulation of apoptosis sensitivity in CD95 type I and type II cells. *The Journal of biological chemistry* *274*, 22532-22538.

Scheffner, M., Werness, B.A., Huibregtse, J.M., Levine, A.J., and Howley, P.M. (1990). The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell* *63*, 1129-1136.

Schellenberg, B., Wang, P., Keeble, J.A., Rodriguez-Enriquez, R., Walker, S., Owens, T.W., Foster, F., Tanianis-Hughes, J., Brennan, K., Streuli, C.H., and Gilmore, A.P. (2013). Bax exists in a dynamic equilibrium between the cytosol and mitochondria to control apoptotic priming. *Molecular cell* *49*, 959-971.

Schreiber, T.H., and Podack, E.R. (2009). A critical analysis of the tumour immunosurveillance controversy for 3-MCA-induced sarcomas. *British journal of cancer* *101*, 381-386.

Schumacher, T.N., and Schreiber, R.D. (2015). Neoantigens in cancer immunotherapy. *Science* *348*, 69-74.

- Schwartz, R.H. (2003). T cell anergy. *Annual review of immunology* 21, 305-334.
- Screpanti, V., Wallin, R.P., Ljunggren, H.G., and Grandien, A. (2001). A central role for death receptor-mediated apoptosis in the rejection of tumors by NK cells. *Journal of immunology* 167, 2068-2073.
- Secchiero, P., di Iasio, M.G., Gonelli, A., and Zauli, G. (2008). The MDM2 inhibitor Nutlins as an innovative therapeutic tool for the treatment of haematological malignancies. *Current pharmaceutical design* 14, 2100-2110.
- Seo, Y.R., Sweeney, C., and Smith, M.L. (2002). Selenomethionine induction of DNA repair response in human fibroblasts. *Oncogene* 21, 3663-3669.
- Serafini, P., Carbley, R., Noonan, K.A., Tan, G., Bronte, V., and Borrello, I. (2004). High-dose granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-producing vaccines impair the immune response through the recruitment of myeloid suppressor cells. *Cancer research* 64, 6337-6343.
- Shangary, S., Qin, D., McEachern, D., Liu, M., Miller, R.S., Qiu, S., Nikolovska-Coleska, Z., Ding, K., Wang, G., Chen, J., *et al.* (2008). Temporal activation of p53 by a specific MDM2 inhibitor is selectively toxic to tumors and leads to complete tumor growth inhibition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 3933-3938.
- Shankaran, V., Ikeda, H., Bruce, A.T., White, J.M., Swanson, P.E., Old, L.J., and Schreiber, R.D. (2001). IFN $\gamma$  and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* 410, 1107-1111.
- Sharma, P., and Allison, J.P. (2015). Immune checkpoint targeting in cancer therapy: toward combination strategies with curative potential. *Cell* 161, 205-214.
- Sheikh, M.S., Huang, Y., Fernandez-Salas, E.A., El-Deiry, W.S., Friess, H., Amundson, S., Yin, J., Meltzer, S.J., Holbrook, N.J., and Fornace, A.J., Jr. (1999). The antiapoptotic decoy receptor TRID/TRAIL-R3 is a p53-regulated DNA damage-inducible gene that is overexpressed in primary tumors of the gastrointestinal tract. *Oncogene* 18, 4153-4159.
- Shi, C.S., Shenderov, K., Huang, N.N., Kabat, J., Abu-Asab, M., Fitzgerald, K.A., Sher, A., and Kehrl, J.H. (2012). Activation of autophagy by inflammatory signals limits IL-1 $\beta$  production by targeting ubiquitinated inflammasomes for destruction. *Nature immunology* 13, 255-263.
- Shibutani, S.T., Saitoh, T., Nowag, H., Munz, C., and Yoshimori, T. (2015). Autophagy and autophagy-related proteins in the immune system. *Nature immunology* 16, 1014-1024.
- Shimada, H., Takeda, A., Arima, M., Okazumi, S., Matsubara, H., Nabeya, Y., Funami, Y., Hayashi, H., Gunji, Y., Suzuki, T., *et al.* (2000). Serum p53 antibody is a useful tumor marker in superficial esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer* 89, 1677-1683.
- Shin, M.S., Kim, H.S., Lee, S.H., Park, W.S., Kim, S.Y., Park, J.Y., Lee, J.H., Lee, S.K., Lee, S.N., Jung, S.S., *et al.* (2001). Mutations of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor 1 (TRAIL-R1) and receptor 2 (TRAIL-R2) genes in metastatic breast cancers. *Cancer research* 61, 4942-4946.
- Shresta, S., Goda, P., Wesselschmidt, R., and Ley, T.J. (1997). Residual cytotoxicity and granzyme K expression in granzyme A-deficient cytotoxic lymphocytes. *The Journal of biological chemistry* 272, 20236-20244.
- Simonsen, A., and Tooze, S.A. (2009). Coordination of membrane events during autophagy by multiple class III PI3-kinase complexes. *The Journal of cell biology* 186, 773-782.

- Smyth, M.J., Thia, K.Y., Street, S.E., MacGregor, D., Godfrey, D.I., and Trapani, J.A. (2000). Perforin-mediated cytotoxicity is critical for surveillance of spontaneous lymphoma. *The Journal of experimental medicine* *192*, 755-760.
- Somasekharan, S.P., Koc, M., Morizot, A., Micheau, O., Sorensen, P.H., Gaide, O., Andera, L., and Martinou, J.C. (2013). TRAIL promotes membrane blebbing, detachment and migration of cells displaying a dysfunctional intrinsic pathway of apoptosis. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* *18*, 324-336.
- Song, X., Krelin, Y., Dvorkin, T., Bjorkdahl, O., Segal, S., Dinarello, C.A., Voronov, E., and Apte, R.N. (2005). CD11b<sup>+</sup>/Gr-1<sup>+</sup> immature myeloid cells mediate suppression of T cells in mice bearing tumors of IL-1beta-secreting cells. *Journal of immunology* *175*, 8200-8208.
- Sot, B., Freund, S.M., and Fersht, A.R. (2007). Comparative biophysical characterization of p53 with the pro-apoptotic BAK and the anti-apoptotic BCL-xL. *The Journal of biological chemistry* *282*, 29193-29200.
- Sou, Y.S., Waguri, S., Iwata, J., Ueno, T., Fujimura, T., Hara, T., Sawada, N., Yamada, A., Mizushima, N., Uchiyama, Y., *et al.* (2008). The Atg8 conjugation system is indispensable for proper development of autophagic isolation membranes in mice. *Molecular biology of the cell* *19*, 4762-4775.
- Souers, A.J., Levenson, J.D., Boghaert, E.R., Ackler, S.L., Catron, N.D., Chen, J., Dayton, B.D., Ding, H., Enschede, S.H., Fairbrother, W.J., *et al.* (2013). ABT-199, a potent and selective BCL-2 inhibitor, achieves antitumor activity while sparing platelets. *Nature medicine* *19*, 202-208.
- Soussi, T., and Wiman, K.G. (2015). TP53: an oncogene in disguise. *Cell death and differentiation* *22*, 1239-1249.
- Speidel, D., Helmbold, H., and Deppert, W. (2006). Dissection of transcriptional and non-transcriptional p53 activities in the response to genotoxic stress. *Oncogene* *25*, 940-953.
- Spel, L., Boelens, J.J., Nierkens, S., and Boes, M. (2013). Antitumor immune responses mediated by dendritic cells: How signals derived from dying cancer cells drive antigen cross-presentation. *Oncoimmunology* *2*, e26403.
- Sprick, M.R., Weigand, M.A., Rieser, E., Rauch, C.T., Juo, P., Blenis, J., Krammer, P.H., and Walczak, H. (2000). FADD/MORT1 and caspase-8 are recruited to TRAIL receptors 1 and 2 and are essential for apoptosis mediated by TRAIL receptor 2. *Immunity* *12*, 599-609.
- Stavridi, E.S., Chehab, N.H., Malikzay, A., and Halazonetis, T.D. (2001). Substitutions that compromise the ionizing radiation-induced association of p53 with 14-3-3 proteins also compromise the ability of p53 to induce cell cycle arrest. *Cancer research* *61*, 7030-7033.
- Strasser, A., Cory, S., and Adams, J.M. (2011). Deciphering the rules of programmed cell death to improve therapy of cancer and other diseases. *The EMBO journal* *30*, 3667-3683.
- Street, S.E., Zerafa, N., Iezzi, M., Westwood, J.A., Stagg, J., Musiani, P., and Smyth, M.J. (2007). Host perforin reduces tumor number but does not increase survival in oncogene-driven mammary adenocarcinoma. *Cancer research* *67*, 5454-5460.
- Sugars, K.L., Budhram-Mahadeo, V., Packham, G., and Latchman, D.S. (2001). A minimal Bcl-x promoter is activated by Brn-3a and repressed by p53. *Nucleic acids research* *29*, 4530-4540.
- Sutton, V.R., Brennan, A.J., Ellis, S., Danne, J., Thia, K., Jenkins, M.R., Voskoboinik, I., Pejler, G., Johnstone, R.W., Andrews, D.M., and Trapani, J.A. (2016). Serglycin determines secretory granule repertoire and regulates natural killer cell and cytotoxic T lymphocyte cytotoxicity. *The FEBS journal* *283*, 947-961.

- Sutton, V.R., Davis, J.E., Cancilla, M., Johnstone, R.W., Ruefli, A.A., Sedelies, K., Browne, K.A., and Trapani, J.A. (2000). Initiation of apoptosis by granzyme B requires direct cleavage of bid, but not direct granzyme B-mediated caspase activation. *The Journal of experimental medicine* *192*, 1403-1414.
- Sutton, V.R., Sedelies, K., Dewson, G., Christensen, M.E., Bird, P.I., Johnstone, R.W., Kluck, R.M., Trapani, J.A., and Waterhouse, N.J. (2012). Granzyme B triggers a prolonged pressure to die in Bcl-2 overexpressing cells, defining a window of opportunity for effective treatment with ABT-737. *Cell death & disease* *3*, e344.
- Sutton, V.R., Wovk, M.E., Cancilla, M., and Trapani, J.A. (2003). Caspase activation by granzyme B is indirect, and caspase autoprocessing requires the release of proapoptotic mitochondrial factors. *Immunity* *18*, 319-329.
- Swann, J.B., and Smyth, M.J. (2007). Immune surveillance of tumors. *The Journal of clinical investigation* *117*, 1137-1146.
- Takahashi, H., Feuerhake, F., Kutok, J.L., Monti, S., Dal Cin, P., Neuberg, D., Aster, J.C., and Shipp, M.A. (2006). FAS death domain deletions and cellular FADD-like interleukin 1beta converting enzyme inhibitory protein (long) overexpression: alternative mechanisms for deregulating the extrinsic apoptotic pathway in diffuse large B-cell lymphoma subtypes. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* *12*, 3265-3271.
- Takimoto, R., and El-Deiry, W.S. (2000). Wild-type p53 transactivates the KILLER/DR5 gene through an intronic sequence-specific DNA-binding site. *Oncogene* *19*, 1735-1743.
- Takimoto, R., Wang, W., Dicker, D.T., Rastinejad, F., Lyssikatos, J., and el-Deiry, W.S. (2002). The mutant p53-conformation modifying drug, CP-31398, can induce apoptosis of human cancer cells and can stabilize wild-type p53 protein. *Cancer biology & therapy* *1*, 47-55.
- Tang, J., Di, J., Cao, H., Bai, J., and Zheng, J. (2015). p53-mediated autophagic regulation: A prospective strategy for cancer therapy. *Cancer letters* *363*, 101-107.
- Tang, R., Yeh, C.Y., Wang, J.Y., Changchien, C.R., Chen, J.S., and Hsieh, L.L. (2009). Serum p53 antibody as tumor marker for follow-up of colorectal cancer after curative resection. *Annals of surgical oncology* *16*, 2516-2523.
- Tang, W., Willers, H., and Powell, S.N. (1999). p53 directly enhances rejoining of DNA double-strand breaks with cohesive ends in gamma-irradiated mouse fibroblasts. *Cancer research* *59*, 2562-2565.
- Tang, Z.H., Chen, X., Wang, Z.Y., Chai, K., Wang, Y.F., Xu, X.H., Wang, X.W., Lu, J.H., Wang, Y.T., Chen, X.P., and Lu, J.J. (2016). Induction of C/EBP homologous protein-mediated apoptosis and autophagy by licochalcone A in non-small cell lung cancer cells. *Scientific reports* *6*, 26241.
- Tasdemir, E., Maiuri, M.C., Galluzzi, L., Vitale, I., Djavaheri-Mergny, M., D'Amelio, M., Criollo, A., Morselli, E., Zhu, C., Harper, F., *et al.* (2008). Regulation of autophagy by cytoplasmic p53. *Nature cell biology* *10*, 676-687.
- Tessoulin, B., Descamps, G., Moreau, P., Maiga, S., Lode, L., Godon, C., Marionneau-Lambot, S., Oullier, T., Le Gouill, S., Amiot, M., and Pellat-Deceunynck, C. (2014). PRIMA-1Met induces myeloma cell death independent of p53 by impairing the GSH/ROS balance. *Blood* *124*, 1626-1636.
- Teufel, D.P., Freund, S.M., Bycroft, M., and Fersht, A.R. (2007). Four domains of p300 each bind tightly to a sequence spanning both transactivation subdomains of p53. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *104*, 7009-7014.

- Textor, S., Fiegler, N., Arnold, A., Porgador, A., Hofmann, T.G., and Cerwenka, A. (2011). Human NK cells are alerted to induction of p53 in cancer cells by upregulation of the NKG2D ligands ULBP1 and ULBP2. *Cancer research* *71*, 5998-6009.
- Thiery, J., Abouzahr, S., Dorothee, G., Jalil, A., Richon, C., Vergnon, I., Mami-Chouaib, F., and Chouaib, S. (2005). p53 potentiation of tumor cell susceptibility to CTL involves Fas and mitochondrial pathways. *Journal of immunology* *174*, 871-878.
- Thiery, J., Dorothee, G., Haddada, H., Echchakir, H., Richon, C., Stancou, R., Vergnon, I., Benard, J., Mami-Chouaib, F., and Chouaib, S. (2003). Potentiation of a tumor cell susceptibility to autologous CTL killing by restoration of wild-type p53 function. *Journal of immunology* *170*, 5919-5926.
- Thiery, J., Keefe, D., Boulant, S., Boucrot, E., Walch, M., Martinvalet, D., Goping, I.S., Bleackley, R.C., Kirchhausen, T., and Lieberman, J. (2011). Perforin pores in the endosomal membrane trigger the release of endocytosed granzyme B into the cytosol of target cells. *Nature immunology* *12*, 770-777.
- Thiery, J., Keefe, D., Saffarian, S., Martinvalet, D., Walch, M., Boucrot, E., Kirchhausen, T., and Lieberman, J. (2010). Perforin activates clathrin- and dynamin-dependent endocytosis, which is required for plasma membrane repair and delivery of granzyme B for granzyme-mediated apoptosis. *Blood* *115*, 1582-1593.
- Thiery, J., Safta, T.B., Ziani, L., and Chouaib, S. (2015). Mechanisms of Cytotoxic Lymphocyte-Mediated Apoptosis and Relationship with the Tumor Suppressor p53. *Critical reviews in immunology* *35*, 433-449.
- Thomas, D.A., Du, C., Xu, M., Wang, X., and Ley, T.J. (2000). DFF45/ICAD can be directly processed by granzyme B during the induction of apoptosis. *Immunity* *12*, 621-632.
- Tilkin, A.F., Lubin, R., Soussi, T., Lazar, V., Janin, N., Mathieu, M.C., Lefrere, I., Carlu, C., Roy, M., Kayibanda, M., and et al. (1995). Primary proliferative T cell response to wild-type p53 protein in patients with breast cancer. *European journal of immunology* *25*, 1765-1769.
- Toledo, F., and Wahl, G.M. (2006). Regulating the p53 pathway: in vitro hypotheses, in vivo veritas. *Nature reviews. Cancer* *6*, 909-923.
- Tomita, Y., Marchenko, N., Erster, S., Nemajerova, A., Dehner, A., Klein, C., Pan, H., Kessler, H., Pancoska, P., and Moll, U.M. (2006). WT p53, but not tumor-derived mutants, bind to Bcl2 via the DNA binding domain and induce mitochondrial permeabilization. *The Journal of biological chemistry* *281*, 8600-8606.
- Trapani, J.A. (2012). Granzymes, cytotoxic granules and cell death: the early work of Dr. Jurg Tschopp. *Cell death and differentiation* *19*, 21-27.
- Tripathi, R., Ash, D., and Shaha, C. (2014). Beclin-1-p53 interaction is crucial for cell fate determination in embryonal carcinoma cells. *Journal of cellular and molecular medicine* *18*, 2275-2286.
- Tron, V.A., Trotter, M.J., Ishikawa, T., Ho, V.C., and Li, G. (1998). p53-dependent regulation of nucleotide excision repair in murine epidermis in vivo. *Journal of cutaneous medicine and surgery* *3*, 16-20.
- Tse, C., Shoemaker, A.R., Adickes, J., Anderson, M.G., Chen, J., Jin, S., Johnson, E.F., Marsh, K.C., Mitten, M.J., Nimmer, P., et al. (2008). ABT-263: a potent and orally bioavailable Bcl-2 family inhibitor. *Cancer research* *68*, 3421-3428.
- Tseng, S.Y., Otsuji, M., Gorski, K., Huang, X., Slansky, J.E., Pai, S.I., Shalabi, A., Shin, T., Pardoll, D.M., and Tsuchiya, H. (2001). B7-DC, a new dendritic cell molecule with potent costimulatory properties for T cells. *The Journal of experimental medicine* *193*, 839-846.

- Tsushima, F., Yao, S., Shin, T., Flies, A., Flies, S., Xu, H., Tamada, K., Pardoll, D.M., and Chen, L. (2007). Interaction between B7-H1 and PD-1 determines initiation and reversal of T-cell anergy. *Blood* *110*, 180-185.
- van der Burg, S.H., Arens, R., Ossendorp, F., van Hall, T., and Melief, C.J. (2016). Vaccines for established cancer: overcoming the challenges posed by immune evasion. *Nature reviews. Cancer* *16*, 219-233.
- Varfolomeev, E., Maecker, H., Sharp, D., Lawrence, D., Renz, M., Vucic, D., and Ashkenazi, A. (2005). Molecular determinants of kinase pathway activation by Apo2 ligand/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *The Journal of biological chemistry* *280*, 40599-40608.
- Varfolomeev, E.E., Schuchmann, M., Luria, V., Chiannikulchai, N., Beckmann, J.S., Mett, I.L., Rebrikov, D., Brodianski, V.M., Kemper, O.C., Kollet, O., *et al.* (1998). Targeted disruption of the mouse Caspase 8 gene ablates cell death induction by the TNF receptors, Fas/Apo1, and DR3 and is lethal prenatally. *Immunity* *9*, 267-276.
- Vaseva, A.V., Marchenko, N.D., Ji, K., Tsirka, S.E., Holzmann, S., and Moll, U.M. (2012). p53 opens the mitochondrial permeability transition pore to trigger necrosis. *Cell* *149*, 1536-1548.
- Vassilev, L.T., Vu, B.T., Graves, B., Carvajal, D., Podlaski, F., Filipovic, Z., Kong, N., Kammlott, U., Lukacs, C., Klein, C., *et al.* (2004). In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2. *Science* *303*, 844-848.
- Vazquez, A., Bond, E.E., Levine, A.J., and Bond, G.L. (2008). The genetics of the p53 pathway, apoptosis and cancer therapy. *Nature reviews. Drug discovery* *7*, 979-987.
- Vermeij, R., Leffers, N., van der Burg, S.H., Melief, C.J., Daemen, T., and Nijman, H.W. (2011). Immunological and clinical effects of vaccines targeting p53-overexpressing malignancies. *J Biomed Biotechnol* *2011*, 702146.
- Veugelers, K., Motyka, B., Goping, I.S., Shostak, I., Sawchuk, T., and Bleackley, R.C. (2006). Granule-mediated killing by granzyme B and perforin requires a mannose 6-phosphate receptor and is augmented by cell surface heparan sulfate. *Molecular biology of the cell* *17*, 623-633.
- Villegas, F.R., Coca, S., Villarrubia, V.G., Jimenez, R., Chillon, M.J., Jareno, J., Zuil, M., and Callol, L. (2002). Prognostic significance of tumor infiltrating natural killer cells subset CD57 in patients with squamous cell lung cancer. *Lung cancer* *35*, 23-28.
- Vivier, E., Ugolini, S., Blaise, D., Chabannon, C., and Brossay, L. (2012). Targeting natural killer cells and natural killer T cells in cancer. *Nature reviews. Immunology* *12*, 239-252.
- Volkman, N., Marassi, F.M., Newmeyer, D.D., and Hanein, D. (2014). The rheostat in the membrane: BCL-2 family proteins and apoptosis. *Cell death and differentiation* *21*, 206-215.
- Voskens, C.J., Goldinger, S.M., Loquai, C., Robert, C., Kaehler, K.C., Berking, C., Bergmann, T., Bockmeyer, C.L., Eigentler, T., Fluck, M., *et al.* (2013). The price of tumor control: an analysis of rare side effects of anti-CTLA-4 therapy in metastatic melanoma from the ipilimumab network. *PloS one* *8*, e53745.
- Voskoboinik, I., Thia, M.C., Fletcher, J., Ciccone, A., Browne, K., Smyth, M.J., and Trapani, J.A. (2005). Calcium-dependent plasma membrane binding and cell lysis by perforin are mediated through its C2 domain: A critical role for aspartate residues 429, 435, 483, and 485 but not 491. *The Journal of biological chemistry* *280*, 8426-8434.
- Vousden, K.H., and Lu, X. (2002). Live or let die: the cell's response to p53. *Nature reviews. Cancer* *2*, 594-604.



- Walczak, H. (2011). TNF and ubiquitin at the crossroads of gene activation, cell death, inflammation, and cancer. *Immunological reviews* 244, 9-28.
- Walker, K.K., and Levine, A.J. (1996). Identification of a novel p53 functional domain that is necessary for efficient growth suppression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 15335-15340.
- Wang, B., Niu, D., Lai, L., and Ren, E.C. (2013). p53 increases MHC class I expression by upregulating the endoplasmic reticulum aminopeptidase ERAP1. *Nature communications* 4, 2359.
- Wang, H., Ma, X., Ren, S., Buolamwini, J.K., and Yan, C. (2011). A small-molecule inhibitor of MDMX activates p53 and induces apoptosis. *Molecular cancer therapeutics* 10, 69-79.
- Wang, S., Sun, W., Zhao, Y., McEachern, D., Meaux, I., Barriere, C., Stuckey, J.A., Meagher, J.L., Bai, L., Liu, L., *et al.* (2014). SAR405838: an optimized inhibitor of MDM2-p53 interaction that induces complete and durable tumor regression. *Cancer research* 74, 5855-5865.
- Wang, W., Takimoto, R., Rastinejad, F., and El-Deiry, W.S. (2003). Stabilization of p53 by CP-31398 inhibits ubiquitination without altering phosphorylation at serine 15 or 20 or MDM2 binding. *Molecular and cellular biology* 23, 2171-2181.
- Wei, M.C., Zong, W.X., Cheng, E.H., Lindsten, T., Panoutsakopoulou, V., Ross, A.J., Roth, K.A., MacGregor, G.R., Thompson, C.B., and Korsmeyer, S.J. (2001). Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science* 292, 727-730.
- Wei, Y., Pattingre, S., Sinha, S., Bassik, M., and Levine, B. (2008). JNK1-mediated phosphorylation of Bcl-2 regulates starvation-induced autophagy. *Molecular cell* 30, 678-688.
- Weilbacher, A., Gutekunst, M., Oren, M., Aulitzky, W.E., and van der Kuip, H. (2014). RITA can induce cell death in p53-defective cells independently of p53 function via activation of JNK/SAPK and p38. *Cell death & disease* 5, e1318.
- Weinmann, L., Wischhusen, J., Demma, M.J., Naumann, U., Roth, P., Dasmahapatra, B., and Weller, M. (2008). A novel p53 rescue compound induces p53-dependent growth arrest and sensitises glioma cells to Apo2L/TRAIL-induced apoptosis. *Cell death and differentiation* 15, 718-729.
- West, L.E., and Gozani, O. (2011). Regulation of p53 function by lysine methylation. *Epigenomics* 3, 361-369.
- Westphal, D., Kluck, R.M., and Dewson, G. (2014). Building blocks of the apoptotic pore: how Bax and Bak are activated and oligomerize during apoptosis. *Cell death and differentiation* 21, 196-205.
- Wilson, N.S., Dixit, V., and Ashkenazi, A. (2009). Death receptor signal transducers: nodes of coordination in immune signaling networks. *Nature immunology* 10, 348-355.
- Wolff, S., Erster, S., Palacios, G., and Moll, U.M. (2008). p53's mitochondrial translocation and MOMP action is independent of Puma and Bax and severely disrupts mitochondrial membrane integrity. *Cell research* 18, 733-744.
- Xu, G.W., Mawji, I.A., Macrae, C.J., Koch, C.A., Datti, A., Wrana, J.L., Dennis, J.W., and Schimmer, A.D. (2008). A high-content chemical screen identifies ellipticine as a modulator of p53 nuclear localization. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* 13, 413-422.

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

Yang, A., Kaghad, M., Wang, Y., Gillett, E., Fleming, M.D., Dotsch, V., Andrews, N.C., Caput, D., and McKeon, F. (1998). p63, a p53 homolog at 3q27-29, encodes multiple products with transactivating, death-inducing, and dominant-negative activities. *Molecular cell* 2, 305-316.

Yang, L., Anderson, D.E., Baecher-Allan, C., Hastings, W.D., Bettelli, E., Oukka, M., Kuchroo, V.K., and Hafler, D.A. (2008). IL-21 and TGF-beta are required for differentiation of human T(H)17 cells. *Nature* 454, 350-352.

Yang, Y.P., Hu, L.F., Zheng, H.F., Mao, C.J., Hu, W.D., Xiong, K.P., Wang, F., and Liu, C.F. (2013). Application and interpretation of current autophagy inhibitors and activators. *Acta pharmacologica Sinica* 34, 625-635.

Yang, Z., and Klionsky, D.J. (2009). An overview of the molecular mechanism of autophagy. *Current topics in microbiology and immunology* 335, 1-32.

Yee, K.S., Wilkinson, S., James, J., Ryan, K.M., and Vousden, K.H. (2009). PUMA- and Bax-induced autophagy contributes to apoptosis. *Cell death and differentiation* 16, 1135-1145.

Yoon, K.W., Byun, S., Kwon, E., Hwang, S.Y., Chu, K., Hiraki, M., Jo, S.H., Weins, A., Hakrrouch, S., Cebulla, A., *et al.* (2015). Control of signaling-mediated clearance of apoptotic cells by the tumor suppressor p53. *Science* 349, 1261669.

Youle, R.J., and Strasser, A. (2008). The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nature reviews. Molecular cell biology* 9, 47-59.

Yu, X., Narayanan, S., Vazquez, A., and Carpizo, D.R. (2014). Small molecule compounds targeting the p53 pathway: are we finally making progress? *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* 19, 1055-1068.

Zalckvar, E., Berissi, H., Mizrachy, L., Idelchuk, Y., Koren, I., Eisenstein, M., Sabanay, H., Pinkas-Kramarski, R., and Kimchi, A. (2009). DAP-kinase-mediated phosphorylation on the BH3 domain of beclin 1 promotes dissociation of beclin 1 from Bcl-XL and induction of autophagy. *EMBO reports* 10, 285-292.

Zandi, R., Selivanova, G., Christensen, C.L., Gerds, T.A., Willumsen, B.M., and Poulsen, H.S. (2011). PRIMA-1Met/APR-246 induces apoptosis and tumor growth delay in small cell lung cancer expressing mutant p53. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 17, 2830-2841.

Zhang, D., Pasternack, M.S., Beresford, P.J., Wagner, L., Greenberg, A.H., and Lieberman, J. (2001). Induction of rapid histone degradation by the cytotoxic T lymphocyte protease Granzyme A. *The Journal of biological chemistry* 276, 3683-3690.

Zhang, J., and Ney, P.A. (2009). Role of BNIP3 and NIX in cell death, autophagy, and mitophagy. *Cell death and differentiation* 16, 939-946.

Zhang, L., and Fang, B. (2005). Mechanisms of resistance to TRAIL-induced apoptosis in cancer. *Cancer gene therapy* 12, 228-237.

Zhang, X.D., Wang, Y., Zhang, X., Han, R., Wu, J.C., Liang, Z.Q., Gu, Z.L., Han, F., Fukunaga, K., and Qin, Z.H. (2009). p53 mediates mitochondria dysfunction-triggered autophagy activation and cell death in rat striatum. *Autophagy* 5, 339-350.

Zhao, K., Chai, X., Johnston, K., Clements, A., and Marmorstein, R. (2001). Crystal structure of the mouse p53 core DNA-binding domain at 2.7 Å resolution. *The Journal of biological chemistry* 276, 12120-12127.

Zhao, T., Zhang, H., Guo, Y., and Fan, Z. (2007). Granzyme K directly processes bid to release cytochrome c and endonuclease G leading to mitochondria-dependent cell death. *The Journal of biological chemistry* 282, 12104-12111.

Zhu, P., Martinvalet, D., Chowdhury, D., Zhang, D., Schlesinger, A., and Lieberman, J. (2009). The cytotoxic T lymphocyte protease granzyme A cleaves and inactivates poly(adenosine 5'-diphosphate-ribose) polymerase-1. *Blood* 114, 1205-1216.

Zitvogel, L., Apetoh, L., Ghiringhelli, F., and Kroemer, G. (2008). Immunological aspects of cancer chemotherapy. *Nature reviews. Immunology* 8, 59-73.

Zitvogel, L., and Kroemer, G. (2015). CANCER. A p53-regulated immune checkpoint relevant to cancer. *Science* 349, 476-477.

Zou, H., Li, Y., Liu, X., and Wang, X. (1999). An APAF-1-cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *The Journal of biological chemistry* 274, 11549-11556.

Zou, W. (2006). Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy. *Nature reviews. Immunology* 6, 295-307.

zur Stadt, U., Rohr, J., Seifert, W., Koch, F., Grieve, S., Pagel, J., Strauss, J., Kasper, B., Nurnberg, G., Becker, C., *et al.* (2009). Familial hemophagocytic lymphohistiocytosis type 5 (FHL-5) is caused by mutations in Munc18-2 and impaired binding to syntaxin 11. *American journal of human genetics* 85, 482-492.

# Annexes



# Mechanisms of Cytotoxic Lymphocyte-Mediated Apoptosis and Relationship with the Tumor Suppressor p53

Jerome Thiery,\* Thouraya Ben Safta, Linda Ziani, & Salem Chouaib

INSERM, U1186, Villejuif, France; Gustave Roussy Cancer Campus, Villejuif, France; and University Paris-Saclay, Faculty of Medicine, Le Kremlin Bicêtre, France

\*Address all correspondence to: Dr. Jerome Thiery, U1186 INSERM, Gustave Roussy Cancer Campus, 39 rue Camille Desmoulins, 94800 Villejuif, FRANCE. Tel. +33 1 421 146 50; Fax: +33 1 421 152 88, E-mail: jerome.thiery@gustaveroussy.fr

**ABSTRACT:** Cytotoxic T lymphocytes and natural killer cells are key effector cells in the immune response against intracellular infection and transformed cells. These killer cells induce multiple programs of cell death to achieve their function of eliminating their targets. In this review, we summarize our current understanding of the signaling pathways involved in target cells apoptosis triggered by the cytotoxic effector cells. We also discuss the role of an important player in the field of apoptosis, the well-known p53 tumor suppressor, in the modulation of cytotoxic lymphocyte-mediated cell death.

**KEY WORDS:** Cytotoxic lymphocytes, granzymes, death domain receptors, p53, apoptosis

**ABBREVIATIONS:** CTL: cytotoxic T lymphocytes, NK: natural killer cell, PFN: perforin, Gzms: granzymes, hGzmB: human granzyme B, DR: death receptors, DD: death domain, DED: death effector domain, TNF-R: tumor necrosis factor (TNF) receptor, TRAIL: tumor-necrosis-factor related apoptosis inducing ligand, FADD: Fas-associated protein with death domain, DISC: death inducing signaling complex, cFLIP: cellular FLICE-like inhibitory protein, MOMP: mitochondria outer membrane permeabilization, OMM: Outer mitochondrial membrane, ROS: Reactive oxygen species

## I. INTRODUCTION

Cytotoxic T lymphocytes (CTLs) and natural killer cells (NKs) eliminate their target cells through two major pathways. The first is a secretory pathway involving the exocytosis by effector cells of preformed cytotoxic granules content (also known as the perforin/granzymes pathway).<sup>1</sup> The second is an alternate pathway based on killer cell surface expression of death inducing ligands and on their corresponding death receptors on target cells (also known as the death domain receptors pathway).<sup>2</sup> As such, these pathways are involved in both immune surveillance and immune regulation. However, on the basis of findings in genetically manipulated mice, human genetic diseases, and *in vitro* studies, the granule exocytosis pathway seems to have the dominant role in eliminating virus-infected cells and in tumor immunosurveillance.<sup>3, 4</sup> In contrast, engagement of the death receptors pathway is critical for maintaining lymphocyte homeostasis in non-

pathogenic situations but also forms a pathway of NK and CD8<sup>+</sup> T-cell-mediated killing of tumor cells.<sup>5</sup>

Target cells destroyed by the perforin/granzymes and the death receptor pathways die a highly regulated death (also known as programmed cell death or apoptosis).<sup>2</sup> During the last decade, numerous groundbreaking studies have been published and describe the signaling cascades triggered by these pathways and by cytotoxic lymphocytes to ultimately induce target cells apoptosis. However, although the key inducers and regulators involved in this process are now well known, major controversies still exist<sup>6, 7</sup> and new players continued to emerge in the field. In this review, we summarize our current understanding of how killer cells destroy their targets through the perforin/granzymes and the death receptor pathways. We also describe several lines of evidence demonstrating the implication of the tumor suppressor p53, a well-known protein involved in stress-induced cell death, in the modulation and induction of CTL and NK cell-mediated apoptosis

of target cells through the perforin/granzymes and death-domain receptor pathways.

## II. PATHWAYS INVOLVED IN CYTOTOXIC LYMPHOCYTES-INDUCED APOPTOSIS

### A. The Perforin/Granzyme Pathway

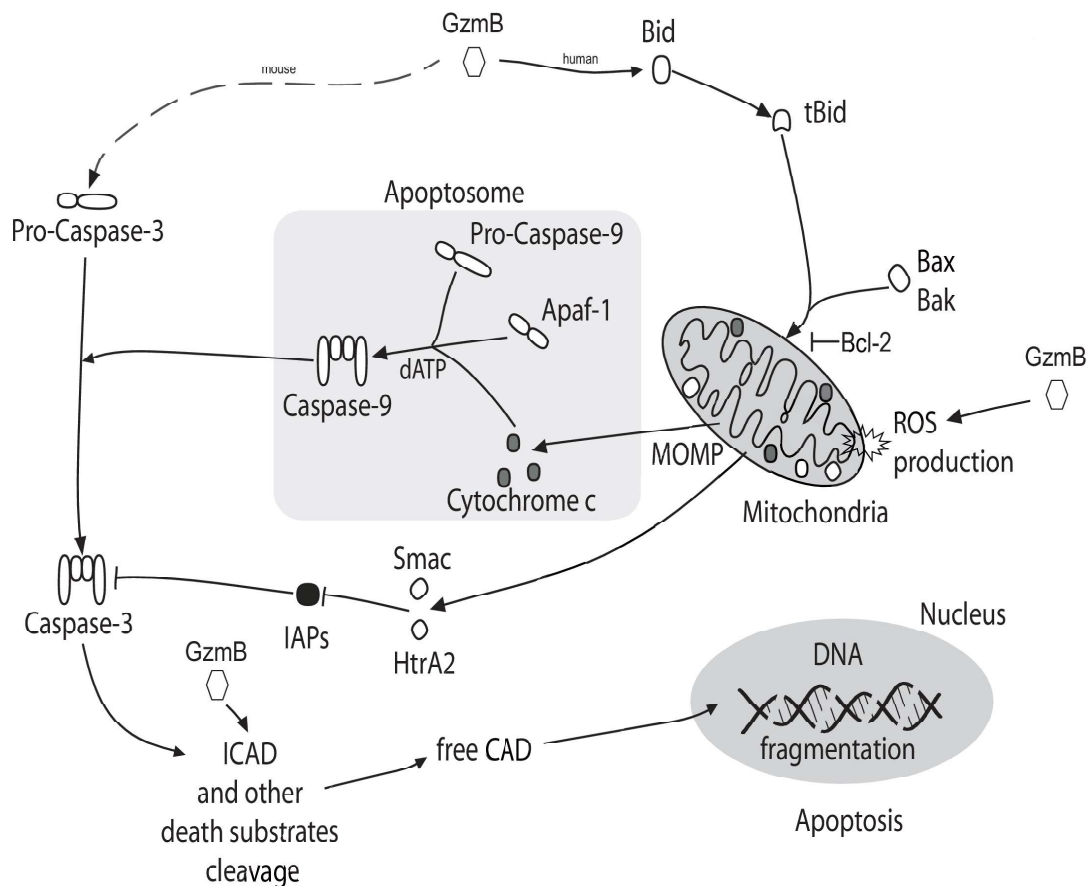
Killer lymphocytes induce apoptosis by releasing cytotoxic mediators from specialized secretory lysosomes, called cytotoxic granules, into the immunological synapse formed with their target cells.<sup>8,9</sup> Cytotoxic granules are complex secretory lysosomes that contain both normal resident lysosomal proteins (i.e., CD107/Lamp1) and effector molecules responsible for target cell elimination.<sup>9</sup> These include perforin (PFN)<sup>10</sup> and a family of highly specific serine proteases known as granzymes (Gzms),<sup>11</sup> which are complexed with a chondroitin sulphate-rich proteoglycan termed serglycin.<sup>12</sup>

PFN is a pore-forming protein that is expressed only by killer lymphocytes and is involved in the delivery of the death-inducing Gzms into the target cell cytoplasm.<sup>10,13–15</sup> In humans, five Gzms have been identified (GzmA, B, H, K and M); GzmA and GzmB have been studied most extensively.<sup>16</sup> Once in target cells, the Gzms independently activate several parallel pathways of programmed cell death by cleaving specific target proteins in the cytoplasm and concentrate within mitochondria and nuclei, where many key Gzms protein substrates reside.<sup>17</sup>

GzmB, one of the main mediators of cell death by the cytotoxic granules pathway, is the most extensively studied Gzm (Fig. 1).<sup>11</sup> Human GzmB (hGzmB) preferentially induces target cells apoptosis in a mitochondria-dependent manner, which is a highly regulated process involving the Bcl-2 family proteins. hGzmB cleaves the pro-apoptotic Bcl-2 family member, BH3-only protein, Bid.<sup>18,19</sup> Truncated Bid (tBid) disrupts the outer mitochondrial membrane (OMM) in a Bax and/or Bak-dependent manner to cause the mitochondrial outer membrane permeabilization (MOMP), the release of the pro-apoptotic factors such as cytochrome c and second

mitochondrial activator of caspases (Smac), leading to the activation of caspase-9 in the “apoptosome” followed by caspase-3 activation, DNA fragmentation, and target cell apoptosis.<sup>20</sup> GzmB also induces cell death in a reactive oxygen species (ROS)-dependent manner. Indeed, GzmB triggers an ROS increase in the target cell by directly attacking several subunits of the NADH:ubiquinone oxidoreductase complex inside the mitochondria. This leads to mitocentric ROS production, which is necessary for the optimal apoptogenic factor release from mitochondria in response to GzmB.<sup>21</sup> Moreover, this pathway is blocked by overexpression of important pro-survival Bcl-2 family proteins, including Bcl-2 or Bcl-X<sub>L</sub>.<sup>22</sup> It has been also proposed that hGzmB can directly initiate effector caspases activation but cannot fully process pro-caspase 3 without disruption of the mitochondrial membrane and the release of Smac/Diablo and HtrA2/Omi that facilitate caspase 3 full activation by blocking the inhibitory action of IAPs (inhibitor of apoptosis proteins).<sup>23</sup> Notably, mouse GzmB preferentially induces direct caspase 3 activation and triggers apoptosis in a Bid-/mitochondria-independent manner. Finally, it has been suggested that GzmB may induce target cell death in the absence of Bid, Bax, and Bak<sup>24</sup> by directly cleaving the inhibitor of caspase-activated DNase (ICAD/DFF45) to free the endonuclease CAD/DFF40<sup>25, 26</sup> and/or by cleaving several caspases<sup>27</sup> or non-caspase substrates.<sup>28</sup>

GzmA induces caspase-independent cell death and triggers single-stranded DNA cuts into large fragments that are much larger than the oligonucleosomal fragments generated during GzmB or caspase-induced cell death (Fig. 2).<sup>29</sup> In mitochondria, GzmA cleaves the electron transport chain complex I subunit Ndufs3, which interferes with mitochondrial redox function and generates superoxide anion.<sup>30,31</sup> These superoxides generated by damaged mitochondria drive an endoplasmic reticulum-associated stress response complex, known as the SET complex,<sup>32</sup> into the nucleus where it plays a key role in GzmA-induced nuclear damages and cell death.<sup>29</sup> The SET complex is formed by three nucleases: the base excision repair endonuclease Ape1 (apurinic/apyrimidinic endonuclease 1), the 5'-3' exonuclease Trex1 (three prime repair exonuclease 1), and the



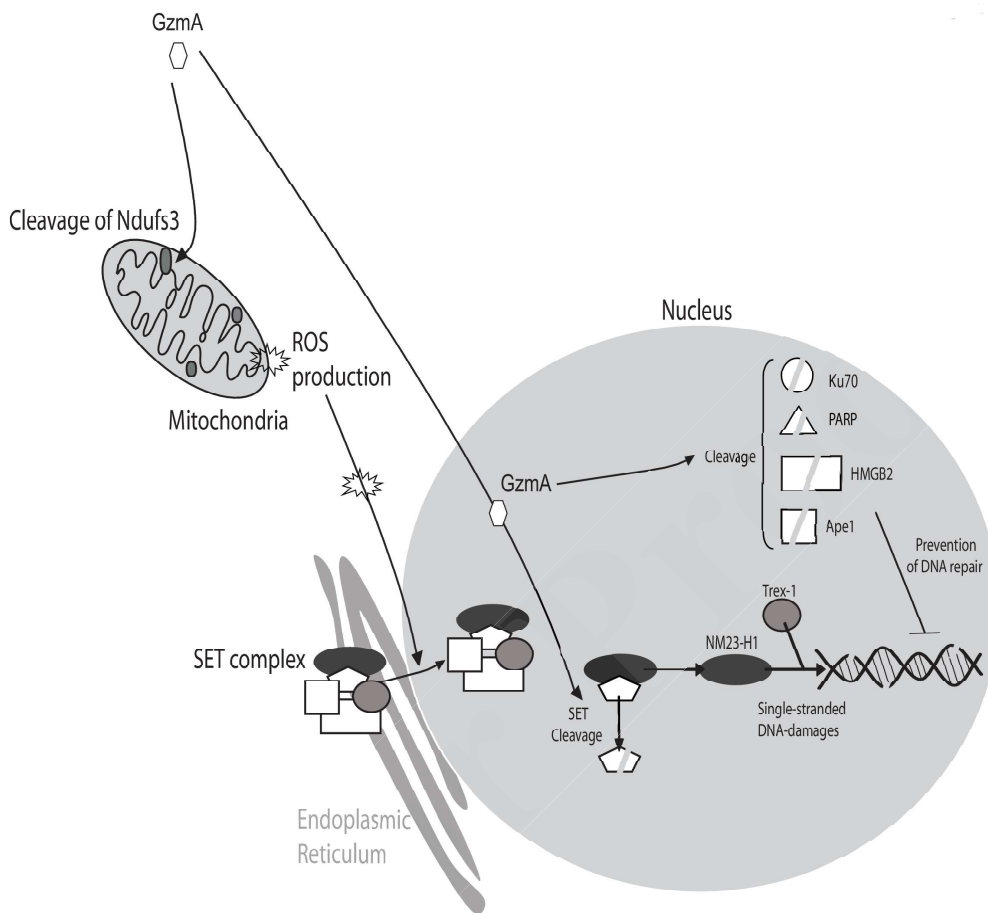
**FIG. 1:** GzmB-mediated apoptosis pathways. GzmB can trigger cell death by initiating the mitochondrial pathways by cleaving the BH3-only protein Bid. Truncated Bid promotes the oligomerization of Bax and/or Bak in the mitochondrial outer membrane (which can be inhibited by the anti-apoptotic protein Bcl-2), leading to the release of cytochrome c assembly of the “apoptosome” followed by caspase 3 activation and the cleavage of different death substrates including ICAD, the inhibitor of the endonuclease CAD. GzmB can also directly process procaspase 3 or ICAD and induces a mitocentric ROS production to promote apoptosis. Human GzmB preferentially operates through the Bid/mitochondrial pathway, whereas mouse GzmB preferentially induces direct caspase 3 activation.

endonuclease NM23-H1 (non-metastatic protein 23-homolog 1). The SET complex also contains the DNA binding protein that recognizes distorted DNA HMGB2 (high mobility group protein B2) and the chromatin modifying proteins SET (which also inhibits the endonuclease NM23-H1) and pp32.<sup>33–35</sup> GzmA, which enters to the nucleus via an unknown mechanism, cleaves SET, allowing NM23-H1 to nick DNA.<sup>34</sup> The exonuclease Trex1 then extends the break.<sup>33</sup> Simultaneously, GzmA cleaves and inactivates HMGB2 and Ape1, interfering with base

excision repair.<sup>35,36</sup> Moreover, GzmA interferes with the recognition of damaged DNA by cleaving Ku70 and poly-ADP-ribose polymerase (PARP).<sup>37,38</sup>

The mechanisms of action of other Gzms, so called “orphan” Gzms, are more obscure, although several substrates have been identified during the last decade.<sup>39</sup> GzmH has been mostly described to interfere with the replication of human adenovirus by cleaving a DNA binding protein and the adenovirus 100K assembly protein<sup>40,41</sup> but could also induce caspase-independent cell death with ROS generation,





**FIG. 2:** GzmA-mediated cell death pathways. In mitochondria, GzmA cleaves the electron transport chain complex I subunit Ndufs3, which interferes with mitochondrial redox function and generates ROS. These ROS drive the endoplasmic reticulum-associated stress response complex SET into the nucleus. GzmA also enters to the nucleus and cleaves the protein SET, allowing the endonuclease NM23-H1 to nick DNA. The exonuclease Trex1 then extends the break. Simultaneously, GzmA cleaves and inactivates HMGB2 and Ape1, interfering with base excision repair, and cleaves Ku70 and PARP interfering with the recognition of damaged DNA.

dissipation of  $\Delta\Psi_m$ , chromatin condensation, and nuclear fragmentation.<sup>42</sup> GzmK has been reported to induce cell death via a process that is similar to both GzmA- and GzmB-mediated apoptosis. GzmK causes the cleavage of Bid, dissipation of  $\Delta\Psi_m$ , MOMP with cytochrome c and EndoG release, but it seems to induce cell death independently of caspases.<sup>43</sup> Others reports have also shown that GzmK cleaves various GzmA substrates, including SET and Ape1, and also triggers ROS production, SET translocation to the nucleus, and DNA nicks.<sup>44,45</sup> Moreover, GzmK has been shown to cleave valsolin-containing proteins, which interfere with the endoplasmic reticulum (ER)

unfolded protein response and promote caspase-independent cytotoxicity.<sup>46</sup> Finally, independent groups have observed that GzmM induces cell death; even if the different published studies do not agree about the class of cell death triggered by this Gzm. It has been reported that GzmM induces caspase-independent cell death that looked like lysis with large vacuoles observed, without MOMP, phosphatidyl serine exposure or DNA fragmentation.<sup>47,48</sup> In other studies, GzmM activated caspase-dependent cell death without Bid cleavage but with MOMP, cytochrome c release, ROS generation, phosphatidyl serine exposure, cleavage of the apoptosis inhibitor

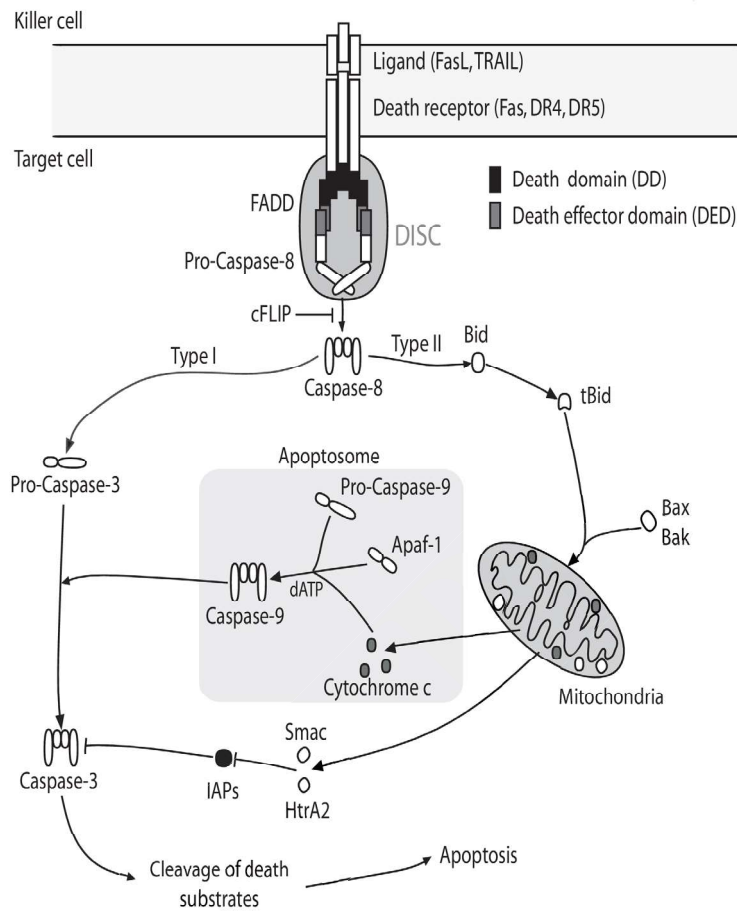
XIAP, and ICAD, followed by CAD activation and disruption of the microtubule network.<sup>49,50</sup>

## B. The Death Receptor Pathway

Killer cells can also induce target cell apoptosis through the death-receptor apoptotic pathway (also called the extrinsic pathway).<sup>51–53</sup> Death receptors belong to the tumor necrosis factor (TNF) receptor (TNFR) superfamily. All members of this death-receptor family are characterized by the presence of an intracellular 80 amino acid long motif, termed death domain (DD), that plays a key role in subsequent apoptotic signaling. The most extensively studied death receptors are FAS (CD95/APO-1), TNF-receptor 1 (TNF-R1/p55/CD120a), TRAIL receptor 1 (TRAIL-R1/DR4), and receptor 2 (TRAIL-R2/DR5), but two additional receptors are present in humans (Death Receptors 3 (DR3/APO-3) and 6 (DR6)).<sup>51</sup> These death receptors are activated by their cognate respective ligands, and all belong to the TNF family: Fas ligand (FasL /CD95L), TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL), and TNF- $\alpha$ .<sup>2</sup> These ligands are expressed as type-II transmembrane, homotrimeric proteins at the surface of activated killer cells, but they can also be released as soluble ligands through the action of specific cell surface proteases.<sup>54,55</sup> Schematically, upon ligation with their respective ligands, FAS, DR4, and DR5 trigger apoptosis in target cells but can eventually engage other pathways (NF $\kappa$ B, JNK/c-Jun, p38/MAPK/AP-1 pathways) that promote cell survival or other cellular function, like inflammation.<sup>56,57</sup> TNF-R1 mainly signals activation of the NF $\kappa$ B, JNK/c-Jun, p38/MAPK/AP-1 cascades, but they can also trigger cell death under certain circumstances.<sup>2,58,59</sup>

Apoptotic signal transduction by FAS, DR4, and DR5 proceeds through shared general steps (Fig. 3). Upon ligand binding, FAS, DR4, or DR5 multimerizes at the cell membrane,<sup>60, 61</sup> leading to a conformational change in the receptor's intracellular domain.<sup>62</sup> This leads to the recruitment of an adaptor protein, namely a Fas-associated protein with death domain (FADD), which contains both a DD that interacts with the receptor's DD, and a death effector domain (DED) that recruits initiator

caspases (caspase 8 and caspase 10).<sup>63</sup> The resulting complex is called death-inducing signaling complex (DISC).<sup>64</sup> Within the DISC, high local concentrations of the initiator caspases lead to the formation of homodimers involved in their activation<sup>65</sup> before their release to the cytoplasm, where they can cleave downstream substrate either via direct activation of the effector caspases 3 or 7 (mitochondria independent) or indirectly via mitochondria-dependent mechanisms. These two mechanisms correspond to the predominant arms of the death-receptor signaling pathway (especially for the CD95 signaling), both leading *in fine* to effector caspase 3 and caspase 7 activation, but these are thought to operate distinctly in two distinct types of cells. Cells using the direct activation of effector caspases by the initiator caspases 8/10 are known as type I cells (i.e., SW480 colon adenocarcinoma, SKW6.4 B lymphoblastoid, and H9 T lymphoma cells), whereas those using the mitochondrial amplification pathway (through the cleavage of Bid protein into truncated Bid, which links caspase 8/10 to the mitochondrial pathway) are known as type II cells (i.e., hepatocytes, Jurkat cells, and pancreatic  $\beta$  cells).<sup>66</sup> The basis of this cellular preference seems to depend on the relative stoichiometry of cleaved caspases 8 and 10 within the DISC and to the numbers of DISC present upon receptor/ligand interaction.<sup>67,68</sup> Because type II cells depend on the mitochondrial branch, apoptosis can be blocked by the overexpression of Bcl-2 or Bcl-X<sub>L</sub>.<sup>69</sup> Importantly, the activation of procaspase-8 in response to death-receptor triggering can also be inhibited by cellular FLICE-like inhibitory proteins (c-FLIP).<sup>70,71</sup> Homologous to caspase 8, cFLIP contains two DEDs and therefore can be recruited at the DISC via FADD. The cFLIP short isoform (cFLIP<sub>short</sub>) lacks the C-terminal caspase catalytic homology domain and therefore acts as a competitive inhibitor of caspase 8 recruitment to the DISC and prevents caspase 8 homodimers formation, inhibiting caspase 8 activation.<sup>72</sup> The cFLIP long isoform (cFLIP<sub>long</sub>) contains a C-terminal caspase catalytic homology domain that lacks caspase activity, but it can modulate apoptosis in two opposite directions depending on its expression level, even if this point is still subject to debate. When expressed at a high



**FIG. 3:** Apoptotic signal transduction by the death domain receptors FAS, DR4 and DR5 proceeds through shared general steps. Upon ligand binding, FAS, DR4 or DR5 multimerize at the cell surface leading to a conformational change in the receptor's intracellular domain. This leads to the recruitment of the adaptor protein FADD, which contains both a death domain (DD) that interacts with the receptor's DD, and a death effector domain (DED) that recruits initiator pro-caspase 8. The resulting complex is called death inducing signaling complex (DISC). Within the DISC, high local concentrations of the initiator caspases lead to formation of homodimers involved in their activation before their release to the cytoplasm where they can cleave downstream substrates, either via direct activation of the effector caspases 3 (type I cells) or indirectly via the cleavage of Bid protein into truncated Bid, which links caspase 8 to the mitochondrial pathway (type II cells). Homologous to caspase 8, cFLIP acts as a competitive inhibitor of caspase 8 activation.

level, cFLIP<sub>long</sub> inhibits the activation of procaspase 8 and thereby blocks the apoptosis initiation. In contrast, when expressed at a low level, cFLIP<sub>long</sub> promotes procaspase 8 activation.<sup>52</sup>

### III. IMPLICATION OF P53 IN THE MODULATION OF CYTOTOXIC LYMPHOCYTES-MEDIATED CELL DEATH

#### A. Transcriptional and Non-transcriptional Regulation of Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization and Apoptosis by Stress-Induced p53

One of the most important and known apoptosis regulators is the tumor suppressor p53. In response to cellular stress, the p53 protein matures from a

latent to an active form. This stress is detected by various proteins, called “sensors.” These proteins activate a cascade of events resulting in the stabilization, accumulation, and re-localization of p53. This model of quantitative activation (stabilization, accumulation) and qualitative localization (nuclear or mitochondrial translocation) involves covalent and noncovalent modifications that induce a conformational change of p53. At the present time, the majority of the proteins that govern the activation of the p53 are represented by kinases (ATM, DNA-PK, P38, JNK, CHK2, etc.), acetyl transferases (P300, CBP, etc.), and ubiquitin ligases (Mdm2, Mdm4).<sup>73</sup> In fact, upstream of the p53 protein, endogenous and exogenous DNA damages constitute a trigger for p53 protein activation and stabilization.

It has been well established that the wild-type tumor suppressor p53 (wtp53) acts as a stress-activated sequence-specific transcription factor that activates transcription from promoters carrying a p53 consensus binding site.<sup>74</sup> As such, it protects cells from a variety of stress signals such as DNA damage, nucleotide depletion, oncogene activation, or  $\gamma$ -irradiation by regulating the transcription of genes involved in cell-cycle arrest, DNA repair, and apoptosis,<sup>75</sup> thereby preventing cells from replicating a genetically compromised genome. Regarding apoptosis, p53 both positively regulates the expression of Bax, Bak, Bid, Puma, and Noxa and inhibits the expression of Bcl-2 or Bcl-X<sub>L</sub>,<sup>75–78</sup> which are important factors of MOMP in response to different apoptosis inducers.<sup>79</sup> P53 also positively regulates the expression of several microRNAs (miRs) including miR34, which negatively regulates the expression of the anti-apoptotic proteins Bcl-2 and survivin.<sup>80</sup> Nevertheless, the activity of p53 in the regulation of apoptosis through MOMP is not limited to its activities as a transcription factor<sup>81</sup> and p53 has been shown to physically interact with several members of the Bcl-2 family.

As mentioned above, it is well known that the mitochondrial pathway and MOMP is regulated by several Bcl-2 family members.<sup>82</sup> Some BH3-only proteins (known as activators, i.e., Bid) mediate MOMP by physically interacting and activating the effector proteins Bax and/or Bak, whereas others

(known as de-repressors, i.e., Bad) act by displacing Bax and/or Bak from Bcl-2 or Bcl-X<sub>L</sub>-mediated inhibition.<sup>83</sup> In this context, the “activator” model postulates that some activator BH3-only proteins (i.e., tBid or Bim) transiently bind to Bax and induce conformational changes required for stable insertion in the OMM. In this model, Bcl-2/Bcl-X<sub>L</sub> proteins sequester the activator BH3-only proteins and neutralize them.<sup>84</sup> On the other hand, the “inactivator” model proposes that the primary function of anti-apoptotic protein Bcl-2/Bcl-X<sub>L</sub> is to neutralize the pro-apoptotic effector proteins Bax and/or Bak by forming heterodimeric complexes,<sup>82,85</sup> limiting their capacity to form pores in the OMM. In this context, the direct role of p53 in the mitochondria has become evident as a major regulator of cell death induced by different kind of stress.<sup>81, 86</sup> Mihara *et al.*<sup>87</sup> reported that p53 protein can directly induce MOMP by forming complexes with the protective Bcl-X<sub>L</sub> or Bcl-2 proteins, resulting in cytochrome *c* release. Consistently, protein modeling, nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy, and site-specific mutagenesis experiments have identified the region of interaction between Bcl-2/Bcl-X<sub>L</sub> proteins and p53 as its DNA-binding domain (DBD).<sup>88–91</sup> Moreover, it has been demonstrated that Bcl-X<sub>L</sub> conformational change upon binding to wild-type (wt) p53 (but not mutant p53) facilitates the dissociation of Bcl-X<sub>L</sub>/Bax complexes.<sup>89</sup> In this model, the formation of p53/Bcl-X<sub>L</sub> or Bcl-2 complexes antagonizes Bcl-X<sub>L</sub>/Bcl-2 function of keeping Bax and Bak inactive, and leads to their activation and oligomerization. P53 can also accumulate in the cytoplasm, where it directly activates the pro-apoptotic protein Bax in a “hit and run” manner to induce mitochondrial release of apoptogenic factors.<sup>92</sup> In parallel, it has also been proposed that stress-induced p53 is initially bound to cytosolic Bcl-X<sub>L</sub> but that transcriptionally induced Puma liberates p53 from this interaction, thereby allowing p53 to interact with Bak/Bax to initiate apoptosis.<sup>93,94</sup> Moreover, a study also demonstrated that p53 binding to mitochondrial Bak is necessary for its release from Mcl-1 (another anti-apoptotic member of the Bcl-2 family) and further oligomerization.<sup>95</sup> Finally, it has also been proposed that mitochondrial p53 could function as an enabler



BH3-only protein to prevent an activator, like tBid, to interact with the anti-apoptotic protein Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub> or Mcl-1.<sup>89,96</sup>

Taken together, the different studies mentioned above demonstrate the key role of p53 in the induction/regulation of stress-induced apoptosis, which in particular has been reported to contribute to the sensitivity of tumor cell to apoptosis induced by many anti-cancer agents and by radiotherapy. However, the role of this tumor suppressor protein in the control of killer cell-mediated cytotoxicity is not well documented.

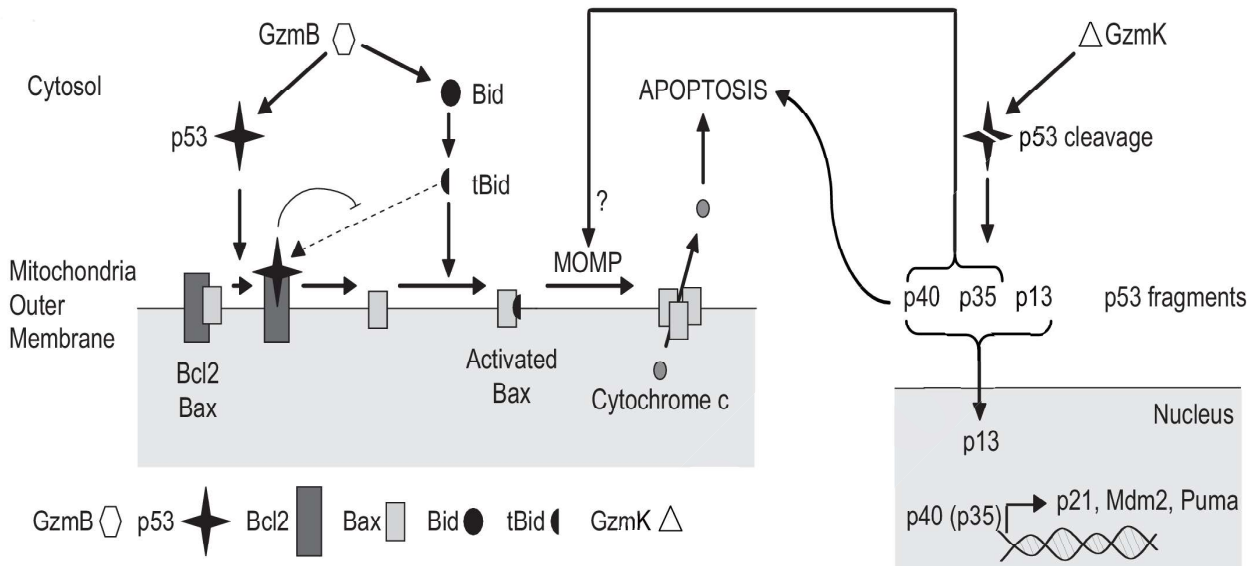
## B. Role of p53 in Granzyme-Induced Cell Death

A few studies have established a link between p53 and tumor cell susceptibility to Gzms-induced cell death. Fan et al. demonstrated that p53 is a physiological target of GzmK and is cleaved at Lys<sup>24</sup> and Lys<sup>305</sup> to generate three fragments: p40, p35, and p13 (Fig. 4, right panel).<sup>97</sup> All three cleavage fragments exert pro-apoptotic activity. P40 and p35 display both nuclear and mitochondrial localization, which might be related to cell-death induction, while p13 localizes to the nucleus to exert pro-apoptotic activity. Moreover, p35 and p13 display no or weak transcriptional activity, while p40 induces the expression of some p53 target genes, including p21, Mdm2, and Puma, suggesting that both transcriptional and non-transcriptional (mitochondrial) p53 activity might be important features in the induction of GzmK-dependent cell death. Importantly, p53 expression seems to be crucial for GzmK-mediated and NK cell-dependent cell death, as shown by the differential susceptibility of colon carcinoma cell line HCT116 p53<sup>+/+</sup> and HCT116 p53<sup>-/-</sup> to both GzmK- and NK cell-mediated lysis.

Our group also recently described a relationship between p53 and hGzmB-induced apoptosis. We demonstrated that both killer cells and hGzmB induce rapid stabilization and activation of p53 within target cells.<sup>98</sup> hGzmB triggers the rapid translocation of a small fraction of the endonuclease CAD to the nucleus in a Bid- and caspase 3-independent manner, which triggers early DNA damage. An ataxia telangiectasia

mutated (ATM)-related genotoxic stress-activated kinase belonging to the phosphoinositide 3-kinase (PI3-kinase)-related kinases (PIKK) family, named hSMG-1,<sup>99</sup> is then rapidly activated in response to hGzmB-induced early DNA damage and would be, at least in part, responsible for a rapid wtp53 phosphorylation, stabilization, and activation in a melanoma target model following interaction with autologous CTL clones or after hGzmB treatment.<sup>100</sup> Furthermore, RNA interference-mediated inhibition of p53 significantly decreased targeted cell death induced by both CTLs and hGzmB, which shows that p53 is an important determinant of hGzmB-induced cell death.<sup>98</sup> More recently, we demonstrated that hGzmB-activated p53 translocates to the target-cell mitochondria outer membrane and interacts with the anti-apoptotic protein Bcl-2 (Fig. 4, left panel).<sup>101</sup> This interaction prevents the Bcl-2 inhibitory effect on both Bax and hGzmB-truncated Bid and promotes hGzmB-induced mitochondrial outer membrane permeabilization. Thus, in response to hGzmB, p53 favors the release of mitochondrial non-activated Bax from Bcl-2 interaction, promoting its activation by tBid, but might also facilitate the dissociation of Bcl-2/activated Bax complex, promoting both Bax activation and oligomerization. In this scenario, hGzmB-induced mitochondrial p53 operates as a BH3-only protein of the “de-repressor” type freeing pro-apoptotic tBid and Bax from Bcl-2-mediated inhibition, and the non transcriptional activity of p53 seems to have the predominant role in the modulation of GzmB-induced cell death. Consequently, the inhibition of p53 mitochondrial translocation and p53-Bcl-2 interaction decrease hGzmB-induced Bax activation, MOMP, cytochrome c release and subsequent effector caspases activation, leading to a decreased sensitivity of target cells to both hGzmB and CTL/NK-mediated cell death.<sup>101</sup>

In summary, to some extent, both transcriptional and non-transcriptional p53 activities seem to be important for target-cell susceptibility to GzmK and hGzmB, and consequently for CTL/NK-mediated cell death. To date, no studies have involved p53 in cell death induced by the others Gzms (GzmA, H, or M). However, given the fact that some of them can induce target cell MOMP by unknown mechanisms,



**FIG. 4:** Implication of p53 in GzmB and GzmK-induced cell death. GzmB induces the accumulation of p53 on target cell mitochondria where it interacts with the pro-survival protein Bcl-2. This interaction allows the release of the pro-apoptotic protein Bax from its inhibitory interaction with Bcl-2 and prevents GzmB-activated tBid sequestration by Bcl-2. In this case, free tBid activates free Bax to induce MOMP, cytochrome c release, and apoptosis. GzmK induces the cleavage of p53 to generate three fragments: p40, p35, and p13. All the three cleavage fragments exert pro-apoptotic activity. P40 and p35 display both a nuclear and mitochondrial localization, which might be involved in MOMP, while p13 localizes to the nucleus to exert pro-apoptotic activity. P35 and p13 display no or weak transcriptional activity, while p40 induces the expression of some p53 target genes, including p21, Mdm2, and Puma.

further studies are required to determine whether p53 might be involved in the cell death induced by these Gzms.

**C. Role of p53 in Death Receptors-Mediated Apoptosis**

Cell death induced through death receptors has been widely studied, especially using recombinant soluble ligands. Clinical studies evaluating the antitumoral effect of TNF- $\alpha$  and FasL were initiated decades ago, and more recently, TRAIL has gained interest, mostly due to its ability to induce apoptosis of transformed but not normal cells.<sup>102</sup> Based on these studies, cross talk between p53 and death-receptor-induced cell death has been described, even if the TNF family can also clearly engage apoptosis in a p53-independent

manner.<sup>103,104</sup> Moreover, several lines of evidence suggest that p53 upregulates the expression of the death receptors Fas, DR4, and DR5, and thus might also mediate apoptosis in part via Fas and/or DR4/DR5.<sup>105-108</sup> For example, under genotoxic stress, p53 may sensitize tumor cells to TRAIL-induced apoptosis through the upregulation of DR4/5 but also by regulating the expression of important pro- and anti-apoptotic proteins (described above) to enhance their sensitivity to the intrinsic pathway.<sup>109,110</sup> It has also been demonstrated that TRAIL itself is a p53 target gene.<sup>111</sup> Similarly, restoring the wtp53 function in tumor cells expressing a mutated p53 (mtp53) or overexpressing Mdm2 can sensitize them to TRAIL-induced cell death,<sup>112-114</sup> TNF $\alpha$ -induced cell death,<sup>115-118</sup> and FasL-induced<sup>119,120</sup> cell death. As such, targeting p53 might serve as an effective

strategy for sensitizing tumor cells to TNF family ligand-induced apoptosis.

As mentioned above, the molecular mechanisms underlying this p53-dependent sensitization of target cells to the death receptor-induced apoptosis mainly depend on the transcriptional activation by p53 of the death receptors themselves and by the modulation of the expression level of key pro- and anti-apoptotic proteins, especially from the Bcl-2 family (e.g., Bax, Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>, etc.). However, these studies mainly used soluble ligands from the TNF family and might not reflect cytotoxic lymphocyte-mediated triggering of the death-receptor pathway. Nevertheless, our group demonstrated that the restoration of a wtp53 function in a lung carcinoma model, harboring a mtp53, restores the expression of the Fas receptor at the cell surface and sensitizes tumor cells to CTL-mediated apoptosis through the Fas/FasL pathway.<sup>121</sup> Furthermore, in this model the effect of wtp53 on the Fas-mediated apoptosis also involves the inhibition of cFLIP<sub>Short</sub> expression, resulting in an efficient pro-caspase 8 activation in target cells after CTL attack.<sup>122</sup> Interestingly, the observed effect of p53 might be dependent on an ubiquitine- or proteasome-dependent degradation of cFLIP<sub>Short</sub> triggered by p53.<sup>123</sup> These results indicate that an activated p53 might also be important in the regulation of CTL/NK-induced apoptosis through the death-receptor pathway. However, further studies are clearly needed to clarify this point.

#### IV. CONCLUDING REMARKS

It has become increasingly clear that the understanding of the cell death mechanisms triggered by immune effector cells will allow us to define more precisely the signaling pathway triggered by CTL and NK cells to destroy their targets, but it could also have several future clinical applications. In this context, the p53 protein is of particular interest based on its role in the regulation of GzmB, GzmK as well as death receptors-induced apoptosis. Notably, it seems that p53 plays different roles in CTL-/NK-mediated cell death. GzmB triggers the stabilization and activation of p53, which in turn facilitates the MOMP

induced by the GzmB-dependent cleavage of Bid. GzmK directly attacks p53 through its cleavage to promote cell death. Finally, it seems that a stress-induced activation of p53 in target cells sensitizes them to apoptosis through the death receptor pathway, at least under certain circumstances.

Furthermore, p53 is not only involved in the regulation of the signaling pathway activated by effector cells to kill their target. For example, a direct link between p53 expression and target recognition by NK cells was recently revealed. The activation of p53 in lung-cancer cell lines strongly upregulates the NKG2D ligands ULBP1 and ULBP2, resulting in NK cell activation.<sup>124</sup> P53 also contributed to phagocytosis of apoptotic cells through the upregulation of its target gene DD1 $\alpha$  (death domain 1 $\alpha$ ) and ensures efficient generation of a precise immune response.<sup>125</sup> In contrast, it was also recently demonstrated that the downmodulation of p53 in response to antigen stimulation is critical for antigen-specific CD4<sup>+</sup> T-cell proliferation.<sup>126</sup>

Importantly, approximately half of human cancers have inactivating mutations of the p53 tumor suppressor gene, and most of the remaining malignancies deactivate the p53 pathway by increasing its inhibitors, reducing its activators, or inactivating its downstream targets. These mutations, resulting in stabilization and accumulation of high level of a defective p53 product, result in loss of p53 functions, and the mutant proteins are frequently functionally compromised for apoptosis induction in response to different kind of stress. Whether these p53 mutations facilitate tumor-cell escape to CTL/NK-mediated lysis through the GzmB, GzmK or death receptors pathways is unclear. In particular, it has been demonstrated that wtp53, but not tumor-derived p53 mutants, binds to Bcl-2 via this DBD and can trigger MOMP.<sup>90</sup> Because of the results pointing out the importance of Bcl-2/wtp53 interaction in hGzmB-induced apoptosis, further studies will be important to determine whether such p53 mutants can be associated with a tumor cell resistance to PFN/hGzmB- and CTL/NK-mediated cell death. Similarly, inactivation of p53 transcriptional activity could be associated with a tumor-cell resistance to CTL/NK-mediated lysis via the FasL and TRAIL pathways.

If this scenario is correct, reactivating p53 might represent an effective strategy for sensitizing tumor cells to CTL-/NK-mediated lysis. During the past decade, several novel molecules have been identified based on their properties to restore wtp53 conformation and function of mutant p53 proteins and triggers apoptosis (PRIMA-1, MIRA-1, STIMA-1, CP-31398, etc.).<sup>127</sup> Recent studies also have shown *in vitro* and *in vivo* that RITA and Nutlin-3a,<sup>128</sup> two inhibitors of Mdm2-p53 interaction, allow the reactivation of the p53 pathway in Mdm2 overexpressing tumor cells. Because the clinical use of these molecules to restore p53 function could be a novel strategy to optimize the immunotherapy against cancer by increasing the CTL/NK-mediated killing of tumor cells, the effect of these molecules on CTL/NK-, FasL-, TRAIL- and GzmB-dependent cytotoxicity in different tumor models expressing a mutated p53 should be tested.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors are supported by the “Ligue Nationale contre le Cancer” (LNCC-Equipe Labéllisée), the “Association pour la Recherche contre le Cancer” (ARC) and INSERM. T.B.S. is supported by a PhD training fellowship from the “Association pour la Recherche contre le Cancer” (ARC). L.Z. is supported by a PhD training fellowship from the “Ligue Nationale contre le Cancer” (LNCC).

## REFERENCES

- Lieberman J. Anatomy of a murder: how cytotoxic T cells and NK cells are activated, develop, and eliminate their targets. *Immunol Revs.* 2010;235(1):5–9. Epub 2010/06/12.
- Ashkenazi A, Salvesen G. Regulated Cell Death: Signaling and mechanisms. *Annual Rev Cell Dev Biology.* 2014;30:337–56. Epub 2014/08/26.
- van den Broek ME, Kagi D, Ossendorp F, Toes R, Vamvakas S, Lutz WK, Melief CJ, Zinkernagel RM, Hengartner H. Decreased tumor surveillance in perforin-deficient mice. *J Exp Med.* 1996;184(5):1781–90. Epub 1996/11/01.
- Voskoboinik I, Whisstock JC, Trapani JA. Perforin and granzymes: function, dysfunction and human pathology. *Nature Rev.* 2015;15(6):388–400. Epub 2015/05/23.
- Screpanti V, Wallin RP, Ljunggren HG, Grandien A. A central role for death receptor-mediated apoptosis in the rejection of tumors by NK cells. *J Immunol.* 2001;167(4):2068–73. Epub 2001/08/08.
- Ewen CL, Kane KP, Bleackley RC. A quarter century of granzymes. *Cell Death Differ.* 2012;19(1):28–35. Epub 2011/11/05.
- Susanto O, Trapani JA, Brasacchio D. Controversies in granzyme biology. *Tissue Antigens.* 2012;80(6):477–87. Epub 2012/11/10.
- Lieberman J. The ABCs of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal. *Nature Rev.* 2003;3(5):361–70.
- Krzewski K, Coligan JE. Human NK cell lytic granules and regulation of their exocytosis. *Front Immunol.* 2012;3:335. Epub 2012/11/20.
- Thiery J, Lieberman J. Perforin: A key pore-forming protein for immune control of viruses and cancer. *Subcell Biochem.* 2014;80:197–220. Epub 2014/05/07.
- Rousalova I, Krepela E. Granzyme B-induced apoptosis in cancer cells and its regulation (review). *Int J Oncol.* 2010;37(6):1361–78.
- Raja SM, Metkar SS, Honing S, Wang B, Russin WA, Pipalia NH, Menaa C, Belting M, Cao X, Dressel R, Froelich CJ. A novel mechanism for protein delivery: granzyme B undergoes electrostatic exchange from serglycin to target cells. *J Biol Chem.* 2005;280(21):20752–61. Epub 2005/03/25.
- Thiery J, Keefe D, Boulant S, Boucrot E, Walch M, Martinvalet D, Goping IS, Bleackley RC, Kirchhausen T, Lieberman J. Perforin pores in the endosomal membrane trigger the release of endocytosed granzyme B into the cytosol of target cells. *Nature Immun.* 2011;12(8):770–7. Epub 2011/06/21.
- Thiery J, Keefe D, Saffarian S, Martinvalet D, Walch M, Boucrot E, Kirchhausen T, Lieberman J. Perforin activates clathrin- and dynamin-dependent endocytosis, which is required for plasma membrane repair and delivery of granzyme B for granzyme-mediated apoptosis. *Blood.* 2010;115(8):1582–93.
- Law RH, Lukyanova N, Voskoboinik I, Caradoc-Davies TT, Baran K, Dunstone MA, D’Angelo ME, Orlova EV, Coulibaly F, Verschoor S, Browne KA, Ciccone A, Kuiper MJ, Bird PI, Trapani JA,



- Saibil HR, Whisstock JC. The structural basis for membrane binding and pore formation by lymphocyte perforin. *Nature*. 2010;468(7322):447–51. Epub 2010/11/03.
16. Chowdhury D, Lieberman J. Death by a thousand cuts: granzyme pathways of programmed cell death. *Annual Rev Immunol*. 2008;26:389–420. Epub 2008/02/29.
  17. Anthony DA, Andrews DM, Watt SV, Trapani JA, Smyth MJ. Functional dissection of the granzyme family: cell death and inflammation. *Immunol Rev*. 2010;235(1):73–92. Epub 2010/06/12.
  18. Heibein JA, Goping IS, Barry M, Pinkoski MJ, Shore GC, Green DR, Bleackley RC. Granzyme B-mediated cytochrome C release is regulated by the Bcl-2 family members Bid and Bax. *J Exp Med*. 2000;192(10):1391–402.
  19. Sutton VR, Davis JE, Cancilla M, Johnstone RW, Ruefli AA, Sedelies K, Browne KA, Trapani JA. Initiation of apoptosis by granzyme B requires direct cleavage of bid, but not direct granzyme B-mediated caspase activation. *J Exp Med*. 2000;192(10):1403–14. Epub 2000/11/21.
  20. Wang GQ, Wieckowski E, Goldstein LA, Gastman BR, Rabinovitz A, Gambotto A, Li S, Fang B, Yin XM, Rabinowich H. Resistance to granzyme B-mediated cytochrome C release in Bak-deficient cells. *J Exp Med*. 2001;194(9):1325–37. Epub 2001/11/07.
  21. Jacquemin G, Margiotta D, Kasahara A, Bassoy EY, Walch M, Thiery J, Lieberman J, Martinvalet D. Granzyme B-induced mitochondrial ROS are required for apoptosis. *Cell Death and Differentiation*. 2014. Epub 2014/11/02.
  22. Pinkoski MJ, Waterhouse NJ, Heibein JA, Wolf BB, Kuwana T, Goldstein JC, Newmeyer DD, Bleackley RC, Green DR. Granzyme B-mediated apoptosis proceeds predominantly through a Bcl-2-inhibitable mitochondrial pathway. *J Biol Chem*. 2001;276(15):12060–7. Epub 2001/03/30.
  23. Sutton VR, Wolk ME, Cancilla M, Trapani JA. Caspase activation by granzyme B is indirect, and caspase autoprocessing requires the release of proapoptotic mitochondrial factors. *Immunity*. 2003;18(3):319–29.
  24. Thomas DA, Scorrano L, Putcha GV, Korsmeyer SJ, Ley TJ. Granzyme B can cause mitochondrial depolarization and cell death in the absence of Bid, Bax, and Bak. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(26):14985–90.
  25. Thomas DA, Du C, Xu M, Wang X, Ley TJ. Dff45/Icad can be directly processed by granzyme B during the induction of apoptosis. *Immunity*. 2000;12(6):621–32. Epub 2000/07/14.
  26. Sharif-Askari E, Alam A, Rheaume E, Beresford PJ, Scotto C, Sharma K, Lee D, DeWolf WE, Nuttall ME, Lieberman J, Sekaly RP. Direct cleavage of the human DNA fragmentation factor-45 by granzyme B induces caspase-activated dnase release and DNA fragmentation. *EMBO J*. 2001;20(12):3101–13. Epub 2001/06/19.
  27. Andrade F, Roy S, Nicholson D, Thornberry N, Rosen A, Casciola-Rosen L. Granzyme B directly and efficiently cleaves several downstream caspase substrates: implications for Ctl-induced apoptosis. *Immunity*. 1998;8(4):451–60. Epub 1998/05/20.
  28. Zhang D, Beresford PJ, Greenberg AH, Lieberman J. Granzymes A and B directly cleave lamins and disrupt the nuclear lamina during granule-mediated cytolysis. *Proc of National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001;98(10):5746–51. Epub 2001/05/02.
  29. Lieberman J. Granzyme a activates another way to die. *Immunol Rev*. 2010;235(1):93–104. Epub 2010/06/12.
  30. Martinvalet D, Zhu P, Lieberman J. Granzyme a induces caspase-independent mitochondrial damage, a required first step for apoptosis. *Immunity*. 2005;22(3):355–70. Epub 2005/03/23.
  31. Martinvalet D, Dykxhoorn DM, Ferrini R, Lieberman J. Granzyme a cleaves a mitochondrial complex I protein to initiate caspase-independent cell death. *Cell*. 2008;133(4):681–92. Epub 2008/05/20.
  32. Beresford PJ, Zhang D, Oh DY, Fan Z, Greer EL, Russo ML, Jaju M, Lieberman J. Granzyme A activates an endoplasmic reticulum-associated caspase-independent nuclease to induce single-stranded DNA nicks. *J Biol Chem*. 2001;276(46):43285–93. Epub 2001/09/14.
  33. Chowdhury D, Beresford PJ, Zhu P, Zhang D, Sung JS, Demple B, Perrino FW, Lieberman J. The Exonuclease Trex1 is in the set complex and acts in concert with Nm23-H1 to degrade DNA during granzyme A-mediated cell death. *Molec Cell*. 2006;23(1):133–42. Epub 2006/07/05.
  34. Fan Z, Beresford PJ, Oh DY, Zhang D, Lieberman J. Tumor suppressor Nm23-H1 is a granzyme A-activated dnase during Ctl-mediated apoptosis, and the nucleosome assembly protein set is

- its inhibitor. *Cell*. 2003;112(5):659–72. Epub 2003/03/12.
35. Fan Z, Beresford PJ, Zhang D, Lieberman J. Hmg2 interacts with the nucleosome assembly protein set and is a target of the cytotoxic T-lymphocyte protease granzyme A. *Molec Cell Biol*. 2002;22(8):2810–20. Epub 2002/03/23.
  36. Fan Z, Beresford PJ, Zhang D, Xu Z, Novina CD, Yoshida A, Pommier Y, Lieberman J. Cleaving the oxidative repair protein Apel enhances cell death mediated by granzyme A. *Nature Immunol*. 2003;4(2):145–53. Epub 2003/01/14.
  37. Zhu P, Martinvalet D, Chowdhury D, Zhang D, Schlesinger A, Lieberman J. The cytotoxic T lymphocyte protease granzyme A cleaves and inactivates poly(adenosine 5'-diphosphate-ribose) polymerase-1. *Blood*. 2009;114(6):1205–16. Epub 2009/06/10.
  38. Zhu P, Zhang D, Chowdhury D, Martinvalet D, Keefe D, Shi L, Lieberman J. Granzyme A, which causes single-stranded DNA Damage, targets the double-strand break repair protein KU70. *EMBO reports*. 2006;7(4):431–7. Epub 2006/01/28.
  39. Bovenschen N, Kummer JA. Orphan granzymes find a home. *Immunolog Rev*. 2010;235(1):117–27. Epub 2010/06/12.
  40. Andrade F, Fellows E, Jenne DE, Rosen A, Young CS. Granzyme H destroys the function of critical adenoviral proteins required for viral DNA replication and granzyme B inhibition. *EMBO J*. 2007;26(8):2148–57. Epub 2007/03/17.
  41. Andrade F. Non-cytotoxic antiviral activities of granzymes in the context of the immune antiviral state. *Immunolog Rev*. 2010;235(1):128–46. Epub 2010/06/12.
  42. Fellows E, Gil-Parrado S, Jenne DE, Kurschus FC. Natural killer cell-derived human granzyme H induces an alternative, caspase-independent cell-death program. *Blood*. 2007;110(2):544–52. Epub 2007/04/06.
  43. Zhao T, Zhang H, Guo Y, Fan Z. Granzyme K directly processes bid to release cytochrome C and endonuclease G leading to mitochondria-dependent cell death. *J Biol Chem*. 2007;282(16):12104–11. Epub 2007/02/20.
  44. Zhao T, Zhang H, Guo Y, Zhang Q, Hua G, Lu H, Hou Q, Liu H, Fan Z. Granzyme K cleaves the nucleosome assembly protein set to induce single-stranded DNA nicks of target cells. *Cell Death Differ*. 2007;14(3):489–99. Epub 2006/09/30.
  45. Guo Y, Chen J, Zhao T, Fan Z. Granzyme K degrades the redox/DNA repair enzyme apel to trigger oxidative stress of target cells leading to cytotoxicity. *Molecular Immunology*. 2008;45(8):2225–35. Epub 2008/01/09.
  46. Guo Y, Chen J, Shi L, Fan Z. Valosin-containing protein cleavage by granzyme K accelerates an endoplasmic reticulum stress leading to caspase-independent cytotoxicity of target tumor cells. *J Immunol*. 2010;185(9):5348–59. Epub 2010/09/30.
  47. Kelly JM, Waterhouse NJ, Cretney E, Browne KA, Ellis S, Trapani JA, Smyth MJ. Granzyme M mediates a novel form of perforin-dependent cell death. *J Biol Chem*. 2004;279(21):22236–42. Epub 2004/03/19.
  48. Bovenschen N, de Koning PJ, Quadir R, Broekhuizen R, Damen JM, Froelich CJ, Slijper M, Kummer JA. NK cell protease granzyme M targets alpha-tubulin and disorganizes the microtubule network. *J Immunol*. 2008;180(12):8184–91. Epub 2008/06/05.
  49. Lu H, Hou Q, Zhao T, Zhang H, Zhang Q, Wu L, Fan Z. Granzyme M directly cleaves inhibitor of caspase-activated Dnase (Cad) to unleash cad leading to DNA fragmentation. *J Immunol*. 2006;177(2):1171–8. Epub 2006/07/05.
  50. Hu D, Liu S, Shi L, Li C, Wu L, Fan Z. Cleavage of survivin by granzyme M triggers degradation of the survivin-X-linked inhibitor of apoptosis protein (Xiap) complex to free caspase activity leading to cytolysis of target tumor cells. *J Biol Chem*. 2010;285(24):18326–35. Epub 2010/04/22.
  51. Wilson NS, Dixit V, Ashkenazi A. Death receptor signal transducers: nodes of coordination in immune signaling networks. *Nature Immunol*. 2009;10(4):348–55. Epub 2009/03/20.
  52. Lavrik IN. Systems biology of death receptor networks: live and let die. *Cell Death Dis*. 2014;5:e1259. Epub 2014/05/31.
  53. Falschlehner C, Schaefer U, Walczak H. Following Trail's path in the immune system. *Immunology*. 2009;127(2):145–54. Epub 2009/05/30.
  54. Ehrlich S, Infante-Duarte C, Seeger B, Zipp F. Regulation of soluble and surface-bound Trail in human T cells, B cells, and monocytes. *Cytokine*. 2003;24(6):244–53. Epub 2003/11/12.
  55. Mohan MJ, Seaton T, Mitchell J, Howe A, Blackburn K, Burkhart W, Moyer M, Patel I, Waitt GM, Becherer JD, Moss ML, Milla ME. The tumor necrosis factor-alpha converting

- enzyme (TACE): a unique metalloproteinase with highly defined substrate selectivity. *Biochemistry*. 2002;41(30):9462–9. Epub 2002/07/24.
56. Varfolomeev E, Maecker H, Sharp D, Lawrence D, Renz M, Vucic D, Ashkenazi A. Molecular determinants of kinase pathway activation by Apo2 ligand/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *J Biol Chem*. 2005;280(49):40599–608. Epub 2005/10/18.
  57. Neumann L, Pforr C, Beaudouin J, Pappa A, Fricker N, Krammer PH, Lavrik IN, Eils R. Dynamics within the Cd95 death-inducing signaling complex decide life and death of cells. *Molec Sys Biol*. 2010;6:352. Epub 2010/03/10.
  58. Micheau O, Tschopp J. Induction of Tnf receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell*. 2003;114(2):181–90. Epub 2003/07/31.
  59. Walczak H. Tnf and ubiquitin at the crossroads of gene activation, cell death, inflammation, and cancer. *Immunol Revs*. 2011;244(1):9–28. Epub 2011/10/25.
  60. Siegel RM, Frederiksen JK, Zacharias DA, Chan FK, Johnson M, Lynch D, Tsien RY, Lenardo MJ. Fas preassociation required for apoptosis signaling and dominant inhibition by pathogenic mutations. *Science* 2000;288(5475):2354–7. Epub 2000/07/06.
  61. Feig C, Tchikov V, Schutze S, Peter ME. Palmitoylation of Cd95 facilitates formation of sds-stable receptor aggregates that initiate apoptosis signaling. *EMBO J*. 2007;26(1):221–31. Epub 2006/12/13.
  62. Scott FL, Stec B, Pop C, Dobaczewska MK, Lee JJ, Monosov E, Robinson H, Salvesen GS, Schwarzenbacher R, Riedl SJ. The Fas-Fadd death domain complex structure unravels signalling by receptor clustering. *Nature*. 2009;457(7232):1019–22. Epub 2009/01/02.
  63. Sprick MR, Weigand MA, Rieser E, Rauch CT, Juo P, Blenis J, Krammer PH, Walczak H. Fadd/Mort1 and caspase-8 are recruited to Trail receptors 1 and 2 and are essential for apoptosis mediated by Trail receptor 2. *Immunity*. 2000;12(6):599–609. Epub 2000/07/14.
  64. Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I, Germer M, Pawlita M, Krammer PH, Peter ME. Cytotoxicity-dependent Apo-1 (Fas/Cd95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J*. 1995;14(22):5579–88. Epub 1995/11/15.
  65. Mace PD, Riedl SJ. Molecular cell death platforms and assemblies. *Curr Opin Cell Biol*. 2010;22(6):828–36. Epub 2010/09/08.
  66. Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A, Friesen C, Li F, Tomaselli KJ, Debatin KM, Krammer PH, Peter ME. Two Cd95 (Apo-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J*. 1998;17(6):1675–87. Epub 1998/05/02.
  67. Schleich K, Warnken U, Fricker N, Ozturk S, Richter P, Kammerer K, Schnolzer M, Krammer PH, Lavrik IN. Stoichiometry of the cd95 death-inducing signaling complex: experimental and modeling evidence for a death effector domain chain model. *Molec Cell*. 2012;47(2):306–19. Epub 2012/06/12.
  68. Lavrik IN, Krammer PH. Regulation of Cd95/Fas signaling at the DISC. *Cell Death Differ*. 2012;19(1):36–41. Epub 2011/11/15.
  69. Scaffidi C, Schmitz I, Zha J, Korsmeyer SJ, Krammer PH, Peter ME. Differential modulation of apoptosis sensitivity in Cd95 type I and type II cells. *J Biol Chem*. 1999;274(32):22532–8. Epub 1999/07/31.
  70. Hu S, Vincenz C, Ni J, Gentz R, Dixit VM. I-Flice, a novel inhibitor of tumor necrosis factor receptor-1- and Cd-95-induced apoptosis. *J Biol Chem*. 1997;272(28):17255–7. Epub 1997/07/11.
  71. Irmeler M, Thome M, Hahne M, Schneider P, Hofmann K, Steiner V, Bodmer JL, Schroter M, Burns K, Mattmann C, Rimoldi D, French LE, Tschopp J. Inhibition of death receptor signals by cellular flip. *Nature*. 1997;388(6638):190–5. Epub 1997/07/10.
  72. Ozturk S, Schleich K, Lavrik IN. Cellular fllice-like inhibitory proteins (C-flips): fine-tuners of life and death decisions. *Exp Cell Res*. 2012;318(11):1324–31. Epub 2012/02/09.
  73. Kruse JP, Gu W. Modes of P53 Regulation. *Cell*. 2009;137(4):609–22. Epub 2009/05/20.
  74. el-Deiry WS, Kern SE, Pietenpol JA, Kinzler KW, Vogelstein B. Definition of a consensus binding site for p53. *Nature Genet*. 1992;1(1):45–9.
  75. Vousden KH, Prives C. Blinded by the light: the growing complexity of p53. *Cell*. 2009;137(3):413–31. Epub 2009/05/05.
  76. Nakano K, Vousden KH. Puma, a novel proapoptotic gene, is induced by P53. *Molec Cell*. 2001;7(3):683–94. Epub 2001/07/21.
  77. Miyashita T, Reed JC. Tumor suppressor P53 is a direct transcriptional activator of the human Bax gene. *Cell*. 1995;80(2):293–9. Epub 1995/01/27.

78. Oda E, Ohki R, Murasawa H, Nemoto J, Shibue T, Yamashita T, Tokino T, Taniguchi T, Tanaka N. Noxa, a Bcl-2 family member and candidate mediator of P53-induced apoptosis. *Science (New York, NY)*. 2000;288(5468):1053-8. Epub 2000/05/12.
79. Chipuk JE, Moldoveanu T, Llambi F, Parsons MJ, Green DR. The Bcl-2 family reunion. *Molecular Cell*. 2010;37(3):299-310. Epub 2010/02/18.
80. Hermeking H. Micromas in the P53 Network: micromanagement of tumour suppression. *Nature Rev Cancer*. 2012;12(9):613-26. Epub 2012/08/18.
81. Speidel D. Transcription-Independent P53 Apoptosis: an alternative route to death. *Trends Cell Biol*. 2010;20(1):14-24. Epub 2009/11/03.
82. Volkmann N, Marassi FM, Newmeyer DD, Hanein D. The rheostat in the membrane: Bcl-2 family proteins and apoptosis. *Cell Death Differ*. 2014;21(2):206-15. Epub 2013/10/29.
83. Galluzzi L, Morselli E, Kepp O, Vitale I, Pinti M, Kroemer G. Mitochondrial liaisons of p53. *Antiox Redox Signal*. 2011;15(6):1691-714. Epub 2010/08/18.
84. Cheng EH, Wei MC, Weiler S, Flavell RA, Mak TW, Lindsten T, Korsmeyer SJ. Bcl-2, Bcl-X(L) sequester Bax domain-only molecules preventing Bax- and Bak-mediated mitochondrial apoptosis. *Molec Cell*. 2001;8(3):705-11. Epub 2001/10/05.
85. Llambi F, Moldoveanu T, Tait SW, Bouchier-Hayes L, Temirov J, McCormick LL, Dillon CP, Green DR. A unified model of mammalian Bcl-2 protein family interactions at the mitochondria. *Molec Cell*. 2011;44(4):517-31. Epub 2011/11/01.
86. Marchenko ND, Wolff S, Erster S, Becker K, Moll UM. Monoubiquitylation promotes mitochondrial p53 translocation. *EMBO J*. 2007;26(4):923-34. Epub 2007/02/03.
87. Mihara M, Erster S, Zaika A, Petrenko O, Chittenden T, Pancoska P, Moll UM. P53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. *Molec Cell*. 2003;11(3):577-90.
88. Petros AM, Gunasekera A, Xu N, Olejniczak ET, Fesik SW. Defining the p53 DNA-binding domain/Bcl-X(L)-binding interface using nmr. *FEBS Letts*. 2004;559(1-3):171-4. Epub 2004/02/13.
89. Hagn F, Klein C, Demmer O, Marchenko N, Vaseva A, Moll UM, Kessler H. Bclxl changes conformation upon binding to wild-type but not mutant p53 DNA binding domain. *J Biol Chem*. 2010;285(5):3439-50. Epub 2009/12/04.
90. Tomita Y, Marchenko N, Erster S, Nemajerova A, Dehner A, Klein C, Pan H, Kessler H, Pancoska P, Moll UM. Wt p53, but not tumor-derived mutants, bind to bcl2 via the DNA binding domain and induce mitochondrial permeabilization. *J Biol Chem*. 2006;281(13):8600-6. Epub 2006/01/31.
91. Follis AV, Llambi F, Ou L, Baran K, Green DR, Kriwacki RW. The DNA-binding domain mediates both nuclear and cytosolic functions of p53. *Nature Struct Molec Biol*. 2014;21(6):535-43. Epub 2014/05/13.
92. Chipuk JE, Kuwana T, Bouchier-Hayes L, Droin NM, Newmeyer DD, Schuler M, Green DR. Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. *Science*. 2004;303(5660):1010-4.
93. Chipuk JE, Bouchier-Hayes L, Kuwana T, Newmeyer DD, Green DR. Puma couples the nuclear and cytoplasmic proapoptotic function of p53. *Science*. 2005;309(5741):1732-5.
94. Vousden KH. Apoptosis. P53 and Puma: a deadly duo. *Science*. 2005;309(5741):1685-6. Epub 2005/09/10.
95. Leu JI, Dumont P, Hafey M, Murphy ME, George DL. Mitochondrial p53 activates Bak and causes disruption of a Bak-Mcl1 complex. *Nature Cell Biol*. 2004;6(5):443-50. Epub 2004/04/13.
96. Han J, Goldstein LA, Hou W, Gastman BR, Rabinowich H. Regulation of mitochondrial apoptotic events by p53-mediated disruption of complexes between antiapoptotic Bcl-2 members and Bim. *J Biol Chem*. 2010;285(29):22473-83. Epub 2010/04/21.
97. Hua G, Wang S, Zhong C, Xue P, Fan Z. Ignition of P53 bomb sensitizes tumor cells to granzyme K-mediated cytolysis. *J Immunol*. 2009;182(4):2152-9. Epub 2009/02/10.
98. Meslin F, Thiery J, Richon C, Jalil A, Chouaib S. Granzyme B-induced cell death involves induction of p53 tumor suppressor gene and its activation in tumor target cells. *J Biol Chem*. 2007;282(45):32991-9.
99. Brumbaugh KM, Otterness DM, Geisen C, Oliveira V, Brognard J, Li X, Lejeune F, Tibbetts RS, Maquat LE, Abraham RT. The Mrna surveillance protein hsmg-1 functions in genotoxic stress response pathways in mammalian cells. *Molec Cell*. 2004;14(5):585-98. Epub 2004/06/04.
100. Meslin F, Hamai A, Mlecnik B, Rosselli F, Richon C, Jalil A, Wemhoff G, Thiery J, Galon J, Chouaib



- S. Hsmg-1 is a granzyme B-associated stress-responsive protein kinase. *J Molecular Med (Berlin, Germany)*. 2011;89(4):411–21.
101. Ben Safta T, Ziani L, Favre L, Lamendour L, Gros G, Mami-Chouaib F, Martinvalet D, Chouaib S, Thiery J. Granzyme B-activated p53 interacts with bcl-2 to promote cytotoxic lymphocyte-mediated apoptosis. *J Immunol*. 2014. Epub 2014/11/19.
  102. Micheau O, Shirley S, Dufour F. Death receptors as targets in cancer. *Brit J Pharmacol*. 2013;169(8):1723–44. Epub 2013/05/04.
  103. Ashkenazi A. Targeting the extrinsic apoptosis pathway in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2008;19(3-4):325–31. Epub 2008/05/23.
  104. Wang S. The promise of cancer therapeutics targeting the TNF-related apoptosis-inducing ligand and trail receptor pathway. *Oncogene*. 2008;27(48):6207–15. Epub 2008/10/22.
  105. Liu X, Yue P, Khuri FR, Sun SY. P53 Upregulates death receptor 4 expression through an intronic p53 binding site. *Cancer Res*. 2004;64(15):5078–83. Epub 2004/08/04.
  106. Takimoto R, El-Deiry WS. Wild-type p53 transactivates the killer/DR5 gene through an intronic sequence-specific DNA-binding site. *Oncogene*. 2000;19(14):1735–43. Epub 2000/04/25.
  107. Henry RE, Andrysik Z, Paris R, Galbraith MD, Espinosa JM. A Dr4:Tbid axis drives the p53 apoptotic response by promoting oligomerization of poised bax. *EMBO J*. 2012;31(5):1266–78. Epub 2012/01/17.
  108. Owen-Schaub LB, Zhang W, Cusack JC, Angelo LS, Santee SM, Fujiwara T, Roth JA, Deisseroth AB, Zhang WW, Kruzel E, et al. Wild-type human p53 and a temperature-sensitive mutant induce Fas/Apo-1 expression. *Molec Cell Biol*. 1995;15(6):3032–40. Epub 1995/06/01.
  109. Zhao J, Lu Y, Shen HM. Targeting p53 as a therapeutic strategy in sensitizing trail-induced apoptosis in cancer cells. *Cancer Letts*. 2012;314(1):8–23. Epub 2011/10/28.
  110. Taketani K, Kawauchi J, Tanaka-Okamoto M, Ishizaki H, Tanaka Y, Sakai T, Miyoshi J, Maehara Y, Kitajima S. Key role of Atf3 in p53-dependent DR5 induction upon DNA damage of human colon cancer cells. *Oncogene*. 2012;31(17):2210–21. Epub 2011/09/20.
  111. Kuribayashi K, Krigsfeld G, Wang W, Xu J, Mayes PA, Dicker DT, Wu GS, El-Deiry WS. Tnfsf10 (Trail), a p53 target gene that mediates p53-dependent cell death. *Cancer Biol Ther*. 2008;7(12):2034–8. Epub 2008/12/25.
  112. Weinmann L, Wischhusen J, Demma MJ, Naumann U, Roth P, Dasmahapatra B, Weller M. A novel p53 rescue compound induces p53-dependent growth arrest and sensitises glioma cells to Apo2l/trail-induced apoptosis. *Cell Death Differ*. 2008;15(4):718–29. Epub 2008/01/19.
  113. Carter BZ, Mak DH, Schober WD, Dietrich MF, Pinilla C, Vassilev LT, Reed JC, Andreeff M. triptolide sensitizes aml cells to trail-induced apoptosis via decrease of Xiap and p53-mediated increase of DR5. *Blood*. 2008;111(7):3742–50. Epub 2008/01/12.
  114. Meijer A, Kruyt FA, van der Zee AG, Hollema H, Le P, ten Hoor KA, Groothuis GM, Quax WJ, de Vries EG, de Jong S. Nutlin-3 preferentially sensitises wild-type p53-expressing cancer cells to DR5-selective trail over RHTrail. *British J Cancer*. 2013;109(10):2685–95. Epub 2013/10/19.
  115. Cai Z, Capoulade C, Moyret-Lalle C, Amor-Gueret M, Feunteun J, Larsen AK, Paillerets BB, Chouaib S. Resistance of MCF7 human breast carcinoma cells to TNF-induced cell death is associated with loss of p53 function. *Oncogene*. 1997;15(23):2817–26. Epub 1998/01/07.
  116. Ameyar M, Shatrov V, Bouquet C, Capoulade C, Cai Z, Stancou R, Badie C, Haddada H, Chouaib S. Adenovirus-mediated transfer of wild-type p53 gene sensitizes TNF-resistant MCF7 derivatives to the cytotoxic effect of this cytokine: relationship with c-myc and rb. *Oncogene*. 1999;18(39):5464–72. Epub 1999/09/28.
  117. Ameyar-Zazoua M, Larochette N, Dorothee G, Daugas E, Haddada H, Gouloumet V, Metivier D, Stancou R, Mami-Chouaib F, Kroemer G, Chouaib S. Wild-type p53 induced sensitization of mutant p53 TNF-resistant cells: role of caspase-8 and mitochondria. *Cancer Gene Therapy*. 2002;9(3):219–27. Epub 2002/03/16.
  118. Muret J, Hasmim M, Stasik I, Jalil A, Mallavialle A, Nanbakhsh A, Lacroix L, Billot K, Baud V, Thiery J, Vielh P, Terrier P, Wiels J, Vassilev L, Lecesne A, Bonvalot S, Chouaib S. Attenuation of soft-tissue sarcomas resistance to the cytotoxic action of TNF-Alpha by restoring p53 function. *PLoS One*. 2012;7(6):e38808. Epub 2012/06/22.
  119. Aguilar-Lemarrooy A, Gariglio P, Whitaker NJ, Eichhorst ST, zur Hausen H, Krammer PH, Rosl F. Restoration of p53 expression sensitizes

- human papillomavirus type 16 immortalized human keratinocytes to CD95-mediated apoptosis. *Oncogene*. 2002;21(2):165–75. Epub 2002/01/23.
120. Senatus PB, Li Y, Mandigo C, Nichols G, Moise G, Mao Y, Brown MD, Anderson RC, Parsa AT, Brandt-Rauf PW, Bruce JN, Fine RL. Restoration of p53 function for selective fas-mediated apoptosis in human and rat glioma cells *in vitro* and *in vivo* by a p53 cooh-terminal peptide. *Molecular Cancer Therapeutics*. 2006;5(1):20–8. Epub 2006/01/25.
121. Thiery J, Dorothee G, Haddada H, Echchakir H, Richon C, Stancou R, Vergnon I, Benard J, Mami-Chouaib F, Chouaib S. Potentiation of a tumor cell susceptibility to autologous ctl killing by restoration of wild-type p53 function. *J Immunol*. 2003;170(12):5919–26.
122. Thiery J, Abouzahr S, Dorothee G, Jalil A, Richon C, Vergnon I, Mami-Chouaib F, Chouaib S. P53 potentiation of tumor cell susceptibility to cytotoxic T lymphocyte involves fas and mitochondrial pathways. *J Immunol*. 2005;174(2):871–8.
123. Fukazawa T, Fujiwara T, Uno F, Teraishi F, Kadowaki Y, Itoshima T, Takata Y, Kagawa S, Roth JA, Tschopp J, Tanaka N. Accelerated degradation of cellular flip protein through the ubiquitin-proteasome pathway in p53-mediated apoptosis of human cancer cells. *Oncogene*. 2001;20(37):5225–31. Epub 2001/08/30.
124. Textor S, Fiegler N, Arnold A, Porgador A, Hofmann TG, Cerwenka A. Human NK cells are alerted to induction of p53 in cancer cells by upregulation of the Nkg2d ligands Ulbp1 and Ulbp2. *Cancer Research*. 2011;71(18):5998–6009. Epub 2011/07/19.
125. Yoon KW, Byun S, Kwon E, Hwang SY, Chu K, Hiraki M, Jo SH, Weins A, Hakrroush S, Cebulla A, Sykes DB, Greka A, Mundel P, Fisher DE, Mandinova A, Lee SW. Control of signaling-mediated clearance of apoptotic cells by the tumor suppressor p53. *Science* 2015;349(6247):1261669. Epub 2015/08/01.
126. Watanabe M, Moon KD, Vacchio MS, Hathcock KS, Hodes RJ. Downmodulation of tumor suppressor p53 by T cell receptor signaling is critical for antigen-specific Cd4(+) T cell responses. *Immunity*. 2014;40(5):681–91. Epub 2014/05/06.
127. Brown CJ, Lain S, Verma CS, Fersht AR, Lane DP. Awakening guardian angels: drugging the p53 pathway. *Nature Rev Cancer*. 2009;9(12):862–73. Epub 2009/11/26.
128. Vassilev LT. Mdm2 inhibitors for cancer therapy. *Trends Molec Med*. 2007;13(1):23–31. Epub 2006/11/28.

## Melanoma-associated fibroblasts decrease tumor cell susceptibility to NK cell-mediated killing through matrix-metalloproteinases secretion

Linda Ziani<sup>1,2,3</sup>, Thouraya Ben Safta-Saadoun<sup>1,2,3</sup>, Johanne Gourbeix<sup>1,2</sup>, Andrea Cavalcanti<sup>4</sup>, Caroline Robert<sup>2,3,5,6</sup>, Gilles Favre<sup>7</sup>, Salem Chouaib<sup>1,2,3</sup>, Jerome Thiery<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>INSERM, UMR 1186, Villejuif, France

<sup>2</sup>Gustave Roussy Cancer Campus, Villejuif, France

<sup>3</sup>University Paris Sud, Faculty of Medicine, Le Kremlin Bicêtre, France

<sup>4</sup>Department of General Surgery, Gustave Roussy Cancer Campus, Villejuif, France

<sup>5</sup>INSERM, UMR 981, Villejuif, France

<sup>6</sup>Dermatology Service, Department of Medicine, Gustave Roussy Cancer Campus, Villejuif, France

<sup>7</sup>INSERM, UMR 1037, Toulouse, France

**Correspondence to:** Jerome Thiery, **email:** jerome.thiery@gustaveroussy.fr

**Keywords:** cancer-associated fibroblasts, natural killer cells, matrix-metalloproteinases, MICA/B, melanoma

**Received:** October 11, 2016

**Accepted:** January 16, 2017

**Published:** February 20, 2017

### ABSTRACT

**Cancer-associated fibroblasts (CAFs) play a central role in the complex process of tumor-stroma interaction and promote tumor growth. Emerging evidences also suggest that these fibroblasts are involved in the alteration of the anti-tumor immune response by impacting several immune cell populations, especially through their secretion of pro-inflammatory and immunosuppressive factors in the tumor microenvironment. However, the underlying immuno-modulating mechanisms triggered by these fibroblasts are still only partially defined. In this study, we provide evidence that melanoma-associated fibroblasts decrease the susceptibility of melanoma tumor cells to NK-mediated lysis through the secretion of active matrix metalloproteinases. This secretion reduces the expression of the two NKG2D ligands, MICA/B, at the surface of tumor cells and consequently decreases the NKG2D-dependent cytotoxic activity of NK cells against melanoma tumor cells. Together, our data demonstrate that the modification of tumor cell susceptibility to killer cells is an important determinant of the anti-tumor immune response alteration triggered by CAFs.**

### INTRODUCTION

Over the past decade, the tumor microenvironment has gained much attention as a critical determinant of tumor progression and clinical outcome [1–3]. Among the stromal cells, activated fibroblasts that share similarities with fibroblasts stimulated by inflammatory signals or activated during a wound healing process, termed cancer-associated fibroblasts (CAFs), play a critical role in the complex process of tumor-stroma interaction [4, 5]. CAFs, one of the prominent stromal cell population

in most types of human carcinomas, are  $\alpha$ -SMA (alpha-smooth muscle actin) positive, spindle-shaped cells, who differentiate and proliferate in the tumor microenvironment in a transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), platelet-derived growth factor (PDGF) and fibroblast growth factor (FGF)-dependent manner from other cell types such as resident fibroblasts, mesenchymal stem cells, endothelial and epithelial cells [5–9]

In the tumor stroma, CAFs play an important role by directly interacting with tumor cells and by the secretion of extracellular matrix proteins (i.e. collagen),

matrix metalloproteinases (MMPs), proteoglycans (i.e. laminin), chemokines (i.e. CXCL12/SDF1), vascularisation promoting proteins (i.e. VEGF) and other factors which affect tumor cells proliferation, invasiveness, survival and stemness (i.e. TGF- $\beta$ ) [5, 10–15]. Consequently, CAFs are a key determinant in tumor growth, angiogenesis, cancer stemness, extracellular matrix remodeling, tissue invasion, metastasis and even chemoresistance [5, 16–18].

During the past few years, it has also been either directly demonstrated or suggested that these activated tumor-associated fibroblasts can affect both the innate and the adaptive antitumor immune response, especially by the secretion of pro-inflammatory and immunosuppressive factors in the tumor microenvironment [19, 20]. In this regard, the secretion of TGF- $\beta$  by CAFs potentially affects several immune cell populations [21], including dendritic cells (by inhibiting their migration, maturation and antigen presentation capabilities [22]), regulatory T cells (Tregs) (by increasing their number within the tumor microenvironment through the induction of FOXP3 expression [23]), cytotoxic T lymphocytes (CTL) (by interfering with their function and frequency within the tumor [24, 25]) and natural killer (NK) cells (by attenuating their interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) production and their expression of NK-activating receptors including NKG2D, NKp30 and NKp44 [26–28]). Similarly, CAFs are a source of VEGF, which is known to affect dendritic cell function, to inhibit the migration of CTL to the tumor and to increase the infiltration of Tregs and immunosuppressive myeloid-derived suppressive cells (MDSC) within the tumor [29]. Moreover, the secretion of several chemokines by CAFs (including CXCL12/SDF1 and CCL2/MCP-1) can potentially attract macrophages in the tumor microenvironment and induce their differentiation into an M2 immunosuppressive phenotype [30, 31], and also allow the recruitment of immunosuppressive MDSC populations in the stroma [32, 33]. Finally, studies involving melanoma, hepatocellular and colorectal carcinoma-derived fibroblasts have shown that CAFs can decrease the expression of several NK activating receptors (including NKp30, NKp44 and NKG2D) on the NK cell surface through the secretion of prostaglandin E2 (PGE2) and/or indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO) [34–36] leading to an attenuate cytotoxic activity of NK cells against their tumor target cells.

These findings highlight the action of CAFs on various immune cell populations involved in the antitumor immune response. However, direct evidence supporting that CAFs also interfere with the tumor cell susceptibility to CTL or NK cell-mediated lysis is still lacking. In this study, we found that melanoma-associated fibroblasts decrease the susceptibility of melanoma tumor cells to NK-mediated lysis through the secretion of high levels of active MMPs, which reduce the NKG2D-dependent cytotoxic activity of NK cells by inducing the shedding of two NKG2D ligands, MICA/B, at the surface of tumor cells.

## RESULTS

### Phenotypic characterization of human fibroblasts isolated from melanoma and normal skin

In order to study the role of melanoma-associated fibroblasts on the modulation of melanoma tumor cell susceptibility to NK cell-mediated lysis, we established four CAFs and three normal skin fibroblasts (NF) primary cell populations from melanoma patient's tumor resection and from normal skin (Table 1). The adherent cells, which display a fibroblast-like morphology (i.e. elongated cells with cytoplasmic extensions) (Figure 1A) were further characterized by flow cytometry and fluorescence microscopy. Both melanoma and normal skin-derived cell populations express the fibroblastic marker FSP-1 (Fibroblast Specific Protein-1) and the mesenchymal marker vimentin, but not the epithelial marker E-cadherin, the endothelial marker CD31, the hematopoietic marker CD34 or the leukocyte marker CD45 (Figure 1B). Moreover, the melanoma-derived fibroblasts (CAF1-4) exhibit an activated phenotype as shown by a higher  $\alpha$ -SMA expression compared to the fibroblasts derived from normal skin (NF1-3) (Figure 1C–1D). These observations indicate that these cell populations are mainly fibroblasts, with minimal contamination with epithelial, endothelial or hematopoietic cells, and confirm the previously described different activation level between tumor-derived and normal fibroblasts.

### Melanoma-associated fibroblasts decrease tumor cell susceptibility to NK-mediated lysis

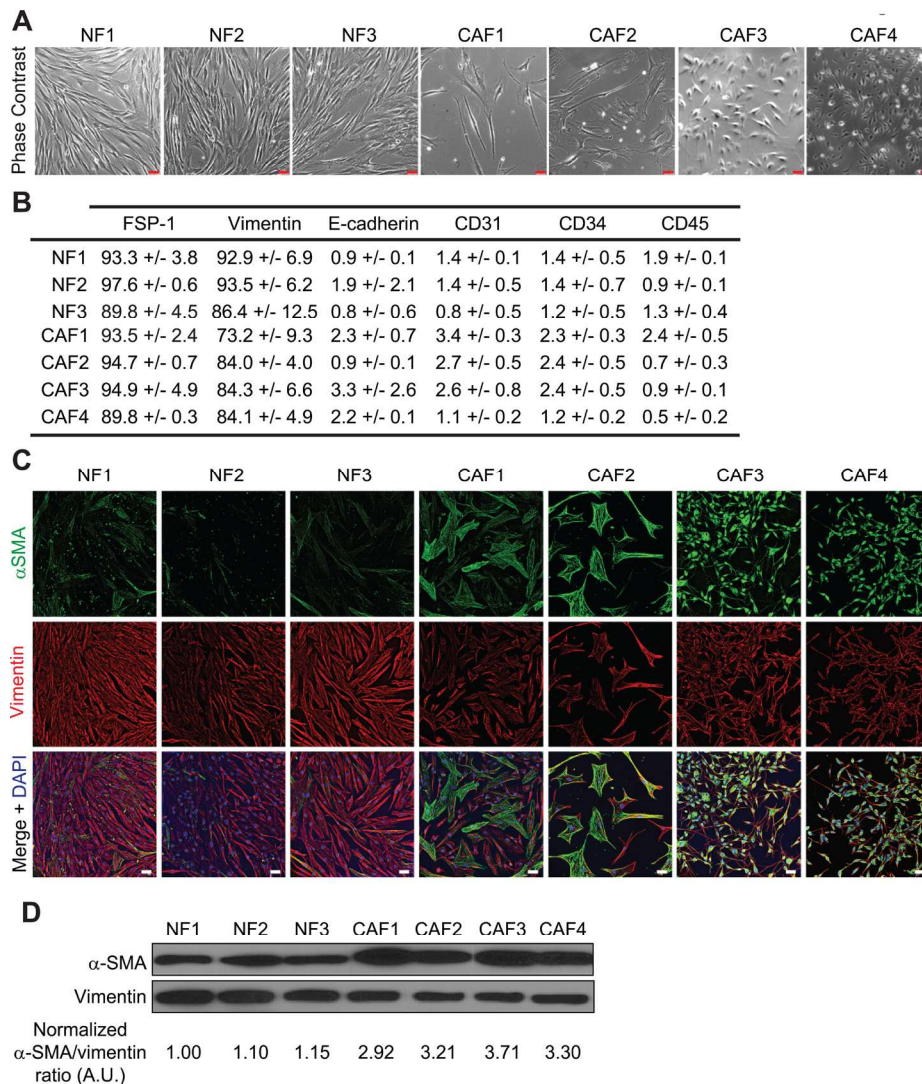
The pro-tumorigenic activity of CAFs includes direct cellular interactions and mostly paracrine effects affecting different cell types present in the tumor microenvironment. To investigate the effect of melanoma-derived CAFs on melanoma tumor cell susceptibility to NK cell-dependent killing, focusing on their “secretome”, we generated conditioned medium (CM) from the culture supernatants of melanoma-derived fibroblasts (CAF1-4) and normal skin-derived fibroblasts (NF1-3) and used them to treat a melanoma tumor cell line established from a tumor biopsy (T1) during 48 hrs. The lysis of T1 target cells by the NK92 clone was thus strongly decreased after pre-treatment with the CAF1-4 CMs while NF1-3 CMs have no effect (Figure 2A–2C). To confirm these results, we used NK cells isolated from two different healthy donor's peripheral blood (NKd1 and NKd2) to test their lytic potential against the T1 melanoma target cells pre-treated with the CAF1,3,4 and NF2,3 CMs. As expected, the NKd1 or NKd2-mediated lysis of T1 target cells was also strongly decreased after pre-treatment with the CAF1-4 CMs while NF2-3 CMs have no effect (Figure 2D–2F).



**Table 1: List of the different fibroblast populations**

Primary fibroblast culture	Origin	Stade
NF1	Normal skin	-
NF2	Normal skin	-
NF3	Normal skin	-
CAF1	Melanoma	Metastatic
CAF2	Melanoma	Metastatic
CAF3	Melanoma	Metastatic
CAF4	Melanoma	Primitive

NF: normal fibroblast. CAF: cancer-associated fibroblast.

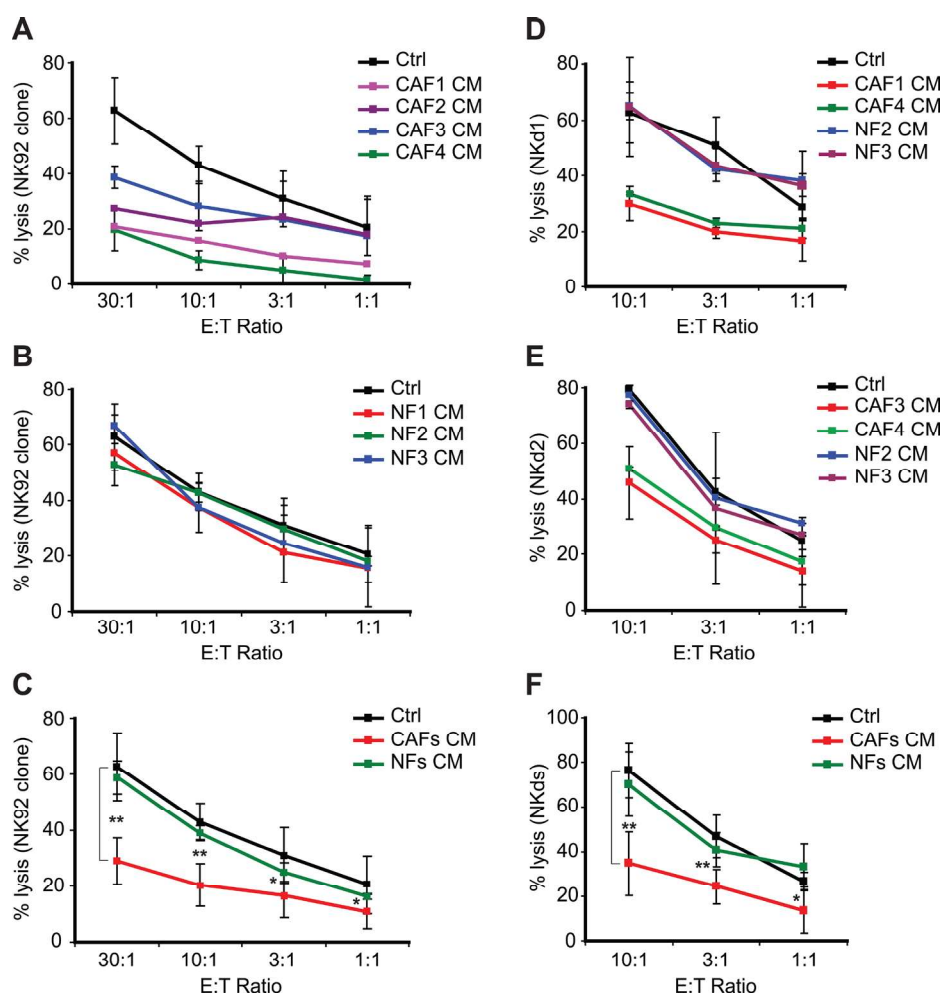


**Figure 1: Phenotypes of fibroblasts derived from melanoma and normal skin.** (A) Morphology of the different fibroblastic primary cultures by phase contrast microscopy. (B) Expression of the fibroblastic, mesenchymal epithelial, endothelial, hematopoietic or leukocytic markers FSP-1, Vimentin, E-cadherin, CD31, CD34 or CD45 by the different isolated fibroblast populations. Data are expressed as the percentage of positive cells  $\pm$  s.d. from three independent flow cytometry experiments. (C–D) CAFs isolated from melanoma patient’s tumor biopsies display an activated phenotype. The expression of the activation marker  $\alpha$ -SMA, together with the mesenchymal marker Vimentin, was evaluated by fluorescence microscopy (C) and western blot (D). CAFs express more  $\alpha$ -SMA than normal skin fibroblasts. The  $\alpha$ -SMA/Vimentin ratio from (D) was calculated by densitometry and normalized to “1” in NF1 cells (A.U.: arbitrary units). Data (C–D) are representative of three independent experiments. Scale bars (A, C): 50  $\mu$ m

Similar results were also obtained using the melanoma tumor cell line WM17-16 and NKd1 effector cells (Supplementary Figure 1).

We then tested whether CAF CMs affect NK cells adhesion to T1 target cells by measuring the immune conjugate formation between T1 cells and NK92 effector cells. CAF or NF CMs-pretreated (48 hrs) or control T1 target cells and NK92 were respectively stained with the lyophilic dyes DiO or DiD and conjugates formation was measured by flow cytometry after 30 min of co-culture. No significant differences were observed for the formation of immune conjugates between NK92 cells and T1 control cells or T1 target cells pretreated with either the CAFs or the NFs CMs (Supplementary Figure 2A–2B). To further

confirm these results, we also evaluated ICAM-1/CD54 expression at the surface of T1 target cells, since its interaction with LFA-1 contributes to NK cells adhesion to target cells. Consistently with the lack of difference in the formation of immune conjugates between NK92 cells and T1 control cells or T1 target cells pretreated with either the CAFs or the NFs CMs, ICAM-1 surface expression was similar in either control or CMs-treated T1 cells (Supplementary Figure 2C). Because the lysis of the T1 tumor target cells by the NK92 clone and by NK cells isolated from healthy donor's is mainly mediated by the Perforin/Granzymes (PFN/Gzms) pathway, as shown by abrogation of NK92 and NKd's cytotoxicity after treatment with concanamycin A (CMA) which inhibits cytotoxic



**Figure 2: Conditioned media from melanoma-associated fibroblasts decrease the susceptibility of tumor cells to NK-mediated killing.** (A–C) The lysis of the T1 melanoma cell line, untreated (Ctrl) or pre-treated during 48 hrs with the conditioned media (CM) of CAFs (CAF1-4) (A) or normal skin fibroblasts (NF1-3) (B) by the NK92 clone was evaluated by  $^{51}\text{Cr}$  release assays at different effector:target (E:T) ratios. Data are the mean  $\pm$  s.d. from five independent experiments. Experiments in (A–B) were performed at the same time but separated in two different panels. (C) represents the mean  $\pm$  s.d. of all the NK92-mediated lysis experiments from (A–B) using the CAFs or NFs pre-treatments of the T1 tumor cell line. (D–E) The lysis of the T1 melanoma cell line, untreated (Ctrl) or pre-treated during 48 hrs with the conditioned media (CM) of CAFs (CAF1, 3 or 4) or normal skin fibroblasts (NF2-3) by the NK cells isolated from two healthy donors (NKd1 and NKd2) was evaluated by  $^{51}\text{Cr}$  release assays at different effector:target (E:T) ratios (D–E). Data are the mean  $\pm$  s.d. from three independent experiments. (F) represents the mean  $\pm$  s.d. of all the NKd-mediated lysis experiments from (D–E) using the CAFs or NFs pre-treatments of the T1 tumor cell line. *P* values (C–D) were determined by unpaired two-tailed student's *t*-test comparing the control and CAFs CM pre-treatments. (\**p* < 0.05; \*\**p* < 0.001)

granules exocytosis (Supplementary Figure 3A), we also tested whether the CAFs or the NFs CMs alter T1 tumor cell susceptibility to PFN/Granzyme B (GzmB)-induced cell death by measuring the activation of effector caspases in either control or CMs-pre-treated cells. We used a flow cytometry-based assay using M30-FITC mAbs to detect a caspase-3 cleavage product of cytokeratin 18 (CK18) [37, 38]. Again, no significant differences were observed for PFN/GzmB-induced apoptosis between T1 control cells or T1 cells pre-treated with either the CAFs or the NFs CMs (Supplementary Figure 3B). Together, these results indicate that melanoma-associated fibroblasts protect melanoma tumor cells against NK-mediated cytotoxicity by a mechanism which is not associated with an alteration of tumor cell recognition or with a decrease of tumor cell susceptibility to PFN/GzmB-induced cell death.

### **Melanoma-associated fibroblasts decrease MICA/B expression on tumor cells**

NK cell functions are regulated by a balance of activating and inhibiting signals triggered by membrane receptors expressed by NK cells and their corresponding ligands expressed by target cells [39]. Among these receptors, the activating receptor NKG2D/CD314 is of major importance for NK cell activation and cytotoxic or secretory functions [40]. NKG2D (Natural Killer Group 2 member D) recognizes ligands from the MIC (MHC class I chain-related protein) and ULBP (HCMV UL16-binding proteins) families which appear on the surface of stressed, transformed or infected target cells. In humans, there are currently eight known members of the MIC and ULBP families: MICA, MICB and ULBP 1-6 [40]. In order to determine whether an alteration of the NKG2D/NKG2D ligands activating pathway might be involved in the decreased susceptibility of melanoma tumor cells to NK-mediated lysis following CAFs CMs treatment, we first determined whether this pathway is involved in NK-mediated killing of the T1 cell line. All NK effector cells used in this study (NK92, NKd1 and NKd2) expressed the NKG2D receptor (Supplementary Figure 4A). Moreover, the use of an anti-NKG2D blocking mAb strongly decreased NK92-, NKd1- and NKd2-mediated killing of T1 melanoma cells (Supplementary Figure 4B), demonstrating that NKG2D is an important determinant for the lysis of T1 cells by NK cells. We then tested the NKG2D ligands expression at the surface of T1 melanoma cells and investigated whether the pre-treatment of these cells with CAFs or NFs CMs can alter their membrane expression. T1 cells strongly express MICA/B and ULBP2/5/6, very slightly express ULBP1 and are negative for ULBP3 and ULBP4 (Figure 3). Importantly, the pre-treatment of T1 cells with the CAFs or NFs CMs does not modify ULBPs surface expression (Figure 3A, 3C), but the pre-treatment of T1 cells with the CAFs CMs strongly decreases MICA/B membrane expression,

while the NFs CMs have no effect (Figure 3A–3B). Furthermore, we evaluated by ELISA the presence of soluble MICA (sMICA) or MICB (sMICB) in tumor cell supernatants following treatment with the CAFs CMs. The concentration of both sMICA and sMICB were thus significantly increased in the supernatant of T1 melanoma tumor cells after treatment with the CAF1-4 CMs compared to control cells (Figure 3D). Together, these results suggest that melanoma-associated fibroblasts protect melanoma tumor cells against NK-mediated cytotoxicity by the secretion of soluble factors leading to a decrease of MICA/B expression at the surface of tumor cells, most likely by a mechanism which involved MICA and MICB shedding at the melanoma tumor cell surface.

### **The secretion of high levels of active matrix metalloproteinases by melanoma-associated fibroblasts is associated with the decrease of MICA/B expression on tumor cells**

Although NKG2D ligands, including MICA and MICB, are up-regulated during malignant transformation in response to oncogenic activation, their expression can be down-regulated both transcriptionally and non-transcriptionally at the level of tumor cells to escape antitumor the immune response [41]. For example, the secretion of TGF- $\beta$  or IFN- $\gamma$  down-regulates NKG2D ligands transcription in tumor cell lines [42–44]. In addition, several studies have reported that the secretion or expression of MMPs by tumor cells (including the secreted MMP-2, MMP-9 and the membrane type MMP-14) can lead to the shedding of MICA/B at their surface [45–51]. MMPs belong to a group of 26 human zinc-binding endopeptidases which are secreted or anchored to the cell membrane and involved in the degradation of different components of the extracellular matrix [52]. As such MMPs play an important role in tumor cell migration and invasion [53]. Importantly, CAFs also play an important role in the modification of the extracellular matrix by expressing a large variety of matrix remodeling enzymes such as MMPs [16]. We thus hypothesized that high levels of active MMPs secreted by our melanoma-associated fibroblasts could induce the observed decrease of MICA/B and shedding at the surface of the T1 melanoma tumor cells. To validate this hypothesis, we first evaluate MMPs activity in the CAFs and NFs CMs. We used a fluorescence-based assay to measure the activity of MMP-1, 2, 3, 7, 8, 9, 12, 13, and 14. This assay is based on a 5-FAM/QXL520 fluorescence resonance energy transfer (FRET) peptide as an MMP substrate. In the intact FRET peptide, the fluorescence of 5-FAM is quenched by QXL520. Upon cleavage into two separate fragments by MMPs, the fluorescence of 5-FAM is recovered and can be monitored. Using this approach, we showed that CAFs CMs contain higher levels of active MMPs as compared to the CMs of NFs. Moreover, the MMPs inhibitor GM6001

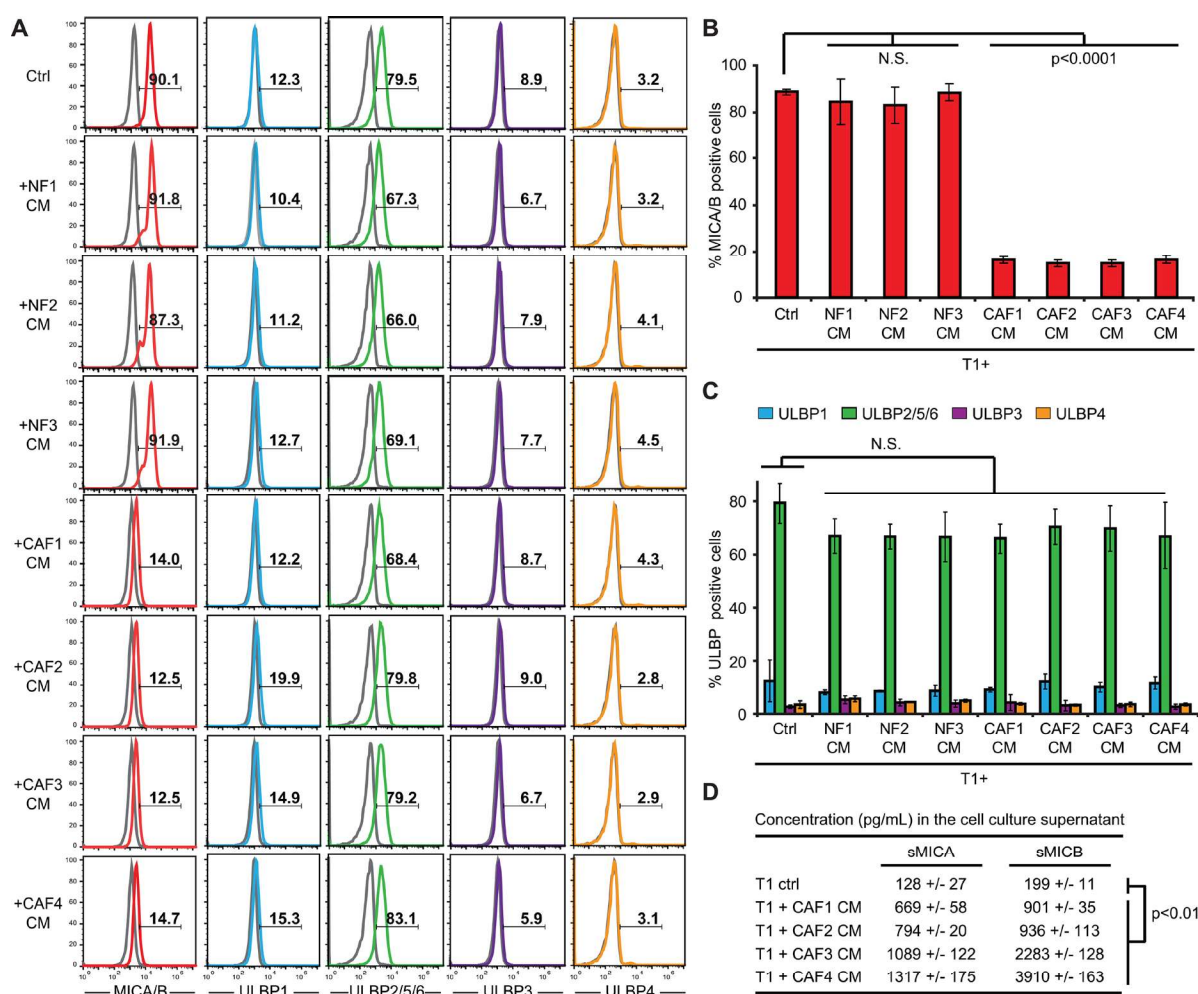


(Galardin/Ilomastat) which inhibits the activity of secreted MMP-1, 2, 3, 7, 8, 9 and 12 strongly inhibits the MMPs activity in these CAFs CMs (Figure 4A–4B). To validate the implication of MMPs in the decreased membrane expression of MICA/B on T1 tumor cells following treatment with the CAFs CMs, CAFs CMs were then pre-treated with 50  $\mu$ M GM6001 during 15 min before incubating T1 tumor cells with these CMs during 48 hrs. Flow cytometry analysis revealed that GM6001 prevents the decrease of MICA/B surface expression induced by the CAFs CMs (Figure 5A–5B).

Together, these results indicate that melanoma-associated fibroblasts secrete high levels of active MMPs leading to a decrease of MICA/B expression at the membrane of tumor cells.

### The inhibition of matrix metalloproteinases activity in melanoma-associated fibroblasts conditioned media restores tumor cell susceptibility to NK-mediated lysis

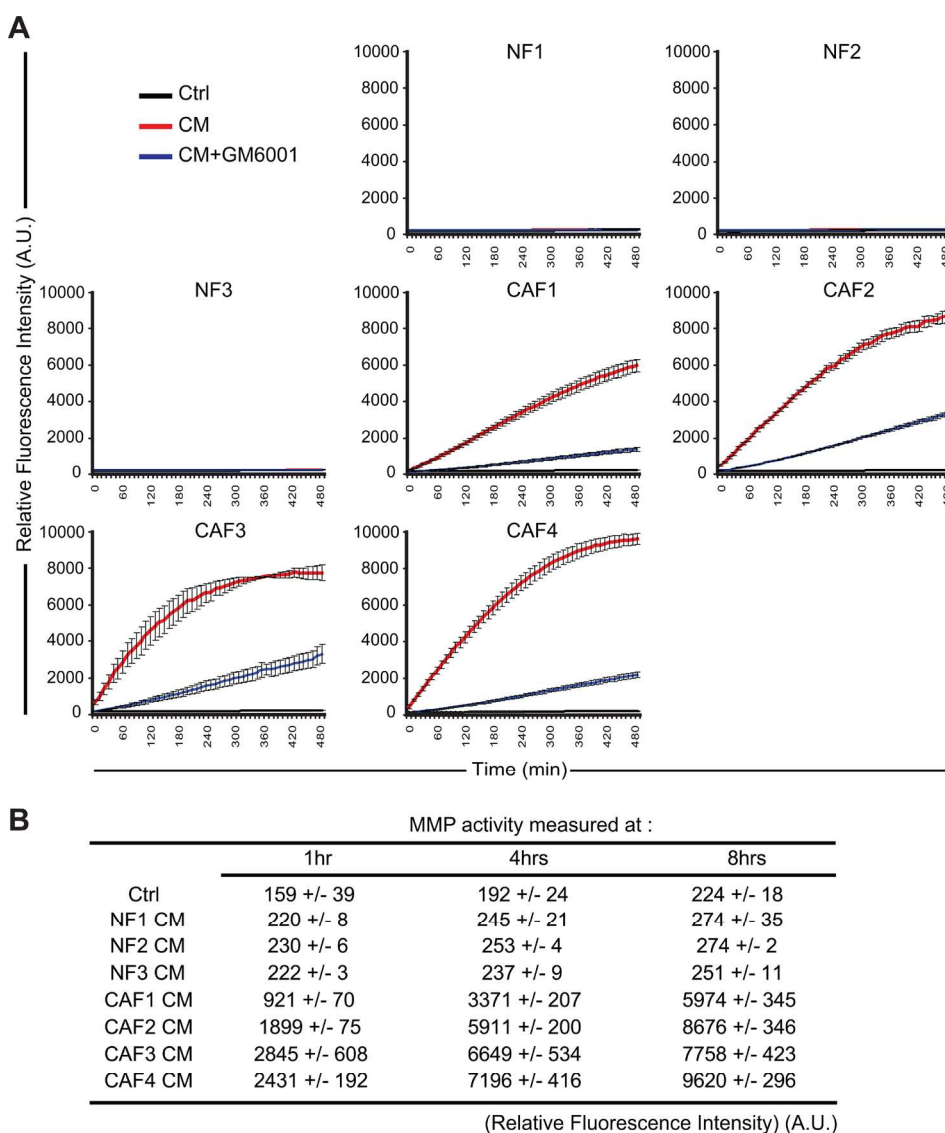
In order to validate the implication of MMPs in the decreased susceptibility of T1 tumor cell susceptibility to NK cell-mediated lysis following treatment with the CAFs CMs, we next tested whether the restoration of MICA/B expression in the presence of the MMPs inhibitor GM6001 can increase CAFs CMs-treated tumor cell-susceptibility to NK cell-mediated killing. For this purpose, T1 tumor cells were treated with control medium or CAFs CMs in the presence or absence of 50  $\mu$ M GM6001 during 48 hrs before measuring NK92 cell cytotoxic activity.



**Figure 3: Conditioned media from melanoma-associated fibroblasts decrease MICA/B expression at the surface of tumor cells.** (A–C) The expression of MICA/B, ULBP1, ULBP2/5/6, ULBP3 and ULBP4 was evaluated at the surface of T1 melanoma cell line, untreated (Ctrl) or pre-treated during 48 hrs with the conditioned media (CM) of CAFs (CAF1–4) or normal skin fibroblasts (NF1–3). Representative flow cytometry histograms (A) and mean  $\pm$  s.d. of percentage MICA/B (B) and ULPBs (C) positive cells from three independent experiments are shown. Gray lines in A represent the isotype controls. (D) The shedding of MICA/B at the surface of T1 tumor cells following a 48 hrs treatment with the conditioned media (CM) of CAFs (CAF1–4) or with control medium, was evaluated by ELISA measuring soluble MICA (sMICA) and MICB (sMICB) concentration (pg/mL) in the cell culture supernatant. Data are represented as mean concentrations  $\pm$  s.d. from two independent experiments performed in duplicate. *P* values (B–D) were determined by unpaired two-tailed student's *t*-test.

As previously described, the treatment of T1 tumor cells with CAF1-4 CMs decreases their susceptibility to NK92-mediated lysis. However, the presence of the MMPs inhibitor GM6001 in the CAF1-4 CMs partially restores (~50%) the killing of T1 tumor cells by the NK92 effector cells (Figure 6A). To further validate these results, and since NKG2D engagement by MICA/B not only triggers the cytolytic activity of NK cells, but also their cytokine production, we next evaluated IFN- $\gamma$  production by NK cells isolated from a healthy donor (Nkd1) co-cultivated with T1 melanoma target cells, pre-treated with CAFs CMs or control medium, in the presence or absence of GM6001. Similarly to NK-mediated lysis, the treatment of T1 tumor cells with CAF1-4 CMs decreases the

induction of IFN- $\gamma$  production by NKd1 cells after 6 hrs of co-culture (while NF1-3 CMs have no effect; Figure 6B and data not shown). Moreover, the presence of the MMPs inhibitor GM6001 partially restores the IFN- $\gamma$  production (~70%) of NKd1 cells following incubation with the CAF1-4 CMs-treated T1 target cells (Figure 6B). Together, these results correlate with the restoration of MICA/B expression at the surface of CAFs CMs-treated T1 tumor cells following GM6001 treatment and demonstrate that MMPs present in the CAFs CMs are, at least partially, responsible for the decreased susceptibility of melanoma tumor cell susceptibility to NK cell-mediated lysis though a diminished NKG2D-dependent NK cell activation.

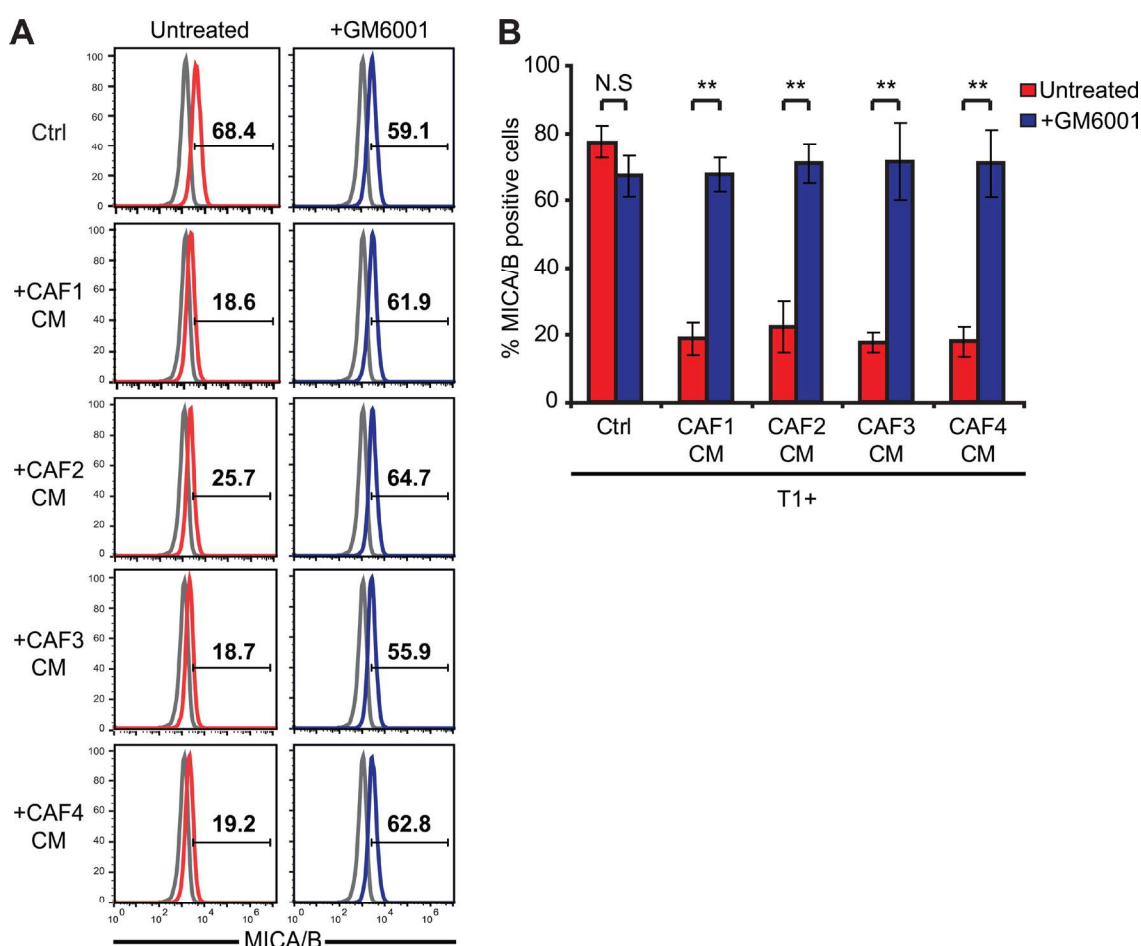


**Figure 4: Conditioned media from melanoma-associated fibroblasts contain a high level of active matrix metalloproteinases.** The activity of MMPs was evaluated in the conditioned media (CM) of CAFs (CAF1-4) or normal skin fibroblasts (NF1-3) in the presence or absence of the MMPs inhibitor GM6001 by measuring the fluorescence emission of a 5-FAM/QXL520 FRET peptide as a MMP substrate. Fluorescence was measured every 10 min. A representative experiment performed in triplicate for each CMs is displayed in (A). The relative mean fluorescence intensity  $\pm$  s.d of two independent experiments, measured at the indicated time (1, 4 and 8 hrs), is represented in (B). (A.U.: arbitrary units)

## DISCUSSION

NK cells can participate to the early immune response against melanoma and contribute to the adaptive immune response by the secretion of cytokines and by the promotion of antigen-presenting cell maturation. However, even if melanoma cells are often efficiently recognized and killed by NK cells *in vitro*, melanomas have developed multiple elaborated strategies to escape from NK cell-mediated destruction *in vivo* [54, 55]. In the present study, we provide evidence that fibroblasts isolated from melanoma tumor biopsies strongly interfere with melanoma tumor cell susceptibility to NK-mediated lysis. This suppressive effect is largely dependent on high levels of active MMPs released by melanoma-associated fibroblasts and is specific of the fibroblasts present in the tumor microenvironment because normal skin fibroblasts only minimally affect melanoma tumor cell susceptibility to NK-mediated killing.

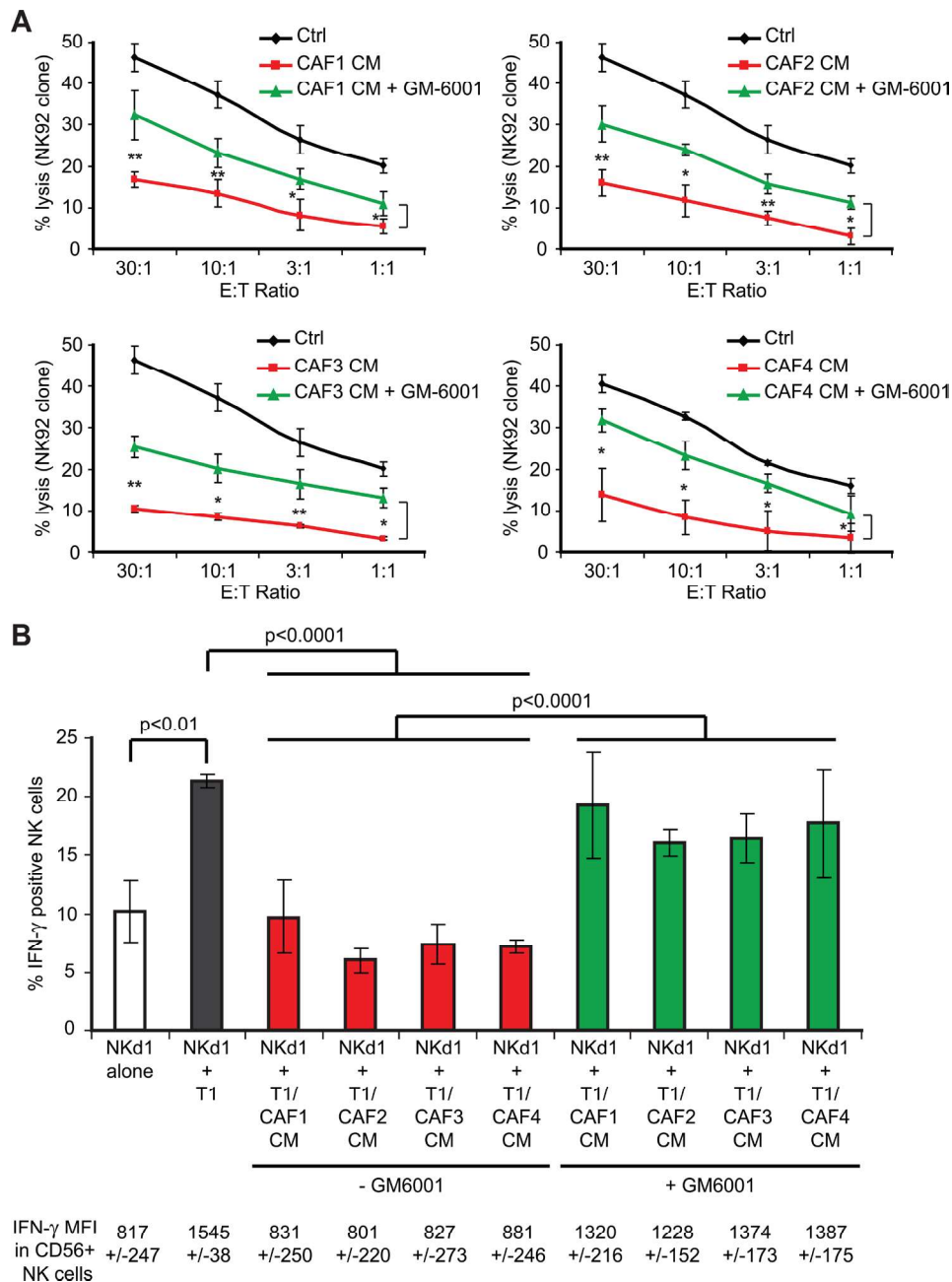
It is now well established that different soluble factors released by tumor cells in the tumor microenvironment (i.e. TGF- $\beta$ , PDGF and FGF) locally activate fibroblasts which acquire phenotypic and functional properties different from their normal counterparts [5]. In particular, when exposed to these stimuli, CAFs express proteases such as MMPs, which can favor remodeling of the extracellular matrix (ECM) and promote tumor invasion. Indeed, normal fibroblasts continually regulate and restrain the change of the ECM in healthy tissue by strictly controlling MMPs secretion and membrane-type matrix metalloproteinases (MT-MMPs) expression, thereby preventing the degradation of basement membrane and consequently blocking a potential metastasis process. On the opposite, soluble factors present in the tumor microenvironment such as TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL1 $\beta$  and FGF promote the expression of MMPs by fibroblasts [56, 57]. Accordingly, we observed in our study that melanoma-associated fibroblasts secrete high level of active MMPs while normal skin fibroblasts only display minor MMPs



**Figure 5: The inhibition of MMPs activity in melanoma-associated fibroblasts conditioned media restores the expression of MICA/B at the surface of tumor cells.** The expression of MICA/B was evaluated at the surface of T1 melanoma cells, untreated (Ctrl) or pre-treated during 48 hrs with the conditioned media (CM) of CAFs (CAF1-4) in the absence or presence of 50  $\mu$ M of the MMPs inhibitor GM6001. CAFs CMs or control medium were pre-treated with GM6001 during 15 min before starting the 48 hrs incubation period. Representative flow cytometry histograms (A) and mean  $\pm$  s.d. of percentage MICA/B positive cells (B) from three independent experiments are shown. *P* values (B) were determined by unpaired two-tailed student's *t*-test. (N.S: non significant; \*\**p* < 10<sup>-5</sup>). Gray lines in A represent the isotype controls.

activity in their CMs. Importantly, this high level of MMPs activity in the CMs of melanoma-derived fibroblasts is associated with the decreased susceptibility of melanoma tumor cells to NK-mediated lysis, as shown by the use of the pan-MMPs inhibitor GM6001 which restores melanoma

tumor cells susceptibility to NK-mediated killing in the presence of melanoma-associated fibroblasts CMs. Of note, the inhibition of MMPs activity in the CAFs CMs using GM6001 is highly effective (Figure 4) but only partially restores melanoma tumor cell susceptibility to NK-mediated



**Figure 6: The inhibition of MMPs activity in melanoma-associated fibroblasts conditioned media partially restores tumor cell susceptibility to NK cell-mediated lysis and interferon-g production by NK cells.** (A) NK92-mediated lysis of the T1 melanoma cell line, untreated (Ctrl) or pre-treated during 48 hrs with the conditioned media (CM) of CAFs (CAF1-4) in the presence or absence of the MMPs inhibitor GM6001 was evaluated by <sup>51</sup>Cr release assays at different effector:target (E:T) ratios. (B) The IFN-γ production by NK cells isolated from a healthy donor (NKd1) was measured by flow cytometry after 6 hrs co-culture with T1 tumor cells, either untreated (Ctrl) or pre-treated during 48 hrs with the conditioned media (CM) of CAFs (CAF1-4) in the presence or absence of the MMPs inhibitor GM6001. Co-cultures were performed in the presence of Brefedrin-A to block the IFN-γ secretion before CD56 and IFN-γ staining. The percentage of IFN-γ positive NK cells is represented and the mean fluorescence intensity (MFI) of IFN-γ in CD56 positive NK cells is indicated below. Data (A-B) are the mean ± s.d. from three independent experiments. P values were determined by unpaired two-tailed student's t-test. (\*p < 0.05; \*\*p < 0.01)



attack (Figure 6A), suggesting that MMPs may not be the sole factor involved.

With regard to the mechanism of inhibition, our data provide evidence that melanoma-associated fibroblasts, through the secretions of active MMPs, decrease MICA/B expression at the surface of melanoma tumor cells. In our model, this effect of melanoma-derived CAFs seems to be specific to these two NKG2D ligands because ULPBs expression is not affected, even if we cannot exclude that the secretion of active MMPs or other factors by CAFs might also influence the expression of other activating receptor ligands (i.e. CD112, CD155, B7-H6, HLA-E) which respectively bind to DNAM-1, NKp30 and NKG2C. Nevertheless, because the activating receptor NKG2D/NKG2DL pathway is of major importance for NK activation, cytolytic functions and cytokine secretion, the observed CAFs and MMPs-dependent decrease in MICA/B expression at the surface of melanoma tumor cells leads to a strong alteration of the NK cells cytotoxic activity against their melanoma target cells, as well as a diminished secretion of IFN- $\gamma$  by NK cells following recognition of their targets. Remarkably, this phenomenon seems to be conserved, as all the CAFs isolated from four different melanoma patient's tumor resection have the same effect on NK cell-dependent killing. Nevertheless, further studies will be needed to determine whether this phenomenon might be extended to CAFs from other tumor tissues. Of note, since NKG2D on some CD8<sup>+</sup> T cells can trigger a co-stimulatory signal [58, 59], CAF-dependent decrease of MICA/B expression at the surface of melanoma tumor cells might also affect the T cell-dependent immune response.

Regarding the mechanism of action of MMPs on MICA/B, a few studies have reported that the secretion or expression of these metalloproteinases by tumor cells (including the secreted MMP-2, MMP-9 and MT-MMP-14) can lead to the proteolytic cleavage/shedding of MICA/B [45–51] and possibly ULBP2 and ULBP3 [60] at their surface. Based on our results, it is likely that not only tumor cells can affect MICA/B membrane expression by the secretion of MMPs, but also stromal cells including CAFs. However, further studies will be needed to identify the exact MMPs involved in this CAF-dependent process. Nevertheless, because MT-MMP-14 is normally anchored to the plasma membrane by a trans-membrane and intra-cytoplasmic domain, it is unlikely that this MMP is, at least directly, involved in the shedding of MICA/B in our study which uses CMs. Moreover, GM6001 mostly inhibits the activity of secreted MMP-1, 2, 3, 7, 8, 9 and 12 and almost completely prevents the shedding of MICA/B at the surface of tumor cells treated with the CAFs CMs (Figure 5), suggesting that one or several of these MMPs are involved. Moreover, RT-qPCR experiments showed that CAF1-4 mostly expressed MMP1,2,3 and 9 at the mRNA level (data not shown), narrowing the list of MMPs possibly

involved in the CAF CMs-dependent shedding of MICA/B at the surface of melanoma tumor cells to MMP1,2,3 and 9.

Finally, it is important to point out that a pioneer study involving CAFs isolated from melanoma, but also other studies involving hepatocellular and colorectal carcinoma-derived fibroblasts, have shown that these cells can decrease NKp30, NKp44, DNAM-1 and/or NKG2D expression at the surface of NK cells, as well as PFN or GzmB expression [34–36]. These effects seem to be dependent, at least partially, on the secretion of PGE2 and IDO by CAFs and lead to an attenuate cytotoxic activity of NK cells against their tumor target cells. In this context, these studies and our results highlight that the CAFs secretome, especially in melanoma, profoundly alter the NK-dependent antitumor immune response by different mechanisms, including the secretion of active MMPs. Further studies will be thus required to determine whether the use of MMPs inhibitors [61] might improve the NK-dependent control of tumor growth in preclinical models, or might be helpful in combination with the current immune-based anti-tumor/anti-melanoma therapies.

## MATERIALS AND METHODS

### Cell Lines

T1 and WM17-16 melanoma tumor cells were grown in RPMI-1640/Glutamax<sup>TM</sup> supplemented with 10% FCS, 100 U/ml penicillin, 100 mg/ml streptomycin and 1% sodium pyruvate (Life Technologies). The T1 tumor cell line was established from the primary lesion of a patient suffering from a melanoma [62]. The metastatic melanoma cells WM17-16 were obtained from ATCC. The NK92 cell line and NK cells isolated from healthy donors (NKd) with human CD56 positive selection kit (StemCell) were cultured in RPMI 1640/GlutaMax<sup>TM</sup> supplemented with 10% of FCS and 300 U/mL rhIL2 (Sanofi).

### Isolation of melanoma-associated and normal skin fibroblasts

A panel of 4 pathology-confirmed melanoma tumor resections and 3 normal skin biopsies from healthy donors was obtained in accordance with consent procedures approved by the Gustave Roussy Institute. A mechanical dissociation by cutting and scrapping the tissue into small pieces (1–2 mm<sup>3</sup>) was performed in a 10 cm culture plate. The pieces were then distributed into a 24 wells plate and fibroblast growth medium (DMEM-F12, 10% FCS, 100 U/ml penicillin and 100 mg/ml streptomycin) was then added. After several days, outgrowth of tumor-derived cells was observed. Tissue debris and non-adherent cells were then removed and medium changed. After 5–7 days, cells were trypsinized 2–3 min with 0.25% trypsin-EDTA until the fibroblast population was released from the plate



as visually assessed by microscopy, whereas tumor cells were retained. The cell suspension was then centrifuged and fresh culture medium was added before the transfer into new wells. Because fibroblasts are highly adherent to plastic, the medium was changed after 30 min to allow the removal of the remaining tumor cells. Cells population homogeneously displaying a fibroblast-like morphology were then phenotypically characterized and assessed for purity by the analysis of the indicated informative markers.

### **Preparation of fibroblast-derived conditioned media and treatment of the melanoma tumor cells**

CAFs or NFs were seeded at equal density ( $2 \times 10^5$  cells/well in 12 well plates) and maintained in culture during 48 hrs in DMEM/F12 medium supplemented with 5% FCS. Culture supernatants were then collected and centrifuged 15 min at 2,000 rpm to remove cell debris. These supernatants, considered as conditioned media (CM), were then immediately used or frozen at  $-20^\circ\text{C}$  for subsequent use. The treatment of T1 or WM17-16 tumor cells with the CMs was performed during 48hrs.

### **Flow cytometry analysis**

Phenotypic analyses of tumor cells, NK cells or fibroblasts were performed by direct or indirect immunostaining. Briefly,  $0.2 \times 10^6$  cells were stained with the following Abs: rabbit anti-FSP-1/S100A4 mAb (clone EPR2761, Abcam); rabbit anti-vimentin mAb (clone SP20, Abcam); PE-conjugated mouse anti-human E-Cadherin/CD324 mAb (clone 67A4, Biolegend); Alexa Fluor<sup>®</sup> 488-conjugated mouse anti-human CD31 (clone M89D3, BD Pharmingen); FITC-conjugated mouse anti-CD34 mAb (clone AC136, Miltenyi Biotec.); PE-conjugated mouse anti-human CD45RO mAb (clone UCHL1, DakoCytomation); PE-conjugated mouse anti-MICA/B mAb (clone 6D4; Biolegend); PE-conjugated mouse anti-human ULBP-1 mAb (clone 170818); APC-conjugated mouse anti-human ULBP-2/5/6 mAb (clone 165903); PE-conjugated mouse anti-human ULBP-3 mAb (clone 166510); PE-conjugated mouse anti-human ULBP-4 mAb (clone 709116) (R&D systems); mouse anti-ICAM-1/CD54(clone 25D7); PE-conjugated mouse anti-NKG2D mAb (clone ON72, Beckman Coulter); Alexa Fluor<sup>®</sup> 488-conjugated goat anti-rabbit Ab (Life Technologies). For intracellular staining, cells were fixed and permeabilized with CytoFix/CytoPerm solution (BD Biosciences). Extracellular staining were performed at  $4^\circ\text{C}$ . Acquisitions were performed using a BD Accuri<sup>™</sup> C6 flow cytometer (BD Biosciences) and data were processed using the FlowJo program.

### **Fluorescence microscopy**

Cells were grown on rat collagen-coated glass coverslips (Sigma) and fixed for 20 min in PBS/2% PFA, washed and incubated 20 min in PBS/50 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . Cells were then washed with PBS, permeabilized for 5 min in PBS/0.2% Triton X-100. After 2 washes in PBS, coverslips were placed in blocking solution (PBS/10% FCS) for 30 min, washed once in PBS and incubated for 1 hr at RT with mouse anti- $\alpha$ -SMA mAb (clone 4A4, Abcam) and rabbit anti-Vimentin mAb (clone SP20, Abcam) in incubation buffer (PBS/0.05% Triton X-100). Cells were then washed 3 times with incubation buffer and incubated 1 hr at RT with goat Alexa-Fluor 488 and Alexa-Fluor 647-conjugated secondary antibody (Life Technologies) in incubation buffer containing 5% FCS. Cells were then washed 3 times in PBS and mounted in Vectashield mounting medium (Vector Laboratories) before imaging (IX83 microscope; Olympus) and analysis (CellSense Dimension software, Olympus).

### **Western blot**

Total cellular extracts were prepared by lysing cells in RIPA buffer (Pierce) containing a cocktail of protease inhibitors (Roche) and 2 mM sodium orthovanadate before denaturation by boiling in Laemmli buffer and SDS-PAGE separation on 4–20% precast gels (Biorad). Blots were probed with the following Ab: anti- $\alpha$ -SMA mouse mAb (clone 4A4, Abcam), anti-Vimentin rabbit mAb (clone SP20, Abcam), HRP-conjugated anti-actin mouse mAb (clone AC-74, Sigma), HRP-conjugated goat anti-mouse or anti-rabbit Ab (Santa Cruz Bio.). Western blot quantification was performed using the Image-J densitometry software.

### **Chromium release assay**

Cytotoxicity was measured by a 4 hr chromium release assay as previously described [63]. Experiments were performed in triplicate. Data are expressed as the percentage of specific  $^{51}\text{Cr}$  release from target cells, calculated as (experimental release-spontaneous release)/(maximum release-spontaneous release)  $\times 100$ . In some experiments, the inhibition of the PFN/Gzm-mediated cytotoxic pathway was performed by using NK effector cells pre-incubation for 2 hr with 100 nM concanamycin A (CMA)(Sigma-Aldrich) (concentration of CMA during lysis: 50 nM). The inhibition of the NKG2D-dependent cytotoxic was performed by using NK effector cells pre-incubation for 30 min with 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  anti-NKG2D blocking mAb (clone Bat-221; Miltenyi Biotec.) which was maintained at the same concentration during lysis.

## Measurement and inhibition of MMPs activity in conditioned media

The metalloproteinases activity in CAFs and NFs CMs was measured using the fluorometric SensoLyte® 520 Generic MMP Activity Kit (AnaSpec) according to a modified manufacturer protocol. Briefly, the supernatants of CAFs or NFs (cultured during 48 hrs without FCS) were collected and centrifuged for 10–15 min at 1,000 g at 4°C. MMPs substrate and MMPs diluents were then mixed together (50 µL) in a 96 wells plate before adding 50 µL of the freshly prepared CAFs or NFs CMs to initiate the enzymatic reaction. Fluorescence was then immediately measured and monitored every 10 min at Ex/Em = 490/520 nm during 8 hrs using a FLUOstar Optima microplate reader (BMG Labtech). In some experiments, the MMPs inhibitor GM6001 (Galardin/Ilomastat) (Santa Cruz Bio.) was used at 50 µM to pre-treat the fibroblasts CMs during 15 min. GM6001 was maintained at the same concentration during the 48 hrs treatment of T1 target cells with the fibroblast CMs or during the measurement of MMPs activity.

## MICA and MICB ELISA

$0.1 \times 10^6$  T1 target cells were treated in 12-w plates during 48 hrs with 500 µL DMEM/F12 medium supplemented with 5% FCS (ctrl) or with the CAFs CMs. The cell culture supernatants were then immediately frozen at -80°C. Soluble MICA and MICB concentration in these supernatants were independently measured by ELISA (Thermo Scientific) according to the manufacturer recommendations.

## Analysis of IFN- $\gamma$ production by NK cells

T1 melanoma cell line, untreated or pre-treated during 48 hrs with the conditioned media of CAFs (CAF1-4) in the presence or absence of the MMPs inhibitor GM6001 (50 µM) were co-cultivated during 6 hrs with resting NK cells isolated from a healthy donor (NKd1) at the effector:target ratio of 3:1. Co-cultures were performed in the presence of 10 µg/mL Brefeldin-A (Sigma) to inhibit IFN- $\gamma$  secretion. After 6 hrs, cells were harvested, washed with PBS and stained on ice with A488-conjugated mouse anti-CD56 mAb (clone B159; BD Biosciences). Cells were then washed 3 times with PBS, permeabilized with CytoFix/CytoPerm solution (BD Biosciences) and stained with APC-conjugated mouse anti-IFN- $\gamma$  mAb (clone B27; BD Biosciences) before flow cytometry analysis of IFN- $\gamma$  positive cells, gating on CD56<sup>+</sup> NK cells.

## Detection of effector /target cell conjugates

Control or CMs pre-treated T1 and NK92 cells were respectively stained during 10 min with the lipophilic dyes DiO or DiD (Molecular Probes) according to the

manufacturer's instructions and washed 3 times with warm culture medium. T1 target cells were then incubated with NK92 effector cells at the effector:target ratio of 3:1 in Ca<sup>2+</sup> free medium (HBSS with 10 mM Hepes pH7.5, 0.4% BSA) during 30 min at 37°C to allow conjugate formation before flow cytometry analysis.

## Apoptosis assays

To assess PFN/GzmB-dependent apoptosis, T1 cells incubated for 2 hr at 37°C with buffer or sublytic PFN  $\pm$  50 nM hGzmB, were analyzed for caspase activation by flow cytometry using M30-FITC mAb staining (M30 CytoDEATH, Roche) to detect an effector caspase-cleavage product of cytokeratin 18, as previously described [37, 38]. Native rat PFN was purified from RNK16 cells and native hGzmB was purified from YT-Indy cells as described [64].

## Statistical analysis

Data are expressed as mean  $\pm$  standard deviation (s.d.). *P* values were determined by unpaired two-tailed student's *t* tests.

## Abbreviations

CAF, Cancer-Associated Fibroblast; CM, Conditioned Medium; Gzm, Granzyme; IFN- $\gamma$ , Interferon gamma; MICA/B, MHC class I polypeptide-related protein A and B; MMP, Matrix metalloproteinase; NF, Normal Fibroblast; NK, Natural Killer cell; NKG2D, Natural Killer Group 2 member D; PFN, Perforin; ULBP, HCMV UL16-binding proteins.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank J. Cherier (CRCT-INSERM UMR 1037, Toulouse, France) for helpful discussion and for technical advices regarding CAFs isolation and culture. We thank N. Kamsu-Kom (INSERM U981, Villejuif, France) for assistance with the melanoma tumor biopsies and M. Khaled (INSERM U1186, ATIP-AVENIR TEAM, Villejuif, France) for technical advices regarding the measurement of MMPs activity. We thank D. Martinvalet (University of Geneva, Switzerland) for the human GzmB.

## CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare no conflicts of interest.

## Authors' contributions

L.Z. performed experiments and analyzed data. T.B.S.S. and J.G. helped with some experiments. A.C. provided normal tissue biopsies. C.R. provided melanoma

tumor biopsies. G.F. participates to helpful discussion. S.C. participates to helpful discussion and edited the manuscript. J.T. conceived and supervised the project, helped designing experiments, analyzed data and wrote the manuscript.

## FUNDING

This work was supported by INSERM and the french “Ligue Nationale Contre Le Cancer” (LNCC-Equipe Labéllisée). L.Z is supported by a PhD training fellowship from the french “Ligue Nationale Contre Le Cancer” and T.B.S.S. by a PhD training fellowship from the “Association pour la Recherche contre le Cancer” (ARC).

## REFERENCES

- Junttila MR, de Sauvage FJ. Influence of tumour micro-environment heterogeneity on therapeutic response. *Nature*. 2013; 501:346–54. doi: 10.1038/nature12626.
- Whiteside TL. The tumor microenvironment and its role in promoting tumor growth. *Oncogene*. 2008; 27:5904–12. doi: 10.1038/onc.2008.271.
- Franco OE, Shaw AK, Strand DW, Hayward SW. Cancer associated fibroblasts in cancer pathogenesis. *Semin Cell Dev Biol*. 2010; 21:33–9. doi: 10.1016/j.semcdb.2009.10.010.
- Madar S, Goldstein I, Rotter V. ‘Cancer associated fibroblasts’—more than meets the eye. *Trends Mol Med*. 2013; 19:447–53. doi: 10.1016/j.molmed.2013.05.004.
- Ohlund D, Elyada E, Tuveson D. Fibroblast heterogeneity in the cancer wound. *J Exp Med*. 2014; 211:1503–23. doi: 10.1084/jem.20140692.
- Elkabets M, Gifford AM, Scheel C, Nilsson B, Reinhardt F, Bray MA, Carpenter AE, Jirstrom K, Magnusson K, Ebert BL, Ponten F, Weinberg RA, McAllister SS. Human tumors instigate granulysin-expressing hematopoietic cells that promote malignancy by activating stromal fibroblasts in mice. *J Clin Invest*. 2011; 121:784–99. doi: 10.1172/JCI43757.
- Direkze NC, Hodivala-Dilke K, Jeffery R, Hunt T, Poulson R, Oukrif D, Alison MR, Wright NA. Bone marrow contribution to tumor-associated myofibroblasts and fibroblasts. *Cancer Res*. 2004; 64:8492–5. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-1708.
- Zeisberg EM, Potenta S, Xie L, Zeisberg M, Kalluri R. Discovery of endothelial to mesenchymal transition as a source for carcinoma-associated fibroblasts. *Cancer Res*. 2007; 67:10123–8. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-3127.
- Kojima Y, Acar A, Eaton EN, Mellody KT, Scheel C, Ben-Porath I, Onder TT, Wang ZC, Richardson AL, Weinberg RA, Orimo A. Autocrine TGF-beta and stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) signaling drives the evolution of tumor-promoting mammary stromal myofibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010; 107:20009–14. doi: 10.1073/pnas.1013805107.
- Rasanen K, Vaheri A. Activation of fibroblasts in cancer stroma. *Exp Cell Res*. 2010; 316:2713–22. doi: 10.1016/j.yexcr.2010.04.032.
- Orimo A, Tomioka Y, Shimizu Y, Sato M, Oigawa S, Kamata K, Nogi Y, Inoue S, Takahashi M, Hata T, Muramatsu M. Cancer-associated myofibroblasts possess various factors to promote endometrial tumor progression. *Clin Cancer Res*. 2001; 7:3097–105. doi: 10.1158/1078-0432.CCR.01-0100.
- Orimo A, Gupta PB, Sgroi DC, Arenzana-Seisdedos F, Delaunay T, Naeem R, Carey VJ, Richardson AL, Weinberg RA. Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell*. 2005; 121:335–48. doi: 10.1016/j.cell.2005.02.034.
- Guo X, Oshima H, Kitmura T, Taketo MM, Oshima M. Stromal fibroblasts activated by tumor cells promote angiogenesis in mouse gastric cancer. *J Biol Chem*. 2008; 283:19864–71. doi: 10.1074/jbc.M800798200.
- Giannoni E, Bianchini F, Masieri L, Serni S, Torre E, Calorini L, Chiarugi P. Reciprocal activation of prostate cancer cells and cancer-associated fibroblasts stimulates epithelial-mesenchymal transition and cancer stemness. *Cancer Res*. 2010; 70:6945–56. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-0785.
- Cai J, Tang H, Xu L, Wang X, Yang C, Ruan S, Guo J, Hu S, Wang Z. Fibroblasts in omentum activated by tumor cells promote ovarian cancer growth, adhesion and invasiveness. *Carcinogenesis*. 2012; 33:20–9. doi: 10.1093/carcin/bgr230.
- Cirri P, Chiarugi P. Cancer associated fibroblasts: the dark side of the coin. *Am J Cancer Res*. 2011; 1:482–97. doi: 10.1155/2011/148297.
- Shimoda M, Mellody KT, Orimo A. Carcinoma-associated fibroblasts are a rate-limiting determinant for tumour progression. *Semin Cell Dev Biol*. 2010; 21:19–25. doi: 10.1016/j.semcdb.2009.10.002.
- Muerkoster S, Wegehenkel K, Arlt A, Witt M, Sipos B, Kruse ML, Sebens T, Kloppel G, Kalthoff H, Folsch UR, Schafer H. Tumor stroma interactions induce chemoresistance in pancreatic ductal carcinoma cells involving increased secretion and paracrine effects of nitric oxide and interleukin-1beta. *Cancer Res*. 2004; 64:1331–7. doi: 10.1158/0008-5472.CCR.03-0100.
- Harper J, Sainson RC. Regulation of the anti-tumour immune response by cancer-associated fibroblasts. *Semin Cancer Biol*. 2014; 25:69–77. doi: 10.1016/j.semcancer.2013.12.005.
- Kraman M, Bambrough PJ, Arnold JN, Roberts EW, Magiera L, Jones JO, Gopinathan A, Tuveson DA, Fearon DT. Suppression of antitumor immunity by stromal cells expressing fibroblast activation protein-alpha. *Science*. 2010; 330:827–30. doi: 10.1126/science.1195300.
- Flavell RA, Sanjabi S, Wrzesinski SH, Licona-Limon P. The polarization of immune cells in the tumour environment by TGFbeta. *Nat Rev Immunol*. 2010; 10:554–67. doi: 10.1038/nri2808.



22. Seeger P, Musso T, Sozzani S. The TGF-beta superfamily in dendritic cell biology. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2015; 26:647–57. doi: 10.1016/j.cytogfr.2015.06.002.
23. Fantini MC, Becker C, Monteleone G, Pallone F, Galle PR, Neurath MF. Cutting edge: TGF-beta induces a regulatory phenotype in CD4+CD25- T cells through Foxp3 induction and down-regulation of Smad7. *J Immunol.* 2004; 172:5149–53. doi:
24. Nazareth MR, Broderick L, Simpson-Abelson MR, Kelleher RJ, Jr., Yokota SJ, Bankert RB. Characterization of human lung tumor-associated fibroblasts and their ability to modulate the activation of tumor-associated T cells. *J Immunol.* 2007; 178:5552–62. doi:
25. Thomas DA, Massague J. TGF-beta directly targets cytotoxic T cell functions during tumor evasion of immune surveillance. *Cancer Cell.* 2005; 8:369–80. doi: 10.1016/j.ccr.2005.10.012.
26. Park YP, Choi SC, Kiesler P, Gil-Krzewska A, Borrego F, Weck J, Krzewski K, Coligan JE. Complex regulation of human NKG2D-DAP10 cell surface expression: opposing roles of the gamma cytokines and TGF-beta1. *Blood.* 2011; 118:3019–27. doi: 10.1182/blood-2011-04-346825.
27. Laouar Y, Sutterwala FS, Gorelik L, Flavell RA. Transforming growth factor-beta controls T helper type 1 cell development through regulation of natural killer cell interferon-gamma. *Nat Immunol.* 2005; 6:600–7. doi: 10.1038/ni1197.
28. Castriconi R, Cantoni C, Della Chiesa M, Vitale M, Marcenaro E, Conte R, Biassoni R, Bottino C, Moretta L, Moretta A. Transforming growth factor beta 1 inhibits expression of NKP30 and NKG2D receptors: consequences for the NK-mediated killing of dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003; 100:4120–5. doi: 10.1073/pnas.0730640100.
29. Voron T, Marcheteau E, Pernot S, Colussi O, Tartour E, Taieb J, Terme M. Control of the immune response by pro-angiogenic factors. *Front Oncol.* 2014; 4: 70. doi: 10.3389/fonc.2014.00070.
30. Comito G, Giannoni E, Segura CP, Barcellos-de-Souza P, Raspolini MR, Baroni G, Lanciotti M, Serni S, Chiarugi P. Cancer-associated fibroblasts and M2-polarized macrophages synergize during prostate carcinoma progression. *Oncogene.* 2014; 33:2423–31. doi: 10.1038/onc.2013.191.
31. Roca H, Varsos ZS, Sud S, Craig MJ, Ying C, Pienta KJ. CCL2 and interleukin-6 promote survival of human CD11b+ peripheral blood mononuclear cells and induce M2-type macrophage polarization. *J Biol Chem.* 2009; 284:34342–54. doi: 10.1074/jbc.M109.042671.
32. Chun E, Lavoie S, Michaud M, Gallini CA, Kim J, Soucy G, Odze R, Glickman JN, Garrett WS. CCL2 Promotes Colorectal Carcinogenesis by Enhancing Polymorphonuclear Myeloid-Derived Suppressor Cell Population and Function. *Cell Rep.* 2015; 12:244–57. doi: 10.1016/j.celrep.2015.06.024.
33. Obermajer N, Muthuswamy R, Odunsi K, Edwards RP, Kalinski P. PGE(2)-induced CXCL12 production and CXCR4 expression controls the accumulation of human MDSCs in ovarian cancer environment. *Cancer Res.* 2011; 71:7463–70. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-2449.
34. Balsamo M, Scordamaglia F, Pietra G, Manzini C, Cantoni C, Boitano M, Queirolo P, Vermi W, Facchetti F, Moretta A, Moretta L, Mingari MC, Vitale M. Melanoma-associated fibroblasts modulate NK cell phenotype and antitumor cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009; 106:20847–52. doi: 10.1073/pnas.0906481106.
35. Li T, Yang Y, Hua X, Wang G, Liu W, Jia C, Tai Y, Zhang Q, Chen G. Hepatocellular carcinoma-associated fibroblasts trigger NK cell dysfunction via PGE2 and IDO. *Cancer Lett.* 2012; 318:154–61. doi: 10.1016/j.canlet.2011.12.020.
36. Li T, Yi S, Liu W, Jia C, Wang G, Hua X, Tai Y, Zhang Q, Chen G. Colorectal carcinoma-derived fibroblasts modulate natural killer cell phenotype and antitumor cytotoxicity. *Med Oncol.* 2013; 30: 663. doi: 10.1007/s12032-013-0663-z.
37. Leers MP, Kolgen W, Bjorklund V, Bergman T, Tribbick G, Persson B, Bjorklund P, Ramaekers FC, Bjorklund B, Nap M, Jornvall H, Schutte B. Immunocytochemical detection and mapping of a cytokeratin 18 neo-epitope exposed during early apoptosis. *J Pathol.* 1999; 187:567–72. doi:
38. Thiery J, Keefe D, Saffarian S, Martinvalet D, Walch M, Boucrot E, Kirchhausen T, Lieberman J. Perforin activates clathrin- and dynamin-dependent endocytosis, which is required for plasma membrane repair and delivery of granzyme B for granzyme-mediated apoptosis. *Blood.* 2010; 115:1582–93. doi: 10.1182/blood-2009-10-246116.
39. Vivier E, Ugolini S, Blaise D, Chabannon C, Brossay L. Targeting natural killer cells and natural killer T cells in cancer. *Nat Rev Immunol.* 2012; 12:239–52. doi: 10.1038/nri3174.
40. Zhang J, Basher F, Wu JD. NKG2D Ligands in Tumor Immunity: Two Sides of a Coin. *Front Immunol.* 2015; 6: 97. doi: 10.3389/fimmu.2015.00097.
41. Raulet DH, Gasser S, Gowen BG, Deng W, Jung H. Regulation of ligands for the NKG2D activating receptor. *Annu Rev Immunol.* 2013; 31:413–41. doi: 10.1146/annurev-immunol-032712-095951.
42. Eisele G, Wischhusen J, Mittelbronn M, Meyermann R, Waldhauer I, Steinle A, Weller M, Friese MA. TGF-beta and metalloproteinases differentially suppress NKG2D ligand surface expression on malignant glioma cells. *Brain.* 2006; 129:2416–25. doi: 10.1093/brain/awl205.
43. Schwinn N, Vokhminova D, Sucker A, Textor S, Striegel S, Moll I, Nausch N, Tuettenberg J, Steinle A, Cerwenka A, Schadendorf D, Paschen A. Interferon-gamma down-regulates NKG2D ligand expression and impairs the NKG2D-mediated cytotoxicity of MHC class I-deficient melanoma by natural killer cells. *Int J Cancer.* 2009; 124:1594–604. doi: 10.1002/ijc.24098.
44. Spear P, Wu MR, Sentman ML, Sentman CL. NKG2D ligands as therapeutic targets. *Cancer Immunol.* 2013; 13:8. doi:

45. Salih HR, Rammensee HG, Steinle A. Cutting edge: down-regulation of MICA on human tumors by proteolytic shedding. *J Immunol.* 2002; 169:4098–102. doi:
46. Lee BK, Kim MJ, Jang HS, Lee HR, Ahn KM, Lee JH, Choung PH. A high concentration of MMP-2/gelatinase A and MMP-9/gelatinase B reduce NK cell-mediated cytotoxicity against an oral squamous cell carcinoma cell line. *In Vivo.* 2008; 22:593–7. doi:
47. Salih HR, Goehlsdorf D, Steinle A. Release of MICB molecules by tumor cells: mechanism and soluble MICB in sera of cancer patients. *Hum Immunol.* 2006; 67:188–95. doi: 10.1016/j.humimm.2006.02.008.
48. Le Maux Chansac B, Misse D, Richon C, Vergnon I, Kubin M, Soria JC, Moretta A, Chouaib S, Mami-Chouaib F. Potentiation of NK cell-mediated cytotoxicity in human lung adenocarcinoma: role of NKG2D-dependent pathway. *Int Immunol.* 2008; 20:801–10. doi: 10.1093/intimm/dxn038.
49. Sun D, Wang X, Zhang H, Deng L, Zhang Y. MMP9 mediates MICA shedding in human osteosarcomas. *Cell Biol Int.* 2011; 35:569–74. doi: 10.1042/CBI20100431.
50. Yamanegi K, Yamane J, Kobayashi K, Ohyama H, Nakasho K, Yamada N, Hata M, Fukunaga S, Futani H, Okamura H, Terada N. Downregulation of matrix metalloproteinase-9 mRNA by valproic acid plays a role in inhibiting the shedding of MHC class I-related molecules A and B on the surface of human osteosarcoma cells. *Oncol Rep.* 2012; 28:1585–90. doi: 10.3892/or.2012.1981.
51. Liu G, Atteridge CL, Wang X, Lundgren AD, Wu JD. The membrane type matrix metalloproteinase MMP14 mediates constitutive shedding of MHC class I chain-related molecule A independent of A disintegrin and metalloproteinases. *J Immunol.* 2010; 184:3346–50. doi: 10.4049/jimmunol.0903789.
52. Page-McCaw A, Ewald AJ, Werb Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007; 8:221–33. doi: 10.1038/nrm2125.
53. Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell.* 2010; 141:52–67. doi: 10.1016/j.cell.2010.03.015.
54. Tarazona R, Duran E, Solana R. Natural Killer Cell Recognition of Melanoma: New Clues for a More Effective Immunotherapy. *Front Immunol.* 2015; 6:649. doi: 10.3389/fimmu.2015.00649.
55. Burke S, Lakshmikanth T, Colucci F, Carbone E. New views on natural killer cell-based immunotherapy for melanoma treatment. *Trends Immunol.* 2010; 31:339–45. doi: 10.1016/j.it.2010.06.003.
56. Stuelten CH, DaCosta Byfield S, Arany PR, Karpova TS, Stetler-Stevenson WG, Roberts AB. Breast cancer cells induce stromal fibroblasts to express MMP-9 via secretion of TNF-alpha and TGF-beta. *J Cell Sci.* 2005; 118:2143–53. doi: 10.1242/jcs.02334.
57. Andersen K, Maeldandsmo GM, Hovig E, Fodstad O, Loennechen T, Winberg JO. Interleukin-1 alpha and basic fibroblast growth factor induction of matrix metalloproteinases and their inhibitors in osteosarcoma cells is modulated by the metastasis associated protein CAPL. *Anticancer Res.* 1998; 18:3299–303. doi:
58. Verneris MR, Karimi M, Baker J, Jayaswal A, Negrin RS. Role of NKG2D signaling in the cytotoxicity of activated and expanded CD8+ T cells. *Blood.* 2004; 103:3065–72. doi: 10.1182/blood-2003-06-2125.
59. Maasho K, Opoku-Anane J, Marusina AI, Coligan JE, Borrego F. NKG2D is a costimulatory receptor for human naive CD8+ T cells. *J Immunol.* 2005; 174:4480–4. doi:
60. Shiraishi K, Mimura K, Kua LF, Koh V, Siang LK, Nakajima S, Fujii H, Shabbir A, Yong WP, So J, Takenoshita S, Kono K. Inhibition of MMP activity can restore NKG2D ligand expression in gastric cancer, leading to improved NK cell susceptibility. *J Gastroenterol.* 2016. doi: 10.1007/s00535-016-1197-x.
61. Vandenbroucke RE, Libert C. Is there new hope for therapeutic matrix metalloproteinase inhibition? *Nat Rev Drug Discov.* 2014; 13:904–27. doi: 10.1038/nrd4390.
62. Dufour E, Carcelain G, Gaudin C, Flament C, Avril MF, Faure F. Diversity of the cytotoxic melanoma-specific immune response: some CTL clones recognize autologous fresh tumor cells and not tumor cell lines. *J Immunol.* 1997; 158:3787–95. doi:
63. Ben Safta T, Ziani L, Favre L, Lamendour L, Gros G, Mami-Chouaib F, Martinvalet D, Chouaib S, Thiery J. Granzyme B-activated p53 interacts with Bcl-2 to promote cytotoxic lymphocyte-mediated apoptosis. *J Immunol.* 2015; 194:418–28. doi: 10.4049/jimmunol.1401978.
64. Thiery J, Walch M, Jensen DK, Martinvalet D, Lieberman J. Isolation of cytotoxic T cell and NK granules and purification of their effector proteins. *Curr Protoc Cell Biol.* 2010; Chapter 3: Unit 3.37. doi:



**Titre :** Implication de la protéine suppresseur de tumeurs p53 dans la mort cellulaire induite par les lymphocytes T cytotoxiques et les cellules NK : rôle dans la régulation de l'apoptose dépendante du granzyme B

**Mots clés :** P53, Apoptose, CTL, NK, Granzyme B.

**Résumé :** Les lymphocytes T cytotoxiques (CTL) et les cellules tueuses naturelles (NK) éliminent leurs cellules cibles tumorales grâce à l'exocytose et à la libération du contenu des granules cytotoxiques contenant une protéine formant des pores, appelée perforine (PFN), et une famille de serine-protéases induisant la mort cellulaire, appelés granzymes (Gzms). Ces Gzms, pénètrent dans les cellules cibles de manière dépendante de la PFN et activent diverses voies de signalisation apoptotiques aboutissant à la mort de la cellule cible. Au cours de ce travail, nous avons étudié le rôle de la protéine suppresseur de tumeurs p53 dans la cascade moléculaire conduisant à l'apoptose induite par les effecteurs cytotoxiques via la voie PFN/Granzyme B (GzmB). Nous avons ainsi pu montrer qu'en réponse au GzmB ou à des effecteurs cytotoxiques, la forme sauvage de p53 s'accumule dans les cellules cibles au niveau des mitochondries afin d'interagir avec la protéine anti-apoptotique Bcl-2 et de réguler positivement la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe induite par le GzmB. L'activité non transcriptionnelle de p53 au niveau des mitochondries joue donc un rôle clé dans le contrôle de l'apoptose induite par les CTL et les NK (Ben Safta *et al.* J Immunol 2015). Étant donné que le gène TP53 est muté dans environ 50% des tumeurs humaines, nous avons également cherché à déterminer si la restauration d'une p53 sauvage dans des cellules tumorales portant une p53 non fonctionnelle pourrait potentialiser la réponse cytotoxique antitumorale. Nos résultats montrent qu'effectivement, la réactivation pharmacologique de l'activité sauvage de p53 dans une lignée d'adénocarcinome mammaire possédant une p53 mutée sensibilise ces cellules tumorales à la lyse induite par les cellules NK via l'activation d'un processus d'autophagie et d'une cascade d'événements moléculaires qui sont en cours d'identification.

**Title :** Involvement of the tumor suppressor p53 in cytotoxic T lymphocytes and NK cells mediated cell death : role in the regulation of granzyme B dependent apoptosis

**Keywords :** P53, Apoptosis, CTL, NK, Granzyme B.

**Abstract :** Cytotoxic T lymphocytes (CTL) and natural killer (NK) cells eliminate their tumor target cells through exocytosis and release of the cytotoxic granules (CG) content. These CG contain a pore-forming protein called perforin (PFN), and a family of cell death inducing serine-proteases, called granzymes (Gzms). Gzms enter the target cells in a PFN-dependent manner and activate various apoptotic signaling pathways leading to the death of the target cell. In this work, we studied the role of the tumor suppressor protein p53 in the molecular cascade leading to apoptosis induced by cytotoxic effectors via the PFN/Granzyme B (GzmB) pathway. We have shown that in response to GzmB or to cytotoxic effectors, wild-type p53 accumulates on target mitochondria in order to interact with the anti-apoptotic protein Bcl-2 and to positively regulate the GzmB-induced mitochondrial outer membrane permeabilization. Thus, the non-transcriptional activity of p53 in the mitochondria plays a key role in the control of apoptosis induced by CTL and NK (Ben Safta *et al.* J Immunol 2015). Because the TP53 gene is mutated in almost 50% of human tumors, we also aimed to determine whether the restoration of a wild-type p53 function in tumor cells carrying a non-functional p53 could potentiate the cytotoxic antitumor response. Our results show that the pharmacological reactivation of a wild-type p53 activity in a mammary adenocarcinoma cell line harboring a mutated p53 sensitizes these tumor cells to the NK cell lysis via the activation of autophagy and a cascade of molecular events that are being identified.