

# Effet de l'inactivation du gène suppresseur de tumeur p53 et de sa réactivation pharmacologique sur la réponse cytotoxique anti-tumorale

## Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n° 582 : oncologie : biologie - médecine – santé  
(CBMS)

Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie  
Inserm UMR1186 « Immunologie intégrative des tumeurs et immunothérapie des  
cancers », Gustave Roussy Cancer Campus, Université Paris-Saclay, Villejuif  
Faculté de médecine

Thèse présentée et soutenue à Gustave Roussy,  
le 26 octobre 2020 par

**Marie CHOLLAT-NAMY**

### Composition du Jury

**Joelle WIELS**

DR CNRS, Gustave Roussy, Université Paris Saclay

Présidente

**Pierre ROUX**

DR INSERM, CRBM, Université de Montpellier

Rapporteur

**Denis MARTINVALET**

Professeur, IMM, Université de Padoue, Italie

Rapporteur

**Nathalie CHAPUT-GRAS**

PU-PH, Gustave Roussy, Université Paris Saclay

Examinatrice

**Ahmed HAMAI**

CR INSERM, INEM, Université Paris Descartes

Examinateur

**Jérôme THIERY**

CR INSERM, Gustave Roussy, Université Paris Saclay

Directeur de thèse

**Titre :** Effet de l'inactivation du gène suppresseur de tumeur p53 et de sa réactivation pharmacologique sur la réponse cytotoxique anti-tumorale

**Mots clés :** p53, granzyme B, autophagie, PD-L1

**Résumé :** Le système immunitaire joue un rôle important dans le contrôle et l'éradication du cancer. Des acteurs majeurs de la réponse immune antitumorale sont les cellules tueuses naturelles (ou cellules NK) et les lymphocytes T cytotoxiques (ou CTL), capables de reconnaître et détruire des cellules tumorales par l'exocytose de perforine et de granzymes contenus dans leur granule cytotoxique. Il a été montré au sein du laboratoire l'implication de la protéine suppresseur de tumeur p53 dans cette voie apoptotique. Or, plus de 50% des tumeurs humaines présentent des mutations inactivatrices de p53 ce qui favorise le développement tumoral. De ce fait, l'inactivation fréquente de p53 dans les tumeurs humaines pourrait leur permettre d'échapper à la destruction par les CTL et les cellules NK.

Dans ce contexte, mes travaux de thèse ont montré que la réactivation pharmacologique de la fonction de p53 sauvage dans des cellules tumorales exprimant une p53 mutée augmente leur susceptibilité à la lyse induite par les cellules NK grâce à l'induction d'un processus d'autophagie. De plus, j'ai cherché à déterminer le lien entre les mutations de p53 et l'expression à la surface des cellules tumorales de PD-L1 qui empêche l'activation optimale des cellules cytotoxiques et conduit à leur épuisement. Mes travaux actuels suggèrent que l'expression de p53 mutantes induit une surexpression de PD-L1 à la surface des cellules cancéreuses. Les mécanismes expliquant ce phénomène sont en cours d'étude.

**Title :** Effect of tumor suppressor p53 gene inactivation and of its pharmacological reactivation on the antitumor cytotoxic response

**Keywords :** p53, granzyme B, autophagy, PD-L1

**Abstract :** Immune system plays an important role in the control and destruction of cancer cells. The major effectors of antitumor immune response are Natural Killer (NK) cells and the cytotoxic T lymphocytes, which recognize and destroy tumor cells by exocytosis of perforin and granzymes contained in cytotoxic granules. It has been previously shown in the laboratory that the tumor suppressor p53 plays an important role in this apoptotic pathway. However more than 50% of human tumors have p53 inactivating mutations which favor tumor development. Consequently, frequent p53 inactivation in human tumor could enable them to escape from destruction by cytotoxic immune cells.

In this context, my thesis work has shown that the pharmacological reactivation of wild type p53 function in cancer cells expressing a mutated p53 increased their susceptibility to NK cell-mediated apoptosis cells through the induction of an autophagic process. Moreover, I tried to determine the link between p53 mutations and the expression of the immune checkpoint ligand PD-L1 which prevent efficient activation of cytotoxic cells and promote immune cells exhaustion. My work suggests that the expression of p53 mutants promotes the expression of PD-L1 at the cancer cell surface. The study of the underlying mechanisms is still in progress.

## Remerciements

Je remercie les membres du jury Joelle Wiels, pour avoir eu la gentillesse d'accepter d'être présidente du jury, Denis Martinvalet et Pierre Roux, pour avoir accepté d'être rapporteurs de ma thèse, Nathalie Chapat-gras et Ahmed Hamai pour avoir assisté à ma soutenance de thèse en qualité d'examineur.

La réalisation de cette thèse n'aurait pas été possible sans la bourse de trois ans de La Ligue contre le cancer. Je remercie cette organisation de m'avoir financé.

Je remercie Fathia Mami-Chouaib et Salem Chouaib pour m'avoir accueilli et permis de travailler au sein de leur laboratoire.

Ma gratitude va tout particulièrement à mon directeur de thèse Jérôme Thiery sans qui ce travail n'aurait pas été possible. Je le remercie pour sa rigueur, son aide, ses conseils, sa patience, pour avoir toujours suivi mon travail avec précision, tout en contribuant à me forger un esprit critique et en me permettant d'acquérir une réelle autonomie. Je le remercie pour m'avoir guidé dans mon projet mais aussi de m'avoir permis de développer certaines de mes idées.

Je remercie Thouraya Ben Safta-Saadoun et Djazia Haferssas pour leurs contributions à la première partie des résultats de cette thèse.

Je remercie notre gestionnaire de laboratoire, maintenant partie en retraite, Christine Leroy. Tu as toujours été là quand on avait besoin de toi et tu m'as été d'une grande aide.

Je remercie tout spécialement ma collègue Flora Doffe, en tant que scientifique et amie, pour m'avoir soutenu en fin de thèse. Je te souhaite le meilleur.

Je remercie Stéphane Terry pour sa curiosité, les nombreuses discussions scientifiques que nous avons eues, sa disponibilité et son aide.

Merci à Marine Leclerc pour la connaissance qu'elle a partagée avec moi et son soutien dans les moments difficiles. J'ai beaucoup appris d'elle.

Je remercie les stagiaires que j'ai contribué à encadrer, Chloé Bernhard et Célia Gardet, qui m'ont aidée pour certaines expériences et m'ont donné un aperçu de ce que peut être le management.

Merci à Gwendoline Gros, Ines Malencica, Isabelle Tihy et Stéphanie Cognac, pour l'ambiance positive qu'elles ont apportée et leurs précieux conseils, je leur souhaite le meilleur pour la suite. De plus, je remercie tous les membres de l'unité Abderamane Abdou, Stéphanie Buart, Pierre Savagnier, Pascal Leroy, Jamila Kacher.

Merci aux membres des labos voisins faisant auparavant partie de l'unité, plus particulièrement Florine Adolphe, l'équipe des « Sophies » et l'équipe « Mehdi ».

Je pense à mes collègues, qui sont partis vers d'autres horizons, Elodie Voilin, Aurélie Durgeau.

Je remercie aussi les membres de la plateforme de cytométrie, Philippe Rameau and Yann Lecluse, de m'avoir formé à l'utilisation du FACS, Guillaume Meurice de la plateforme génomique, ainsi que les personnes des plateformes de spectrométrie de masse de l'Institut Jacques Monod et de microscopie électronique de Gustave Roussy pour avoir analysé mes échantillons.

Merci à tous mes amis pour leurs encouragements et leur soutien. Je leur souhaite bien du courage, particulièrement pour ceux et celles qui sont encore en thèse.

Je remercie les membres du collectif de chercheurs Internation et mes amis d'Extinction Rebellion pour m'avoir redonné espoir en l'avenir malgré les lourdes menaces qui pèsent sur notre future.

J'adresse un profond merci à ma mère et à mon copain, pour m'avoir soutenu et aidé à la relecture de mon manuscrit, et aussi à mes frères. Particulièrement Yoann, qui m'a chaleureusement accueilli pendant la période de confinement du Covid et qui m'a encouragé pendant l'écriture de ma thèse.

Je garde mon dernier remerciement à Mei, mon chat adoré décédé cet été. Je le remercie pour le réconfort, l'amitié, l'amour et les câlins qu'il m'a apportés pendant mon doctorant, me permettant d'oublier mes soucis.

# Sommaire

<b>REMERCIEMENTS</b> .....	<b>2</b>
<b>SOMMAIRE</b> .....	<b>4</b>
<b>TABLE DES ILLUSTRATIONS</b> .....	<b>7</b>
<b>LISTE DES ABREVIATIONS</b> .....	<b>9</b>
<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>14</b>
1. LA REPONSE IMMUNE ANTITUMORALE .....	15
1.1. <i>L'immunosurveillance antitumorale</i> .....	15
1.2. <i>Les étapes de la réponse immune anti-tumorale</i> .....	16
1.3. <i>Les cellules effectrices de la réponse immune antitumorale</i> .....	19
1.3.1. Les cellules tueuses naturelles ou Natural Killer (NK) .....	19
1.3.2. Les lymphocytes T CD8+ cytotoxiques .....	22
1.4. <i>Les mécanismes de cytotoxicité des cellules effectrices</i> .....	23
1.4.1. Mise en place de la réponse cytotoxique antitumorale : la synapse immunologique lytique .....	23
1.4.2. Les voies de lyse .....	25
1.4.2.1. La voie de l'exocytose du contenu des granules cytotoxiques .....	25
1.4.2.1.1. Généralités .....	25
1.4.2.1.2. Contenu des granules cytotoxiques .....	26
1.4.2.1.3. Mécanismes d'exocytose du contenu des granules cytotoxiques .....	27
1.4.2.1.4. La perforine et ses fonctions biologiques .....	28
1.4.2.1.5. Mécanismes de cytotoxicité du granzyme B .....	30
1.4.2.1.6. Fonction des autres granzymes chez l'homme .....	33
1.4.2.2. La voie des récepteurs à domaines de mort .....	35
1.4.2.2.1. Généralités .....	35
1.4.2.2.2. Exemple de la voie Fas/FasL .....	36
2. L'ÉCHAPPEMENT TUMORAL AU SYSTEME IMMUNITAIRE .....	38
2.1. <i>Mécanismes d'échappement intrinsèques aux cellules tumorales</i> .....	38
2.1.1. Echappement à la reconnaissance et perte de l'expression des molécules d'adhésion .....	38
2.1.2. Instabilité génétique et résistance à la mort cellulaire induite par les cellules cytotoxiques .....	39
2.1.2.1. Résistance à l'apoptose induite par la voie Perforine/Granzymes .....	39
2.1.2.2. Résistance à la voie des récepteurs à domaine de mort .....	40
2.2. <i>Mécanismes d'échappement dépendants des points de contrôle immunitaires</i> .....	40
2.2.1. Le principe des points de contrôle ou « checkpoints » immunitaires .....	40
2.2.2. Exemple de l'axe PD1/PD-L1 .....	42
2.2.3. Régulation de l'expression de PD-L1 .....	43
2.2.4. Immunothérapies ciblant l'axe PD1/PDL1 .....	44

2.3.	<i>Développement d'un microenvironnement immunosuppresseur.....</i>	45
2.3.1.	Les facteurs immunosuppresseurs solubles présents au sein du microenvironnement tumoral .....	46
2.3.2.	Les cellules immunosuppressives présentes dans le microenvironnement tumoral.....	47
2.3.3.	L'hypoxie, une condition physico-chimique immunosuppressive du microenvironnement tumoral .	50
3.	LA PROTEINE SUPPRESSEUR DE TUMEURS P53.....	50
3.1.	<i>La découverte de P53 : oncogène ou gène suppresseur de tumeur ?.....</i>	50
3.2.	<i>Structure du gène et de la protéine p53 .....</i>	51
3.3.	<i>Activation, régulation et dégradation de p53.....</i>	53
3.4.	<i>Fonctions anti-tumorales de p53 .....</i>	55
3.4.1.	Régulation du cycle cellulaire.....	56
3.4.2.	Régulation de l'apoptose .....	56
3.4.2.1.	Les mitochondries : carrefour de la mort .....	56
3.4.2.2.	Régulation par p53 de la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe.....	58
3.4.3.	Régulation de la réponse immunitaire.....	59
3.4.3.1.	Rôle de p53 dans la susceptibilité à la lyse induite par les effecteurs cytotoxiques .....	60
3.4.3.1.1.	Implication de p53 dans la modulation de l'apoptose induite par les granzymes.....	60
3.4.3.1.2.	Rôle de p53 dans l'apoptose induite par les récepteurs à domaines de mort .....	61
3.4.3.2.	Rôle de p53 dans la régulation de l'activité antitumorale des cellules T et NK.....	62
3.4.3.2.1.	Rôle de p53 dans la reconnaissance et la liaison des effecteurs cytotoxiques avec leurs cellules cibles .....	62
3.4.3.2.2.	Rôle de p53 dans la régulation de l'expression du ligand de checkpoint inhibiteur PD-L1 ....	62
3.4.3.3.	Autres rôles de p53 dans la régulation de la réponse immune antitumorale .....	63
3.4.3.3.1.	Implication dans la production de cytokines inflammatoires.....	63
3.4.3.3.2.	Implication dans le recrutement et l'activité des cellules immunosuppressives du microenvironnement tumoral .....	63
3.4.4.	P53 et autophagie .....	64
3.4.4.1.	Principe de l'autophagie.....	64
3.4.4.2.	Les différentes étapes de l'autophagie .....	66
3.4.4.3.	Régulation de l'autophagie par p53 .....	69
4.	LES MUTATIONS ET INACTIVATIONS DE P53.....	71
4.1.	<i>Prévalence et localisation des mutations de p53.....</i>	71
4.2.	<i>Inactivation indirecte de la voie p53.....</i>	73
4.3.	<i>Influence des mutations de p53 sur ses fonctions biologiques et sur la progression tumorale.</i>	74
4.3.1.	Perte de fonction .....	74
4.3.2.	Gain de fonction.....	75
4.4.	<i>Mutation et résistance aux thérapies conventionnelles .....</i>	78
4.5.	<i>Influence des mutations de p53 sur la réponse immunitaire antitumorale.....</i>	79
4.6.	<i>Stratégies thérapeutiques ciblant les mutants de p53 .....</i>	81
4.6.1.	Stratégies génétiques.....	81

4.6.2. Molécules réactivatrices de p53 .....	82
4.6.2.1. CP-31398.....	82
4.6.2.2. PRIMA-1 et APR246 .....	83
4.6.2.3. Autres molécules réactivatrices de p53.....	84
4.6.3. Stratégies d'inhibition du gain de fonction .....	86
<b>OBJECTIFS.....</b>	<b>88</b>
<b>RESULTATS.....</b>	<b>91</b>
PARTIE 1 : MISE EN EVIDENCE DE L'EFFET POTENTIALISATEUR DE LA RESTAURATION PHARMACOLOGIQUE DES FONCTIONS DE P53 SUR LA SENSIBILITE DES CELLULES DE CANCER DU SEIN P53 MUTEES A LA LYSE INDUITE PAR LE GRANZYME B ET LES CELLULES NK.....	
	92
PARTIE 2 : ETUDE DU LIEN POTENTIEL ENTRE MUTATIONS DE P53 ET EXPRESSION DE PD-L1 .....	
	95
<i>Objectifs des travaux en cours</i> .....	96
<i>Matériel et méthodes</i> .....	98
<i>Résultats</i> .....	102
<i>Conclusion</i> .....	112
<b>DISCUSSION .....</b>	<b>114</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>127</b>

## Table des illustrations

**Figure 1** : Schéma simplifié de la réponse immunitaire antitumorale

**Figure 2** : L'activation des cellules NK est modulée par une balance entre signaux activateurs et inhibiteurs

**Figure 3** : Structure conventionnelle de la synapse immunologique

**Figure 4** : Représentation d'un granule cytotoxique et de son contenu

**Figure 5** : Mécanisme d'exocytose du contenu des granules cytotoxiques.

**Figure 6** : Mécanisme d'action de la perforine

**Figure 7** : Mécanisme d'induction de l'apoptose par le Granzyme B

**Figure 8** : Mécanisme d'action du Granzyme A

**Figure 9** : La voie apoptotique des récepteurs à domaine de mort (Fas/DR4/DR5)

**Figure 10** : Mécanisme d'échappement tumoral par l'intermédiaire de « checkpoints » immunitaires

**Figure 11** : Mécanisme de régulation de PD-L1

**Figure 12** : Représentation schématique et modélisation de la structure de la protéine p53

**Figure 13** : Les différents types de stress cellulaires activant p53

**Figure 14** : Rôle de p53 dans la suppression des tumeurs

**Figure 15** : Mécanisme d'action des membres de la famille Bcl-2 impliqués dans la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe (MOMP)

**Figure 16** : Implication de p53 dans la voie apoptotique dépendante des mitochondries

**Figure 17** : Implication de p53 dans la voie de signalisation apoptotique du granzyme B.

**Figure 18** : Le processus autophagique et ses différents composants.

**Figure 19** : Modèle de formation de l'omégasome

**Figure 20** : Système d'élongation de la membrane d'isolation

**Figure 21** : Etape finale du processus autophagique : la maturation

**Figure 22** : Régulation de l'autophagie par p53.

**Figure 23** : Fréquence des mutations de p53 (tous cancers confondus)

**Figure 24** : Mécanismes de gain de fonction des p53 mutantes

**Figure 25** : L'inactivation de p53 (mutation ou déplétion) semblent induire une résistance à l'apoptose induite par la voie Perforine/Granzyme B



**Figure 26** : L'expression de PD-L1 semble dépendre du statut de p53

**Figure 27** : Représentation topologique de CP-31398

**Figure 28** : Stratégies de réactivation de p53

**Figure 29** : Schéma récapitulatif de l'effet du traitement de cellules p53 mutée par CP-31398 sur l'apoptose induite par les effecteurs cytotoxiques

**Figure 30** : Schéma récapitulatif de l'effet hypothétique de certains mutants de p53 sur l'expression de PD-L1

## Liste des abréviations

**ADCC** : cytotoxicité dépendante des anticorps/Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity

**Ag** : Antigène

**AMP** : Adénosine MonoPhosphate

**AMPK** : kinase activée par l'AMP/AMP- activated kinase

**APAF-1** : facteur activateur de peptidases apoptotiques-1/Apoptotic Peptidase Activating Factor 1

**APC** : cellules présentatrices d'antigène/ Antigen Presentating Cell

**ARF-BP1** : protéine de liaison à ARF/ARF-Binding Protein 1

**ARNm** : Acide ribonucléique messenger

**ATG** : gènes liés à l'autophagie/Autophagy related genes

**ATM** : Ataxia Telangiectasia Mutated

**ATP** : Adénosine TriphosPhate

**ATR** : ATM-related

**Bad** : antagoniste de la mort cellulaire de type Bcl-2/Bcl-2 antagonist of cell death

**Bak** : antagoniste tueur de type Bcl-2 1/Bcl-2 antagonist killer 1

**Bax** : protéine x associée à Bcl-2/Bcl-2-associated x protein

**BCR** : récepteur de cellule B/B Cell Receptor

**Bcl-2** : lymphome de cellules B 2/B-cell lymphoma-2

**Bcl-xL** : lymphome de cellules B extra large/B-cell lymphoma extra large

**BH** : Bcl-2-Homologie/Bcl-2-Homology

**Bid** : agoniste de domaine de mort interagissant avec Bcl-2/Bcl-2 interacting domain death agonist

**Bim** : médiateur d'apoptose interagissant avec Bcl-2/Bcl-2 interacting mediator of apoptosis

**CAD** : ADNase activée par les caspase/Caspase Activated DNase

**CAF** : fibroblastes associés aux cancers/Cancer Associated Fibroblast

**CD** : Cluster de différenciation

**CDK** : kinase dépendante de cycline/Cyclin-Dependent Kinase

**cFLIP** : protéine inhibitrice similaire à FLICE cellulaire/Cellular FLICE-like inhibitory protein

**CG** : granules cytotoxiques/Cytotoxic Granules

**CI** : checkpoints inhibiteurs

**CMH** : Complexe majeur d'histocompatibilité

**CTL** : lymphocyte T cytotoxique/Cytotoxic T lymphocyte

**DC** : cellule dendritique/Dendritic Cell

**DcR** : récepteur leurre/Decoy Receptor

**DD** : domaine de mort/Death domain

**DED** : domaine effecteur de mort/Death effector domain

**DISC** : complexe de signalisation induisant la mort/Death Inducing Signaling Complex

**DRAM** : régulateur d'autophagie régulé par des dommages/Damage-regulated autophagy regulator

**EGF** : facteur de croissance endothelial/Endothelial Growth Factor

**RE** : Réticulum endoplasmique

**FADD** : domaine de mort associé à Fas/Fas associated death domain

**FGFR-1** : récepteur de facteur de croissance 1/fibroblast growth factor receptor-1

**FHL**: lymphohistiocytose hémophagocytaire familiale/Familial Hemophagocytic Lymphohistiocytosis

**FIP200** : Focal adhesion kinase family Interacting Protein of 200 kD

**FT** : facteurs de transcription

**Gadd45**: Growth Arrest and DNA Damage 45

**GM-CSF**: Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating factor

**GOF** : gain de fonction

**Grzm** : Granzyme

**HAUSP** : herpesvirus-associated ubiquitin-specific protease

**HDAC** : Histone deacetylase

**HIF** : Hypoxia-Inductible Factor

**HPV** : papillomavirus humain

**HSP** : protéines de choc thermique/Heat Shock Proteins

**IAP** : protéine inhibitrice d'apoptose/Inhibitor of Apoptosis Protein

**ICAD** : inhibiteur de CAD/Inhibitor of CAD

**ICAM-1** : molécule d'adhésion intercellulaire-1/InterCellular Adhesion Molecule-1

**IDO** : Indoleamine 2,3-DiOxygénase

**IFN** : Interferon

**IL** : Interleukine

**iNOS** : Inducible Oxyde Nitrique Synthase

**ITIM** : Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition Motif

**JNK** : c-JUN NH2 terminal Kinase

**KIR** : Killer cell Immunoglobulin -like Receptor

**KO** : Knock-Out

**LC3** : light chain 3

**LFA-1** : Lymphocyte function-associated antigen 1

**MACPF** : complexe d'attaque membranaire/Membrane Attack Complex/Perforin

**MAP1B** : Microtubule Associated Protein 1B

**MAPK** : Mitogen-activated protein kinases  
**Mcl-1** : Myeloid cell leukemia 1  
**MDM2** : Murine Double Minute 2  
**MDSC** : cellules immunosuppressives dérivées de myéloïdes/Myeloid-Derived Suppressor Cells  
**MEC** : matrice extracellulaire  
**MET** : microenvironnement tumoral  
**MIC** : MHC class I Chain-related molecule  
**MOMP** : perméabilisation de la membrane mitochondriale externe/Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization  
**MPT** : modifications post-traductionnelles  
**MQ** : méthylène quinuclidinone  
**MTOC** : centre organisateur des microtubules/MicroTubule Organizing Center  
**mTORC**: mammalian TOR complex  
**MVB** : corps multi-vésiculaires  
**NCR** : Natural Cytotoxicity Receptors  
**NER** : Nucleotide excision repair  
**NES** : Nuclear Export Signal  
**NF-κB** : Nuclear Factor- κB  
**NK** : cellules “tueuse naturelle”/Natural Killer cell  
**NKG2D** : NK cell group 2D  
**NKT** : Natural Killer T cell  
**NLS** : signal de localisation nucléaire/Nuclear Localization Signal  
**NO** : oxide nitrique/Nitric Oxide  
**PAMP** : motifs moléculaires associés aux pathogènes/Pathogen associated molecular pattern  
**PARP** : poly-ADP-ribose polymérase/Poly-ADP-Ribose Polymerase  
**PBMC** : cellules mononucléées du sang périphérique/Peripheral blood mononuclear cells  
**PD-1** : Programmed Death-1  
**PD-L1**: Programmed Death Ligand1  
**PDGF** : platelet-derived growth factor  
**PE** : phosphatidylethanolamin  
**PFN** : Perforine  
**PGE2** : ProstaGlandine E2  
**PI3K** : Phosphoinositide 3 kinase PIKK (PI3-kinase)- related kinases  
**PI3P**: Phosphatidylinositol-3-phosphate  
**PKC** : protéine kinase C

**PRD** : domaine polyproline/proline-rich domain  
**PRIMA-1** : p53 reactivation and induction of massive apoptosis  
**PTEN** : Phosphatase and TENsin homolog  
**PUMA** : P53 Upregulated Modulator of Apoptosis  
**RE** : réticulum endoplasmique  
**RING** : Really interesting new gene  
**RITA** : reactivation of p53 and induction of tumour cell apoptosis  
**ROS** : espèces réactives de l'oxygène/Reactive Oxygen Species  
**SESN1/2** : Sestrine-1 ou 2  
**SMAC** : cluster supramoléculaire d'activation/supramolecular activation cluster  
**SI** : Synapse Immunologique  
**SNAP23** : SyNaptosomal-Associated Protein of 23 kDa  
**SNARE** : Soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein Receptor  
**SV40** : virus simien 40  
**TAA** : antigènes associés aux tumeurs/Tumor-associated Antigen  
**TAD** : domaine de transactivation/Transactivation domain  
**TAM** : macrophage associées aux tumeurs/Tumor Associated Macrophage  
**TAP** : Transporter associated with Antigen Processing  
**TCR** : récepteur de cellule T/T Cell Receptor  
**TGFβ** : Transforming Growth Factor β  
**Th** : T-helper  
**TIL** : lymphocyte infiltrant la tumeur/Tumor Infiltrating Lymphocytes  
**TLR** : Toll-like receptor  
**TNF** : facteur de nécrose tumorale/Tumor Necrosis Factor  
**TNFR** : Tumor Necrosis Factor Receptor  
**Treg** : lymphocytes T régulateurs  
**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  
**VAMP** : Vesicle-Associated Membrane Protein  
**VEGF** : Vascular Endothelial Growth Factor  
**VPS** : Vacuolar protein sorting -34 WIPI: WD-repeat protein interacting with phosphoinositides

**WT** : sauvage/wild type

**XIAP** : X-linked inhibitor of apoptosis protein

# INTRODUCTION

# 1. La réponse immune antitumorale

## 1.1. L'immunosurveillance antitumorale

L'idée que le système immunitaire peut contrôler la croissance tumorale est de nos jours bien établie et acceptée par la communauté scientifique. Historiquement, les premiers travaux dans ce domaine ont été réalisés par William Coley au XIX<sup>ème</sup> siècle et ont montré qu'un cocktail de bactéries inactivées injecté au sein de la tumeur pouvait diminuer la croissance tumorale en activant le système immunitaire et en le dirigeant contre la tumeur. Au début du XX<sup>ème</sup> siècle, Paul Ehrlich a établi le terme de « surveillance immunitaire » qui a plus tard été développé par Frank MacFarlane Burnet et Lewis Thomas en 1959. Ces derniers ont émis l'hypothèse que le système immunitaire, connu pour protéger efficacement l'hôte contre les différents agents pathogènes, joue un rôle majeur dans la reconnaissance et l'élimination des cellules tumorales par les lymphocytes, car ce premier s'active lors de la croissance tumorale (Burnet, 1957). De plus, Edward J. Foley a montré que les souris possédant un système immunitaire affaibli étaient plus susceptibles de développer des tumeurs que les souris immunocompétentes (Foley, 1953). Toutes ces expériences pionnières ont amené les chercheurs à s'intéresser au développement tumoral dans le contexte d'un système immunitaire déficient. Cependant, la plupart des travaux dans ce domaine ayant été réalisés sur des souris immuno-compétentes ou immuno-déficientes ayant été exposées à des carcinogènes ou des virus oncogéniques, la portée de ces études est longtemps restée limitée, notamment en ce qui concerne l'impact plus spécifique des nombreuses composantes du système immunitaire sur le développement tumoral. L'enthousiasme autour de l'immunosurveillance a repris au début des années 2000 quand plusieurs modèles de souris knock-out (KO) (par exemple des souris IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup> (Interferon- $\gamma$ ) ou Perforine<sup>-/-</sup> (PFN)) ont démontré l'implication des lymphocytes T dans le contrôle du développement tumoral. (Street et al., 2001). A la suite de ces nombreuses décennies suggérant que le système immunitaire de l'hôte pouvait avoir un effet protecteur contre le développement tumoral, le principe d'immunosurveillance antitumorale a ainsi été complété par la théorie de l'« immunoédition » (ou « immunoediting », encore appelée « théorie des 3E ») (Mittal et al., 2014). Selon ce concept, au cours du développement tumoral, le système immunitaire contrôle le devenir de la tumeur en trois phases : une phase d'élimination, d'équilibre et d'échappement. Lors de la phase initiale d'élimination, les cellules tumorales sont détectées et détruites par les cellules immunitaires. Les cellules tumorales qui réussissent à résister à la destruction par le système immunitaire atteignent néanmoins une phase d'équilibre où les cellules effectrices cytotoxiques essaient de détruire autant que possible les cellules tumorales. En effet, différents mécanismes résultant notamment de l'instabilité génétique des cellules tumorales contribuent à l'émergence et la sélection de variants tumoraux résistants au système immunitaire. Ceci conduit à une phase



d'échappement (détaillé au chapitre II) où la tumeur, remaniée par le système immunitaire perfectionne ses mécanismes de résistance et établit un microenvironnement immunosuppresseur tout en devenant cliniquement apparente (Dunn et al., 2002).

## 1.2. Les étapes de la réponse immune anti-tumorale

Comme décrit dans le paragraphe précédent, l'immunosurveillance antitumorale fait intervenir différentes populations lymphocytaires (Figure 1). Les premières étapes de la mise en place de cette réponse immune antitumorale font intervenir le système immunitaire inné, celui-ci protégeant l'organisme contre les pathogènes et les cellules transformées reconnues comme du « non soi », notamment les cellules tueuses naturelles (NK /*Natural Killer*). En effet, lors du développement tumoral, les cellules tumorales se multiplient de manière anarchique, envahissent les tissus jusqu'à créer une masse tumorale (dans le cas des tumeurs solides). Les apports nutritifs sont importants pour soutenir la croissance de la tumeur et ses besoins métaboliques grandissants. Les cellules tumorales sécrètent alors des molécules angiogéniques conduisant à un processus de néo-angiogénèse et à la formation de vaisseaux sanguins. Non seulement ces vaisseaux transportent les nutriments nécessaires au développement tumoral, mais ils permettent aussi l'infiltration de cellules de l'immunité innée, attirées par des signaux inflammatoires, au niveau de la tumeur (Reiman et al., 2007). Comme indiqué précédemment, des acteurs clés de l'immunité innée sont les cellules NK, qui suite à leur activation, induisent l'apoptose des cellules tumorales (voir partie 1.3.1) et la libération d'antigènes associés aux tumeurs (TAA/Tumor-associated Antigen). Cette population lymphocytaire sécrète également des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IFN- $\gamma$  permettant de recruter des cellules dendritiques (DC/*Dendritic Cell*) (Walzer et al., 2005), et d'activer d'autres cellules du système immunitaire (notamment les cellules T).

Les cellules dendritiques (DC) ont été découvertes au début des années 1980 par Ralph Steinman. Les DCs sont des cellules spécialisées dans la présentation d'antigènes (Ag) qu'elles captent dans leur microenvironnement et qu'elles présentent, en même temps que des signaux de costimulations, aux cellules du système immunitaire adaptatif (Shortman and Naik, 2007). Initialement, les DCs résident à l'état immature au sein des tissus périphériques. A ce stade, les DCs possèdent une haute capacité à capturer les Ags, expriment peu de molécules de costimulation et sécrètent peu de cytokines (Trombetta and Mellman, 2005), (Steinman et al., 2003). Différents stimulus associés aux virus, bactéries ou aux cellules malignes, comme des motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMP/Pathogen-Associated Molecular Patterns), des TAA ou encore des signaux de danger (protéines de choc thermique (HSP/Heat Shock Proteins), calréticulin...), peuvent être captés par les DCs et induire leur activation et leur maturation. Une fois activées, les

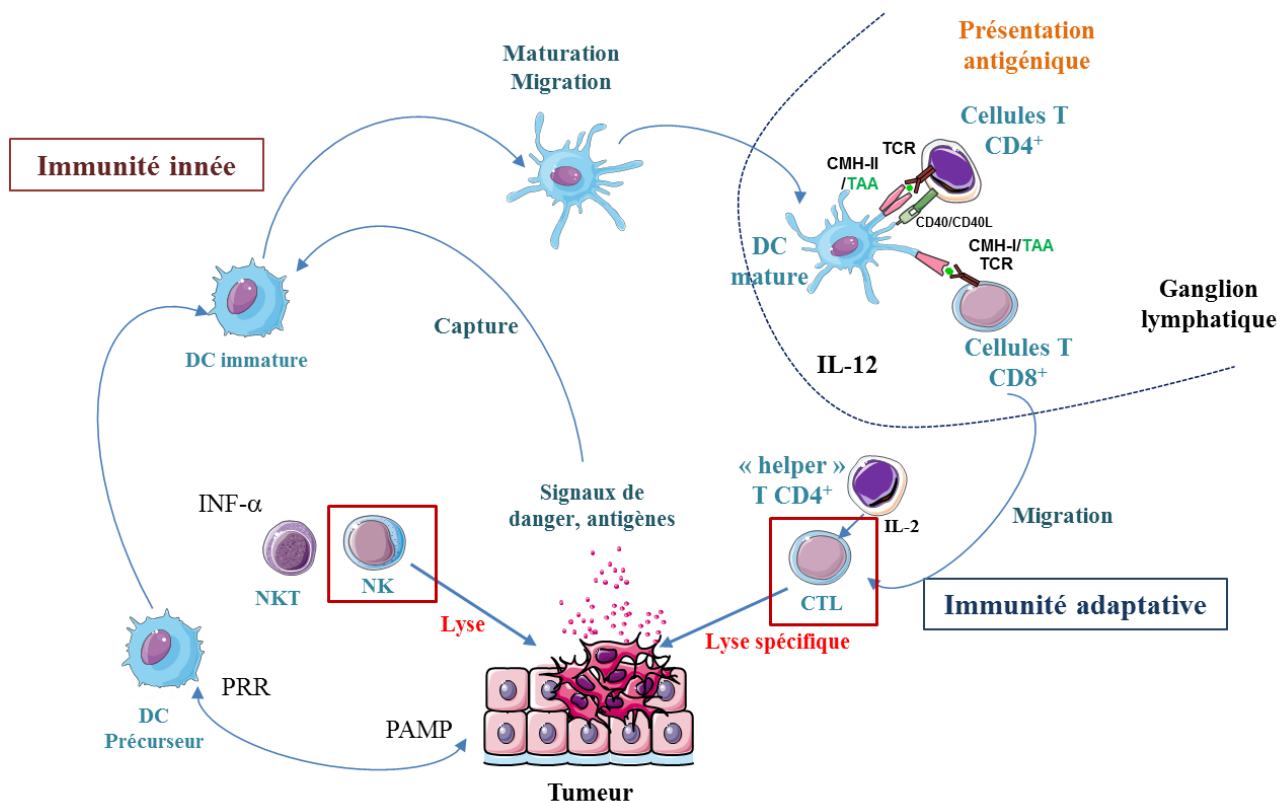
DCs communiquent la présence de pathogènes, de tissus endommagés ou tumoraux au système immunitaire adaptatif en initiant une réponse durable et spécifique à l'Ag. Pour cela, les DCs migrent au niveau des ganglions lymphatiques drainant la tumeur grâce notamment à la surexpression de récepteurs de chimiokines (comme C-C chemokine receptor type 7 (CCR7) (Hirao et al., 2000). Au niveau de ces ganglions lymphatiques, les DCs vont pouvoir présenter aux cellules T CD4<sup>+</sup> et T CD8<sup>+</sup> naïves les peptides de TAA captés au niveau de la tumeur via leur complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I et II, respectivement. Ces peptides sont générés notamment grâce à l'immuno-protéasome qui va dégrader les TAA captés en peptides fortement immunogènes (Vigneron and Van den Eynde, 2012) qui vont être chargés sur les molécules de classe I et II du CMH. En effet, les DCs possèdent la capacité unique de pouvoir présenter des antigènes extracellulaires, captés dans leur environnement, à la fois via les molécules de CMH de classe I (qui présentent normalement uniquement des antigènes intracellulaires), et via les molécules de CMH de classe II (Sánchez-Paulete et al., 2017). Cette capacité unique des DCs est nommée présentation croisée (ou « *cross-présentation* »). Par la suite, l'interaction peptide-CMH avec le récepteur spécifique des cellules T (TCR/T Cell Receptor) va permettre l'activation et la prolifération de ces dernières. De plus, cet effet du TCR est amplifié par l'interaction de signaux de co-stimulation dépendants de molécules co-stimulatrices exprimées par les cellules T (comme par exemple CD28) et de leurs ligands (CD80/B7-1, CD86/B7-2) exprimés à la surface des DCs. De façon non négligeable, les DCs produisent également des cytokines (interleukin-12 (IL-12)) et des interférons de type I (IFN- $\alpha$  et - $\beta$ ), nécessaires à l'activation optimale des cellules T mais aussi des cellules NK. Ainsi les DC font le lien entre la réponse immune innée et la réponse immune adaptative. Comme mentionnée ci-dessus, cette réponse immune antitumorale spécifique est assurée par deux grandes familles de lymphocytes, les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>, qui assurent des fonctions régulatrices et effectrices.

Les cellules T CD4<sup>+</sup>, nommées aussi T auxiliaires (ou Th pour T-helper) exercent diverses fonctions allant de l'activation des cellules du système immunitaire (cellules B, cellules T CD8<sup>+</sup>) à la suppression de la réaction immunitaire (Kennedy and Celis, 2008). En effet, les cellules T CD4<sup>+</sup>, une fois activées via leur TCR, vont pouvoir se différencier/polariser en divers sous-types, et proliférer, leur permettant de jouer un rôle majeur dans la régulation de la réponse immunitaire antitumorale à travers notamment la sécrétion de cytokines (Borst et al., 2018). En particulier, en réponse à la sécrétion d'IL-12 par les cellules dendritiques, les cellules T CD4<sup>+</sup> naïves se différencient en cellules de type Th1 productrices d'IL-2, d'IL-12, d'IFN- $\gamma$  et de facteur de nécrose tumorale (TNF- $\alpha$ /tumor necrosis factor- $\alpha$ ). Ces lymphocytes T CD4<sup>+</sup> de type Th1 possèdent un rôle antitumoral majeur en activant les fonctions cytotoxiques des cellules de l'immunité innée ou

adaptative, en particulier les cellules NK et T CD8+ cytotoxiques (Ekkens et al., 2007). D'autre part, les lymphocytes T CD4+ peuvent également se polariser en d'autres sous catégories comme les cellules Th2 (qui sécrètent de l'IL-4, IL-5, IL-9, IL-13 et favorisent une réponse humorale), les lymphocytes T régulateurs (Treg) qui sont des inhibiteurs puissants de l'immunité antitumorale (détaillés au chapitre 2.3.2), les cellules Th17, T-helper folliculaires (Tfh), les cellules T régulatrices induites (iTreg), et les cellules T régulatrices de type 1(Tr1). La différenciation en ces différents sous types dépend d'un réseau complexe de cytokines et de signalisations spécifiques déclenchant l'expression de facteurs de transcription et également des modifications épigénétiques (Feili-Hariri et al., 2005)(Schmidl et al., 2018).

Enfin, il est important de noter qu'il existe un dialogue réciproque entre DC et cellules T CD4<sup>+</sup>. En effet, l'interaction entre CD40 exprimé par les DC et CD40 ligand exprimé par les cellules T CD4 permet aux DC de devenir pleinement compétentes, d'optimiser leur présentation antigénique (Eickhoff et al., 2015), leur sécrétion des cytokines et l'expression des signaux de co-stimulation spécifiques aux cellules T CD8+, favorisant leur expansion clonale et leur différenciation en cellules T effectrices et mémoires (Laidlaw et al., 2016).

En résumé, l'initiation de la réponse immunitaire antitumorale passe par l'intervention des cellules de l'immunité innée (notamment les cellules NK), qui collaborent avec les cellules de l'immunité adaptative conduisant à l'activation de cellules T cytotoxiques (CTL/cytotoxic T lymphocyte) afin de détruire les cellules cancéreuses de façon spécifique, efficace et contrôlée. Dans le paragraphe ci-dessous, je vais me concentrer sur les cellules effectrices cytotoxiques, NK et CTL, et détailler leurs fonctions effectrices.



**Figure 1 : Schéma simplifié du déroulement de la réponse immunitaire antitumorale**

Les cellules NK et les NKT sont capables de reconnaître et lysent les cellules tumorales. Cette première étape contribue à la libération de signaux de danger et d'antigènes stimulant les DC immatures, qui se mettent à sécréter de l'INF- $\alpha$ , principal activateur de l'immunité innée. Les molécules PAMP (Pathogen Associated Molecular Pattern) des cellules cancéreuses sont reconnus par les précurseurs des DC grâce à leur PRR (Pattern Recognition Receptors) ce qui entraîne leur différenciation en DC immatures. La capture des antigènes tumoraux par les DC induit leur activation, leur maturation et leur migration au niveau des ganglions lymphatiques drainant la tumeur. Les DC matures expriment les molécules nécessaires à la présentation antigénique aux cellules T CD8<sup>+</sup> et T CD4<sup>+</sup> de l'immunité adaptative. Les cellules CD4<sup>+</sup> « helper » favorisent le déclenchement et le maintien de la réponse cytotoxique antitumorale en induisant la maturation finale des DC par l'intermédiaire de l'interaction CD40/CD40L. Les DC activées sécrètent alors de l'IL-12 et expriment des molécules de coactivation afin d'activer, avec l'aide des cellules T CD4<sup>+</sup> « helper », les cellules T CD8<sup>+</sup> cytotoxiques spécifiques de la tumeur. Ces dernières migrent alors au sein de la tumeur et lysent les cellules cancéreuses de façon spécifique.

### 1.3. Les cellules effectrices de la réponse immune antitumorale

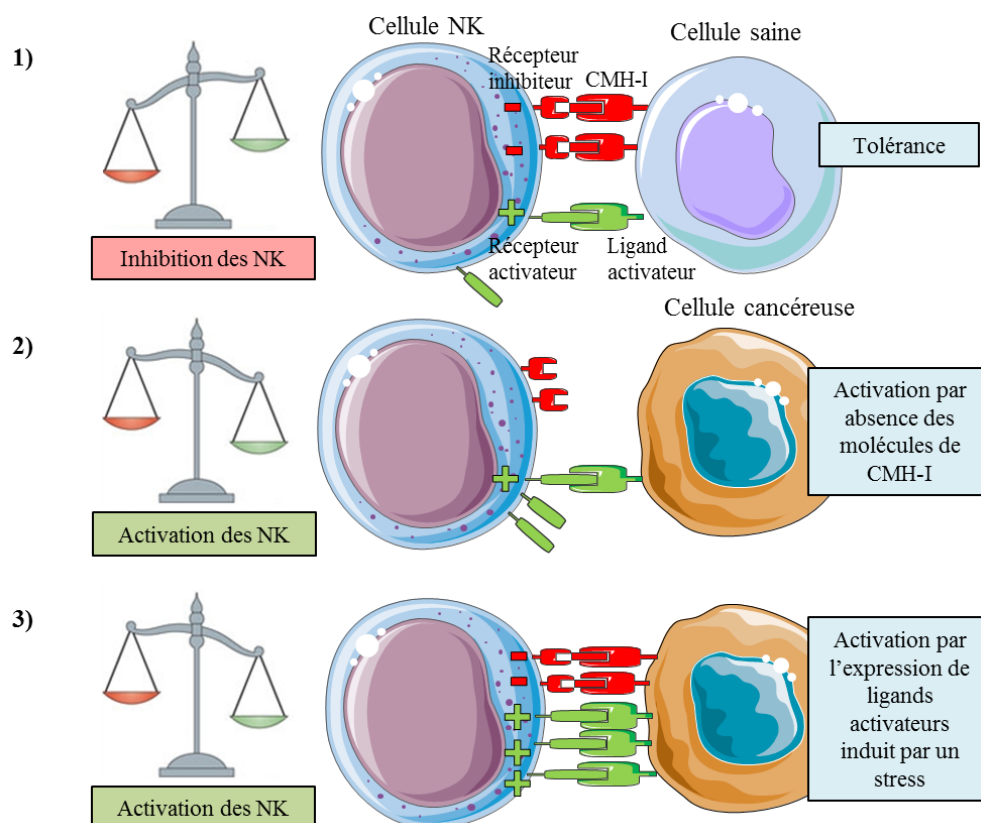
#### 1.3.1. Les cellules tueuses naturelles ou Natural Killer (NK)

Les cellules NK, sont un type de lymphocyte cytotoxique majeur du système immunitaire inné (Cerwenka and Lanier, 2001). Ces cellules, découvertes dans les années 1970 (Kiessling et al., 1975) se présentent sous forme de larges lymphocytes granuleux et constituent le troisième type cellulaire différencié à partir des progéniteurs lymphoïdes communs aux lymphocytes B et T. Les cellules NK se différencient et mûrissent dans la moelle osseuse, les ganglions lymphatiques, la rate et le thymus, avant de rejoindre la circulation sanguine (Di Santo and Voshenrich, 2006). Les cellules NK forment une population de faible densité (5–15% des cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC/ peripheral blood mononuclear cell)) et ont la particularité de posséder une activité cytotoxique et de produire de l'IFN- $\gamma$  (Artis and Spits, 2015).

Chez l'Homme, le phénotype des cellules NK se caractérise par l'expression des molécules CD16 (FcγRIIIA), CD56 et par l'absence des marqueurs spécifiques des lymphocytes T (TCR, CD3) et des lymphocytes B (BCR/B cell receptor et CD19). De plus, les cellules NK peuvent être classifiées en deux sous-populations fonctionnellement distinctes selon leur niveau d'expression de CD56, à savoir les cellules NK CD56<sup>bright</sup> et CD56<sup>dim</sup> (Sedlmayr et al., 1996). Les cellules NK CD56<sup>bright</sup> ont la particularité de pouvoir produire de grandes quantités d'IFN-γ (20 à 30 fois supérieures à la population CD56<sup>dim</sup>) (Fehniger et al., 1999). De plus, les NK CD56<sup>bright</sup> peuvent libérer d'autres cytokines telles que le GM-CSF (Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating factor), l'IL-1β, l'IL-2, l'IL-5, l'IL-6, l'IL-8, l'IL-10, l'IL-13 et le TNF-α (Reefman et al., 2010) qui agissent à la fois sur les cellules tumorales et sur les autres populations de cellules immunitaires. Par exemple, les cellules NK <sup>bright</sup> peuvent à la fois favoriser la maturation des cellules dendritiques, l'activation des macrophages, la différenciation des cellules T CD4+ en Th1 et l'activation des CTL par leur production d'IFN-γ (Harizi, 2013). Cependant, ces cellules CD56<sup>bright</sup> ont une activité cytotoxique plus faible que les cellules NK CD56<sup>dim</sup>. En effet, les NK CD56<sup>dim</sup> produisent beaucoup plus de granzymes et de perforine que la population CD56<sup>bright</sup> (Jacobs et al., 2001), leur conférant des capacités cytotoxiques plus importantes. De plus, les NK CD56<sup>dim</sup> possèdent la particularité de pouvoir tuer les cellules cancéreuses marquées par des anticorps grâce à la reconnaissance de la partie Fc (extrémité non variable des chaînes lourdes des anticorps) par les récepteurs activateurs FcγRIIIa/CD16 présents à leur surface (Vivier et al., 1991). Ce mécanisme est appelé cytotoxicité cellulaire dépendante d'anticorps (ADCC/antibody dependent cellular cytotoxicity).

Comme évoqué précédemment, les cellules NK ont pour fonction de déclencher une réponse immunitaire rapide contre les cellules infectées par des pathogènes intracellulaires et contre la formation de tumeurs. En effet, les cellules NK ont la particularité de reconnaître et détruire, sans stimulation antigénique préalable, les cellules stressées ou anormales notamment en cas d'absence de marqueur du « soi » (Vivier et al., 2011). En particulier, les cellules NK sont capables de détecter l'expression réduite ou incomplète des molécules de CMH-I, ce concept étant plus largement décrit comme modèle du « soi manquant » (Kärre et al., 1986), (Vivier et al., 2008). Leur rôle est ainsi particulièrement important en terme d'immuno-surveillance antitumorale, en particulier dans le cas des cellules tumorales ayant perdu l'expression des molécules de classe I du CMH qui ne sont pas détectées et détruites par les lymphocytes T CD8+. Néanmoins, il est important de noter que les cellules NK modulent également leur activité grâce à une balance complexe reposant sur l'intégration de signaux activateurs et inhibiteurs émanant de la cellule cible (Figure 2), de cellules accessoires ou du microenvironnement pro- ou anti-inflammatoire (Vivier et al., 2011) (Moretta et al., 2006). Ainsi, la lyse des cellules cancéreuses est inhibée par l'interaction entre que les récepteurs de type lectine appartenant à la famille des KIR (Killer Immunoglobulin-like Receptor) et les

molécules du CMH-I à la surface des cellules avoisinantes (Thielens et al., 2012). De même, l'interaction des récepteurs présentés par les cellules NK tels que TIGIT et CD96, avec leur ligand CD155, envoie un signal inhibant l'activation des cellules NK. A l'inverse, un faible engagement des KIR et un fort engagement d'autres récepteurs de type « activateurs » comme les récepteurs NKG2D (NK cell group 2D), NCR (Natural Cytotoxicity Receptors') (NKp30, NKp44, NKp46) et DNAM-1 peuvent déclencher la réponse cytotoxique des cellules NK. Ces nombreux récepteurs engagent des ligands induits par le « stress cellulaire ». Ces ligands ne sont normalement pas exprimés sur les cellules saines en conditions de non-inflammation mais peuvent être induits par exemple en réponse aux dommages à l'ADN comme c'est le cas pour les ligands du récepteur activateur NKG2D qui est le principal récepteur associé à la reconnaissance d'une transformation cellulaire ou d'infections (Gasser et al., 2005). En effet, le récepteur NKG2D possède un rôle majeur dans la reconnaissance et la lyse des cellules tumorales en se liant aux molécules MICA et MICB (MHC class I Chain-related molecule A et B) (Bacon et al., 2004) (Bauer et al., 1999) (Cosman et al., 2001) ainsi qu'aux protéines de la famille des ULBP (UL16 Binding Protein) (Fernández-Messina et al., 2012).



**Figure 2 : L'activation des cellules NK est modulée par une balance entre signaux activateurs et inhibiteurs.**

(1) Lorsque les signaux d'activation sont atténués par l'engagement de récepteurs inhibiteurs, les cellules NK sont tolérantes envers les cellules saines exprimant les molécules de CMH-I. (2) Lorsque les cellules tumorales n'expriment plus les molécules du CMH-I, elles n'inhibent plus les cellules NK qui s'activent alors par le mécanisme du « soi-manquant ». (3) Suite à un stress, les cellules cibles peuvent exprimer suffisamment de ligands activateurs des cellules NK pour que la somme des signaux activateurs surmonte celle des signaux inhibiteurs. La balance de signaux penche vers l'activation des cellules NK. L'activation des NK peut être suffisante pour entraîner leur réponse cytotoxique et la lyse des cellules tumorales. Adapté de (Vivier et al., 2012).

Finalement, il semblerait que les cellules NK soit aussi des effecteurs de l'immunité adaptative (Arina et al., 2007). En effet, de nombreuses études ont montré leur capacité immunorégulatrice leur permettant de s'ajuster finement à leur environnement immédiat et de mettre en place une forme de mémoire immunologique spécifique d'antigènes (Watzl, 2014). En effet, plusieurs travaux ont montré que les cellules NK peuvent contrôler le nombre de cellules dendritiques, de cellules T CD4+ et CD8+ activées et même induire la formation de cellules B et T mémoires (Narni-Mancinelli et al., 2012) (Rydyznski et al., 2015) (Schuster et al., 2014) (Waggoner et al., 2011). C'est pourquoi le rôle des cellules NK, à la fois dans l'immunité innée et adaptative, reçoit un intérêt croissant dans le cadre des thérapies anti-cancéreuses.

En partie I.4.2 et I.4.3, nous verrons que, suite à l'activation et la reconnaissance de leurs cellules cibles, les cellules NK forment avec celles-ci une synapse immunologique et induisent la mort cellulaire selon deux modes possibles (voie des récepteurs à domaine de mort et voie perforine/granzyme).

### **1.3.2. Les lymphocytes T CD8+ cytotoxiques**

Parmi les lymphocytes infiltrant la tumeur, les CTL, ou cellules T CD8+ cytotoxiques, sont le deuxième type cellulaire pouvant directement tuer les cellules cancéreuses. Ces CTL constituent les principales cellules effectrices cytotoxiques de la réponse immunitaire innée. Il n'est donc pas étonnant que plusieurs stratégies thérapeutiques visent à (ré)-activer les CTL pour stimuler la lyse des cellules cancéreuses et limiter le processus de métastase.

Après leur développement dans le thymus et un processus de sélection négative, les lymphocytes T CD8+ naïfs entrent dans la circulation et migrent vers les organes lymphoïdes secondaires (notamment les ganglions lymphatiques). Comme décrit précédemment, une fois dans les ganglions, ces lymphocytes T CD8+ peuvent interagir de façon spécifique, via leur TCR, avec un peptide antigénique « cross-présenté » par les cellules présentatrices d'antigènes (APC/ Antigen Presenting Cell) telles que les DCs, via leur CMH-I. Ces antigènes tumoraux 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 mutants : l'instabilité génétique des tumeurs génère des mutations, des insertions, des délétions et/ou des translocations des gènes. L'expression de ces gènes en protéines anormales fournit des peptides mutés potentiellement reconnus par les CTL. Ce concept a aujourd'hui évolué vers la notion de « néo-antigènes » qui sont des antigènes nouveaux, issus de ces peptides mutés et totalement absents des tissus humains normaux (Sun et

al., 2017) (Jiang et al., 2019). C'est le cas par exemple de certains peptides issus de l'expression de p53 mutée (Lo et al., 2019).

- les antigènes viraux : certains cancers, lorsqu'ils sont induits par des virus (par exemple le papillomavirus), peuvent exprimer des protéines virales dont les peptides se retrouvent présentés par les molécules de CMH-I (Kenter et al., 2009).
- Les antigènes surexprimés : ces antigènes se retrouvent surexprimés dans les cellules tumorales par rapport aux cellules saines (par exemple p53, Hsp70, HER2/Neu)
- les antigènes produits par des changements épigénétiques : les cellules cancéreuses peuvent être soumises à des changements épigénétiques, notamment une dé-méthylation de l'ADN, induisant l'expression de protéines normalement exprimées par les cellules germinales mâles, générant des Ag tumoraux nommés « Cancer Testis » (par exemple: MAGE-A/B/C) (Sang et al., 2011).

De plus, l'activation et la prolifération de cellules T CD8<sup>+</sup> en CTL nécessitent d'autres signaux de stimulation en plus de l'interaction entre le TCR-CMH/peptide; à savoir l'interaction entre des ligands et des molécules de co-stimulation exprimées à la surface des DC et les lymphocytes T (Chen and Flies, 2013) et la stimulation par des cytokines pro-inflammatoires (IL-12, IL-2...). L'activation des cellules T CD8<sup>+</sup> conduit ainsi à leur différenciation leur donnant des fonctions cytotoxiques spécifiques (Kaech et al., 2002). En effet, lors de leur différenciation en effecteurs cytotoxiques, les CTL se mettent à exprimer des facteurs de transcription impliqués dans la régulation de l'expression de protéines nécessaires à leurs nouvelles fonctions. C'est le cas par exemple de facteurs de transcription de la famille T-box: T-bet (TBX21) et Eomesodermin (EOMES) qui régulent l'expression de molécules liées à la cytotoxicité (perforine, granzymes) et de l'IFN- $\gamma$  (Glimcher et al., 2004), (Pearce et al., 2012). D'autre part, les CTLs acquièrent la capacité de migrer au niveau de tissus tumoraux grâce à l'expression de molécules d'adhésion (CD44, intégrines  $\beta$ 1 et  $\beta$ 2) et de récepteurs aux chimiokines (notamment CCR5 et CCR2) (Glimcher et al., 2004). Les fonctions cytotoxiques des CTL et les mécanismes moléculaires de lyse des cellules cibles sont détaillés dans le chapitre suivant.

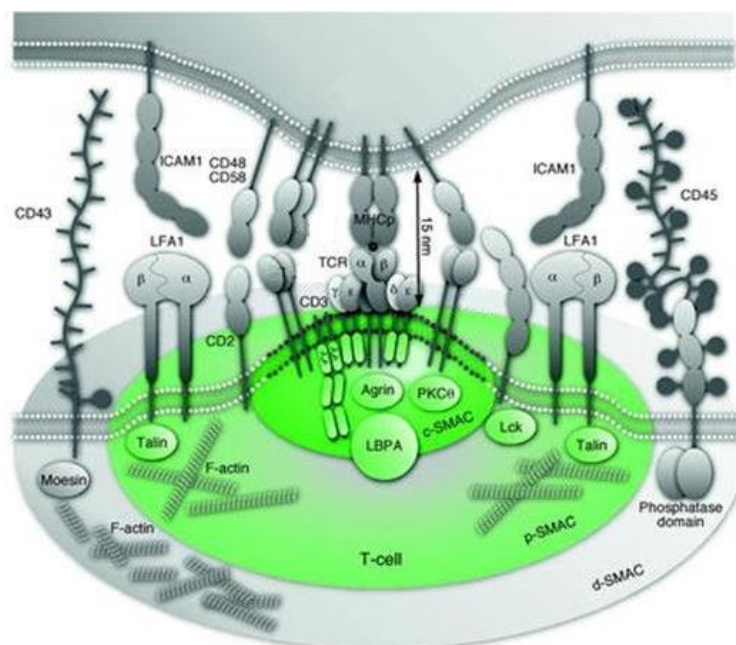
#### 1.4. Les mécanismes de cytotoxicité des cellules effectrices

##### **1.4.1. Mise en place de la réponse cytotoxique antitumorale : la synapse immunologique lytique**

Au cours du processus de la reconnaissance de leur cellule cible aboutissant à la destruction de cette dernière, CTL et cellules NK vont former un complexe avec la cellule à détruire, souvent appelé « conjugué ». L'espace de quelques nanomètres entre les deux cellules est appelé « synapse



immunologique » (SI) (Dustin, 2014). Cette SI est une région hautement organisée dont l'architecture dépend de la relocalisation des récepteurs impliqués dans la reconnaissance et l'adhésion afin de former un domaine fonctionnel à l'interface entre les deux cellules (Figure 3). En effet, les TCR, en interaction avec les molécules de CMH-I, sont rassemblés avec des protéines impliquées dans sa signalisation comme la protéine kinase C (PKC)- $\theta$  au centre de la SI. Cette zone, communément nommée cluster supramoléculaire d'activation central (cSMAC/ central supramolecular activation cluster) (Monks et al., 1998) contient également des molécules de co-stimulation telles que CD28, impliquée dans le recrutement de PKC- $\theta$ , ICOS et CD278, capables d'activer la kinase phosphatidylinositol-3 (Xu et al., 2013), CD27, GITR (CD357), 4-1BB (CD137) et OX40 (CD134) (So et al., 2011). D'autres récepteurs co-stimulateurs pouvant être présents dans cette zone font partie de la super famille des récepteurs de type lectines, tels que NKG2D, impliqué dans le recrutement des kinases phosphatidylinositol-3 et donc le déclenchement de l'exocytose des granules cytotoxiques (Giurisato et al., 2007). Cette zone c-SMAC est entourée d'un anneau, appelé SMAC périphérique (pSMAC), composé de molécules d'adhésion telles que LFA-1 (Lymphocyte function-associated antigen 1) liées à ICAM-1 (InterCellular Adhesion Molecule-1). Des précédents travaux au sein de notre laboratoire ont d'ailleurs montré l'implication de l'intégrine CD103/ITGAE (Integrin alpha E) dans la zone pSMAC. Cette protéine contribue à la maturation et à la régulation des fonctions effectrices des CTL à travers sa liaison à la E-cadherine, exprimée sur les cellules tumorales épithéliales (Le Floc'h et al., 2011). En outre, de l'actine est accumulée autour de la région pSMAC pour former, avec CD45 et CD43, la zone SMAC distale (dSMAC) (Delon et al., 2001), (Freiberg et al., 2002).



**Figure 3 : Structure conventionnelle de la synapse immunologique**

La synapse immunologique conventionnelle s'organise en trois zones : la zone c-SMAC, où sont localisés les récepteurs nécessaires à l'activation de la cellule effectrice, la zone p-SMAC, impliquée dans l'adhésion de la cellule effectrice à la cellule cible, et la zone d-SMAC, impliquée dans la stabilisation de la structure de la synapse. D'après (Yokosuka and Saito, 2010).

Ainsi, la zone cSMAC est spécialisée dans la reconnaissance et l'activation du lymphocyte tueur alors que les zones pSMAC et dSMAC maintiennent la structure de la SI. Néanmoins, il est important de noter qu'il existe un autre modèle d'organisation de la SI constitué de micro-cluster de TCR. Ces micro-clusters se forment et se répartissent de façon homogène au niveau de la zone de contact cellule cible/lymphocyte, puis, suite à l'augmentation de la stimulation du lymphocyte et du nombre de micro-clusters de TCR, ceux-ci se rassemblent au centre de la zone de contact pour former le cSMAC et une structure de SI conventionnelle (Yokosuka and Saito, 2010).

Bien que les deux types de lymphocytes cytotoxiques, cellules NK et CTL, possèdent de grandes différences phénotypiques, ces cellules effectrices induisent la mort des cellules tumorales de façon similaire grâce à deux voies principales distinctes : l'exocytose du contenu des granules cytotoxiques au niveau de la synapse immunologique formée entre la cellule tueuse et sa cellule cible ; et la voie dépendante de récepteurs pro-apoptotiques dits « à domaine de mort ».

## **1.4.2. Les voies de lyse**

### 1.4.2.1. La voie de l'exocytose du contenu des granules cytotoxiques

#### 1.4.2.1.1. Généralités

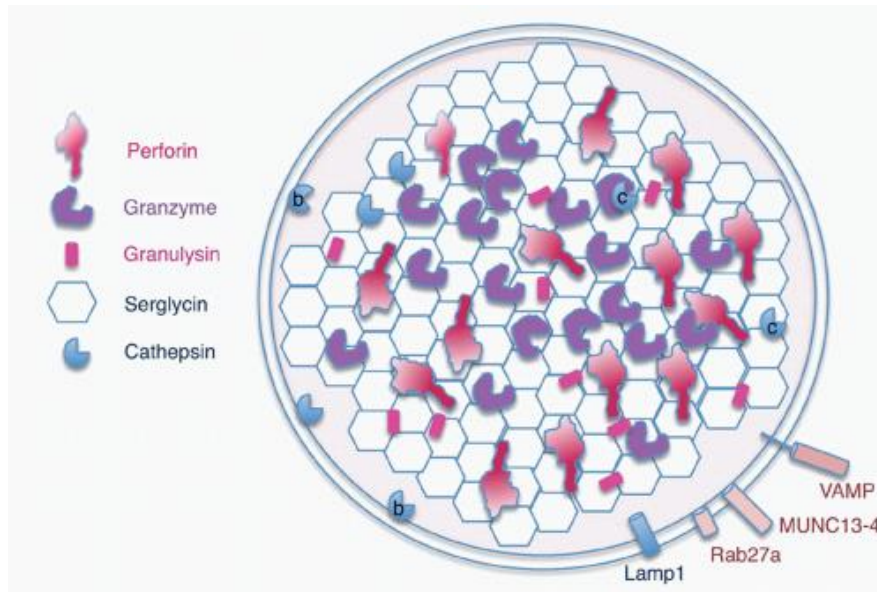
La voie des granules cytotoxiques (CG), encore nommée voie perforine/granzyme est la principale voie de lyse utilisée par les cellules NK et les CTL pour tuer leurs cellules tumorales. En effet, les souris présentant des perturbations de cette voie, par l'inactivation du gène de la PFN notamment, développent de nombreux cancers au cours de leur vieillissement et leur réponse immunitaire antitumorale est inefficace (Smyth et al., 2000) (Kägi et al., 1994) (Badovinac et al., 2003) (Walsh et al., 1994). De plus, les mutations des gènes qui interfèrent avec l'exocytose des CG et avec l'activité de la PFN, induisent un trouble rare de l'homéostasie immunitaire appelé lymphohistiocytose hémophagocytaire familiale (LHF) (Stepp et al., 1999). Les personnes atteintes de LHF présentent une prolifération et une activation incontrôlée des cellules T CD4+ et CD8+, une activation des macrophages et une cytotoxicité des cellules NK profondément altérée (Voskoboinik et al., 2010). Cette voie dépend de la présence dans le cytoplasme des cellules NK et des CTL de lysosomes sécrétoires spécialisés plus communément nommés « granules cytotoxiques ». Ces granules contiennent une famille de protéases nommées Granzymes (Gzms), capables d'induire la mort des cellules cibles après internalisation grâce à la perforine, une autre protéine clé des CG. Suite à la reconnaissance des cellules cibles par les NK et les CTL, le contenu des CG est libéré de façon polarisée au niveau de la synapse immunologique, ce qui induit la mort de la cellule cible. L'ensemble des mécanismes cellulaires et moléculaires permettant cette exocytose et

déclenchement du processus de mort cellulaire sont détaillés dans les chapitres suivants.

#### 1.4.2.1.2. Contenu des granules cytotoxiques

Les CG, présents seulement dans les NK et les CTL, sont des organites composés d'une membrane lipidique encapsulant des molécules lysosomales classiques et des molécules effectrices spécifiques impliquées dans la lyse des cellules cibles (Trapani, 2012) (Figure 4). En effet, les CG contiennent une protéine responsable de la formation de pores dans les cellules cibles, la PFN (détaillée en partie 1.3.2.3) et, dans une moindre mesure, de la granulysine qui possèdent une activité antibactérienne et antiparasitaire (Dotiwala et al., 2016), (Walch et al., 2014).

Les CG contiennent également une famille de serine protéases appelés granzymes, (pour granules enzymes; Gzms). Il en existe cinq Gzms différents chez l'Homme (GzmA, B, H, K et M) et 11 chez la souris (A, B, C, D, E, F, G, H, K, M et N). Chez l'Homme, les gènes codant pour les GzmA et GzmK, GzmB et GzmH, et GzmM sont localisés sur les chromosomes 5, 14, et 19, respectivement (Ewen et al., 2012). Ces Gzms sont synthétisés sous forme de pré-pro-enzymes. Au niveau du réticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi, le clivage en N-terminal de leur séquence « leader », un peptide signal hydrophobique, en deux longs pro-peptides (Jenne and Tschopp, 1988) constitue une première étape de leur maturation. Une seconde étape s'effectue au sein des CGs, où la cathepsine C termine la maturation des Gzms en clivant les pro-peptides, permettant d'obtenir une enzyme active (Perišić Nanut et al., 2014). D'autre part, les CG contiennent de la Calreticuline, un chelateur de calcium qui empêche l'insertion de la PFN dans la membrane des CG. On peut noter que le stockage du Gzms et de la PFN au sein des CG est assuré par la serglycine, un protéoglycane riche en sulfate, qui forme des complexes avec ces protéines (Sutton et al., 2016). Ces interactions avec la serglycine contribuent à concentrer les Gzms et la PFN (sous forme de monomères) au centre des CG en limitant leur diffusion dans la cellule cytotoxique (Grujic et al., 2005). Enfin, les CG contiennent des protéines exprimées par les lysosomes de toutes les cellules telles que la protéine membranaire Lamp1 (CD107a), CD63 et des enzymes lysosomales dont les cathepsines B et C, mentionnée précédemment. Au niveau des GC, la cathepsine B membranaire permettrait, après exocytose des CG, de préserver la membrane de la cellule tueuse des effets de sa propre PFN en la clivant (Balaji et al., 2002). Cependant, puisque les CTL de souris déficientes en cathepsine B ne semblent pas affectées pendant la lyse de leur cellule cible *in vitro* et *in vivo* (Baran et al., 2006), il est probable que d'autres cathepsines des CG se liant à la membrane puissent inactiver la PFN lorsque la cathepsine B est absente.



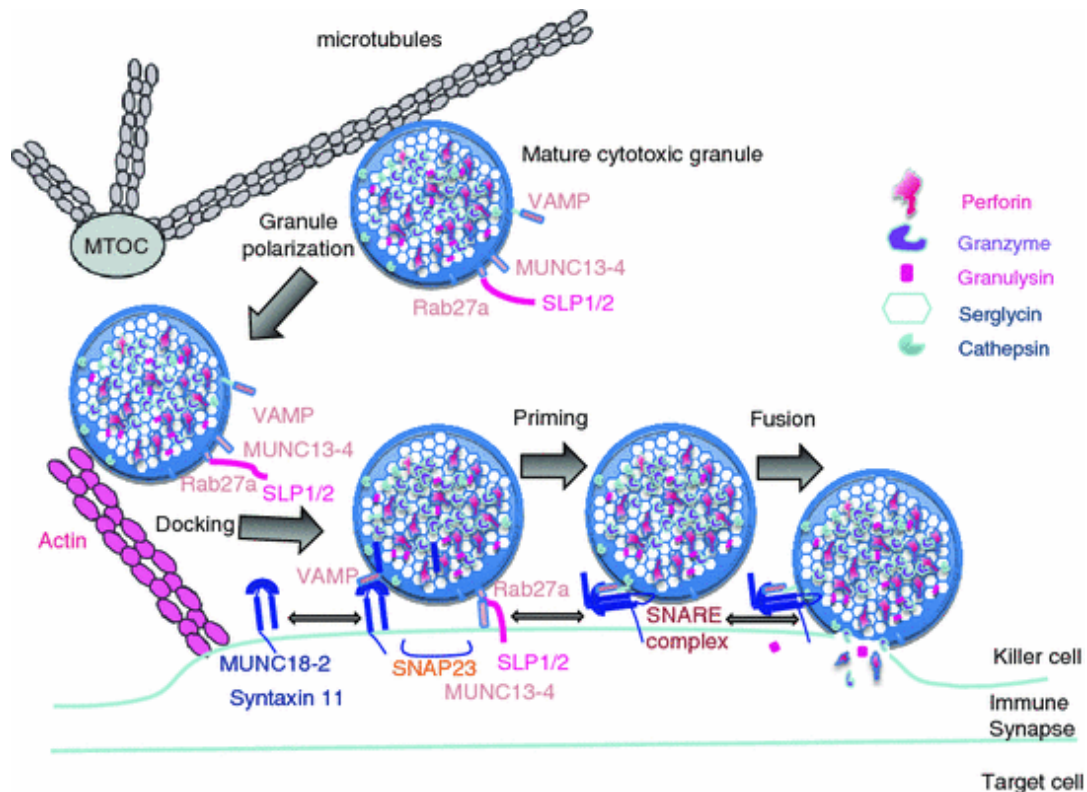
**Figure 4 : Représentation d'un granule cytotoxique et de son contenu.**

Les granules cytotoxiques contiennent des molécules cytolytiques (granzymes, perforine et granulysine). Ces molécules sont complexées au sein d'une matrice de serglycine, un protéoglycane. Les granules cytotoxiques étant à l'origine des lysosomes, contiennent également des molécules lysosomales comme Lamp1 et des cathepsines, ainsi que des protéines spécifiques de ces lysosomes sécrétoires, à savoir Rab27a, Munc13-4 et VAMP8 impliquées dans l'exocytose des granules cytotoxiques. D'après <http://oncohemakey.com/cell-mediated-cytotoxicity-3>

#### 1.4.2.1.3. Mécanismes d'exocytose du contenu des granules cytotoxiques

Suite à la reconnaissance de la cellule cible par un lymphocyte cytotoxique, le contenu de leurs CGs va être « déversé » dans la SI par un processus d'exocytose (Figure 5). L'initiation de l'exocytose du contenu des CG passe par la voie de signalisation  $Ca^{2+}$ /calcineurine/NFAT. En effet, la signalisation induite par le TCR induit la libération de calcium du réticulum endoplasmique vers le cytosol, provoquant la multimérisation de protéines STIM (Stromal Interaction Molecules). Ces complexes protéiques entrent alors en contact avec la protéine formant des pores ORAI et activent un influx de calcium intracellulaire à travers les canaux CRAC ( $Ca^{2+}$  release-activated  $Ca^{2+}$  channels) (Feske et al., 2015). L'augmentation intracellulaire de  $Ca^{2+}$  provoque une rapide activation de la calcineurine qui active à son tour par déphosphorylation le facteur de transcription cytosolique NFAT et induit sa translocation vers le noyau (Hogan et al., 2003). NFAT contribue ensuite à l'expression de gènes impliqués dans la réorganisation du cytosquelette d'actine et du réseau des microtubules, nécessaire à la polarisation des CG du cytoplasme vers la SI. Néanmoins, c'est l'augmentation de la concentration de  $Ca^{2+}$  intracellulaire qui induit la translocation du centre organisateur des microtubules (MTOC/Microtubule organization center) et le déplacement des GC au centre de la SI. A noter que la dynéine est une des principales protéines responsables du transport des CG le long des microtubules (Mentlik et al., 2010). Une fois les CG matures à proximité de la SI, ils sont pris en charge par le réseau d'actine sous-membranaire pour se rapprocher de la membrane plasmique. La protéine Rab27a, présente du côté cytosolique de la membrane de CG, se lie alors aux protéines SYTL1 et SYTL2 (SYnapTotagmin-Like protein) insérées dans la membrane

plasmique de la cellule tueuse et induit l'amarrage des CG. Ensuite, la protéine Munc13-4, présente sur la surface des CG, initie la fusion des CG avec la membrane plasmique en interagissant avec la syntaxin 11 de la membrane du lymphocyte. Il se forme alors un complexe appelé SNARE (Soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein REceptor) contenant les protéines SNAP23 (SyNaptosomal-Associated Protein of 23 kDa), syntaxin 11 et VAMP (Vesicle-Associated Membrane Protein) (Loo et al., 2009), (Krzewski et al., 2011). L'addition des protéines Munc18-2 achève l'activation du complexe SNARE et la fusion de la membrane du CG avec la membrane du lymphocyte tueur, ce qui provoque la libération du contenu des CG dans la SI (Tang, 2015).



**Figure 5 : Mécanisme d'exocytose du contenu des granules cytotoxiques.**

Lorsque les cellules NK/CTL sont activées, les granules cytotoxiques (CG) migrent le long des microtubules vers la synapse immunologique (polarisation de CG) puis se lie à la membrane plasmique via les interactions de RAB27a avec les protéines SLP1 ou SLP2 s'insérant dans la membrane plasmique, et du complexe d'ancrage MUNC18-2/ syntaxine 11 avec VAMP. Les granules sont ensuite amarrés par MUNC13-4 et un complexe entre SNARE composé de SNAP23, VAMP et syntaxine 11 se forme. Enfin, le changement de conformation de MUNC18-2 finalise la fusion des CG avec la membrane plasmique, ce qui libère le contenu des CG dans la SI et termine l'exocytose. D'après (Thiery and Lieberman, 2014).

#### 1.4.2.1.4. La perforine et ses fonctions biologiques

Comme mentionné auparavant, la PFN, principalement exprimée par les lymphocytes tueurs, est une protéine clé des CG. Cette protéine, exprimée sous forme de monomère au sein du lymphocyte, est composée de 533 acides aminés qu'on peut regrouper en trois domaines :

(1) un domaine C-terminal initiant l'amarrage de la PFN avec la membrane plasmique de la cellule cible. Ce domaine est constitué d'un domaine C2 contenant entre autres des résidus d'acides aspartiques pouvant fixer au maximum 4 cations  $Ca^{2+}$  (Voskoboinik et al., 2005).

(2) un deuxième domaine de type « EGF-like ». Il semblerait que ce domaine ait un rôle dans

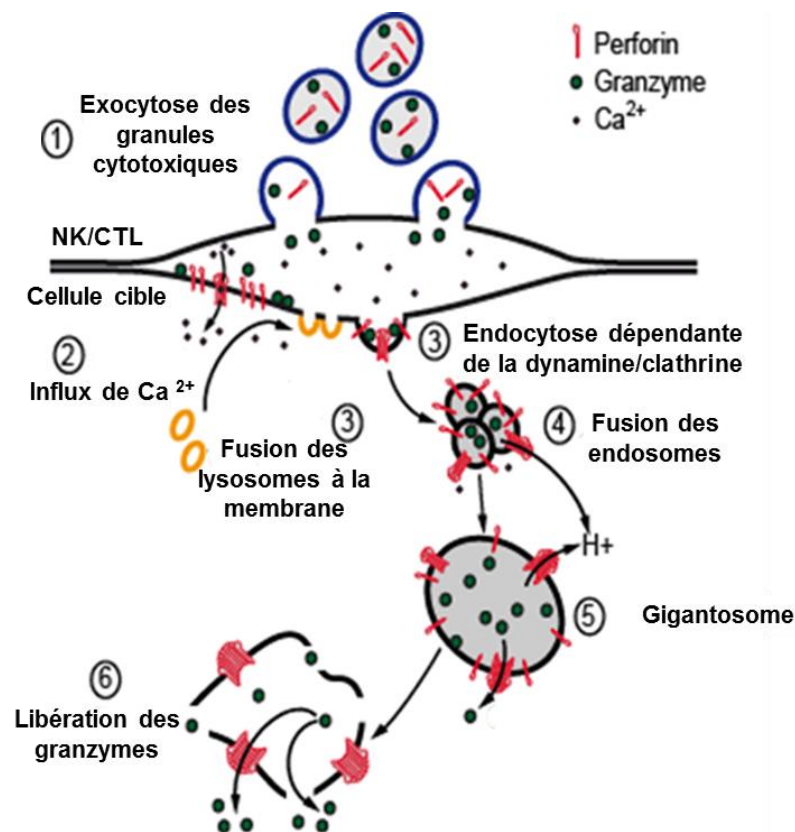
l'orientation des monomères de PFN vers la membrane en interagissant avec les hélices du domaine N-terminal (Law et al., 2010).

(3) un troisième domaine N-terminal nommé complexe d'attaque membranaire (MACPF/Membrane Attack Complex/PerForin) contenant deux  $\alpha$ -hélices TMH1 et TMH2 (Transmembrane Helical Region). Ce domaine est similaire au domaine formant des pores des CDCs (cholesterol-dependent cytolysins), telles que la perfringolysin, exprimées par des bactéries Gram+ (Rosado et al., 2007) ou la streptolysin (SLO) (Anderluh et al., 2014).

Ces hélices permettent aux monomères de PFN de s'ancrer au niveau de la SI dans les membranes riches en cholestérol uniquement. En effet, en présence  $Ca^{2+}$  et à forte concentration dans la membrane de la cellule cible, ces hélices se détendent et s'insèrent dans la membrane lipidique (Baran et al., 2009). Ce processus permet la multimérisation des monomères de PFN et la formation de pores de deux types : des "pré-pores" de petite taille d'environ 7 monomères, ayant potentiellement la forme d'arc (Metkar et al., 2015), et d'autres pores plus stables et plus large (Thiery et al., 2011), (Praper et al., 2011). Selon certaines études, ces pores seraient suffisamment larges pour permettre la diffusion passive de dimères de GzmA et de monomères de GzmB dans le cytosol de la cible (Law et al., 2010). Cependant, il a été montré que la PFN, en concentration similaire à celle utilisée par les CTL et les NK pour induire l'apoptose, forme des pores trop petits et instables pour faire passer les Gzms à travers la membrane plasmique (Sauer et al., 1991), (Keefe et al., 2005). De plus, d'autres travaux ont démontré que les Gzms sont internalisés via les endosomes des cellules cibles (Kawasaki et al., 2000).

Finalement, le modèle descriptif de l'action de la PFN qui semble prédominer à l'heure actuelle est le suivant (Figure 6) : dans un premier temps, la PFN s'insère dans la membrane plasmique de la cellule cible, ce qui induit un influx de calcium transitoire de la SI vers son cytosol. Dans un second temps, cet influx de  $Ca^{2+}$  génère une réaction de réparation de la membrane plasmique nommée « wound healing response » (McNeil and Kirchhausen, 2005), (Reddy et al., 2001), destinée initialement à stopper le passage passif de molécules indésirables et protéger les cellules de la nécrose. Ce mécanisme de « cicatrisation » est caractérisé par la fusion des lysosomes avec la membrane plasmique, afin de remplacer la membrane endommagée par des morceaux de membranes nouvellement synthétisées. En conséquence, même si les dommages causés par la PFN sont rapidement éliminés, ce mécanisme induit l'internalisation des Gzms qui sont liés à la membrane plasmique du fait de leur charge (Shi et al., 2005) par endocytose de façon dépendante de la voie dynamine II/clathrine, au sein d'endosomes de grande taille nommés « gigantosomes » (Thiery et al., 2010) (Keefe et al., 2005). Dans un troisième temps, la PFN présente dans les gigantosomes finit de se multimériser, formant des pores plus stables et potentiellement plus larges, ce qui entraîne la rupture de la membrane des endosomes, la libération des Gzms endocytés et

l'apoptose de la cellule cible (Thiery et al., 2011).



**Figure 6 : Mécanisme d'action de la perforine**

Suite à (1) l'exocytose des granules cytotoxiques dans la SI, la PFN forme des petits pores dans la membrane plasmique de la cellule cible ce qui provoque (2) un influx de  $Ca^{2+}$  vers la cellule cible, induisant (3) la fusion des lysosomes à la membrane pour la réparer. Les Gzms et la PFN sont alors internalisés par un mécanisme (3) d'endocytose dépendant de la voie dynamine/clathrine. Les endosomes (4) fusionnent ensuite de façon dépendante de Rab5 pour (5) former des « gigantesomes ». Au sein des gigantesomes, la PFN finit de se multimériser et forme des pores plus grands induisant (6) la libération de Gzms puis l'éclatement de l'endosome et la libération complète des Gzms dans le cytosol de la cellule cible. Adapté de (Thiery et al., 2011).

#### 1.4.2.1.5. Mécanismes de cytotoxicité du granzyme B

Le GzmB, une fois internalisé dans le cytoplasme de la cellule cible va cliver différents substrats situés au niveau du cytoplasme, des mitochondries ou du noyau, et déclencher trois grandes voies apoptotiques (Figure 7) décrites ci-dessous :

- Induction de la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe (MOMP/Mitochondrial outer membrane permeabilization).

L'apoptose induite par le GzmB humain fait principalement intervenir la voie mitochondriale ainsi que de nombreuses protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 (Sutton et al., 2003). En effet, le GzmB humain clive principalement Bid, une protéine de type « BH3-only » de la famille Bcl-2, en tBid (Sutton et al., 2000) (Waterhouse et al., 2005) (Waterhouse et al., 2006). Cette forme tronquée induit ensuite la MOMP, de manière dépendante de Bax et/ou Bak (Heibein et al., 2000),

(Desagher et al., 1999), (Eskes et al., 2000), libérant ainsi différents facteurs apoptotiques comme le cytochrome c (Alimonti et al., 2001), (Kluck et al., 1997), (Jürgensmeier et al., 1998), le Second Activateur Mitochondrial des Caspases (Smac)/Diablo et HtrA2/Omi (Heibein et al., 2000). L'activité pro-apoptotique du cytochrome-c est essentiellement dépendante de son interaction avec la protéine APAF-1 (Apoptotic Peptidase Activating Factor 1) qui va former, en présence d'Adénosine Triphosphate (ATP), un complexe multimérique appelé « apoptosome ». Ce complexe permet le recrutement et l'activation auto-catalytique de la pro-caspases 9 qui va par la suite activer des pro-caspases effectrices, notamment la pro-caspase 3 (Zou et al., 1999). A noter que Smac et HtrA2 bloquent les fonctions des protéines inhibitrices de l'apoptose (IAPs /Inhibitors of Apoptosis Protein) et favorisent l'activation de la pro-caspase 3 (Sutton et al., 2003). De plus, la destruction protéolytique du complexe Mcl-1/Bim à la membrane externe de la mitochondrie pourrait constituer un mécanisme alternatif du déclenchement de la MOMP par le GzmB. En effet, le GzmB peut cliver Mcl-1 et ainsi permettre à Bim d'induire une MOMP (Han et al., 2004), (Han et al., 2005). Finalement, il a également été récemment démontré que le GzmB peut cliver la protéine Hax-1 (HS-1-associated protein X-1) au niveau de sa partie N-terminale et que le fragment qui en résulte participerait à la dépolarisation de la mitochondrie. (Han et al., 2010a).

- Clivage directe des pro-caspases effectrices :

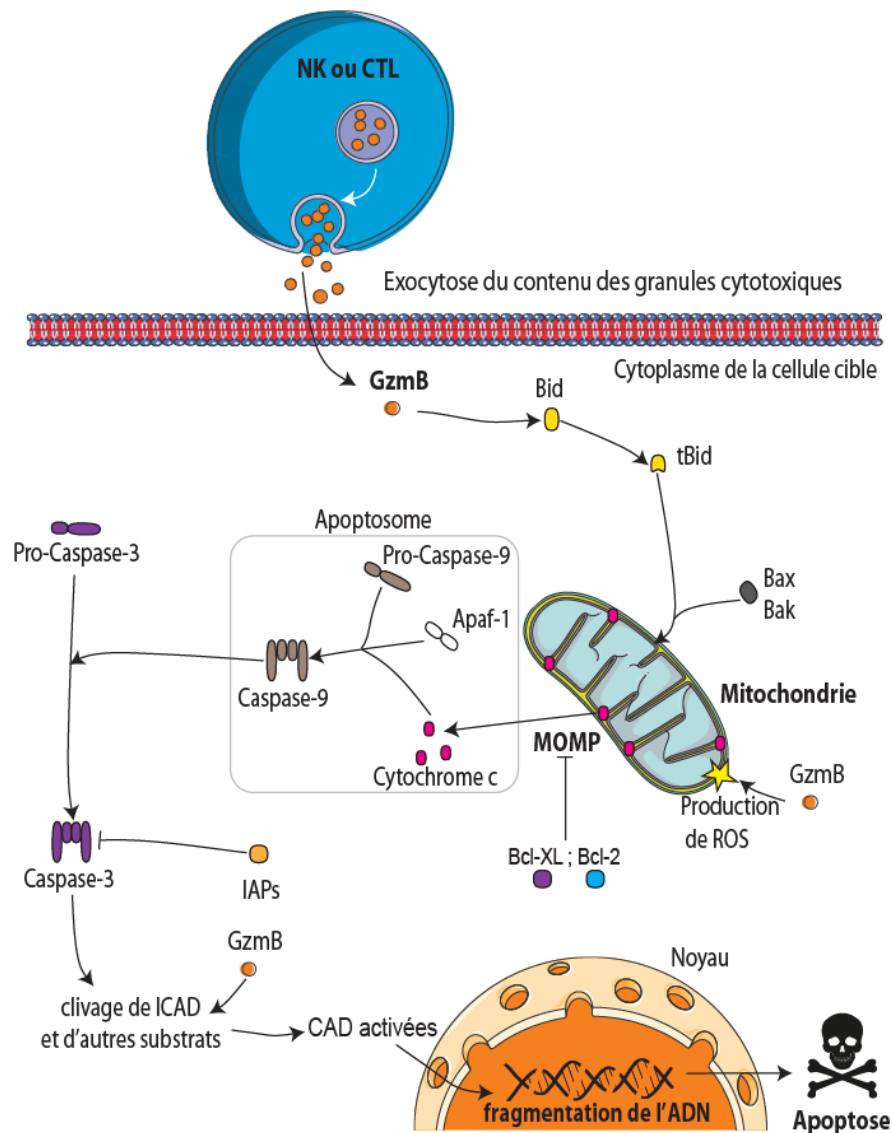
Différentes études ont suggéré que le GzmB humain pouvait cliver directement la pro-caspase 3 (Adrain et al., 2005). Néanmoins, il semble que ce clivage soit incomplet et nécessite une amplification par la voie mitochondriale (Goping et al., 2003). Au contraire, le GzmB murin induit préférentiellement le clivage des pro-caspases 3 et 7, au niveau de leurs résidus d'acide aspartique, ce qui provoque l'apoptose via la fragmentation de l'ADN par la DNase CAD (Caspase-Activated DNase) grâce au clivage de son inhibiteur ICAD (Inhibitor of CAD) (Kaiserman et al., 2006) (Adrain et al., 2005) par ces dernières. Finalement, même si cela reste controversé, la pro-caspase-8 pourrait être clivée et activée par le GzmB (Murphy et al., 2004).

- Génération de ROS (espèces réactives de l'oxygène) :

Il a été montré récemment que le GzmB peut induire la production de ROS de façon indépendante de la MOMP et de l'activation des caspases. En effet, le GzmB peut entrer à l'intérieur de la mitochondrie (Chiusolo et al., 2017), cliver les sous unité NDUFS1, NDUFS2 et NDUFV1 du complexe I de la chaîne de transport d'électrons et ainsi générer des ROS qui participent à la mort cellulaire induite par le GzmB et les lymphocytes cytotoxiques (Martinvalet, 2015). De plus, cette altération de la chaîne de respiration mitochondriale participerait à la



libération des facteurs pro-apoptotiques de la mitochondrie, notamment le cytochrome-c (Jacquemin et al., 2015).



**Figure 7 : Mécanisme d'induction de l'apoptose par le Granzyme B**

Le GzmB induit l'apoptose des cellules cibles en activant principalement la voie mitochondriale via le clivage de Bid. La forme tronquée de Bid (tBid) favorise l'oligomérisation de Bax et/ou Bak dans la membrane mitochondriale externe (inhibée éventuellement par les protéines anti-apoptiques Bcl-2 et Bcl-XL) conduisant à perméabilisation de cette membrane (MOMP) et à la libération de cytochrome c. En présence de cytochrome c et d'ATP, les protéines Apaf1 forment un complexe avec la pro-caspase 9 nommé « apoptosome » qui active la caspase 9. La caspase 9 active ensuite la caspase 3 qui clive différents substrats tels que ICAD, l'inhibiteur de l'endonucléase CAD, permettant à cette dernière de fragmenter l'ADN. Le GzmB peut induire également le clivage direct de la procaspase 3 ou d'ICAD, et une production mitocentrique de ROS pour favoriser l'apoptose des cellules cibles. A noter, le GzmB humain induit l'apoptose préférentiellement via la voie Bid/mitochondrie, alors que le GzmB murin induit l'apoptose via l'activation directe de la pro-caspase 3. D'après (Thierry et al., 2015).

Au-delà de ces capacités à induire des voies de signalisation pro-apoptotiques, le GzmB induit également le clivage de protéines nécessaires au maintien de l'intégrité cellulaire. Par exemple, le GzmB peut désorganiser le cytosquelette de la cellule cible en clivant plusieurs de ses composants telles que la tubuline (Adrain et al., 2005), la filamine (Browne et al., 2000) et ROCK II (Rho-associated coiled coil-containing protein kinase 2 (Sebbagh et al., 2005). De plus, le GzmB pourrait perturber la cohésion de la lamina nucléaire en clivant directement la lamine B, ce qui

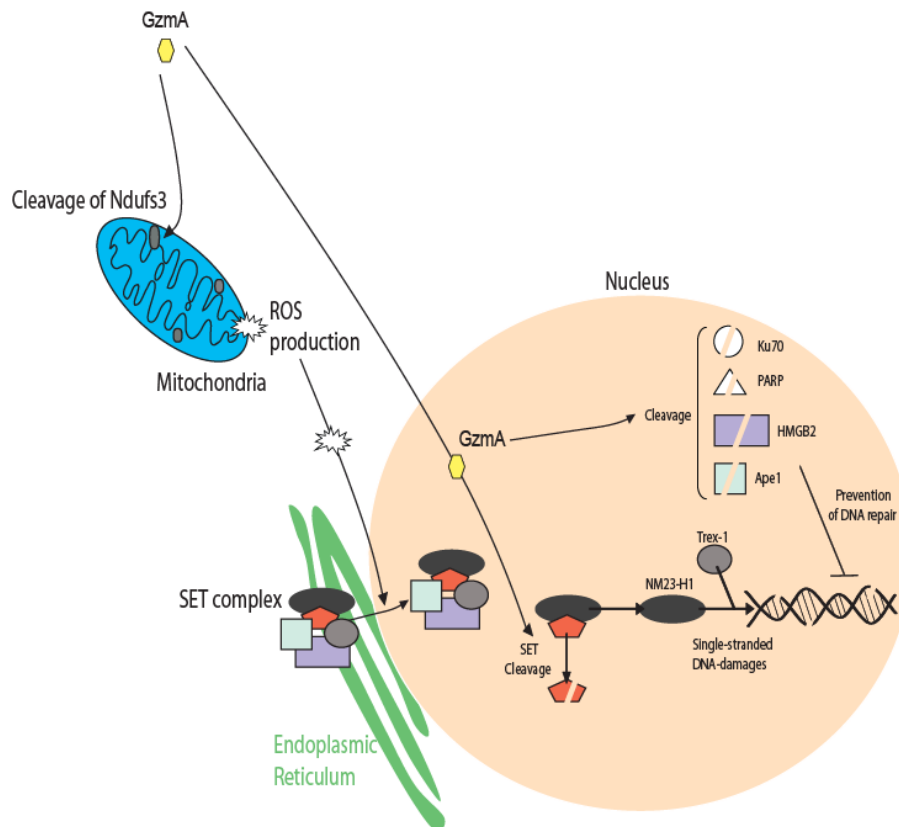
pourrait par ailleurs faciliter l'entrée du GzmB dans le noyau par les pores nucléaires (Zhang et al., 2001a). Des travaux plus anciens ont également suggéré que le GzmB pouvait perturber des voies de signalisations pro-survies en clivant des substrats comme Notch1 ou FGFR-1 (fibroblast growth factor receptor-1) (Loeb et al., 2006). Finalement, il est important de noter qu'une activité extracellulaire du GzmB a été récemment mise en évidence. Par exemple, le GzmB peut cliver des composants de la matrice extracellulaire telles que la vitronectine, la fibronectine ou la laminine (Choy et al., 2004), (Buzza et al., 2005) ce qui peut déclencher une mort cellulaire par détachement, ou « anoikis » (Chiarugi and Giannoni, 2008).

#### 1.4.2.1.6. Fonction des autres granzymes chez l'homme

- Granzyme A

Le Gzm le mieux décrit après le GzmB est le GzmA, qui fût le premier Gzm découvert en 1986 (Masson et al., 1986). Le GzmA, exprimé par la plupart des cellules cytotoxiques, est une tryptase. Son mécanisme d'induction de l'apoptose est, contrairement au GzmB, indépendant des caspases (Figure 8). En effet, plusieurs études indiquent que le GzmA, après internalisation dans la cellule cible, clive Ndufs3, une sous-unité du complexe I de la chaîne de transport d'électrons des mitochondries, cela perturbe leur morphologie, leur potentiel transmembranaire, leur fonction rédox ce qui génère des dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) et des anions superoxydes (Martinvalet et al., 2008). Ces anions provoquent la translocation dans le noyau du complexe SET, un complexe de réponse au stress oxydatif réparant les dommages au niveau des sites abasiques de l'ADN (Beresford et al., 2001). Ce complexe est composé d'une protéine de liaison à l'ADN (HMGB2), d'une exonucléase (Trex1), de deux endonucléases (Ape1 et NM23-H1) et de deux autres protéines modifiant la chromatine (pp32 et SET).

En parallèle, le GzmA migre aussi dans le noyau où il dissocie le complexe en clivant la protéine SET, et libère ses composants. NM23-H1 peut ainsi induire des coupures simple-brin de l'ADN à l'aide de Trex1 qui les agrandit (Chowdhury et al., 2006). Par ailleurs, HMGB2 et Ape1 sont clivées et inactivées par le GzmA, les empêchant de réparer les coupures de l'ADN (Fan et al., 2003). De plus, le GzmA clive plusieurs substrats : la poly-ADP-ribose polymérase (PARP-1) et Ku70, inhibant ainsi la détection des brins d'ADN endommagés (Zhu et al., 2009); l'histone H1, déclenchant l'ouverture de la chromatine ; et enfin les extrémités des histones, rendant l'ADN plus accessible aux nucléases (Zhang et al., 2001b). Toutes ces réactions finissent par générer la fragmentation de l'ADN et l'apoptose de la cellule cible sans faire intervenir les caspases.



**Figure 8 : Mécanisme d'action du Granzyme A**

Après internalisation dans la cellule cible, le GzmA clive au niveau des mitochondries Ndufs3 (une sous unité du complexe I de la chaîne de transport d'électrons), ce qui perturbe les fonctions oxydo-réductrices mitochondriales et génère des ROS. Les ROS provoquent la translocation du complexe SET du réticulum endoplasmique vers le noyau. Le GzmA entre aussi dans le noyau et libère l'endonucléase NM23-H1 en clivant la protéine SET. Cette endonucléase induit des cassures simple brin de l'ADN. L'exonucléase Trex1 va ensuite étendre ces cassures. Simultanément, le GzmA clive et inactive HMGB2 et Ape1, interférant avec la réparation de l'ADN, et clive également Ku70 et PARP interférant avec la reconnaissance de l'ADN endommagé. D'après (Thiery et al., 2015).

D'autre part, le GzmA possède un rôle pro-inflammatoire, considéré par certains comme étant son activité principale. En effet, le GzmA intracellulaire peut participer à la conversion de la pro-IL-1 $\beta$  en IL-1 $\beta$  de manière dépendante de l'activité de la caspase-1 et de l'inflammasome (Hildebrand et al., 2014) (Irmiler et al., 1995).

Concernant, les trois autres Gzms humains (Gzms M, H et K), leurs fonctions ne furent identifiées que plus tard, d'où l'appellation initiale de « granzymes orphelins ». De plus, malgré de nombreuses études, leurs fonctions et mécanismes d'action restent à l'heure actuelle bien souvent soumis à controverse.

- Granzyme H

Des études ont montré que le GzmH a la capacité de cliver la protéine d'assemblage adéovirale 100K et la protéine de liaison à l'ADN nécessaire à la réplication des adénovirus humains (Andrade et al., 2007). De plus, le GzmH pourrait inhiber l'activité traductionnelle du virus de l'hépatite C en clivant la phosphoprotéine multifonctionnelle La (Romero et al., 2009). Ce Gzm a donc un rôle dans l'immunité antivirale mais aussi dans l'immunité antitumorale en provoquant par

plusieurs processus l'apoptose indépendamment des caspases : perturbation du potentiel membranaire des mitochondries, génération de ROS, contraction de la chromatine et morcellement de l'ADN (Fellows et al., 2007).

- Granzyme K

Le mécanisme d'induction de la mort cellulaire par le GzmK est, quant à lui, similaire à celui du GzmB et du GzmA. En effet, GzmK, comme le GzmB, clive Bid, induit la MOMP et la libération de cytochrome c mais sans que cela n'entraîne l'activation des caspases (Zhao et al., 2007). De plus, le GzmK génère aussi des ROS et clive Ape1 et SET, provoquant la translocation du complexe dans le noyau et la fragmentation de l'ADN (Guo et al., 2008).

- Granzyme M

Enfin, le mécanisme d'action du GzmM est plus controversé. D'un côté, le GzmM semble induire l'apoptose sans activation des caspases, sans MOMP et sans fragmentation de l'ADN (Kelly et al., 2004). D'un autre côté, d'autres travaux ont montré que le GzmM induit la mort cellulaire via les caspases sans cliver Bid mais en induisant une MOMP, la libération de cytochrome c, le clivage de ICAD et de XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis protein), l'activation de CAD et finalement la déstructuration du réseau de microtubules (Lu et al., 2006) (Bovenschen et al., 2008).

En résumé, les Gzms, protéines clés de la cytotoxicité des CTL et des cellules NK, déclenchent la mort cellulaire en parallèle selon des voies moléculaires et phénotypiques différentes mais présentant tout de même des points communs. Cette redondance des mécanismes d'action permettrait vraisemblablement d'améliorer la protection de l'hôte contre les tumeurs et les pathogènes qui peuvent développer des mécanismes d'échappement à la mort induite par les Gzms.

#### 1.4.2.2. La voie des récepteurs à domaines de mort

##### 1.4.2.2.1. Généralités

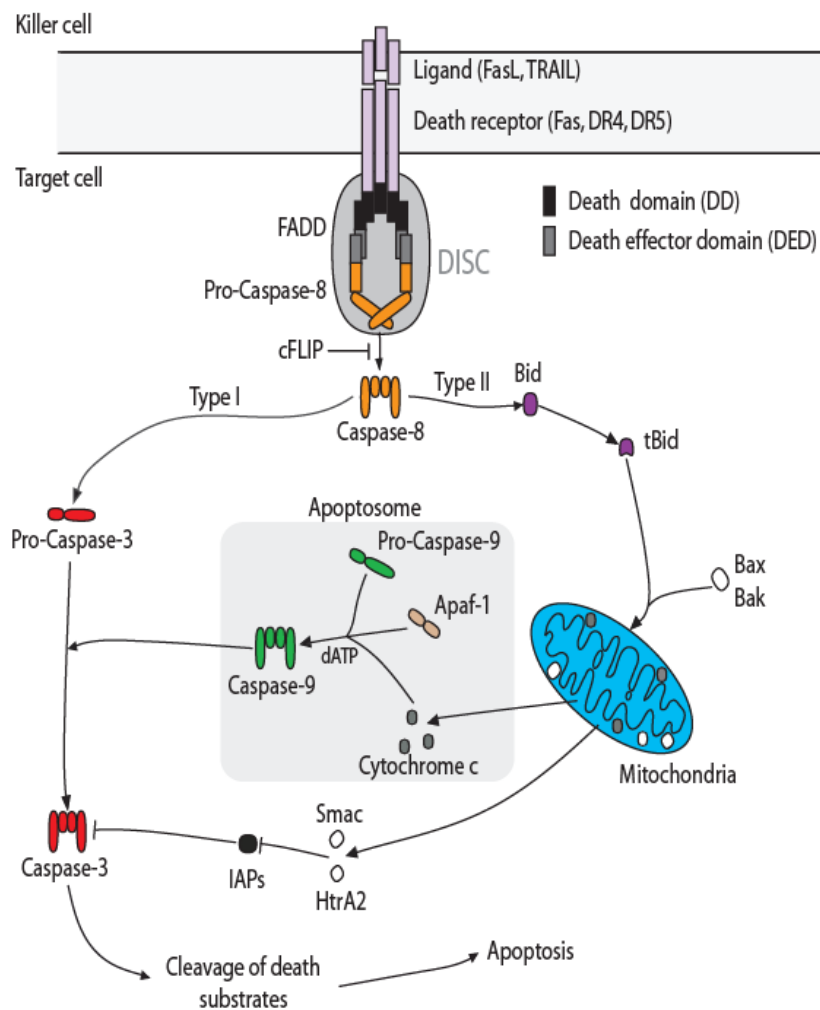
La seconde voie de lyse utilisée par les cellules NK et les CTL activées pour détruire leurs cellules cibles tumorales, est également nommée voie des récepteurs à domaine de mort alterne à la voie principale de l'exocytose du contenu des granules cytotoxiques. Cette voie fait intervenir des protéines membranaires spécifiques (ligands) exprimées par les cellules NK et les CTL activées pouvant se lier à leurs récepteurs dits « à domaine de mort » (DR/Death Receptors) exprimés à la surface des cellules cibles. Les récepteurs à domaine de mort font partie de la superfamille du récepteur de type I au TNF (TNF-RI /p55). Ces récepteurs sont principalement des protéines transmembranaires présentant un domaine intra-cellulaire, nommé domaine de mort (DD/Death

Domain), d'environ 80 à 100 acides aminés pouvant transduire un signal apoptotique. Il existe chez l'Homme six récepteurs à domaine de mort : DR3, DR6, FAS (nommé CD95), TRAIL (TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand)-R1 et -R2 (DR4 et DR5), et TNF-R1 (Wilson et al., 2009). Les ligands pouvant activer ces DR font partie de la famille du TNF : Fas ligand (CD95L), TRAIL et TNF- $\alpha$  (Ashkenazi and Salvesen, 2014). Très schématiquement, l'interaction DR/ligand permet la mise en place d'un complexe protéique d'initiation de la mort cellulaire de la cellule cible, principalement par apoptose. Néanmoins, la liaison des DR à leurs ligands peut aussi déclencher d'autres processus cellulaires, notamment liés à la survie. En effet, l'activation des voies NF-kappaB JNK (c-Jun N-terminal kinase) ou p38/MAPK (mitogen-activated protein kinase) peut participer à la survie cellulaire et induire une réaction inflammatoire, tout du moins dans certaines circonstances (Ehrhardt et al., 2003) (Azijli et al., 2013) (Liu et al., 1996b). Le paragraphe suivant détaille à titre d'exemple la voie de signalisation apoptotique du récepteur FAS.

#### 1.4.2.2.2. Exemple de la voie Fas/FasL

La voie de signalisation apoptotique induite par le récepteur FAS est la voie des récepteurs à domaine de mort la mieux décrite. Cette voie peut être utilisée par les lymphocytes cytotoxiques pour induire la destruction de leurs cellules cibles tumorales (Thiery et al., 2005) (Screpanti et al., 2001). Le processus de déclenchement de la mort cellulaire dépend ainsi de plusieurs étapes conduisant à la fragmentation de l'ADN de la cellule cible (Figure 9). Lors de la première étape, l'interaction de FAS avec FasL permet la trimérisation des récepteurs, grâce à des interactions homotypiques entre récepteurs CD95. Cette trimérisation permet le recrutement de protéines adaptatrices appelées FADD (Fas-Associated protein with Death Domain (DD)) et leur liaison au récepteur. Ce processus dépend de l'interaction homotypique entre le DD présent au niveau de FADD et DD des récepteurs FAS. Par la suite, FADD va permettre le recrutement de pro-caspases initiatrices (notamment la pro-caspase-8) grâce à un domaine commun appelé « domaine effecteur de mort » (DED/Death Effector Domain). Cet ensemble protéique forme un complexe macromoléculaire appelé complexe de signalisation induisant la mort (DISC/Death-Inducing Signaling Complex), permettant l'initiation de la transduction du signal apoptotique en permettant l'activation des caspases initiatrices (Yang, 2015). En effet, la concentration élevée de pro-caspases initiatrices au niveau du DISC permet leur clivage autocatalytique et la libération de ces enzymes activées dans le cytoplasme. Ces caspases 8 et 10 activent par la suite des pro-caspases effectrices (pro-caspases 3, 6 et/ou 7) qui peuvent à leur tour réagir avec leurs substrats aboutissant à la mort cellulaire apoptotique. Dans les cellules « de type I » (par exemple les thymocytes), ces événements sont suffisants pour déclencher l'apoptose car la quantité de caspase-8 activée au niveau du DISC est suffisante pour activer directement les caspases effectrices. Au contraire, dans les cellules « de type

II » (par exemple les cellules B), le déclenchement de l'apoptose requière une amplification supplémentaire par le clivage de la protéine Bid par la caspase 8 ce qui induit une amplification du signal apoptotique par la voie apoptotique mitochondriale (Wilson et al., 2009) (Barnhart et al., 2003). Il est à noter que la surexpression des protéines anti-apoptotique Bcl-XL ou de Bcl-2 dans ce type de cellule peut suffire à bloquer l'apoptose induite par FasL (Scaffidi et al., 1998). De même, l'activation de la caspase 8 peut aussi être inhibée par des protéines inhibitrices telles que l'homologue des caspases c-FLIP (cellular FLICE-like inhibitory protein). En effet, c-FLIP, en tant qu'inhibiteur compétitif, empêche le recrutement de la pro-caspase 8 au niveau du DISC, son clivage et donc son activation (Rasper et al., 1998) (Oztürk et al., 2012).



**Figure 9 : La voie apoptotique des récepteurs à domaine de mort (Fas/DR4/DR5)**

Suite à la liaison avec leurs ligands respectifs, FAS, DR4 et DR5 se multimérisent à la membrane plasmique ce qui induit le recrutement de la protéine adaptatrice FADD qui contient un domaine de mort (DD) lui permettant d'interagir de façon homotypique avec les récepteurs, et un domaine effecteur de mort (DED) recrutant la pro-caspase-8. Le complexe résultant de ces interactions est appelé complexe de signalisation induisant la mort (DISC). Ce complexe induit l'activation de la caspase 8 et sa libération dans le cytoplasme. cFLIP, un homologue de la caspase-8, peut inhiber de façon compétitive l'activation de cette dernière. Dans les cellules de type I, les caspases 8 induisent l'apoptose en clivant directement la pro-caspase 3. Dans les cellules de type II, les caspases 8 induisent indirectement l'apoptose via le clivage de Bid et l'activation de la voie mitochondriale. D'après (Thiery et al., 2015).

## 2. L'échappement tumoral au système immunitaire

Bien que les lymphocytes cytotoxiques précédemment décrits puissent limiter le développement tumoral, l'instabilité génétique des cellules tumorales, le microenvironnement tumoral ainsi que la pression de sélection imposée par le système immunitaire peut conduire, lors de l'immuno-édition, à l'émergence de cellules cancéreuses résistantes à la réponse immunitaire. Le système immunitaire perd alors le contrôle du développement de la tumeur primaire, ainsi que des processus d'invasion et de formation de métastases. Les mécanismes variés permettant aux cancers d'interférer et d'échapper au système immunitaire sont très étudiés afin d'augmenter *in fine* l'efficacité des approches d'immunothérapies anticancéreuses. Je m'appliquerai à décrire ces différents mécanismes d'échappement à l'immunosurveillance, intrinsèques et extrinsèques à la tumeur, dans les paragraphes suivants.

### 2.1. Mécanismes d'échappement intrinsèques aux cellules tumorales

#### 2.1.1. Echappement à la reconnaissance et perte de l'expression des molécules d'adhésion

Concernant l'échappement à la reconnaissance par les CTL, comme énoncé précédemment, la reconnaissance des cellules cibles tumorales par les CTL nécessite la liaison de leur TCR au complexe CMH-I/peptide ainsi qu'un signal de co-stimulation. Ainsi la reconnaissance des cellules cibles par les CTL peut être bloquée par l'absence de présentation d'antigènes par les cellules cancéreuses due à une altération de l'apprêtement ou de la présentation par le CMH des peptides antigéniques. En effet, entre 40 et 90% des tumeurs, issues de tissus CMH-I positifs, diminuent leur présentation d'antigènes pendant leur développement (Bubeník, 2003). Ces dysfonctionnements sont principalement causés par la perte d'expression des molécules de CMH-I. En effet, des mutations spécifiques, des pertes de fragments chromosomiques ou des déficiences au niveau de la transcription de certains gènes du *CMH-I* ou de la  *$\beta$ 2-microglobuline* (protéine nécessaire à l'expression du CMH-I), ont été détectées au niveau des tumeurs de nombreux patients (Korkolopoulou et al., 1996) (Gattoni-Celli et al., 1992). D'autre part, l'altération ou la diminution d'expression d'un ou des gènes codant pour les protéines impliquées dans l'apprêtement du peptide (Marincola et al., 2000) (Restifo et al., 1996) et dans le transport du peptide antigénique du cytoplasme vers le réticulum endoplasmique, conduisent également à une perte de reconnaissance. C'est le cas notamment des gènes *LMP* (Low Molecule weight Protein)-2 et -7 (des sous-unités catalytiques du protéasome) et de *TAP* (Antigen peptide transporter)-1 et *TAP-2*, des protéines nécessaires au transport des antigènes (Neefjes et al., 1993). De plus, le blocage *in vitro* et *in vivo*

d'expression des protéines membranaires de co-stimulation, B7-1 et B7-2 à la surface des cellules cancéreuses, induit la tolérance des lymphocytes cytotoxiques (Schwartz, 2003).

Concernant l'échappement à l'immunosurveillance dépendante des cellules NK, les cellules tumorales peuvent altérer les mécanismes de leurs reconnaissance en sur-exprimant par exemple des inhibiteurs des NK telles que les molécules du CMH-I (Classen et al., 2003), les molécules HLA-G (le ligand des récepteurs inhibiteurs KIR2DL4 et ILT-2) (Rouas-Freiss et al., 2005) et HLA-E (ligand de CD94/NKG2) (Rodríguez, 2017). De même, les cellules cancéreuses peuvent restreindre l'activation des cellules NK en inhibant l'expression des ligands de NKG2D (MICA, MICB, ULBP1-6) (Fernández-Messina et al., 2012). Cette inhibition est causée dans certains cas par l'engagement chronique des récepteurs des cellules NK par leurs ligands à la surface des cellules tumorales ou par le TGF- $\beta$  (Clayton et al., 2008) (Coudert et al., 2005) (Oppenheim et al., 2005). De plus, l'excrétion des ligands de NKG2D et NKp30 (MICA, B7-H6, BAG6) de la surface des cellules tumorales pourrait rendre ces cellules moins sensibles à la reconnaissance par les cellules NK puisque les ligands rendus solubles peuvent masquer les récepteurs des cellules NK. La présence de ces ligands solubles est d'ailleurs corrélée avec un mauvais pronostic chez les patients (Groh et al., 2002) (Reiners et al., 2013) (Salih et al., 2002) (Schlecker et al., 2014).

Finalement, LFA-1 (Lymphocyte function-associated antigen 1) et CD54 sont essentielles à la formation de la SI en interagissant avec la molécule d'adhésion ICAM-1 et permettent la bonne orientation des CG vers la cellule cible (Anikeeva et al., 2005) (Chong et al., 1994). Ainsi, les cellules cancéreuses peuvent perturber la formation de SI et échapper aux lymphocytes cytotoxiques en diminuant l'expression d'ICAM-1 (Gregory et al., 1988).

## **2.1.2. Instabilité génétique et résistance à la mort cellulaire induite par les cellules cytotoxiques**

### **2.1.2.1. Résistance à l'apoptose induite par la voie Perforine/Granzymes**

Les mécanismes à l'origine de la résistance à la lyse induite par la voie Perforine/Granzymes dépendent principalement d'altérations des voies de signalisation apoptotiques déclenchées au sein des cellules cancéreuses. En effet, au niveau des cellules tumorales, leur instabilité génétique peut contribuer à l'échappement tumoral aux CTL/NK en altérant la voie de signalisation apoptotique induite par le GzmB et dépendant de la mitochondrie. Par exemple, des mutations des protéines pro-apoptotiques Bax et Bak, identifiées dans certaines cellules tumorales, (Kholoussi et al., 2014) pourraient interférer avec le déclenchement de l'apoptose par le GzmB. En effet, certaines études suggèrent que dans les cellules cancéreuses dont l'apoptose est dépendante de Bak, les déficiences en Bak peuvent contribuer aux mécanismes d'évasion immunitaire (Wang et al., 2001). De plus, la



déficience des cellules cancéreuses en protéines pro-apoptotiques, telles que Bid (Waterhouse et al., 2005), leurs permet de résister à l'apoptose induite par les lymphocytes tueurs. D'autre part, cette voie apoptotique peut être inhibée par la surexpression des protéines anti-apoptotiques telles que Bcl-XL et Bcl-2 (qui inhibent la MOMP (Sutton et al., 1997) (Sedelies et al., 2008)) et certaines IAPs (Goping et al., 2003). D'ailleurs, ces protéines se retrouvent sur-exprimées dans de nombreux cancers (Sui et al., 2002) (Ferrandina et al., 2005) (Kiss et al., 2015). De plus, les cellules cancéreuses peuvent exprimer, après stimulation par l'INF-  $\gamma$ , la serpine SPI-6 (PI-9 chez la souris), un inhibiteur intracellulaire de l'activité du GzmB (Rousalova et al., 2010) (Ray et al., 2012).

#### 2.1.2.2. Résistance à la voie des récepteurs à domaine de mort

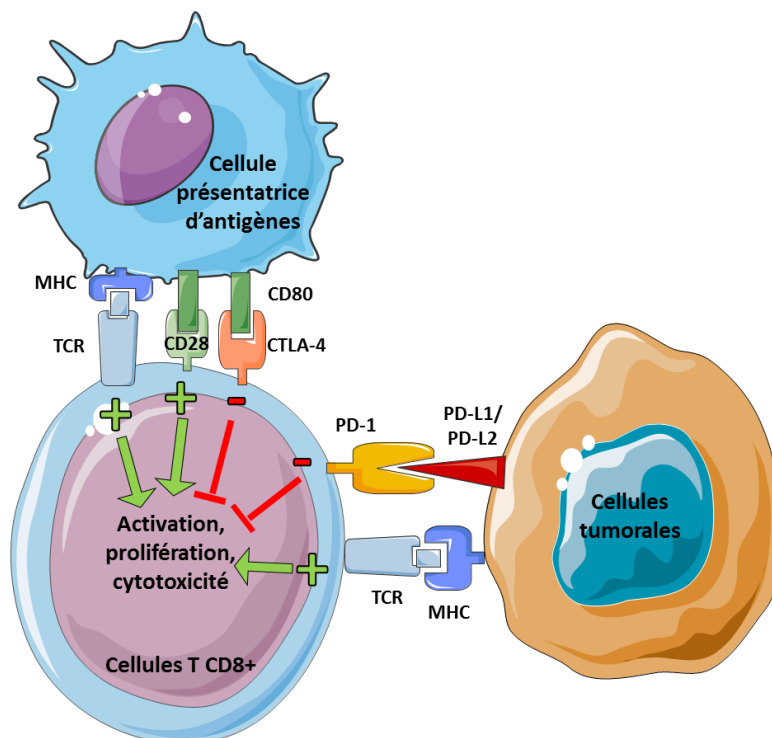
De même que pour l'apoptose induite par la voie PFN/GzmB, l'instabilité génétique peut contribuer à l'échappement tumoral aux CTL/NK en interférant avec les éléments de la voie des récepteurs à domaine de mort. En effet, des mutations des gènes codant pour les récepteurs FAS (Takahashi et al., 2006), DR5 (Shin et al., 2001) ou la pro-caspase-8 (Hopkins-Donaldson et al., 2003) identifiés dans certains cancers, leur permettent de résister à cette voie de lyse. De plus, la sur-expression de protéines anti-apoptotiques telles que les IAPs, BclxL, Bcl-2 et cFLIP sont impliquées dans la résistance à l'apoptose via cette voie (Hopkins-Donaldson et al., 2003) (Jäättelä et al., 1995) (Hinz et al., 2000). En effet, cFLIP inhibe le clivage de la pro-caspase 8 par compétitivité en étant recrutée à la place de la pro-caspase 8 au niveau du DISC grâce à son domaine effecteur de mort, sans pour autant exercer de fonction catalytique (Kataoka et al., 1998) (Shirley and Micheau, 2013). D'autre part, les cellules cancéreuses peuvent exprimer des récepteurs leurres (Decoy Receptor) pour TRAIL tels que DcR1, DcR2 et l'osteoprotegerin (OPG). Ces protéines se lient à TRAIL mais ne possèdent pas de DD fonctionnel et donc ne peuvent pas transmettre le signal pro-apoptotique (Marsters et al., 1999) (Miyashita et al., 2004). A noter que les voies de signalisation apoptotiques induites par la voie PFN/GzmB et la voie des récepteurs à domaine de mort, se rejoignent en partie, ainsi les mutations de Bax/Bak et la surexpression des protéines pro-apoptotiques peuvent altérer l'apoptose induite par ces deux voies (Dai et al., 2003).

## 2.2. Mécanismes d'échappement dépendants des points de contrôle immunitaires

### 2.2.1. Le principe des points de contrôle ou « checkpoints » immunitaires

L'échappement des cellules cancéreuses au système immunitaire peut être causé par l'épuisement du système immunitaire. Une des caractéristiques principales de l'épuisement des CTL et des NK est la perte de leurs fonctions effectrices, c'est-à-dire, leurs capacités de tuer les cellules tumorales et de sécréter les cytokines nécessaires à la mise en place et au maintien d'une

réponse immunitaire efficace. Leur mécanisme d'action cytotoxique, leur prolifération et leur survie peuvent être bloqués via l'expression et l'activation de récepteurs inhibiteurs ou checkpoints inhibiteurs (CI) tels que PD-1, Tim-3, CTLA-4, LAG-3 (Figure 10). Les CI forment un groupe hétérogène de marqueurs de surface qui contre-balancent l'activité des récepteurs costimulateurs en conditions homéostatiques afin de contrôler l'activité des cellules effectrices. Les CI peuvent diminuer l'activité des cellules cytotoxiques de deux façons, soit en se liant de manière compétitive aux récepteurs activateurs sans pour autant les activer, soit en déclenchant un signal inhibiteur via leur motif inhibiteur ITIM (Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition Motif) induisant la transcription de gènes inhibiteurs (Coxon et al., 2017). Au sein du microenvironnement tumoral, les CTL et les NK sont exposées en continu à des antigènes tumoraux et des cytokines immunosuppressives qui induisent la surexpression de CI. Plusieurs options thérapeutiques basées sur les CI sont entrées dans les pratiques cliniques et ont pour but d'inverser l'état d'épuisement des CTL/NK et promouvoir l'immunité antitumorale. Par exemple, au cours de la dernière décennie, de nombreux traitements basés sur les anticorps bloquants les CI ont donné des résultats encourageants voire spectaculaires et sont entrés sur le marché. L'intérêt envers les checkpoints inhibiteurs, a grandement augmenté après les résultats impressionnants de réduction de la masse tumorale et de réponse durable après un traitement anti-CTLA4 chez des patients atteints de mélanome (Hodi et al., 2010) et anti-PD-L1 chez des patients atteints de cancer du poumon ou de mélanome (Borghaei et al., 2015) (Larkin et al., 2015) (Darvin et al., 2018).



**Figure 10 : Mécanisme d'échappement tumoral par l'intermédiaire de « checkpoints » immunitaires.**

Les cellules cancéreuses peuvent échapper au système immunitaire en exprimant à leur surface des checkpoints inhibiteurs, c'est-à-dire des protéines pouvant se lier à des récepteurs inhibiteurs des CTL/NK ou leurs récepteurs activateurs sans pour autant les activer. Ici, PD-L1 et CD80 se lient à leurs récepteurs inhibiteurs respectifs PD-1 et CTLA-4, ce qui provoque l'inhibition de la prolifération et de la cytotoxicité des CTL, voire même induit leur apoptose. Les CTL sont alors incapables de tuer les cellules tumorales et de sécréter les cytokines nécessaires à la réponse immunitaire anti-tumorale.

## 2.2.2. Exemple de l'axe PD1/PD-L1

PD-1 (Programmed cell death protein 1/CD279), codé par le gène *PDCD1*, est une protéine exprimée constitutivement à la surface des cellules Treg, mais de façon induite à la surface des cellules NK, NKT, B et T lors de leur activation (Keir et al., 2008). Toutes les cellules effectrices activées expriment PD-1, qui n'est donc pas un marqueur spécifique de l'épuisement, mais qui participe au maintien de l'épuisement puisque son blocage peut réactiver les fonctions effectrices de cellules T épuisées (Barber et al., 2006). PD-1 est un checkpoint immunitaire puisqu'il fonctionne comme un régulateur de la réponse immunitaire que les cellules effectrices doivent « dépasser » pour exercer leurs fonctions. En effet, PD-1 s'active en se liant à son ligand PD-L1 (CD274/B7-H1) et/ou PD-L2 (CD273/B7-DC), et contrecarre les signaux positifs provenant du TCR (Freeman et al., 2000). Quand PD-1 se lie à son ligand, les motifs tyrosine de son domaine cytoplasmique sont phosphorylés, déclenchant une cascade de signalisation qui fait concurrence aux signaux d'activation (Sheppard et al., 2004). Cette voie de signalisation de PD-1 peut aussi inhiber la reprogrammation métabolique, lors de l'activation initiale des cellules T (Patsoukis et al., 2015), et la prolifération des cellules effectrices en sous-exprimant les protéines du cycle cellulaire (Patsoukis et al., 2012) et en inhibant la fonction des cellules T et leur sécrétion de cytokines telles que l'IFN- $\gamma$ , le TNF- $\alpha$ , et l'IL-2, nécessaires à leur survie (Quigley et al., 2010) (Wei et al., 2013). Ainsi, PD-1 contribue à la régulation de l'activation, la fonction, la tolérance et donc à l'adaptation des cellules T.

Le principal ligand de PD-1, PD-L1 (B7-H1, CD274) a été découvert initialement par la recherche d'immunoglobulines fortement exprimées à la surface des tissus cancéreux humains dans un contexte immunosuppresseur (Dong et al., 1999). PD-L1 est largement exprimé par certaines cellules cancéreuses (entre 5 et 40% selon les cancers (Xie et al., 2016) (Xiang et al., 2018)), et par les cellules T, B, DC, les cellules endothéliales vasculaires et stromales. L'expression du deuxième ligand de PD-1, PD-L2, plus restreinte que celle de PD-L1, peut se retrouver sur les cellules B, DC ou les macrophages. PD-L2 a une plus grande affinité pour PD-1 que PD-L1 mais est beaucoup moins exprimé (Ghiotto et al., 2010) (Latchman et al., 2001). L'expression de PD-L1 est principalement induite par la stimulation par l'IFN- $\gamma$ . Ainsi au sein du microenvironnement tumoral, l'IFN- $\gamma$  produit par les CTL et NK augmente l'expression de PD-L1, celui-ci se lie à PD-1 des lymphocytes cytotoxiques, transmet un signal inhibiteur et génère de l'immunosuppression (Dong et al., 2002) (Pauken and Wherry, 2015) (Curiel et al., 2003) (Ahmadzadeh et al., 2009).

Ce phénomène de résistance adaptative des tumeurs par la surexpression de PD-L1 est très étudié, tant au niveau de sa régulation que de son impact sur la réponse immunitaire et a donné lieu à de nouvelles thérapies détaillées au paragraphe 2.2.4.

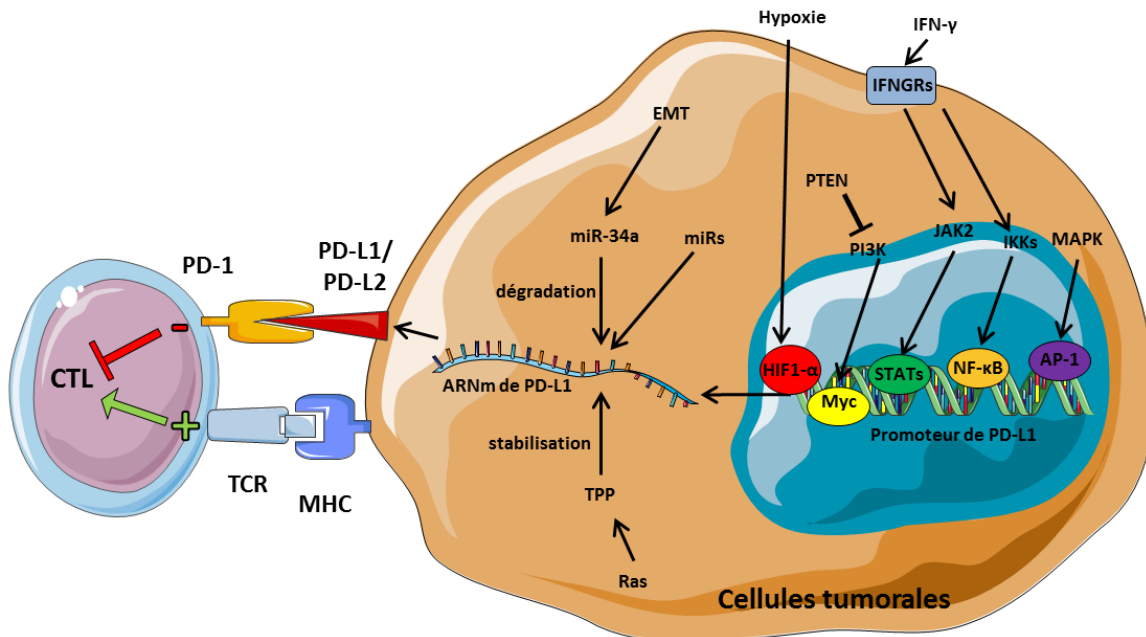
### 2.2.3. Régulation de l'expression de PD-L1

Comme évoqué précédemment, l'expression de PD-L1 est induite principalement par l'IFN- $\gamma$ , mais sa régulation au sein des cancers est complexe et fait intervenir de nombreux autres mécanismes à la fois aux niveaux génétique, épigénétique, transcriptionnel, traductionnel et post-traductionnel (Figure 11).

En effet, au niveau génétique, certaines tumeurs présentant une amplification du nombre de copies de PD-L1 produisent plus d'ARN messagers (ARNm) de PD-L1 (Budczies et al., 2016). D'autre part, au niveau transcriptionnel, plusieurs facteurs de transcription impliqués dans l'expression de PD-L1 ont été identifiés. Par exemple, STAT3, lui-même induit par l'IFN- $\gamma$ , est un des principaux facteurs de transcription modulant l'expression de PD-L1 en se liant à son promoteur (Marzec et al., 2008). NF- $\kappa$ B (nuclear factor-kappa B), principal facteur de transcription impliqué dans la tumorigénicité associée à l'inflammation, pourrait lui aussi stimuler l'expression de PD-L1 (Gowrishankar et al., 2015). Au contraire, PTEN (Phosphatase and TENsin homolog) semble inhiber l'expression de PD-L1 dans les cancers du sein via la voie PI3K (phosphoinositide 3-kinase) (Mittendorf et al., 2014). De plus, les voies de signalisation JAK2/STAT1 et MAPK pourraient elles aussi induire la surexpression de PD-L1 dans certains cancers (Chen et al., 2016). De plus, la fixation de HIF-1 $\alpha$ , un facteur de transcription associé à la réponse à l'hypoxie, au promoteur de PD-L1, stimule la transcription de PD-L1 (Noman and Chouaib, 2014). Ainsi, dans un microenvironnement hypoxique, les tumeurs surexpriment PD-L1 par l'activation de la voie HIF-1 $\alpha$  (Ban et al., 2017) (Marchiq and Pouyssegur, 2016).

Au niveau post-transcriptionnel, plusieurs Micro ARN (miRNA), définis comme des ARNs non codant de 22 à 24 nucléotides, peuvent réguler l'expression de PD-L1 (Wang et al., 2017) en se liant et dégradant son ARNm. Les principaux miRNAs impliqués sont mirR-513 (Gong et al., 2009), miR-570 (Wang et al., 2013b), miR-34a (Wang et al., 2015), miR-152 (Xie et al., 2017), miR-138 ((Zhang et al., 2017), miR-142-5p (Jia et al., 2017), miR-424 (Xu et al., 2016), miR-193a (Kao et al., 2017), miR-140/142/340/383 (Dong et al., 2018) et miR-200. Dans le cas de miR-200, il semblerait que la transition épithéliaux-mésenchymateuse (EMT) contrôle l'expression de PD-L1 grâce à ce miRNA (Chen et al., 2014b). Certains miRNA, tels que miR-20b, miR-21, miR-130b et miR-197, peuvent aussi affecter l'expression de PD-L1 de façon indirecte en modifiant l'expression de ses régulateurs (Zhu et al., 2014) (Fujita et al., 2015).

Plus récemment, des travaux ont identifié un nouveau mécanisme de stabilisation de l'ARNm de PD-L1 par la modulation de la TTP (tristetraproline protein), une protéine se liant aux éléments riches en AU de son ARN, elle-même modulée par la voie de signalisation oncogénique dépendante de Ras (Coelho et al., 2017).



**Figure 11 : Mécanisme de régulation de PD-L1**

PD-L1 est régulé par différents facteurs de transcription (STAT3, NF- $\kappa$ B, HIF-1 $\alpha$ , Myc...) appartenant à diverses voies (PTEN, JAK2, MAPK...), elles mêmes activées par différents types de stress ou des cytokines tels que l'hypoxie et l'IFN- $\gamma$ . De plus, de nombreux micro-ARN (miR) sont impliqués dans l'inhibition de l'expression de PD-L1 par dégradation de son ARNm. A l'inverse, certaines molécules telles que les TPP (tristetraprolin protein), activées par la voie oncogénique Ras, peuvent stimuler l'expression de PD-L1 en stabilisant son ARNm. Adapté de (Wang et al., 2018).

Enfin au niveau traductionnel et post-traductionnel, plusieurs mécanismes modulent la stabilité, la fonction et la durée de vie de PD-L1 tels que sa glycosylation, sa phosphorylation, son ubiquitination/déubiquitination, son repliement par des protéines chaperonnes, sa dégradation lysosomale et son transport à la membrane (Wang et al., 2018) (Zhang et al., 2018). Par exemple, les CMTM (CKLF Like MARVEL Transmembrane Domain Containing) 6 et 4, des protéines transmembranaires de type 3 présentes à la surface de certaines cellules cancéreuses, peuvent s'associer avec PD-L1, réduire son ubiquitination et ainsi augmenter la demi-vie de PD-L1 (Mezzadra et al., 2017).

#### 2.2.4. Immunothérapies ciblant l'axe PD1/PDL1

De nombreuses études *in vitro* et *in vivo* ont montré que le blocage de l'interaction PD-1/PD-L1 par des anticorps monoclonaux anti-PD1 ou anti-PD-L1 restaure l'activité des CTL, élimine la résistance tumorale et stimule l'immunité anti-cancéreuse (Ribas and Wolchok, 2018), (Sun et al., 2020). Ces résultats précliniques ont conduit au développement d'anticorps monoclonaux thérapeutiques bloquant PD-1 et PD-L1 pour lesquels la perturbation de la voie de signalisation de PD-1 a provoqué une réponse antitumorale durable chez certains cancers humains. Le premier anticorps anti-PD1, le nivolumab, a été approuvé en 2014 dans le traitement du mélanome avancé par la FDA (« Food and Drug Administration » américaine). Le Pembrolizumab (Keytruda®), comme le nivolumab (Opdivo®), ciblent PD-1, alors que l'atezolizumab

(Tecentriq®), l'avelumab (Bavencio®) et le durvalumab (Imfinzi®) bloquent PD-L1 (Abril-Rodriguez and Ribas, 2017). Ces agents thérapeutiques ont été approuvés pour le traitement d'une grande variété de cancers, tels que le mélanome métastatique, le cancer du poumon non à petites cellules et de nombreux autres cancers (Sundar et al., 2015), (Hamid et al., 2013), (Brahmer et al., 2012). Ces agents inhibent les effets régulateurs de PD-L1 via PD-1 chez les lymphocytes de patients ; en résulte l'amélioration de l'activité immunitaire préexistante antitumorale. Ils augmentent la prolifération des cellules T infiltrant la tumeur et la clonalité du répertoire des TCR des populations de cellules T spécifiques de la tumeur (Tumeh et al., 2014). Ces effets profitent directement aux patients dont la réponse immunitaire est significative et durable contre leur tumeur, avec des réponses complètes pouvant durer plusieurs années dans certains cas. La thérapie par anticorps monoclonaux anti-PD-1/PD-L1 est alors devenue le fer de lance des thérapies contre les cancers en stade avancé. Malgré un bon taux de réponse et une réponse durable à la thérapie anti-PD-1, certains patients ne répondent pas au traitement ou finissent par rechuter. Il est donc important d'identifier les marqueurs prédictifs de réponse (comme par exemple la charge mutationnelle des tumeurs, le type de mutation, l'expression de PD-L1/PD1...), les mécanismes de résistance à ses thérapies (sous-expression de PD-L1...) et les moyens pour contourner ces résistances.

### 2.3. Développement d'un microenvironnement immunosuppresseur

Les propriétés intrinsèques aux cellules néoplasiques (instabilité génétique, expression de ligands des checkpoints immunitaires...) ne sont pas les seuls facteurs impliqués dans l'échappement tumoral puisqu'ils ne peuvent pas par exemple, expliquer pourquoi certaines tumeurs présentant des antigènes immunogéniques et une expression normale du CMH-I ne sont pas reconnues et éliminées par le système immunitaire. L'explication, au moins en partie, repose sur le microenvironnement tumoral (MET). Le MET est un ensemble complexe d'interactions entre les cellules tumorales et des cellules non transformées hétérogènes qui communiquent entre elles à l'aide de facteurs et de cytokine pouvant être pro-inflammatoires ou immunosuppresseurs au sein d'une matrice extracellulaire modifiée (Binnewies et al., 2018). En effet, les cytokines sécrétées au niveau du MET peuvent agir sur les CTL et les NK directement ou indirectement à travers les DC intratumorales ou les macrophages, pour les rendre « anergiques », c'est-à-dire incapable de répondre aux stimuli nécessaires à l'induction d'une réponse immunitaire adéquate (Mocellin et al., 2001). De même, la présence de cellules T régulatrices (Treg), des cellules suppressives dérivées de myéloïdes (MDSC/myeloid-derived suppressor cells) et d'autres cellules immunitaires pro-tumorales génère un impact négatif sur les fonctions des lymphocytes cytotoxiques et sur la destruction de la tumeur. Enfin, les conditions physico-chimiques du MET telles que l'hypoxie

peuvent perturber la réponse immunitaire antitumorale (Hinshaw and Shevde, 2019).

### **2.3.1. Les facteurs immunosuppresseurs solubles présents au sein du microenvironnement tumoral**

Les cytokines sécrétées et autres facteurs immunosuppresseurs présents dans le MET au niveau de la matrice extracellulaire (MEC), peuvent être produits par les cellules cancéreuses elles-mêmes mais aussi par les cellules non transformées environnantes, qui sont un composant majeur de MET, et qui seront décrites dans le chapitre suivant :

- **VEGF** (Vascular Endothelial Growth Factor): En plus de ses fonctions pro-angiogéniques (Orimo et al., 2005), le VEGF possède de multiples rôles immunorégulateurs (Li et al., 2016). Par exemple, le VEGF contribue à protéger les cellules tumorales de la réponse immunitaire antitumorale en inhibant la génération et la maturation des DC (Dikov et al., 2005), (Gabrilovich et al., 1998), (Gabrilovich et al., 1996), notamment en réduisant leur expression de CMH-II et leur capacité à capturer des antigènes. De plus, le VEGF participe au recrutement des Tregs et des MDSC au sein de la tumeur (Mace et al., 2013), (Christiansen et al., 2016).
- **TGF beta** : Cette cytokine favorise la mort cellulaire des cellules T CD8+ en inhibant l'expression la protéine pro-survie Bcl-2 (Sanjabi et al., 2009) et en inhibant l'expression de gènes clés impliqués dans leur activité cytotoxique (perforine, granzymes A et B, FasL et IFN- $\gamma$ ) (Ahmadzadeh and Rosenberg, 2005) (Thomas and Massagué, 2005). Le TGF- $\beta$  est aussi impliqué dans l'inhibition de l'activité cytotoxique des cellules NK en induisant la transcription de miR-183 qui a pour conséquence de réduire l'expression des récepteurs activateurs NKp30 et NKG2D (Castriconi et al., 2003), (Donatelli et al., 2014), (Park et al., 2011). De plus, le TGF- $\beta$  réduit aussi la sécrétion d'IFN- $\gamma$  par les cellules NK, limitant ainsi la stimulation des cellules CD4+ Th1 antitumorales (Flavell et al., 2010), (Trotta et al., 2008), (Laouar et al., 2005).
- **IL10** : Cette cytokine immunosuppressive supprime la capacité des DC et des macrophages à stimuler la prolifération des cellules CD4+ spécifiques des TAA (Haase et al., 2002) en provoquant l'expression par les macrophages de la ligase March-1 qui empêche l'expression du CMH-II et de CD86 (Mittal et al., 2015), (Thibodeau et al., 2008). De plus, l'IL10 peut perturber les voies de signalisation de l'IFN- $\gamma$  et des TLR (Toll Like Receptor) essentielles à l'activation des macrophages et des DC (Mittal et al., 2015).
- **IDO** (Indoleamine-pyrrole 2,3-dioxygenase): L'IDO inhibe la réponse immunitaire des cellules T CD8+ (Mantovani et al., 2017). De plus, l'IDO diminue l'expression de plusieurs récepteurs activateurs des cellules NK (tels que NKp30, NKp44 et NKG2D) ainsi que

l'expression de la perforine et du granzyme B (Balsamo et al., 2009), (Li et al., 2012), (Li et al., 2013) ce qui atténue l'activité cytotoxique des NK envers leurs cellules cibles cancéreuses. De plus, l'IDO (Chen et al., 2014a), (Meisel et al., 2004), pourrait contribuer à l'immuno-suppression, la tolérance et l'échappement tumoral en catabolisant la dégradation du tryptophane en kynurenines (Kyn) contribuant à l'anergie des cellules T et l'apoptose induite par la déplétion de tryptophane et l'accumulation de catabolites de tryptophane immuno-suppressifs (Fallarino et al., 2002), (Platten et al., 2012).

- Arginase 1 et 2 : Ces enzymes participent à la déplétion de l'arginine du MET ce qui inhibe la prolifération et les fonctions des cellules T (Powell and Huttenlocher, 2016), (Shaul and Fridlender, 2017), (Timosenko et al., 2017).
- PGE2 : La Prostaglandine E2 diminue l'expression des récepteurs activateurs des cellules NK, de la perforine et du granzyme B (Li et al., 2012) et limite ainsi les fonctions cytotoxiques des cellules NK (Demotte et al., 2008).
- ROS : Les ROS favorisent le recrutement et les fonctions immunosuppressives ainsi que le stade non différencié des MDSCs (Ohl and Tenbrock, 2018). Les ROS peuvent même altérer les molécules de TCR et de CD8 et perturber les capacités des CTL à se lier aux molécules de CMH des cellules cancéreuses, ce qui empêche la reconnaissance des cellules cancéreuses et favorise la tolérance immunitaire (Nagaraj et al., 2007). De plus, les ROS peuvent induire l'expansion des Tregs (Huang et al., 2006), (Nagaraj et al., 2013) et supprimer la prolifération et les fonctions antitumorales des cellules NK (Fortin et al., 2012), (Zhu et al., 2012) et des cellules B (Lelis et al., 2017).
- iNOS (Inducible Oxyde Nitrique Synthase) : Ce super-oxide, en coopération avec l'arginase 1, bloque la prolifération et la fonction des cellules T (Bronte et al., 2003), (Mazzoni et al., 2002). De plus, la stabilisation de l'ARNm de l'IL-2 par des facteurs de transcription et l'expression du récepteur de l'IL-2 au sein des cellules tueuses peuvent être inhibées par l'oxyde nitrique (NO) issu de la dégradation de L-Arginine par iNOS (Bronte and Zanovello, 2005).

### **2.3.2. Les cellules immunosuppressives présentes dans le microenvironnement tumoral**

Les facteurs immunosuppresseurs décrits précédemment sont à l'origine d'un réseau immunosuppresseur complexe au sein du MET. Comme énoncé ci-dessus, ils peuvent être sécrétés par les cellules tumorales elles mêmes, ou par des cellules immuno-suppressives présentes au niveau du MET, et permettent à la fois un recrutement de ces cellules immuno-suppressives et un dialogue (ou « crosstalk ») complexe entre cellules tumorales, cellules du stroma tumoral et cellules immunitaires. Les principales cellules immuno-suppressives (lymphocytes T régulateurs (Treg),



MDSC (Myeloid-Derived Suppressor Cells), macrophages associées aux tumeurs (TAM) et fibroblastes associées à la tumeur (CAF/Cancer-Associated Fibroblast)) sont décrites ci-dessous :

- Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> régulateurs (Tregs) :

Ces cellules ont des propriétés pro-tumorales et favorisent l'anergie des CTL (Damo and Joshi, 2019) en produisant divers facteurs immunosuppressifs tels que le TGF- $\beta$  (Gorelik and Flavell, 2001), l'IL-10 (Sawant et al., 2019), l'IL-35 (Collison et al., 2007) et de l'AMP (adenosine-monophosphate). En particulier, l'AMP qu'elles produisent supprime les fonctions des CTL grâce à l'activation du récepteur d'adénosine 2A (A2AR) (Kobie et al., 2006). De plus, l'exposition de cellules T CD4<sup>+</sup> conventionnelles au TGF- $\beta$  favorise leur différenciation en Treg elles-mêmes productrices de TGF- $\beta$ , ce qui crée une boucle de rétroaction positive génératrice de Treg (Tran et al., 2007). D'autre part, les Tregs favorisent la progression tumorale en inhibant le recrutement et/ou la différenciation des monocytes inflammatoires (Pommier et al., 2013) et en supprimant les fonctions des autres cellules immunitaires (CTL, cellules T CD4<sup>+</sup>, cellules B, cellules NK, DC...) (Vignali et al., 2008). Par exemple, les Tregs peuvent diminuer la quantité d'IL2 soluble au sein du MET ce qui altère la survie des CTL (Fontenot et al., 2005). De plus, il semblerait que les Treg puissent être cytotoxiques en sécrétant de la PFN et du GzmB (Gondek et al., 2005), (Cao et al., 2007), ce qui peut induire la mort des DC présentes dans les ganglions lymphatiques drainant la tumeur et donc limiter la réponse des CTL (Boissonnas et al., 2010).

- Les MDSC

L'appellation MDSC correspond à un groupe hétérogène de cellules immunosuppressives présentes dans les tumeurs qui proviennent de cellules myéloïdes et sont caractérisées chez l'homme par l'expression de Gr1 and CD11b (Bronte et al., 1999). Les MDSC inhibent les populations de l'immunité innée et adaptative en produisant de l'arginase-1, de l'iNOS, du TGF- $\beta$ , de l'IL-10 et de l'IDO. Selon certaines études, les MDSC pourraient également directement perturber l'interaction entre les complexes MHC-I-peptide et le TCR des CTL par la nitration des tyrosines (Nagaraj et al., 2007). De plus, ces cellules permettraient d'établir des niches pré-métastatiques et de recruter les autres cellules immunosuppressives au sein des tumeurs (Lindau et al., 2013).

- Les macrophages de type 2

Les TAM (Tumor Associated Macrophages) sont des cellules de l'immunité innée présentes dans de multiples cancers, pouvant se polariser en macrophages immunosuppressives de type M2.

Ces cellules favorisent à la fois l'initiation et la promotion du développement de la tumeur, le développement de métastases, l'angiogenèse et l'immunosuppression (Yang and Zhang, 2017). En effet, les macrophages polarisées en M2 contribuent à la suppression de la prolifération des CTL par la production de ROS, dépendante du métabolisme de l'arginine (Lu et al., 2011). De plus, le PGE2, l'IL-10 et l'IDO sécrétés par les macrophages de type 2 induisent la formation de Treg et les chimiokines CCL17, CCL18 et CCL22 provenant des TAM attirent les Tregs au sein de la tumeur, favorisant ainsi la suppression de CTL (Bingle et al., 2002). D'autre part, il semblerait que la production d'IL-23, d'IL-6 et de IL-17 par les macrophages de type 2 contribue à la progression de certains cancers (Grivennikov et al., 2012), (Kong et al., 2016). De plus, les macrophages de type 2 stimulent l'angiogenèse en sécrétant du PDGF (platelet-derived growth factor), du VEGF, du TNF- $\alpha$ , de l'IL-1 $\beta$  et de l'IL-8 (Qian and Pollard, 2010). Enfin, des études suggèrent que les macrophages de type 2 peuvent promouvoir le développement de niches près-métastatiques de façon dépendante de STAT6 (Binnemars-Postma et al., 2018).

- Les CAF

Les CAF correspondent à une sous-population de fibroblastes caractérisées par l'expression des marqueurs de fibroblastes activées comme par exemple  $\alpha$ -SMA ( $\alpha$ -smooth muscle actin) et FAP (fibroblast activation protein) (Franco et al., 2010). Ces CAF favorisent la croissance tumorale et altèrent la réponse immune antitumorale en sécrétant divers facteurs de croissance et cytokines immunosuppressives (Ziani et al., 2018). Par exemple, les CAF sécrètent du TGF- $\beta$  qui altère la fonction des cellules NK en diminuant leur production d'IFN- $\gamma$  et leur expression de récepteurs activateurs (NKp44, NKp30, NKG2D). De plus, l'expression de NKG2D peut être aussi réprimée par la sécrétion d'IDO et de PGE2 par les CAF (Balsamo et al., 2009), (Pietra et al., 2012). Par ailleurs, les CAF peuvent diminuer la sensibilité des cellules cancéreuses à la lyse par les NK en sécrétant des métallo-protéase dans le MET, qui ont la propriété de réduire l'expression des ligands de NKG2D et MICA/B par les cellules cancéreuses (Pietra et al., 2012). De plus, les CAF altèrent les fonctions cytotoxiques des CTL en favorisant, par la sécrétion de cytokines, l'activation et le recrutement d'autres cellules immunosuppressives telles que les Treg (grâce à leur sécrétion de TGF- $\beta$  et de PGE2), les MDSC (par la sécrétion IL6, SDF1, CCL2) ou la polarisation des macrophages en TAM de type 2 (via la sécrétion de SDF1, IL-6, M-CSF, CCL2 et Chi3L1). De plus, les CAF peuvent aussi altérer la fonction et la prolifération des cellules T par différents mécanismes (Takahashi et al., 2015), reposant sur la production de facteurs de reprogrammation métabolique (tels que IL6, CXCL8, TNF ou TGF- $\beta$ ) (Ziani et al., 2018).

### **2.3.3. L'hypoxie, une condition physico-chimique immunosuppressive du microenvironnement tumoral**

Les conditions physico-chimiques de la MEC tumorale peuvent jouer sur l'inhibition du système immunitaire, en particulier le manque d'oxygène appelé hypoxie (Noman et al., 2015). En effet, certaines études ont démontré que, en conditions hypoxiques, les cellules tumorales résistent plus à la lyse induite par les CTL, selon un mécanisme dépendant de STAT3 (Noman et al., 2011). L'hypoxie contribue aussi à la reprogrammation des DC et perpétue l'inflammation tumorale via l'induction d'un phénotype pro-inflammatoire des DC (Bosco and Varesio, 2012), (Terry et al., 2017). De plus, en condition hypoxique, les cellules tumorales sécrètent de nombreuses cytokines telles que de l'EMAP-II (endothelial monocyte-activating polypeptide II) (Youssef et al., 2006), du VEGF (Chouaib et al., 2012), de l'endothéline 2 (Grimshaw et al., 2002) et du MCP-1/CCL2 (monocyte chemotactic protein-1) (Sceneay et al., 2012). La sécrétion de ces cytokines induit l'accumulation de TAM et de Treg au sein du MET. Ces cellules produisent du TGF- $\beta$  et suppriment la prolifération et l'activité des cellules NK (Flavell et al., 2010). De plus, il semblerait que l'hypoxie contribue à l'échappement de l'immuno-surveillance par les cellules NK en augmentant la sécrétion de MIC soluble (Siemens et al., 2008). Enfin, l'hypoxie tumorale réduit la susceptibilité à la lyse par les NK des cellules cancéreuses par un mécanisme entraînant l'activation de l'autophagie dégradant le granzyme B provenant des NK (Baginska et al., 2013), (Messai et al., 2014).

## **3. La protéine suppresseur de tumeurs p53**

### **3.1. La découverte de P53 : oncogène ou gène suppresseur de tumeur ?**

La protéine p53 a été découverte en 1979 à l'issue de deux séries d'études complémentaires. Cette protéine a tout d'abord été identifiée, par immuno-précipitation, comme protéine d'une masse de 53KDa interagissant avec l'antigène T de SV40 (virus simien 40) dans des cellules cancéreuses de souris transformées par ce virus (Kress et al., 1979), (Lane and Crawford, 1979). Dans une deuxième étude, p53 a été fortement détectée dans des tumeurs induites par divers produits chimiques (DeLeo et al., 1979). D'autre part, p53 a présenté la capacité à transformer en cellules cancéreuses des fibroblastes d'embryons de rat (Eliyahu et al., 1984) et à immortaliser des cellules après transfection de son gène dans ces cellules (Jenkins et al., 1984). Ainsi, il a été émis l'hypothèse que p53 serait un oncogène potentiel favorisant la transformation des cellules saines en cellules cancéreuses.

Cependant, douze ans plus tard, des chercheurs se sont rendu compte que l'ADN

complémentaire de p53 ayant servi aux premières études contenait une mutation de p53 (Finlay et al., 1989). Les études suivantes ont alors montré que p53 sauvage (WT/wild type) n'était pas un oncogène mais au contraire un puissant gène suppresseur de tumeurs. En effet, lorsque des cellules d'ostéosarcome p53<sup>-/-</sup> ont été transfectées avec le gène sauvage de p53, celles-ci ont perdu certaines de leurs caractéristiques cancéreuses (Chen et al., 1990). D'ailleurs, le gène de p53, *TP53*, est le gène le plus fréquemment muté dans les tumeurs solides humaines, tels que le cancer du sein triple négatif, le cancer du poumon, le carcinome épidermoïde de la tête et du cou, le cancer ovarien de haut-grade ainsi que le cancer de la prostate (Kandoth et al., 2013). De plus, la fonction de suppresseur de tumeurs de p53 se retrouve au travers de la forte prédisposition à développer des tumeurs des souris *TP53*<sup>-/-</sup> ainsi que des personnes atteintes du syndrome de Li-Fraumeni dont un des allèles de *TP53* est muté de manière constitutive (Brady and Attardi, 2010), (Magnusson et al., 2012). De manière intéressante, selon certaines études, cette caractéristique de suppresseur de tumeurs serait particulièrement accentuée chez les éléphants africains du fait qu'ils possèdent 20 copies du gène *TP53*. Cette particularité expliquerait la meilleure réponse aux dommages à l'ADN par rapport aux autres cellules de mammifères et le faible taux d'incidence de cancer chez ses éléphants (Abegglen et al., 2015).

### 3.2. Structure du gène et de la protéine p53

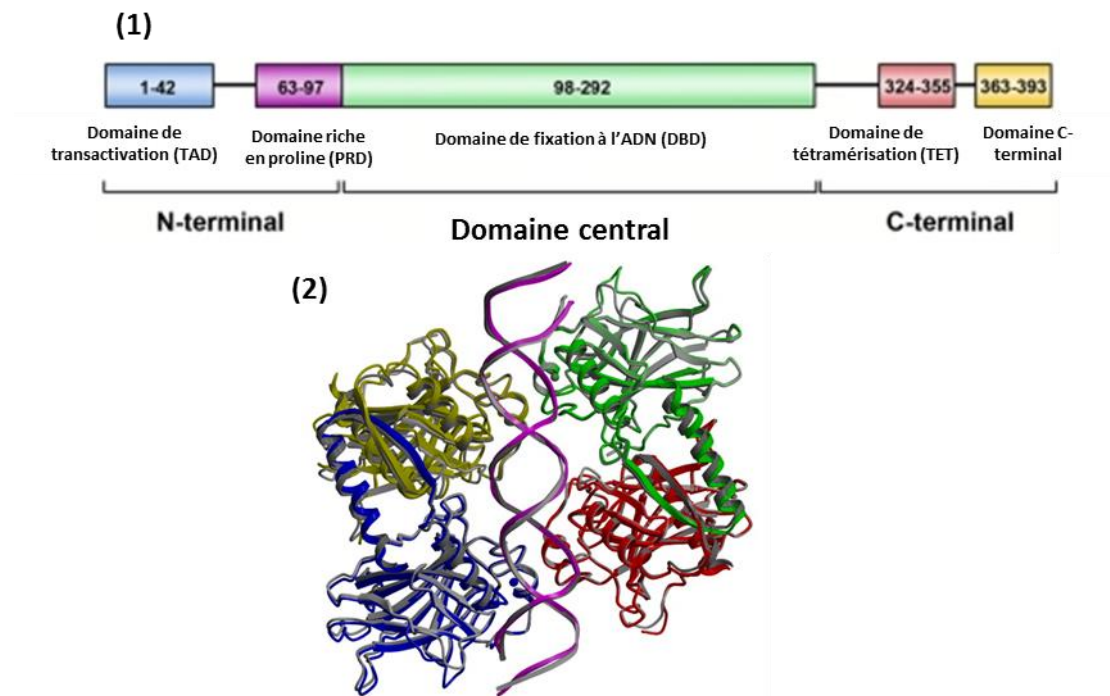
Chez l'homme, le gène *TP53* est composé de 11 exons et 10 introns codant pour un ARNm d'une longueur de 2,2 Kb. Ce gène se situe en position 17p13.1 du bras court du chromosome 17 et code pour de nombreuses isoformes différentes du fait qu'il possède deux promoteurs, deux sites d'initiation de la traduction et que son ARNm subit un épissage alternatif (Khoury and Bourdon, 2010). L'isoforme  $\alpha$ , la plus longue générée à partir du premier promoteur, code pour la forme WT de p53 composée de 393 acides aminés (Lamb and Crawford, 1986). Les autres isoformes, générées à partir du deuxième promoteur, traduites à partir du deuxième site de traduction ou subissant un épissage alternatif, conduisent à la production d'une p53 généralement tronquée et/ou non fonctionnelle, celles-ci peuvent être exprimées dans des tissus sains et dans certains tissus cancéreux (Khoury and Bourdon, 2010).

La protéine p53 fait partie d'une famille de facteur de transcription comprenant deux autres membres, p73 et p63, identifiés en 1997 (Yang et al., 1998), (Kaghad et al., 1997). Celles-ci possèdent des homologies structurales et fonctionnelles avec p53, notamment au niveau du domaine de liaison à l'ADN, ce qui leur permet de transactiver des gènes cibles de p53 voire même d'aider p53 à déclencher l'apoptose ou l'arrêt du cycle cellulaire (Flores et al., 2002). P73 et p63 possèdent cependant leurs propres fonctions différentes de celles de p53 (Murray-Zmijewski et al., 2006) mais l'épissage alternatif de leur ARNm génère des isoformes non fonctionnelles pouvant perturber les

fonctions de p73, p63 et p53 WT (Levrero et al., 1999).

La protéine p53 possède une structure primaire divisible en trois domaines (Figure 12) : un domaine N-terminal (de Met<sup>1</sup> à Ser<sup>97</sup>), un domaine central (de Thr<sup>102</sup> à Lys<sup>292</sup>) et un domaine C-terminal (de Pro<sup>301</sup> à Asp<sup>393</sup>).

- Le domaine N-terminal (100 acides aminés) comprend un sous domaine acide de transactivation (TAD/transactivation domain) et un sous domaine polyproline (PRD/proline-rich domain) (Walker and Levine, 1996) (Chang et al., 1995). Le TAD permet de recruter les composants du complexe TFIID (Transcription Factor IID), la sous unité TBP (TATA-Box Binding Protein) et des protéines TAF (TBP-Associated Factors), nécessaires à la transcription des gènes cibles (Lu and Levine, 1995). Ce domaine permet également le recrutement de MDM2, impliqué dans l'inhibition de p53, son ubiquitination et sa dégradation par le protéasome (Piette et al., 1997). Le PRD permet la liaison avec les protéines possédant des domaines SH3. Ce sous domaine est impliqué dans la stabilité de p53, sa dégradation par la protéine E6 du papillomavirus HPV16 et dans sa fonction non transcriptionnelle d'induction de l'apoptose (Thomas et al., 1999).
- Le domaine central de p53 constitue le domaine de liaison à l'ADN (DBD/DNA Binding Domain), en particulier à une séquence consensus (nommée aussi p53-RE/p53 responsive element) composée de deux copies du motif 5'-PuPuPu-C(A/T)(T/A)G-PyPyPy-3' séparées par un maximum de 13 nucléotides (Zhao et al., 2001). Le DBD a besoin d'un ion Zn<sup>2+</sup> pour se replier de façon fonctionnelle et se fixer sur les p53-RE présents dans les promoteurs des gènes cibles de p53 (Duan and Nilsson, 2006).
- Le domaine C-terminal de p53 est composé d'un sous-domaine charnière flexible, faisant le lien entre les domaines central et C-terminal, un sous-domaine d'oligomérisation, une séquence signal d'export nucléaire (NES/Nuclear Export Signal), d'import nucléaire (NLS/Nuclear localization sequence) et enfin un sous domaine C-terminal basique. Ce sous-domaine basique permet à p53 de se stabiliser et de s'activer en se liant de façon non spécifique aux cassures simples ou doubles brins de l'ADN (Bakalkin et al., 1994). Quant au sous-domaine d'oligomérisation, il est nécessaire à la tétramérisation indispensable à p53 pour agir comme facteur de transcription (Clore et al., 1995).



**Figure 12 : Représentation schématique et modélisation de la structure de la protéine p53**

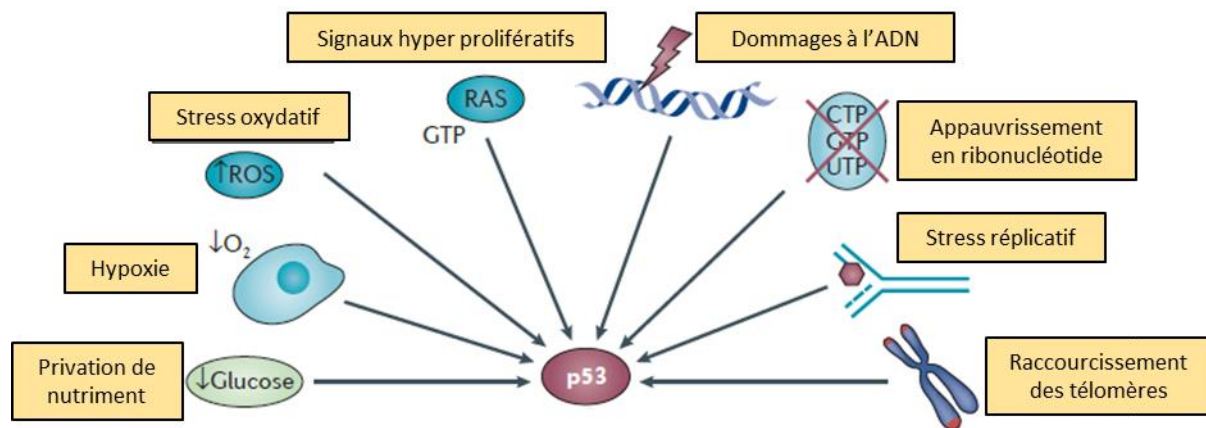
(1) Représentation schématique des domaines fonctionnels de p53 représentés par couleurs: en bleu, domaine de transactivation N-terminal (TAD)(acides aminés 1 à 42); en violet, domaine riche en proline (PRD)( acides aminés 61-97); en vert, domaine de liaison à l'ADN central (DBD)( acides aminés 102-292); en rouge, domaine de tétramérisation (TET) (acides aminés 324-355) et en jaune extrémité C terminale (CT)(acides aminés 301-393) contenant les séquences signales d'export nucléaire (NES) et de localisation nucléaire (NLS). D'après (Bernard et al., 2011). (2) Modélisation de la structure en trois dimensions de p53 liée à de l'ADN double brin. D'après (Emamzadah et al., 2011).

### 3.3. Activation, régulation et dégradation de p53

De nombreux stimuli (ou stress) intrinsèques ou extrinsèques perturbant notamment l'intégrité génomique engendrent des modifications post-traductionnelles (MPT) spécifiques de p53, ce qui l'active, la stabilise, régule sa fonction ou induit sa dégradation. Les phosphorylations des sérines et des thréonines, les méthylations, les sumoylations, les glycosylations, les ubiquitinations, les acétylations et les néddylations des lysines font partie des MPT que peut subir p53, se retrouvant surtout au niveau des domaines C- et N-terminaux (Bode and Dong, 2004).

#### ✓ Activation de p53

En conditions normales, p53 est présente sous une forme inactive et continuellement dégradée par MDM2. Sa demi-vie est ainsi très courte (5-20 minutes)(Haupt et al., 1997). Un stress cellulaire est ainsi nécessaire pour faire passer p53 sous sa forme active. Celui-ci est signalé par des « senseurs », des protéines capables de réagir à un stress et d'engendrer des MPT de p53 la rendant fonctionnellement apte à maintenir l'intégrité cellulaire. Le stress oxydatif, les signaux hyperprolifératifs, l'appauvrissement en nutriments et/ou en ribonucléotides, l'hypoxie et les dommages à l'ADN sont les principaux stress pouvant activer p53, générés notamment lors de l'initiation et du développement tumoral (Giaccia and Kastan, 1998) (Figure 13).



**Figure 13 : Les différents types de stress cellulaire activant p53**

Les stress cellulaires tels que le stress oxydatif, les signaux hyper-prolifératifs, l'appauvrissement en nutriments et/ou en ribonucléotides, l'hypoxie et les dommages à l'ADN sont détectés par des protéines « senseurs », qui engendrent en retour des modifications post-traductionnelles de p53 activant ainsi sa stabilisation et ses fonctions anti-tumorales. Adapté de (Biegging et al., 2014).

### ✓ Régulation de l'activité de p53

Les phosphorylations de sérines et thréonines et les modifications de lysines, provoquées par un stress cellulaire, sont des MPT jouant un rôle majeur dans l'activation de p53. En particulier, suite à des dommages à l'ADN, les Ser<sup>15</sup> et Ser<sup>20</sup> ainsi que la Thr<sup>18</sup> de p53 sont phosphorylées par la kinase ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated), ce qui induit un changement conformationnel augmentant l'affinité de p53 pour ses co-activateurs comme p300/CBP, et inhibe sa dégradation par une perte d'affinité de p53 pour MDM2 (Shieh et al., 1997). Des phosphorylations d'autres résidus favorisent également la liaison de p53 à sa séquence spécifique de l'ADN (Ashcroft et al., 1999). De plus, en réponse à de nombreux types de stress cellulaire, p53 est activée par la phosphorylation de différents résidus par des kinases telles que CHK1/CHK2 (Checkpoint Kinase 1 et 2), MAPK2 (Mitogen-Activated Protein Kinase), HIPK2 (Homeodomain-Interacting Protein Kinase 2), p38 kinase, PKC (Protein Kinase C), GSK3 $\beta$  (Glycogen Synthase Kinase 3  $\beta$ ), ERK (Extracellular signal-Regulated Kinases), JNK (c-JUN NH2 terminal Kinase), ATR (Ataxia Telangiectasia And Rad3 Related) et CDK (Cyclin-Dependent Kinase) (Kastenhuber and Lowe, 2017). De plus, la déphosphorylation de certains résidus, tels que la Ser<sup>376</sup>, peut aussi activer p53 (Stavridi et al., 2001). Quant aux lysines, elles peuvent être modifiées par différents MPT. Par exemple, l'acétylation par le facteur PCAF (Di Stefano et al., 2005) et l'ubiquitination par l'ubiquitine-ligase E4F1 de la Lys<sup>320</sup> semble favoriser l'arrêt du cycle cellulaire mais pas l'apoptose (Knights et al., 2006). D'ailleurs, l'arrêt du cycle cellulaire est aussi favorisé par l'ubiquitination de la Lys<sup>48</sup> par E4F1 (Le Cam et al., 2006). Par contre, l'ubiquitination de certaines lysines par MDM2 induit la dégradation de p53. D'autre part, la liaison de p53 avec son interactome peut être favorisée ou inhibée par la méthylation de lysine (Carr et al., 2012). Enfin, la sumoylation de p53 module positivement ou négativement sa fonction transcriptionnelle contrairement à la neddylation qui

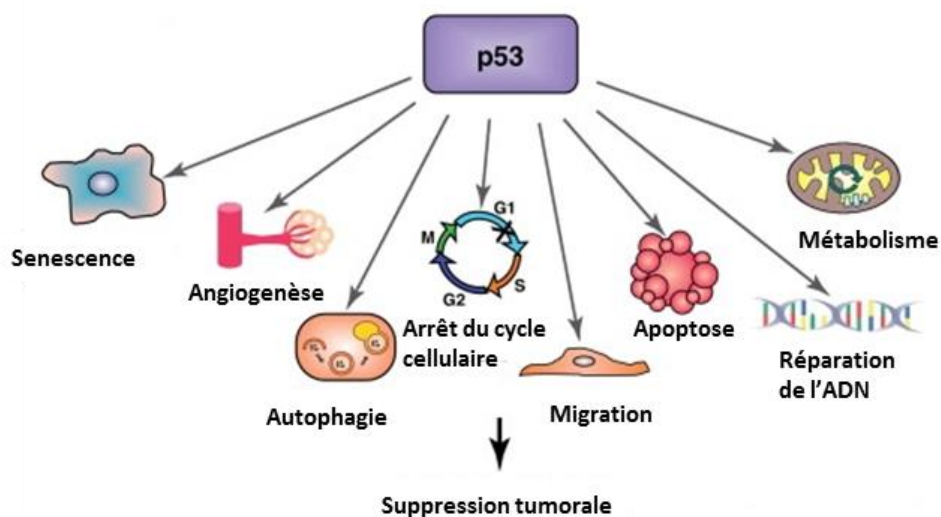
semble seulement l'inhiber (Bode and Dong, 2004)).

✓ Dégradation de p53

Le premier mécanisme de dégradation de p53 a été découvert en étudiant la protéine E6 du papillomavirus humain qui a la capacité de dégrader p53 (Thomas et al., 1999). Depuis, plusieurs ubiquitine-ligases, induisant la dégradation de p53 par le protéasome, ont été découvertes telles que MDM2. Cette ubiquitine-ligase de type E3, considérée comme un proto-oncogène, est exprimée de façon constitutive dans les cellules et participe à l'homéostasie de p53 en l'ubiquitinant, ce qui induit l'export nucléaire et la dégradation de p53 par le protéasome. Il existe d'autres ubiquitine-ligases E3 possédant des domaines proches de celui de MDM2 et pouvant cibler p53 (Pirh2 (P53-induced RING-H2), COP1 (COnstitutively Photomorphogenic 1), synoviolin...) mais leur action sur p53 semble moins prépondérante que celle de MDM2 (Chao, 2015). La dégradation de p53 par les ubiquitine-ligases est inhibée en réponse au stress, ce qui permet la stabilisation et l'activation rapide de p53 (Maki and Howley, 1997).

### 3.4. Fonctions anti-tumorales de p53

P53 est une protéine suppresseur de tumeur majeure notamment du fait de ses multiples fonctions biologiques limitant la croissance tumorale au sens large (Figure 14). Au cours des chapitres suivants, je vais détailler quelques-unes de ses fonctions en particulier son implication dans la régulation du cycle cellulaire, la régulation de l'apoptose, la régulation de la réponse immunitaire et la régulation de l'autophagie (Kaiser and Attardi, 2018) (Bieging et al., 2014) .



**Figure 14 : Rôle de p53 dans la suppression des tumeurs**

Parmi les fonctions anti-tumorales de p53, les premières à avoir été découvertes sont la sénescence, la réparation de l'ADN, l'apoptose, la sénescence et l'arrêt du cycle cellulaire. Plus récemment, il a été montré que p53 module aussi d'autres fonctions pouvant être anti-tumorales telles que l'autophagie, le métabolisme, la migration cellulaire et même l'angiogenèse. Adapté de (Bieging et al., 2014).



### 3.4.1. Régulation du cycle cellulaire

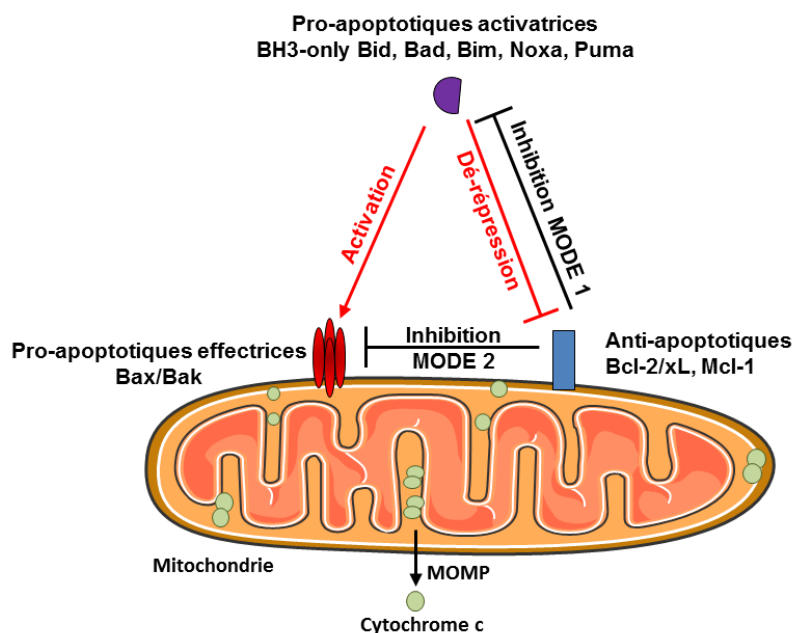
Une des premières fonctions de p53 ayant été découverte est son rôle dans l'induction de l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1. En effet, lorsque ATR ou ATM détectent des dommages à l'ADN (causés par un stress génotoxique, comme par exemple les radiations ionisantes), ces kinases activent p53 qui induit la transcription de gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire tels que p21(WAF1) ou Gadd45 (Growth Arrest and DNA Damage-45) (Brugarolas et al., 1995) (Kastan et al., 1992). P21, la première cible transcriptionnelle directe de p53 à avoir été identifiée, inhibe des kinases cycline-dépendantes (E/Cdk2 et D/Cdk4) bloquant transitoirement le cycle cellulaire en phases de transition G1-S et G2-M (Agarwal et al., 1995). Cet arrêt permet de laisser le temps nécessaire à la réparation du génome des cellules et contribue ainsi à réduire la propagation de mutations pouvant être oncogéniques (Lane, 1992). Cette fonction a ainsi amené à l'appellation de « gardien du génome » de p53. Cependant, il semblerait dans certains modèles murin, que l'arrêt du cycle cellulaire soit déclenché par d'autres gènes cibles de p53 et que la sensibilité au développement spontané de tumeurs ne soit pas exacerbée lorsque p21 ou Gadd45 sont inactivées (Martín-Caballero et al., 2001) (Hollander et al., 1999).

### 3.4.2. Régulation de l'apoptose

#### 3.4.2.1. Les mitochondries : carrefour de la mort

La mitochondrie, outre son rôle majeur dans la production d'énergie sous forme d'ATP nécessaire à la cellule, est particulièrement impliquée dans la modulation de la mort cellulaire, notamment par apoptose. Les mécanismes de contrôle par la mitochondrie de la mort cellulaire programmée font intervenir les protéines de la famille Bcl-2 (Banjara et al., 2020). Ces protéines ont la particularité de posséder quatre domaines conservés d'homologie BCL-2 (BH/Bcl-2 Homology) (BH1- 4). Le contrôle de l'apoptose est principalement dépendant du domaine BH3 présent chez toutes les protéines de la famille Bcl-2. Ces protéines s'inscrivent dans un réseau complexe d'interactions protéiques pouvant déclencher l'apoptose ou au contraire contribuer à la survie cellulaire (Chipuk and Green, 2008) (Youle and Strasser, 2008). En effet, les membres de cette famille de protéines, selon leur structure, sont soit anti-apoptotiques et inhibent la MOMP, c'est le cas de Bcl-2, Mcl-1 et Bcl-xL, soit pro-apoptotiques et induisent la MOMP. Parmi les protéines pro-apoptotiques, Bax et Bak, après une stimulation adéquate, génèrent la MOMP qui conduit à l'apoptose en s'oligomérisant sous forme de pores dans la membrane externe de la mitochondrie (Oltvai et al., 1993) (Chittenden et al., 1995). Ces pores permettent à la fois de stopper la production d'ATP par la mitochondrie et de libérer le cytochrome c pro-apoptotique dans le cytoplasme, celui-ci déclenchant une cascade d'activation des caspases débouchant sur la mort de

la cellule (Liu et al., 1996a). L'activité de Bax et de Bak est finement modulée, à la fois par des protéines anti-apoptotiques de type Bcl-2 et des protéines activatrices pro-apoptotiques, afin d'empêcher le déclenchement inopportun de l'apoptose et de maintenir l'intégrité cellulaire (Lindsten et al., 2000) (Wei et al., 2001) (Figure 15). En effet, certaines protéines, appelées BH3-only, telles que Bid, PUMA, NOXA, Bad, peuvent directement activer Bax et Bak (Huang and Strasser, 2000) ou inhiber les protéines anti-apoptotiques inhibitrices de Bax et Bak telles que Bcl-2, Mcl-1 et Bcl-xL (Huang et al., 2019). En effet, ces protéines anti-apoptotiques peuvent inhiber l'oligomérisation et la formation de pores en se liant directement avec Bax et Bak (« MODE 2 » d'inhibition) (Llambi et al., 2011) ou en maintenant Bax hors des mitochondries par rétro-translocation de Bax dans le cytosol (Edlich et al., 2011). Bcl-2 et Bcl-xL peuvent aussi empêcher l'activation de Bax et Bak en séquestrant les protéines BH3-only (« MODE 1 » d'inhibition) (Llambi et al., 2011). De plus, des protéines BH3-only, comme Bad, ciblent et séquestrent aussi les protéines anti-apoptotiques Bcl-xL/Mcl-1 qui ne peuvent plus réprimer les protéines Bax/Bak, ce qui provoque l'activation spontanée de Bax/Bak. Ainsi ces protéines BH3-only possèdent une activité de dé-répresseur et activent indirectement Bax/Bak en neutralisant les protéines de la famille Bcl-2 anti-apoptotiques ce qui induit la MOMP et l'apoptose (Huang et al., 2019). Compte tenu de l'importance de ses protéines dans le contrôle de la voie apoptotique mitochondriale, les protéines de la famille Bcl-2 représentent des cibles thérapeutiques potentielles (Green and Kroemer, 2005) (Strasser et al., 2011).



**Figure 15 : Mécanismes d'action des membres de la famille Bcl-2 impliqués dans la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe (MOMP)**

Les protéines activatrices de type BH3-only (comme Bid, Bad ou Bim) interagissent de manière transitoire à Bax ou Bak, ce qui induit leur insertion stable dans la membrane mitochondriale externe conduisant à la MOMP et à la libération de cytochrome c. Les protéines anti-apoptotiques inhibitrices (comme Bcl-2, Bcl-XL et Mcl-1) peuvent neutraliser les protéines pro-apoptotiques Bax et/ou Bak en formant des hétérodimères, limitant ainsi la capacité de ces protéines effectrices à former des pores dans la membrane mitochondriale externe (MODE 2 d'inhibition). Les membres inhibiteurs Bcl-2/Bcl-XL peuvent aussi séquestrer les protéines pro-apoptotiques activatrices et neutraliser leur action (MODE 1 d'inhibition). Ces protéines activatrices peuvent en retour dé-répresseur la MOMP en inhibant l'interaction entre Bax et/ou Bak et les protéines inhibitrices Bcl-2 ou Bcl-xL. Adapté de (Westphal et al., 2014).

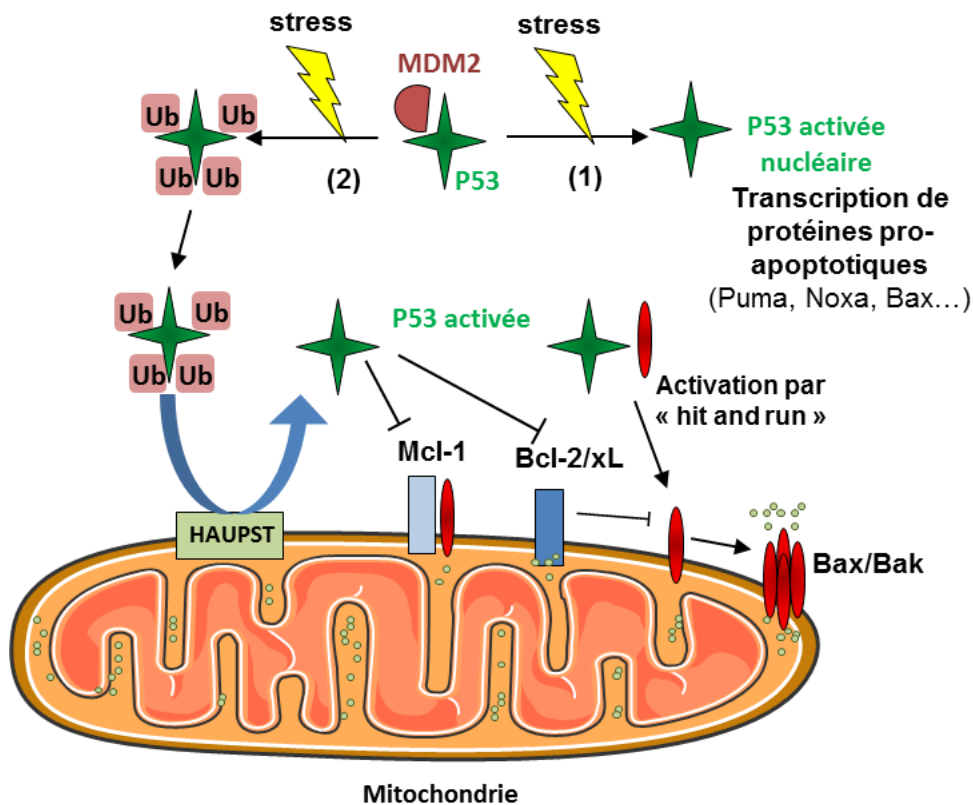
#### 3.4.2.2. Régulation par p53 de la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe

L'activité suppresseur de tumeur de p53 est également due en partie à sa capacité à contrôler la mort cellulaire programmée. Cette fonction agit majoritairement sur la voie apoptotique mitochondriale (Figure 16). En effet, p53 a pour gènes cibles des membres pro-apoptotiques de cette voie comme Bid, Noxa, Bax, Bak, Puma ou APAF-1, dont l'expression est induite par p53 selon le type de stimulation et le type de cellule (Vousden and Lu, 2002) (Nakano and Vousden, 2001) (Miyashita and Reed, 1995) (Oda et al., 2000). P53 peut aussi réprimer la transcription de gène codant pour des protéines anti-apoptotiques comme Bcl-2 (Miyashita et al., 1994) (Vousden and Prives, 2009) (Chipuk et al., 2010). P53 régule également l'expression de plusieurs microARNs (miRs), notamment miR34 impliqué dans la répression des protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et survivine (Hermeking, 2012).

D'autre part, P53 contrôle l'apoptose de façon non transcriptionnelle au niveau du cytoplasme et des mitochondries (Speidel, 2010) (Leu et al., 2004) (Mihara et al., 2003). En effet, suite à un stress cellulaire (dommages à l'ADN, hypoxie, activation d'oncogène...), p53 peut s'accumuler dans le cytoplasme ou au niveau des mitochondries et contribuer à l'activation de Bax et de Bak et ainsi au déclenchement de la MOMP (Arima et al., 2005) (Sansome et al., 2001) (Moll et al., 2006) (Chipuk et al., 2004). Cette translocation de p53 vers la mitochondrie serait modulée grâce à la multi/mono-ubiquitylation de plusieurs résidus de p53 par Mdm2 (Marchenko et al., 2007). A niveau de la mitochondrie, p53 est rapidement activée par désubiquitination par HAUSP (herpesvirus-associated ubiquitin-specific protease) et favorise la MOMP selon différents mécanismes. En effet, p53 peut interagir directement, via son DBD (Petros et al., 2004) avec des protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2, en particulier Bcl-xL et Bcl-2 (Bharatham et al., 2011) (Deng et al., 2006) et ainsi induire la déstabilisation des complexes tBid/Bax/Bcl-xL ou Bcl-2/Bax, la libération des protéines pro-apoptotiques et la MOMP (Mihara et al., 2003) (Petros et al., 2004) (Han et al., 2010b). Dans ce contexte, il a été démontré qu'un changement conformationnel de Bcl-XL suite à son interaction avec p53 WT facilite la dissociation des complexes Bcl-XL/Bax (Hagn et al., 2010) et que l'activité apoptotique de certains mutants de p53, ne possédant plus la capacité à se lier à Bcl-2/Bcl-xL, était amoindrie (Tomita et al., 2006). D'ailleurs, la formation de complexes p53/Bcl-XL ou p53/Bcl-2 « séquestre » en quelque sorte Bcl-xL et Bcl-2, les empêchant de maintenir Bax et Bak inactifs et conduisant ainsi à leur activation et à la MOMP (Mihara et al., 2003), conférant ainsi à p53 une activité de dé-répresseur similaire à celui de Bad. En parallèle, il a été également démontré que p53 activée par le stress était initialement liée, au niveau du cytosol, à Bcl-xL mais que Puma, dont l'expression est transcriptionnellement induite par p53, permettait de libérer p53 de cette interaction, lui permettant d'interagir avec Bak/Bax pour induire l'apoptose

(Chipuk et al., 2005) (Vousden, 2005). Il existerait donc un « dialogue » entre activité transcriptionnelle et non transcriptionnelle de p53. D'autre part, p53 semble interagir avec Bak au niveau de la membrane de la mitochondrie (Leu et al., 2004) (Mihara et al., 2003), ce qui libère Bak de sa séquestration par l'inhibiteur anti-apoptotique Mcl-1 et provoque son activation, la MOMP et la libération subséquente du cytochrome c (Sot et al., 2007).

Enfin, selon certaines études, p53 pourrait directement activer Bax dans le cytoplasme par un mécanisme de type « hit-and-run » consistant à induire un changement conformationnel de Bax sans interaction stable et sans l'aide d'autres protéines activatrices (Chipuk et al., 2004). Cette activation de Bax provoquerait sa translocation mitochondriale, son oligomérisation dans la membrane de la mitochondrie et la MOMP (Chipuk et al., 2003) (Speidel et al., 2006). Ainsi, que ce soit grâce à son activité transcriptionnelle ou son activité mitochondriale, p53 est un régulateur clé de l'apoptose induite par le stress cellulaire.



**Figure 16 : Implication de p53 dans la voie apoptotique dépendante des mitochondries**

(1) Suite à un stress, une fraction importante de p53 transloque vers le noyau pour induire la transcription de ses gènes cibles pro-apoptotiques Puma, Bid, Noxa, Bax, Bak... (2) Une autre fraction de p53 transloque vers la mitochondrie grâce à la poly-ubiquitylation de plusieurs résidus de p53 par Mdm2. Les p53 s'accumulent au niveau de la membrane de la mitochondrie grâce à la dés-ubiquitylation par HAUSP. Au niveau des mitochondries, p53 activée interagit avec les membres anti- et pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 : P53 interagit avec Bcl-xL et Bcl-2, ce qui permet la libération de Bax/Bak et leur oligomérisation en forme de pore dans la membrane mitochondriale externe. P53 active aussi Bak par interaction directe de type « hit and run ». De plus, p53 peut libérer Bak de son complexe inhibiteur avec Mcl-1. Ainsi, p53 se comporte comme une protéine pro-apoptotique activatrice de type BH3-only, en combinant à la fois l'activation des protéines pro-apoptotiques effectrices et l'inhibition/séquestration des protéines anti-apoptotiques.

### 3.4.3. Régulation de la réponse immunitaire

Durant cette dernière décennie, de nombreuses études ont établi l'importance de p53 dans la réponse immunitaire antitumorale. En effet, p53 peut agir à la fois sur l'immunité innée et l'immunité adaptative en modulant les voies de lyses induites par les CTL et les cellules NK. P53 peut également réguler indirectement l'activité de ses cellules en agissant sur leur recrutement, leur activation, leur inhibition et leur capacité de reconnaissance de leurs cellules cibles (Muñoz-Fontela et al., 2016).

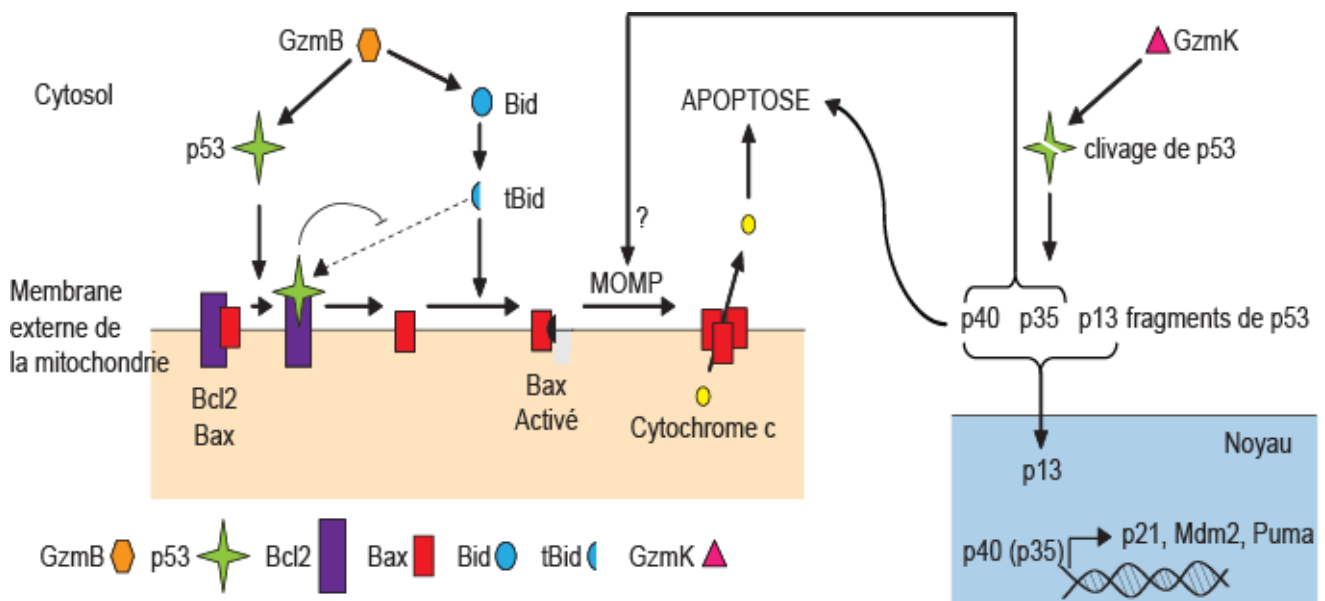
#### 3.4.3.1. Rôle de p53 dans la susceptibilité à la lyse induite par les effecteurs cytotoxiques

##### 3.4.3.1.1. Implication de p53 dans la modulation de l'apoptose induite par les granzymes

Plusieurs travaux ont montré l'implication de p53 sauvage dans la susceptibilité des cellules cancéreuses à l'apoptose induite par les Gzms (Figure 17). En effet, le GzmK peut cibler p53 et la cliver potentiellement au niveau de deux sites distincts, ce qui génère trois fragments pro-apoptotiques (p13, p35 et p40) (Hua et al., 2009). De plus, il se trouve que la susceptibilité des cellules cancéreuses à l'apoptose induite par le GzmK et les cellules NK est plus faible dans la lignée HCT116 p53<sup>-/-</sup> que dans la lignée HCT116 p53<sup>+/+</sup>. Cette observation révèle l'importance de p53 dans l'apoptose dépendante du GzmK et des cellules NK (Hua et al., 2009).

D'autre part, comme énoncé précédemment, p53 est très impliqué dans la modulation de l'expression et de l'activité de protéines anti- et pro- apoptotiques (Bax, Bcl-2/XL...) impliquées notamment dans la voie apoptotique PFN/GzmB, et participe ainsi au contrôle de la susceptibilité des cellules tumorales à cette voie (Thiery et al., 2015). En effet, plusieurs études réalisées au sein de notre laboratoire ont démontré l'importance de p53 dans le contrôle de l'apoptose induite par le GzmB. Il a ainsi été montré que les CTL et le GzmB induisent un stress cellulaire aboutissant à une activation et une accumulation rapide de p53 dans les cellules cibles, notamment tumorales, nécessaire à leur destruction par les CTL/NK ou le GzmB (Meslin et al., 2007). Au niveau mécanistique, le GzmB provoque un stress génotoxique rapide et sans doute transitoire conduisant à l'activation directe de l'endonucléase CAD, sa translocation au sein du noyau et l'induction de dommages à l'ADN. Ces dommages à l'ADN induisent l'activation rapide de la protéine hSMG-1, une kinase de stress de type PIKK ((PI3-kinase)- related kinases) (Brumbaugh et al., 2004), qui participerait à la phosphorylation, à la stabilisation et à l'activation rapide de p53 dans les cellules cibles en réponse au GzmB (Meslin et al., 2011). Par la suite, p53 activée s'accumule au niveau des mitochondries et interagit avec Bcl-2. Cette interaction empêche l'effet inhibiteur de Bcl-2 sur Bax et tBid (tronqué par le GzmB) et favorise la MOMP. Dans ce contexte, P53 jouerait donc le rôle d'un dé-répresseur (comme Bad par exemple). En conséquence, le blocage de l'interaction p53/Bcl-

2 diminue l'activation de Bax induite par le GzmB, la libération du cytochrome c de la mitochondrie et l'activation des caspases effectrices conduisant à la diminution de la susceptibilité des cellules cibles à la lyse par le GzmB et les CTL/NK (Ben Safta et al., 2015).



**Figure 17 : Implication de p53 dans la voie de signalisation apoptotique du granzyme B.**

Le GzmB induit la stabilisation, l'activation rapide de p53 et son accumulation au niveau des mitochondries des cellules cibles. P53, en interagissant avec la protéine anti-apoptotique Bcl-2, libère la protéine pro-apoptotique Bax de son complexe inhibiteur avec Bcl-2 et empêche l'interaction tBid/Bcl-2. tBid est alors libre d'activer Bax et d'induire la MOMP, la libération de cytochrome c et l'apoptose de la cellule cible. Adapté de (Thiery et al., 2015).

#### 3.4.3.1.2. Rôle de p53 dans l'apoptose induite par les récepteurs à domaines de mort

En complément de la voie PFN/Gzm, p53 est aussi impliquée dans la régulation de la voie apoptotique des DR. En effet, suite à des dommages à l'ADN causés par des agents génotoxiques, p53 pourrait favoriser l'apoptose induit par les CTL et les NK en induisant l'expression de DR tels que DR4 (Liu et al., 2004), DR5 (Takimoto and El-Deiry, 2000) et Fas (Owen-Schaub et al., 1995) (Bouvard et al., 2000). D'ailleurs, il a été montré que la restauration des fonctions de p53 dans des cellules cancéreuses surexprimant MDM2 ou possédant une p53 mutée peut dans certains cas les sensibiliser au TNF- $\alpha$ , à TRAIL et à FasL (Weinmann et al., 2008) (Meijer et al., 2013) (Aguilar-Lemarroy et al., 2002) (Muret et al., 2012). En particulier, dans ces cellules, la restauration de l'expression de p53 WT induit l'expression du récepteur Fas et les sensibilise en partie à l'apoptose induite par les CTL via la voie des DR (Thiery et al., 2003). Cette augmentation de la sensibilité à la voie apoptotique Fas/FasL au contact des CTL suite à l'expression de p53 WT passe par l'induction de la dégradation sélective de cFLIP<sub>short</sub> (isoforme courte de cFLIP) par le protéasome, ce qui permettrait l'activation efficace de la caspase 8 (Thiery et al., 2005). D'autre part, p53 est impliqué dans la régulation de l'expression de DcR1 et DcR2, des récepteurs leurres de TRAIL (Ruiz de Almodóvar et al., 2004).

En conclusion, le rôle de p53 dans la mort cellulaire induite par les CTL/NK via les voies apoptotiques PFN/Gzm et DR est primordial et sa réactivation dans les cellules tumorales dépourvues de p53 fonctionnelle pourrait les sensibiliser à la lyse par les effecteurs cytotoxiques.

#### 3.4.3.2. Rôle de p53 dans la régulation de l'activité antitumorale des cellules T et NK

##### 3.4.3.2.1. Rôle de p53 dans la reconnaissance et la liaison des effecteurs cytotoxiques avec leurs cellules cibles

P53 est impliquée dans la modulation de la réponse immunitaire antitumorale en contrôlant notamment certains aspects de la reconnaissance des cellules cancéreuses et de l'activation des effecteurs cytotoxiques. Par exemple, en réponse aux dommages à l'ADN, p53 activée augmenterait l'expression de TAP1 ce qui favoriserait l'apprêtement des TAA et l'expression des complexes CMH-/peptide à la surface des cellules cancéreuses (Zhu et al., 1999). En parallèle, l'induction de l'expression de ERAP1 (Endoplasmic reticulum amino peptidase 1) par p53 augmenterait aussi le nombre de peptides disponibles pour l'apprêtement par les molécules de CMH (Wang et al., 2013a). Cette augmentation de la présentation antigénique améliorerait la reconnaissance des cellules cancéreuses par les CTL spécifiques des TAA. D'autre part, p53 peut stimuler l'expression de ICAM-1, une molécule d'adhésion intracellulaire essentielle à la formation des SI entre cellule tumorale et cancéreuse, et ainsi favoriser l'activité cytotoxique des CTL/NK (Gorgoulis et al., 2003). De plus, concernant l'activation des cellules NK, p53 régule directement et selon le contexte l'expression des ligands de NKG2D. En effet, la réactivation de p53 par la molécule réactivatrice RITA (reactivation of p53 and induction of tumour cell apoptosis) induit la transcription de ULBP1 et ULBP2 par les cellules cancéreuses et les sensibilise à la lyse par les cellules NK (Textor et al., 2011) (Li et al., 2011c). Cependant, l'induction de miR-34a et miR-34c par p53 WT dans des cellules de mélanome conduit à la répression de ULBP2 et pourrait contribuer à l'échappement tumoral à la destruction cytotoxique (Heinemann et al., 2012).

##### 3.4.3.2.2. Rôle de p53 dans la régulation de l'expression du ligand de checkpoint inhibiteur PD-L1

Il semblerait que p53 puisse moduler aussi l'activité des CTL et des cellules NK en agissant spécifiquement sur l'expression du checkpoint inhibiteur PD-L1, même si cela reste sujet à controverse, notamment en terme mécanistique. En effet, une étude a démontré que miR34a, une cible transcriptionnelle de p53 sauvage, peut se lier directement à la région 3'-UTR (untranslated region) de l'ARN messager de PD-L1 et réprimer son expression. A l'inverse, la perte d'activité de p53 augmenterait l'expression de PD-L1 à la surface des cellules tumorales ce qui supprimerait les fonctions des CTL (Cortez et al., 2016). De manière similaire à ces travaux, l'expression intense de

p53 (probablement du fait de mutations ) corrèle avec une expression forte de PD-L1 chez des patients atteints de cancer du poumon (Biton et al., 2018) (Cha et al., 2016) (Dong et al., 2017) et de cancer buccal (Tojyo et al., 2019).

Cependant, une autre étude a montré à l'inverse que l'activation de p53, par la Nutlin-3 (une molécule réactivatrice de p53) ou par un stress génotoxique, induit l'expression de PD-L1, ce qui pourrait contribuer à l'immunosuppression (Yoon et al., 2015). Finalement, une autre étude récente suggère que p53 possède seulement une influence mineure sur l'expression constitutive de PD-L1, mais joue un rôle important, indépendamment de son activité transcriptionnelle, dans l'expression de PD-L1 induit par l'IFN- $\gamma$  via la voie de signalisation JAK-STAT (Thiem et al., 2019).

Ainsi, malgré plusieurs travaux récents, les liens entre p53 et l'expression de PD-L1 et les mécanismes sous-jacents demeurent controversés et nécessitent clairement des études supplémentaires.

### 3.4.3.3. Autres rôles de p53 dans la régulation de la réponse immune antitumorale

#### 3.4.3.3.1. Implication dans la production de cytokines inflammatoires

P53 est également impliqué dans la modulation de la sécrétion de cytokines et de chimiokines au sein du MET (Walton et al., 2016) (Wellenstein et al., 2019) (Wörmann et al., 2016). Par exemple, la perte de p53 peut augmenter la sécrétion de CCL2 par les cellules tumorales ce qui induit le recrutement de populations de cellules myéloïdes immunosuppressives (Walton et al., 2016), et la sécrétion de ligands de Wnt (Wnt/ wingless integration), ce qui stimule la production d'IL-1 $\beta$  par les macrophages de type 2 (Wellenstein et al., 2019). De plus, p53 est potentiellement impliquée dans la diminution des capacités immunosuppressives des cellules immunosuppressives du MET. Par exemple, au sein des CAF, p53 semble réprimer leur sécrétion de CXCL1, CXCL12, IL-8, IL-1 $\beta$  et de VEGF (Addadi et al., 2010) (Narendran et al., 2003) (Schauer et al., 2013). De même, p53 semble inhiber la sécrétion de iNOS par les cellules mésenchymateuses immunosuppressives du MET (Huang et al., 2014). D'autre part, la forme sauvage p53 régule l'inflammation à travers l'axe IL-6-STAT3. En effet, lorsque la voie de signalisation de l'IL-6 est activée (Nowak et al., 2015), la perte de p53 de certaines cellules cancéreuses augmente la sécrétion de ROS, ce qui inhibe la phosphatase SHP2 (Src homology region 2) et provoque l'activation par phosphorylation de STAT3 et la modification du MET (Wörmann et al., 2016).

#### 3.4.3.3.2. Implication dans le recrutement et l'activité des cellules immunosuppressives du microenvironnement tumoral



De récentes études ont démontré le rôle de p53 dans le recrutement et l'activité des cellules immunosuppressives au sein du MET en particulier les Treg, les MDSC et les macrophages de type 2. En effet, la perte de p53 au niveau des cellules tumorales favoriserait le développement de populations de Treg hautement immunosuppressives au sein de la tumeur et réduirait la production de cytokines inflammatoires par les CTL (Blagih et al., 2020). De plus, la perte de p53 par les cellules cancéreuses favorise le recrutement et les capacités immunosuppressives des MDSC, grâce à l'augmentation de l'expression de CXCR3/CCR2 et de M-CSF (macrophage colony-stimulating factor), et altère la réponse immunitaire dépendante des CTL et des cellules Th1 (Blagih et al., 2020). D'autre part, la perte de p53 peut aussi augmenter le nombre de macrophages de type 2 (Ruddell et al., 2008) (Walton et al., 2016). Par ailleurs, l'expression de DD1 $\alpha$ , une protéine impliquée dans la stimulation de la phagocytose par les macrophages, est régulée au niveau transcriptionnel par p53 et améliore ainsi l'élimination des cellules apoptotiques et l'efficacité de la réponse immunitaire (Yoon et al., 2015). Cependant, DD1 $\alpha$  présente en parallèle un rôle similaire aux « immune checkpoints ». Son induction par p53 pourrait ainsi inhiber les fonctions des CTL et contribuer à l'échappement tumoral (Zitvogel and Kroemer, 2015).

#### **3.4.4. P53 et autophagie**

De nombreuses preuves expérimentales obtenues durant cette dernière décennie ont démontré que p53 participe, selon sa localisation subcellulaire, à la régulation du processus d'autophagie en tant qu'activateur ou inhibiteur et que cette fonction de p53 pourrait contribuer à son activité de suppresseur de tumeur (Tasdemir et al., 2008a) (Mrakovcic and Fröhlich, 2018).

##### **3.4.4.1. Principe de l'autophagie**

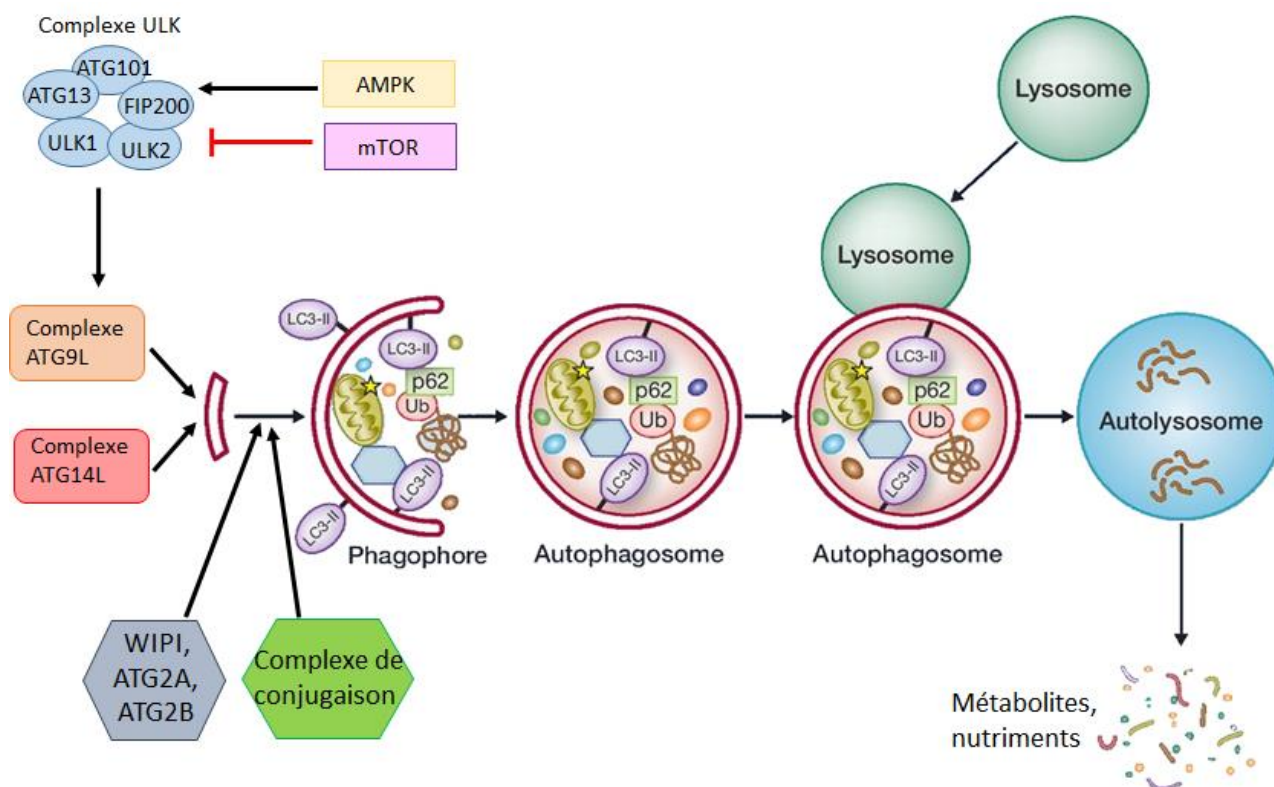
L'autophagie est un mécanisme cellulaire essentiel par lequel le matériel cytoplasmique non nécessaire ou dysfonctionnel est internalisé dans des vésicules appelées « autophagosomes » pour être dégradé, permettant ainsi le recyclage des composants de la cellule et produisant de l'énergie et des précurseurs de macromolécules (Yang and Klionsky, 2009). Cette voie catabolique contribue fortement à l'homéostasie métabolique, l'intégrité cellulaire et donc à la survie de la cellule en condition physiologique et en condition de stress métabolique (stress nutritionnel, stress oxydatif...) (Levine and Kroemer, 2008). En effet, le processus autophagique conduit à l'élimination des composants cellulaires nocifs tels que les agrégats (agréphagie), des protéines malformées ou endommagées, des organites dysfonctionnels comme les mitochondries (mitophagie) (Mathew and White, 2011), les lysosomes (péxophagie) (Cho et al., 2018) et des agents pathogènes (xénophagie) (Nakagawa et al., 2004). Même si l'autophagie a été d'abord identifiée comme non spécifique, agréphagie, mitophagie, péxophagie et xénophagie sont des formes d'autophagie dites

« sélectives », grâce à des mécanismes permettant de cibler le matériel cellulaire à dégrader via des protéines dites « cargos » (Abdrakhmanov et al., 2020). L'autophagie joue ainsi un rôle pouvant être pro-survie ou pro-apoptotique selon les conditions. Ce processus est ainsi impliqué dans de nombreuses pathologies comme le cancer ou la neurodégénérescence. En effet, dans un microenvironnement tumoral adéquat ou soumis à des agents de chimiothérapie par exemple, l'autophagie au niveau des cellules tumorales peut favoriser fortement leur survie. A l'inverse, l'autophagie basale, régulée négativement dans certains cancers par des altérations épigénétiques ou génétiques, ne peut plus exercer son rôle suppresseur de tumeur (Boya et al., 2013). D'autre part, en condition de léger stress nutritionnel, l'effet pro-survie de l'autophagie prédomine alors que, lorsque le stress nutritionnel est trop intense, l'autophagie favorise la mort cellulaire (Maiuri et al., 2010).

L'étude de l'importance et des mécanismes de l'autophagie a donné lieu récemment à un prix Nobel de physiologie et de médecine en 2016. Ces mécanismes ont d'abord été étudiés chez la levure puis chez l'homme où plusieurs dizaines de gènes codant pour des protéines impliquées dans le processus autophagique (ATG/Autophagy-related Genes) ont été découvertes. Ces protéines peuvent être regroupées en familles fonctionnelles (Figure 18) :

- a) Les protéines appartenant au complexe d'initiation de l'autophagie : ULK1, ULK2 (kinases de type Unc-51 1 et/ou 2), FIP200 (Focal adhesion kinase family Interacting Protein of 200 kD), ATG101 et ATG13 composent le complexe ULK qui se forme et s'active suite à la transduction de signaux provenant de protéines senseurs (Itakura and Mizushima, 2010). AMPK (AMP-activated protein kinase) et le complexe mTORC1 (mammalian Target Of Rapamycin Complex 1) régulent respectivement positivement et négativement l'activité du complexe ULK (Kim et al., 2011). Les premières étapes de formation des autophagosomes sont quant à elles initiées par ATG9L1 et ATG9L2 formant le complexe membranaire ATG9L. Ces deux complexes d'initiation permettent de recruter le complexe ATG14L nommé aussi PI3K de classe III (phosphatidylinositol-3-OH kinase-III/PI3K-III).
- b) Les protéines du complexe ATG14L, composé de Beclin-1, VPS (Vacuolar protein sorting)-34, VPS-15 (kinase activant VSP34) et ATG14L, produisent du PI3P (Phosphatidylinositol 3-phosphate) au niveau des sites de contact entre les mitochondries et le réticulum endoplasmique, ce qui induit le recrutement des protéines de liaison de la famille WIPI (WD-repeat protein Interacting with PhosphoInositides) (Hamasaki et al., 2013).
- c) Le complexe composé de WIPI, ATG2A et de ATG2B interagit avec ATG16L1 et la plateforme de liaison nommée l'« omégasome » (Dooley et al., 2014).
- d) Les protéines du complexe de conjugaison comprenant ATG12, ATG5 et ATG16L, est situé au niveau de la membrane d'isolation au cours de la formation de l'autophagosome avant de

se dissocier de la membrane. Les enzymes ATG7 et ATG10 conjuguent de façon covalente ATG5 à ATG12 qui peuvent à leur tour conjuguer LC3 (Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3) à un phosphatidylethanolamine (PE) (Nakatogawa et al., 2009). Le complexe de conjugaison se met en place au niveau de la zone d'accumulation de ATG16L1 à la membrane d'isolation où LC3 est alors conjugué en LC3-PE (Fujita et al., 2008a) (Nakatogawa et al., 2009).



**Figure 18 : Le processus autophagique et ses différents composants.**

Suite à des signaux inducteurs d'autophagie (stress nutritionnel), une cascade de signalisation faisant intervenir les membres des complexes ULK et des protéines de la famille des ATG induit la formation d'une membrane d'isolation. Cette membrane se referme autour de différents composants cellulaires dysfonctionnels ou endommagés (agrégats, protéines, organites...) pour former un autophagosome, grâce notamment aux protéines LC3-PE. Enfin, l'autophagosome fusionne avec un lysosome pour former un autolysosome dans lequel le contenu de l'autophagosome est dégradé par les hydrolases lysosomales. Adapté de (Cicchini et al., 2015).

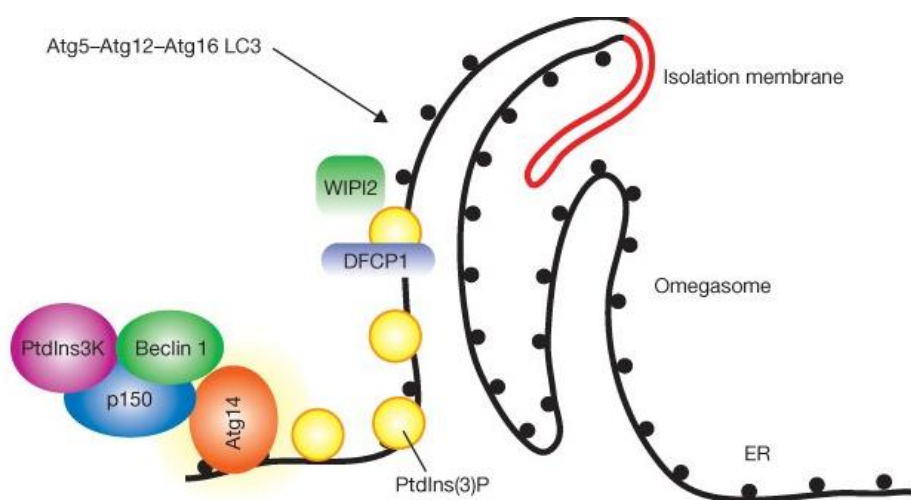
#### 3.4.4.2. Les différentes étapes de l'autophagie

Le processus autophagique est composé de trois étapes fortement régulées constituant le flux autophagique (Figure 18) : l'initiation, l'élargissement et la maturation des autophagosomes.

##### ✓ Initiation

L'autophagie, bien que présente en permanence à un niveau basal, peut être induite/augmentée par divers stimuli. Par exemple, l'absence de facteurs de croissance, l'hypoxie

ou le manque de nutriments inhibent la synthèse d'ATP, augmentent le taux d'AMP (Adénosine MonoPhosphate) ce qui active AMPK (Hardie, 2007). AMPK active le complexe TSC1:TSC2 (Tuberous sclerosis complex) par phosphorylation, ce qui inactive Rheb et par conséquent inhibe la protéine mTORC1 (mammalian target of rapamycin complex 1) (Inoki and Guan, 2006). Or mTORC1 est le principal inhibiteur du complexe ULK. Ainsi, l'inactivation de mTORC1 par déphosphorylation conduit à l'activation de ULK1/2 qui activent à leur tour ATG13 et FIP200 et déclenchent l'initiation de l'autophagie (Kim et al., 2011). Cette dernière nécessite aussi le recrutement, grâce à ATG13, d'une protéine essentielle, ATG101, au niveau de ULK1 (Itakura and Mizushima, 2010). Il existe un débat quant à l'origine de la membrane des autophagosomes (provenant du réticulum endoplasmique (RE), des mitochondries ou de l'appareil de Golgi), mais il semblerait, selon les dernières observations, que la membrane d'isolation provienne de la zone de contact entre la mitochondrie et le RE (Hamasaki et al., 2013) (Lamb et al., 2013). En effet, la syntaxine-17, localisée au niveau du RE, et les mitochondries sont indispensables à l'accumulation des complexes ATG9L1 et ULK au niveau de cette zone de contact (Itakura and Mizushima, 2010) (Kageyama et al., 2011). Ces deux complexes recrutent à leur tour le complexe PI3K-III, dont la sous unité catalytique VPS34 qui se met à synthétiser du PI3P, et d'autres protéines effectrices (DECP1 (Double FYVE-containing protein 1), les protéines du complexe WIPI) au sein du compartiment cellulaire appelé « omégasome » (Figure 19). Ce dernier, composé de la membrane d'isolation enrichie en PI3P et des complexes protéiques ATG9L1 et ULK possède une morphologie ressemblant à la lettre oméga. L'omégasome est le site à partir duquel la membrane d'isolation croît grâce à la déformation de la membrane du RE (Funderburk et al., 2010) (Simonsen and Tooze, 2009).

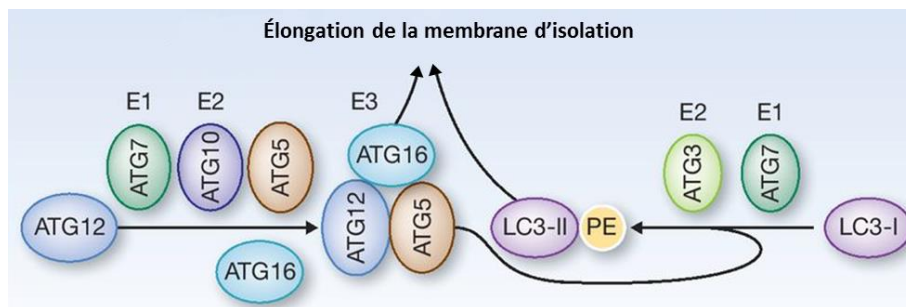


**Figure 19 : Modèle de formation de l'omégasome**

Suite à des signaux de stimulation de l'autophagie, l'activation de la voie mTOR-ULK entraîne la formation du complexe PI3K de classe III, composé de Beclin-1, p150, ATG14 et VPS34 au niveau du point de contact entre RE et mitochondrie. Ce complexe produit localement le phosphatidylinositol-3-phosphate (PtdIns(3)P). Le PtdIns(3)P est reconnu par les protéines effectrices DFCP1 et WIPI2. Ceci induit la déformation de la membrane du RE, le recrutement des complexes d'élongation (ATG5-12-16 LC3) et la formation de la membrane d'isolation en omégasome (en rouge). Adapté de (Tooze and Yoshimori, 2010).

### ✓ Elongation

Au cours de l'élongation, la double membrane d'isolation s'allonge jusqu'à former, autour des composants cellulaires à recycler, une vésicule fermée appelée « autophagosome ». Cette étape nécessite les complexes protéiques de conjugaison de type « ubiquitine-like » ATG5-12-16L1 et LC3. En effet, ATG7 et ATG10, des enzymes de type E1 et E2, commencent par conjuguer ATG12 à ATG5. Ensuite, la liaison ATG5-ATG16L déclenche la dimérisation du complexe ATG12-ATG5-16L1 (Mizushima et al., 2003) qui se lie de façon stable à la membrane de l'autophagosome en formation (Mizushima et al., 2001). Par la suite, ATG7, ATG3 et le complexe ATG16L1 conjuguent la protéine LC3 à une phosphatidyléthanolamine (PE) membranaire lipophile (Fujita et al., 2008a). Le système LC3-PE (LC3-II) ainsi formé s'insère dans la membrane et contribue à contrôler la taille des autophagosomes (Nakatogawa et al., 2007), leur mouvement le long des microtubules (Kimura et al., 2008) et leur fermeture en vésicules (Fujita et al., 2008b) (Figure 20).



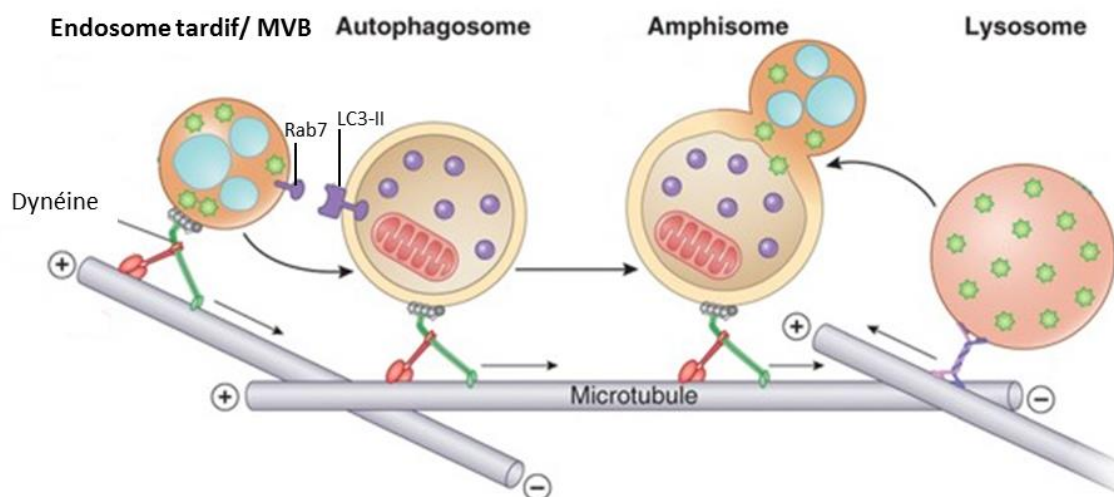
**Figure 20 : Système d'élongation de la membrane d'isolation**

L'élongation de l'autophagosome en formation fait intervenir des protéines de conjugaison de type « ubiquitine-like » en deux étapes : (1) ATG7 et ATG10 conjuguent ATG12 à ATG5 et ATG16 se lie à ATG5 ce qui déclenche la dimérisation du complexe ATG12-ATG5-16. (2) ATG7, ATG3 et le complexe ATG16 conjuguent la protéine LC3 à une phosphatidyléthanolamine (PE) membranaire lipophile. Ces deux complexes (ATG12-5-16 et LC3-PE) se lient de façon stable à la membrane de l'autophagosome en formation et permettent son élongation. Adapté de (Cicchini et al., 2015).

### ✓ Maturation

Au cours de la maturation, les autophagosomes, dépourvu d'activité lytique, fusionnent avec les lysosomes ce qui dégrade leur contenu. Cependant, il semblerait que les autophagosomes aient besoin de fusionner au préalable avec d'autres composants de la voie d'endocytose pour obtenir les facteurs nécessaires à la fusion finale avec les lysosomes. Ces fusions séquentielles, avec par exemples des corps multi-vésiculaires (MVB) et/ou des endosomes précoces et tardifs, donnent naissance à une organelle nommée « amphisome » (Razi et al., 2009). En effet, certaines études indiquent que pendant le processus autophagique, les MVB n'exercent plus leur fonction sécrétrice et contribuent à la maturation des autophagosomes (Fader et al., 2008). Ces fusions sont favorisées par le déplacement bidirectionnel des autophagosomes, le long des microtubules grâce à la dynéine, en direction du MTOC où les lysosomes sont présents en nombre (Ravikumar et al., 2005) (Jahreiss et al., 2008). La fusion autophagosomes/lysosomes ou endosome nécessite notamment Rab7, une

GTPase, qui peut être inhibée par la dépolymérisation des microtubules induit par des agents tels que la vinblastine ((Köchler et al., 2006) (Figure 21). De manière importante, il existerait deux types de fusion : une fusion complète aboutissant à la génération d'une organelle appelée « autolysosome » et une fusion transitoire appelée « kiss and-run », où le contenu de l'autophagosome est transféré au lysosome sans que les deux organelles ne fusionnent totalement (Jahreiss et al., 2008).



**Figure 21 : Etape finale du processus autophagique : la maturation**

Lors de la maturation, les autophagosomes fusionnent de façon séquentielle, d'abord avec des corps multi-vésiculaires (MVB) et/ou des endosomes (précoces et tardifs) puis des lysosomes pour former des « amphisomes ». Ces fusions se font le long des microtubules grâce à la dynéine et font intervenir différentes protéines à la surface des endosomes/lysosomes et des autophagosomes telles que Rab7. D'après (Nixon, 2013).

#### 3.4.4.3. Régulation de l'autophagie par p53

P53 est capable de réguler le processus autophagique à la fois positivement au niveau du noyau grâce à son activité transcriptionnelle (Gao et al., 2011) (Kenzelmann Broz et al., 2013) et négativement au niveau du cytoplasme via son activité non-transcriptionnelle (Maiuri et al., 2010) (Figure 22):

- ✓ Rôle de p53 nucléaire dans la régulation de l'autophagie

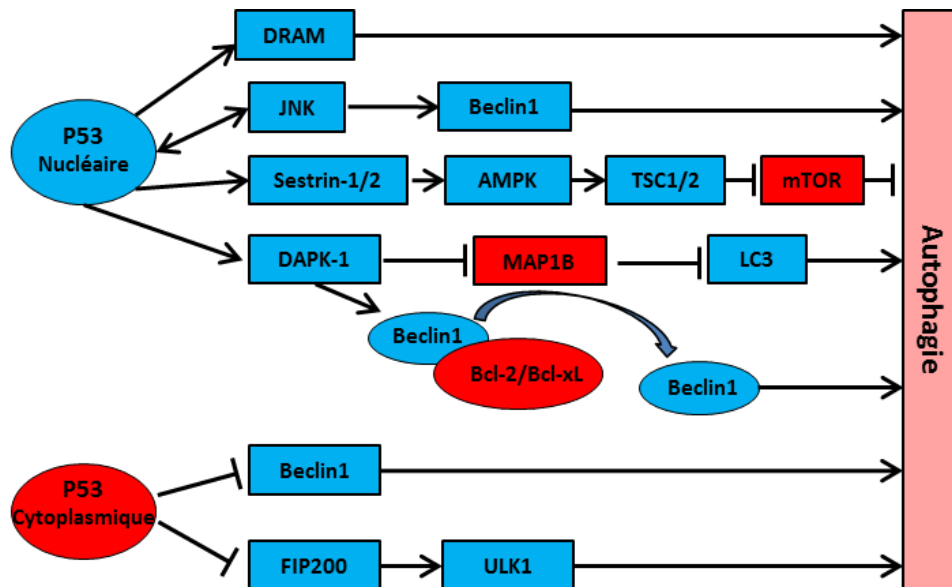
Suite à l'activation de p53 par un stress, cette protéine peut initier un processus d'autophagie par la transcription de gènes impliqués dans les différentes voies décrites précédemment. En effet, p53 peut induire la transcription de ses gènes cibles sestrine-1 et -2, ainsi que de TSC2 et AMPK. L'activation de AMPK par les sestrines (Budanov and Karin, 2008) active à son tour TSC1 et 2, ce qui inhibe l'activité de mTOR, un inhibiteur majeur de l'autophagie, et déclenche indirectement l'autophagie (Feng et al., 2005) (Feng et al., 2007). De plus, suite à son activation, p53 peut induire l'expression de *DRAM* (damage-regulated autophagy modulator) codant pour la protéine lysosomale DRAM, impliquée dans l'initiation de l'autophagie (Crighton et al., 2006) et dans la régulation de la fusion autophagosome-lysosome (Jj et al., 2005).

D'autre part, DAPK-1 (Death associated protein kinase 1), une protéine suppresseur de tumeur cible de p53, peut initier l'autophagie par liaison avec un inhibiteur de LC3 appelé « MAP1B » (Microtubule Associated Protein 1B) (Gozuacik and Kimchi, 2006) (Harrison et al., 2008) et par la phosphorylation du domaine BH3 de Beclin 1 afin de dissocier Beclin 1 de Bcl-XL (Zalckvar et al., 2009). En parallèle, p53 favorise la libération de Beclin 1 en induisant l'expression de protéines pro-apoptotiques (PUMA, Bad, Bax et Bnip3) (Levine and Kroemer, 2008) et en réprimant l'expression des protéines anti-apoptotiques Bcl-XL et Bcl-2 (Sugars et al., 2001).

Enfin, p53 nucléaire peut activer partiellement la kinase JNK (kinase c-Jun N-terminale), qui déclenche alors l'autophagie de deux façons. Premièrement JNK, à l'instar de DAPK-1, peut phosphoryler Beclin-1 et la libérer du complexe Beclin-1-Bcl-XL (Wei et al., 2008). Deuxièmement, JNK peut à son tour activer p53 par phosphorylation créant ainsi une boucle de rétroaction positive de l'autophagie et induisant l'expression de gènes pro-autophagiques (Lorin et al., 2010).

#### ✓ Rôle de p53 cytoplasmique dans la régulation de l'autophagie

P53 cytoplasmique semble réguler négativement l'autophagie, principalement lorsque les cellules ne sont pas soumises à un stress. En effet, certaines études tendent à montrer que l'inhibition de l'expression de p53 cytoplasmique déclenche l'autophagie et que sa ré-expression peut inhiber l'autophagie (Tasdemir et al., 2008b). Même si les mécanismes sous-jacents sont mal connus et nécessitent des recherches supplémentaires, il semblerait que p53 cytoplasmique puisse inhiber l'autophagie de plusieurs façons : par ubiquitination directe de Beclin 1, ce qui provoque sa dégradation par le protéasome (Tripathi et al., 2014) et par interaction avec FIP200, ce qui inactive ULK1, altère la distribution des autophagosomes en formation et perturbe le déclenchement du processus autophagique (Morselli et al., 2011).



**Figure 22 : Régulation de l'autophagie par p53.**

Selon sa localisation cellulaire, p53 régule positivement ou négativement l'autophagie. Dans le noyau, p53 peut induire la transcription de gènes inducteurs de l'autophagie tels que DRAM, DAPK-1, JNK et Sestrine-1/2. Ces dernières déclenchent l'autophagie par la voie AMPK qui inhibe la voie mTOR. A l'inverse, dans le cytoplasme, p53 inhibe l'autophagie via des mécanismes peu connus. Par exemple, P53 peut induire la dégradation de Beclin-1 et l'inactivation de FIP200 par interaction directe. (En bleu les facteurs pro-autophagies, en rouge les facteurs anti-autophagies). Adapté de (Tang et al., 2015).

## 4. Les mutations et inactivations de p53

Comme mentionné précédemment, la protéine p53 joue un rôle central dans la suppression des tumeurs. Cependant, *TP53* est le gène le plus fréquemment muté dans les cancers humains. En effet, plus de la moitié des cancers contiennent des mutations de *TP53* ou des altérations au niveau de protéines en amont ou en aval de cette voie, et impliquées par exemple dans son activation ou sa stabilisation (Freed-Pastor and Prives, 2012) (Muller and Vousden, 2013). La majorité de ces mutations sont des mutations faux sens conduisant à l'expression d'une protéine p53 non fonctionnelle dont les capacités de suppresseur de tumeur sont perdues. Néanmoins, de nombreux travaux ont aujourd'hui clairement démontré que certaines mutations de p53 associées aux tumeurs acquièrent de nouvelles fonctions favorisant le développement tumoral, ce phénomène est nommé « gain de fonction » (GOF) (Stein et al., 2019). Compte tenu de ce taux de mutations élevé, les mutants de p53 sont devenus une cible thérapeutique attractive, tant pour réactiver la fonction WT de p53 que pour inhiber son GOF (Silva et al., 2020). Comprendre les mécanismes d'inactivation et de gain de fonction de p53, leurs effets sur le développement tumoral, ainsi qu'étudier les effets de sa réactivation pharmacologique pourrait ainsi accélérer le développement de thérapies ciblées pour les cancers humains exprimant des p53 mutées.

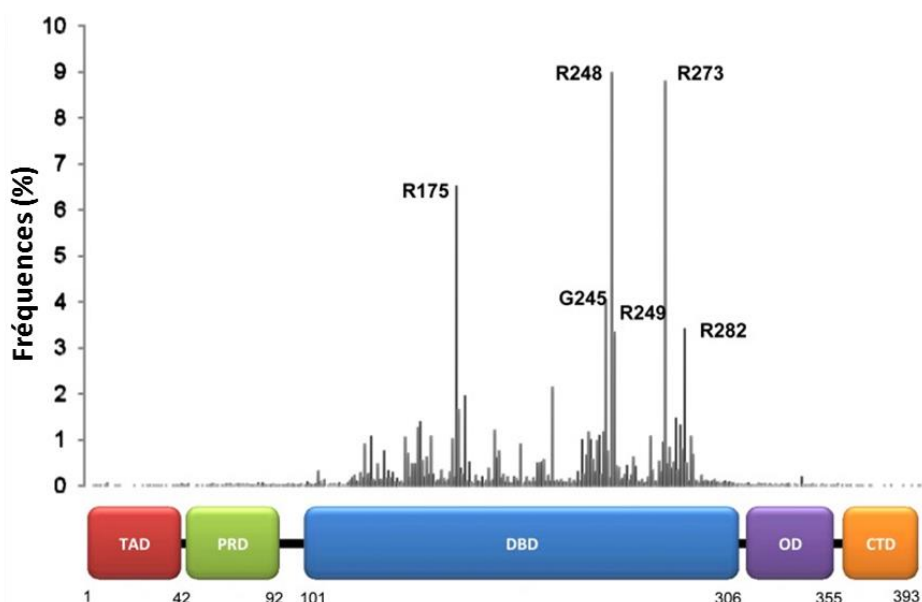
### 4.1. Prévalence et localisation des mutations de p53

Parmi les 20 000 gènes que comporte le génome humain, p53 est le plus fréquemment muté



dans les cancers. Son inactivation par mutations a lieu dans approximativement 50% de tous les cancers chez l'Homme (Olivier et al., 2010). Cependant, dans certains sous-types de cancers tels que les cancers du sein triple négatif, les cancers du poumon et les cancers ovariens de haut grade, des mutations de *TP53* peuvent être trouvées jusque dans 80% des échantillons (Kandoth et al., 2013). Quant aux mutations germinales de p53 qui suppriment ses fonctions, celles-ci sont très rares mais génèrent une forme héréditaire de cancer connue comme le syndrome de Li-Fraumeni (Malkin et al., 1990).

Le gène *TP53* possède une répartition des mutations particulière (Figure 23). En effet, la majorité des mutations, de type faux sens, ont lieu au niveau de son DBD, zone nécessaire à la protéine p53 WT pour se lier au promoteur de ses gènes cibles et agir comme un facteur de transcription (Olivier et al., 2004). De façon intéressante, plus de 25% des mutations de p53 dans les cancers humains se répartissent entre 6 « hotspots », ciblant les acides aminés R175, G245, R248, R249, R273 et R282, bien que des mutations de p53 ont été trouvées sur presque chaque codon de son DBD dans les cancers humains (Baugh et al., 2018) (Pitolli et al., 2019).



**Figure 23 : Fréquence des mutations de p53**

P53 est principalement inactivée par des mutations faux sens au niveau de son DBD qui perturbent sa capacité à se lier à l'ADN. Les mutations les plus fréquentes (« hot spot ») sont en position R175, G245, R248, R249, R273 et R282. Les fréquences des mutations faux sens de *TP53* de patients atteints du cancer (N=19 262) ont été obtenue à partir de la base de données du Centre International de Recherche sur le Cancer (IARC) et indiquées en fonction de leur position sur la chaîne d'acide aminé de p53. Adapté de <http://p53.free.fr> et de (Freed-Pastor and Prives, 2012).

De plus, les mutations de p53 peuvent se subdiviser en deux grandes catégories : les mutations de contact, qui modifient les résidus impliqués dans le contact direct avec l'ADN (par exemple R248 et R273) (Pfister and Prives, 2017) et les mutations de structures (par exemple R175, G245, R282 et R249) qui modifient les résidus nécessaires au repliement correct et donc à la conformation optimale de la protéine (Cho et al., 1994) (Soussi and Lozano, 2005). Les mutations de contact peuvent préserver les propriétés thermodynamiques de la p53 WT mais altèrent sa capacité à se lier à l'ADN ou avec des protéines partenaires (Hagn et al., 2010). En d'autres termes,

certaines mutations de contact telles que R273H et R273C ne font que modifier précisément certains résidus du DBD de p53 et inhibent ses fonctions transcriptionnelles sans pour autant perturber l'architecture globale de la protéine p53 (Joerger et al., 2006). Quant aux mutations de structure, elles peuvent impacter la stabilité thermodynamique de p53 et/ou sa capacité à migrer dans le noyau, la retenant ainsi au niveau du cytoplasme (Koulgi et al., 2013). Ces deux types de mutations altèrent ainsi la fonction transcriptionnelle de p53 en l'empêchant, directement ou indirectement, de se lier à l'ADN (Olivier et al., 2010), mais peuvent aussi influencer sur sa fonction non transcriptionnelle voire même contribuer à un gain de fonction.

D'autre part, les mutants de p53 ne perdent pas seulement les fonctions correspondant à la forme WT de la protéine (Kern et al., 1991), mais, suite à leur accumulation dans les cellules cancéreuses, exercent aussi un effet dominant négatif sur les p53 WT coexprimées. En effet, les p53 mutantes s'hétéro-dimérisent avec les p53 WT pour former des complexes tétramériques dépourvus de fonctions transcriptionnelles (Milner and Medcalf, 1991) (Willis et al., 2004). De plus, les mutations de *TP53* sont souvent suivies par la délétion de l'allèle sauvage restant. Ce phénomène, appelé perte d'hétérozygotie, suggère qu'en dépit de l'effet dominant négatif exercé par les p53 mutantes, la perte complète de la p53 WT donne aux cellules cancéreuses un avantage sélectif (Baker et al., 1990). Il est également important de noter que selon certaines études *in vivo*, la perte d'hétérozygotie nécessite la stabilisation du mutant p53 et son acquisition de nouvelles propriétés oncogéniques de type GOF (Alexandrova et al., 2017).

#### 4.2. Inactivation indirecte de la voie p53

Dans certaines tumeurs présentant apparemment un gène *TP53* non muté, l'activité de p53 peut être réprimée par divers mécanismes tels que la surexpression d'inhibiteurs de p53, l'altération de voies de signalisation en amont de p53 ou la présence d'inhibiteurs viraux. En effet, dans différentes tumeurs sans mutation de p53, l'inactivation de p53 peut avoir lieu par la surexpression de ses régulateurs négatifs MDM2 et MDM4 (aussi connus sous le nom de HDM4, MDMX et HDMX). Par exemple, MDM2 est particulièrement surexprimé dans certains sarcomes, mélanomes et cancers du sein, et MDM4 est fréquemment surexprimé dans les mélanomes, les cancers colorectaux, et les cancers du sein (Li and Lozano, 2013) (Wade et al., 2013). Ces deux protéines inhibent p53 de manière différente et complémentaire : MDM2 réduit avant tout la stabilité de p53 alors que MDM4 agit négativement sur l'activité transcriptionnelle de p53 (Francoz et al., 2006). En effet, comme cité précédemment, MDM2 engendre par ubiquitination la dégradation de p53 par le protéasome (Kubbutat et al., 1997). De plus, il a été montré que MDM2 inhibe le domaine de trans-activation de p53 et provoque son export du noyau vers le cytoplasme. (Vassilev, 2007). Un fort niveau de MDM2 engendre donc un faible niveau d'expression de p53 en absence de stress

cellulaire. Bien que MDM4 n'ait pas une activité ligase intrinsèque, elle peut interagir avec MDM2, former un hétérodimère avec une capacité améliorée pour ubiquitiner et dégrader p53 (Toledo and Wahl, 2006) (Linares et al., 2003) (Gu et al., 2002). De plus, comme MDM2, MDM4 peut se lier au domaine de transactivation de p53 et réprimer ses capacités transcriptionnelles (Shvarts et al., 1996).

D'autre part, les voies de régulation de p53 plus en amont peuvent être altérées. Par exemple, dans plusieurs lymphomes, le gène codant pour p14ARF, une protéine suppresseur de tumeur inhibitrice de MDM2, est supprimé ce qui induit la surexpression de MDM2 et l'inactivation de p53. (Lindström et al., 2001). De façon similaire, dans certains cancers du sein exprimant une p53 WT, l'oncogène inhibiteur de la famille p53, iASPP (inhibitory member of the apoptosis-stimulating proteins of the p53 family), est particulièrement surexprimé (Dong et al., 2015). De même, chez des patients atteints d'ataxie-télangiectasie, la mutation du gène *ATM* génère une protéine ATM non fonctionnelle ne pouvant plus activer p53 en cas de dommage à l'ADN. En conséquence, ces patients présentent un profond déficit immunitaire et une grande prédisposition à développer des cancers (Austen et al., 2005).

Enfin, un autre mécanisme par lequel p53 WT peut être inactivée est sa liaison à des protéines encodées par certains virus (Aloni-Grinstein et al., 2018). En effet, l'oncoprotéine E6 du papillomavirus humain (HPV) type 16/18 se lie et inactive p53 WT en entraînant sa dégradation dans les cellules du col de l'utérus (Scheffner et al., 1990). Cette inactivation de p53 WT par ces virus est impliquée dans la formation de nombreux cancers du col de l'utérus (Miwa et al., 1995). D'autre part, comme énoncé précédemment, le virus SV40 produit l'antigène T qui a la capacité de se lier au DBD de p53, inhiber sa fonction transcriptionnelle et ainsi contribuer à la transformation de la cellule infectée en cellule cancéreuse (Liu and Marmorstein, 2006) (Drayman et al., 2016).

#### 4.3. Influence des mutations de p53 sur ses fonctions biologiques et sur la progression tumorale

##### 4.3.1. Perte de fonction

La première conséquence des mutations de *TP53* est la perte des fonctions WT de p53, ce qui représente un avantage fondamental pour le développement tumoral en privant les cellules de leurs réponses antitumorales intrinsèques telles que l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose. En effet, à quelque exceptions près, les mutations de p53 au niveau de son DBD réduisent, altèrent ou empêchent l'interaction de p53 avec sa séquence d'ADN consensus et donc sa fonction transcriptionnelle (Kern et al., 1991) (Kern et al., 1992). Cela entraîne la dérégulation de l'induction de l'arrêt du cycle cellulaire par p21, notamment suite à des dommages à l'ADN. Cette capacité des cellules cancéreuses à échapper aux mécanismes d'arrêt du cycle cellulaire, qui permettent

normalement la réparation adéquate des dommages à l'ADN, favorise la prolifération de cellules génétiquement instables (Freed-Pastor and Prives, 2012). De plus, la perte de fonction transcriptionnelle de p53 mutée induit l'arrêt de la régulation négative de p53 par MDM2 et contribue à son accumulation au sein des cellules cancéreuses (Oren and Rotter, 2010).

Puisque p53 WT peut induire la transcription des protéines pro-apoptotiques Bid, Noxa, Bax, Bak, Puma et APAF-1 (Miyashita and Reed, 1995) (Nakano and Vousden, 2001) et la répression des protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et survivine, sa perte de fonction transcriptionnelle par mutation perturbe l'induction de l'apoptose et favorise la survie des cellules cancéreuses (Chipuk et al., 2010). De plus, comme énoncé précédemment, p53 contrôle la MOMP en formant, grâce à son DBD, un complexe inhibiteur avec Bcl-xL. Certaines p53 mutées au niveau de la DBD inhibent alors la formation des complexes Bcl-XL/p53 et ces p53 mutantes ne peuvent plus induire l'apoptose par la voie mitochondriale (Tomita et al., 2006). Ainsi, la perte par mutation des capacités de p53 à induire l'apoptose, favorise la survie des cellules même si elles ont subi de nombreux dommages à l'ADN. En conséquence, la perte de fonction de p53 est une étape critique de la carcinogenèse et confère un avantage sélectif important (Vousden and Prives, 2009). A noter cependant que certaines mutations font perdre la capacité de p53 à induire l'arrêt du cycle cellulaire mais pas sa capacité à induire l'apoptose (Toledo and Wahl, 2006) et inversement (Rowan et al., 1996). D'autre part, les mutations de p53 peuvent aussi perturber sa capacité à moduler l'autophagie. En effet, la perte de sa fonction transcriptionnelle peut limiter l'induction de l'autophagie par l'absence d'expression de ses gènes clés (Sestrine 1-2, DRAM-1, ULK1...) (Maiuri et al., 2010). L'accumulation de p53 mutantes au niveau du cytoplasme peut aussi bloquer l'autophagie et contribuer à la survie cellulaire (Rodriguez et al., 2012). A l'inverse, certaines mutations de p53, comme la K382R, suppriment la capacité de p53 à inhiber l'autophagie (Morselli et al., 2011).

Puisque p53 est impliquée dans la réponse aux dommages à l'ADN (Smith and Seo, 2002), les mutations de p53 peuvent également perturber les processus cellulaires impliqués dans la réparation des lésions de l'ADN (Yuan et al., 1995), comme c'est le cas pour les cellules issues du syndrome de Li-Fraumeni homozygotes pour des mutations de p53 et présentant des déficiences de réparation de l'ADN (Ford and Hanawalt, 1995). De la même manière, compte tenu du rôle de p53 dans la suppression des tumeurs via l'induction de la senescence, les mutations de p53 altèrent les mécanismes de senescence des cellules cancéreuses et favorisent leur prolifération (Qian and Chen, 2013).

#### **4.3.2. Gain de fonction**

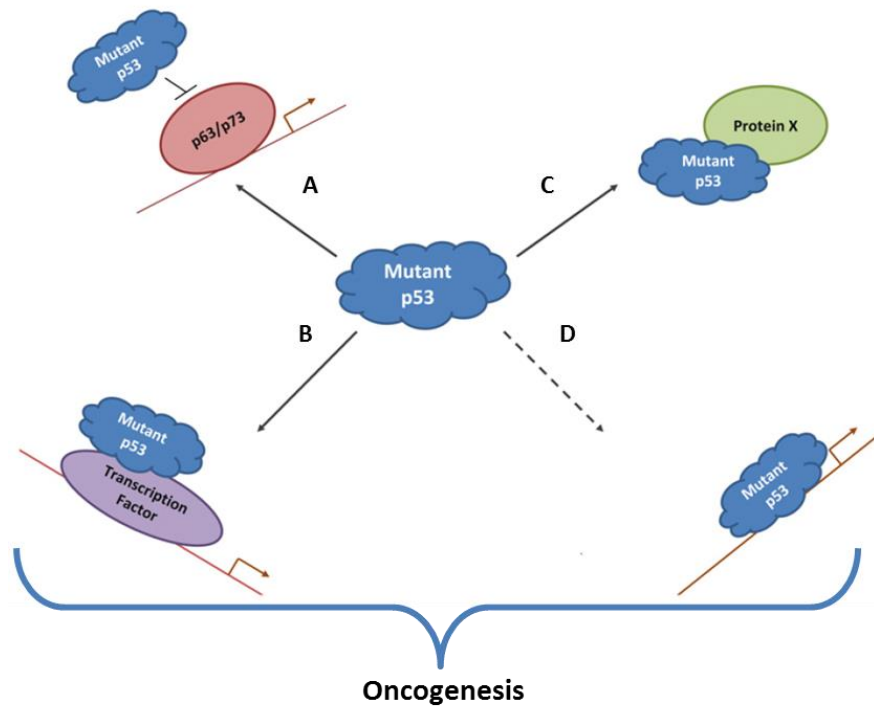
Historiquement, l'identification de p53 en tant que "proto-oncogène" était en partie due au

clonage de l'ADNc d'une p53 mutante à partir d'une cellule tumorale. Son expression ectopique provoquait la transformation et augmentait la tumorigénicité des cellules p53<sup>NULL</sup> (Levine and Oren, 2009) (Eliyahu et al., 1984) (Jenkins et al., 1984). Même si ces études préliminaires ont masqué la véritable fonction de la p53 WT, elles ont révélé l'aspect gain de fonction (GOF) des p53 mutantes dans le développement tumoral. Le GOF de p53 fut particulièrement mis en évidence par le fait que les souris exprimant les mutants de p53<sup>R172H</sup> ou <sup>R270H</sup> développent plus de tumeurs métastatiques que les souris p53<sup>NULL</sup> (Bartek et al., 1990) (Alsner et al., 2008), et que les patients atteints du syndrome de Li-Fraumeni portant une mutation faux sens de p53 sont caractérisés par le développement de tumeurs plus précocement que les patients avec une déplétion de p53 (Terzian et al., 2008).

Le GOF de p53 mutant correspond principalement à la capacité des p53 mutantes à interagir, de façon différente de la p53 WT, avec des séquences de l'ADN ou des protéines et modifier leurs fonctions, ce qui induit des changements du phénotype cellulaire pouvant contribuer au développement tumoral (Figure 24). Le spectre et l'étendu des activités GOF des mutations de p53 dépendent de la localisation et du type de mutation (conformationnelle *versus* de structure) (Kim and Lozano, 2018). Un des principaux GOF des p53 mutantes est leur capacité à se lier à des facteurs de transcription (FT) et transactiver ou atténuer l'expression de leurs gènes cibles (Freed-Pastor and Prives, 2012). Les mutants de p53 peuvent aussi modifier l'accessibilité à la chromatine et contrôler l'expression de gènes localisés sur des régions distinctes du génome. En effet, de nombreux travaux ont étudié l'impact de l'interaction entre des p53 mutantes et des FT. Par exemple, certaines p53 mutantes, en interagissant avec PTEN, augmentent l'expression de c-Myc et Bcl-XL et favorisent la croissance tumorale (Huang et al., 2013). De plus, les p53 mutantes, en se liant aux FT comme p63, p73 et Smads, inhibent l'activation de leur gènes cibles conduisant à l'augmentation de l'invasion et du processus métastatique (Adorno et al., 2009) (Ji et al., 2015) (Gaiddon et al., 2001). De même, l'expression des gènes cibles de FT, tels que NF-Y (Nuclear Transcription Factor Y), SP1 (Specificity Protein 1), NF- $\kappa$ B, ETS1 (Erythroblastosis-1), YAP (Yes Associated Protein) et le récepteur de la vitamine D, est altérée par l'interaction directe de ces FT avec des p53 mutantes (Freed-Pastor et al., 2012) (Stambolsky et al., 2010) (Di Agostino et al., 2016) (Dell'Orso et al., 2011) (Vaughan et al., 2014). En effet, NF-Y se lie aux p53 mutantes R175H et R273C et induit l'expression de gènes augmentant le cycle cellulaire (Di Agostino et al., 2006). Quant à SP1, celui-ci interagit avec les mutants V134A, R175H, R249S, et R273H pour activer la transcription de ses gènes cibles (Bargonetti et al., 1997) (Chicas et al., 2000) (Hwang et al., 2011), notamment ENTPD5 qui contribue à l'invasion tumorale et à la formation de métastases (Vogiatzi et al., 2016). D'autre part, dans les tumeurs hypoxiques, la coopération de p53 mutantes avec HIF-1 induit l'expression de composants fondamentaux du MET (tels que la laminine- $\gamma$ 2 et le

collagène type VIIa1) (Amelio et al., 2018) et génère un MET pro-tumoral qui facilite l'invasion et la croissance tumorale (Petrova et al., 2018). Par ailleurs, il a été récemment montré que des p53 mutantes peuvent coopérer avec le FT NRF2 au niveau de promoteurs des gènes codant pour certains composants du protéasome, ce qui induit l'augmentation du taux de protéasome, amplifie la dégradation des protéines suppresseurs de tumeur et confère une résistance aux inhibiteurs de protéasome thérapeutiques (Walerych et al., 2016). D'autre part, l'interaction entre Mer11 et certains mutants de p53 empêche l'activation d'ATM. Il en résulte la désorganisation des éléments de réponses aux dommages à l'ADN et de l'instabilité génétique (Song et al., 2007).

De façon intéressante, il a également été montré récemment que le GOF de p53 peut induire l'altération de l'expression de gènes via la modification d'histones, ce qui module l'accessibilité de la chromatine aux FT sans liaison directe de ces FT avec les p53 mutantes. En effet, les p53 mutantes peuvent coopérer avec des complexes impliqués dans le contrôle de la structure de la chromatine, remodeler la chromatine au niveau du promoteur de facteur angiogénique VEGFR2 et augmenter ainsi son expression (Pfister et al., 2015). Des mutants de p53 peuvent aussi se lier et activer les méthyltransferases MLL1 et MLL2, augmenter la méthylation des histones, modifier la transcription de certains gènes et ainsi favoriser la croissance tumorale (Zhu et al., 2015). Il semblerait même que p53 puisse directement se fixer sur des nouvelles séquences spécifiques de l'ADN et induire l'expression de gènes favorisant le développement tumoral, mais ce mécanisme reste encore à prouver (Freed-Pastor and Prives, 2012).



**Figure 24 : Mécanismes de gain de fonction des p53 mutantes.**

Il existe de multiples mécanismes par lesquels les p53 mutantes exercent leurs gains de fonctions, pouvant être transcriptionnels ou non transcriptionnels. Ces mécanismes peuvent se classer en plusieurs catégories :

- (A) Interaction physique avec les membres de la famille de p53 (p63 et p73), pour inhiber la transcription de leur gènes cibles respectifs.
- (B) Interaction avec des facteurs de transcription (par exemple NF-Y, Sp1, Ets-1...) induisant leur inhibition ou au contraire leur recrutement au niveau de leur site de fixation à l'ADN et la transcription de leurs gènes cibles respectifs.
- (C) Interaction directe avec d'autres protéines qui ne sont pas des facteurs de transcription (Bcl-xL, MLL1...)
- (D) Recrutement directe des p53 mutantes sur de nouvelles séquences spécifiques de l'ADN, mais ce mécanisme est encore mal connu

D'après (Freed-Pastor and Prives, 2012).

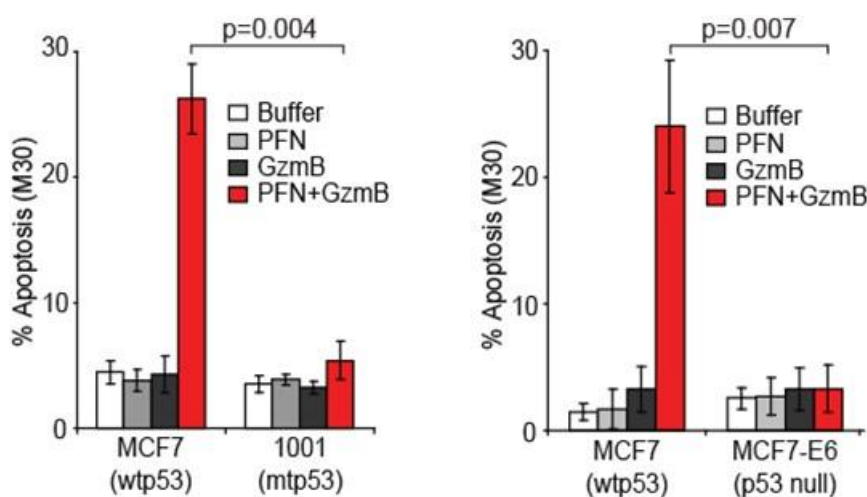
#### 4.4. Mutation et résistance aux thérapies conventionnelles

Le principal objectif des thérapies anti-cancéreuses est d'inhiber la prolifération et de favoriser la mort des cellules cancéreuses. De manière intéressante, l'expression de p53 mutantes a été associée à de nombreuses chimio-résistances dans les cancers mammaires (Aas et al., 1996), ovariens (Shelling, 1997), pulmonaires (Horio et al., 1993), gastriques et colorectaux (Hamada et al., 1996). Ce n'est pas seulement la perte des fonctions clés pro-apoptotiques de p53 qui confèrent cette résistance aux chimiothérapies, mais également l'effet GOF exercé par certains mutantes de p53. Par exemple, les mutantes de p53 stimulent l'expression de ABCB1 (ATP Binding Cassette Subfamily B Member 1), un transporteur qui gère les flux d'agents thérapeutiques à travers la membrane plasmique, ce qui confère une résistance à de multiples agents (Wijdeven et al., 2016). D'ailleurs, p53 WT exerce l'effet opposé sur l'expression de ABCB1 en comparaison aux p53 mutantes (Chin et al., 1992). Certains mutantes p53 bloquent la réponse aux dommages à l'ADN dépendante de l'activation d'ATM et stimulent l'activité de PARP1, permettant aux cellules tumorales de survivre à la présence d'un taux élevé d'altération du génome (Song et al., 2007) (Polotskaia et al., 2015) ce qui pourrait constituer un mécanisme de résistance à la radiothérapie.

D'ailleurs, plusieurs études ont montré que les p53 mutantes étaient capables d'induire une résistance à la radiothérapie (Lowe et al., 1994) (Lee and Bernstein, 1993) et étaient associées à un mauvais pronostic (Bergh et al., 1995).

#### 4.5. Influence des mutations de p53 sur la réponse immunitaire antitumorale

Compte tenu du rôle de p53 dans la réponse immunitaire antitumorale, les mutations de p53 peuvent sans doute altérer cette réponse par de différentes façons, même si cet aspect reste peu étudié. Néanmoins, des travaux préliminaires non publiés du laboratoire ont montré que l'apoptose induite par les cellules effectrices cytotoxiques ou la voie PFN/GzmB du clone 1001 (p53<sup>R273H</sup>) et de la lignée MCF7-E6 (p53<sup>NULL</sup>), est diminuée par rapport à celle de leur lignée parentale MCF7 (p53<sup>WT</sup>) (Figure 25). Ainsi, l'inactivation de p53 par mutation semble diminuer de façon significative la mort des cellules cibles induite par les cellules effectrices cytotoxiques, suggérant que les mutations inactivatrices de p53 pourraient être associées avec une résistance tumorale à la mort induite par les cellules tueuses.

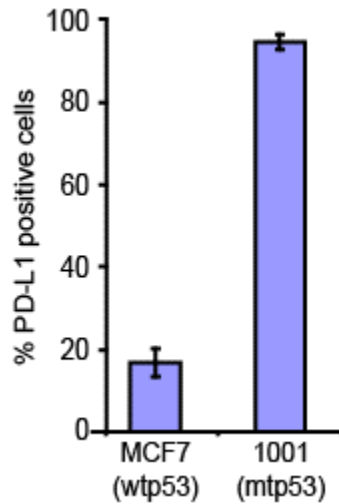


**Figure 25 : L'inactivation de p53 (mutation ou déplétion) semblent induire une résistance à l'apoptose induite par la voie Perforine/Granzyme B**

L'apoptose induite par le traitement PFN/GzmB des cellules du clone 1001 (p53<sup>R273H</sup>) et de la lignée MCF7-E6 (p53<sup>NULL</sup>) est très réduite par rapport à lignée parentale MCF7 (p53<sup>WT</sup>). L'apoptose a été mesurée par cytométrie en flux en utilisant un marquage par l'anticorps M30 (qui reconnaît un épitope de la cytokératine 18 produit après son clivage par les caspases effectrices). La moyenne +/- écart-type du pourcentage de cellules M30<sup>+</sup> de quatre expériences indépendantes est représentée. La p-value a été déterminée par un test de Student. (Thierry J, données non publiées).

Par ailleurs, des résultats préliminaires du laboratoire indiquent également que les cellules du clone 1001 (p53<sup>R273H</sup>) expriment bien plus de PD-L1 que les cellules parentales MCF7 (p53<sup>WT</sup>) (Figure 26). Ces données suggèrent que l'inactivation de p53 par mutation favorise l'expression de PD-L1, même si le rôle de p53 WT dans la régulation de PD-L1, évoqué au chapitre 3.4.3.2.2, reste controversé.





**Figure 26 : L'expression de PD-L1 semble dépendre du statut de p53**

Le pourcentage de cellules positives pour PD-L1 parmi les cellules du clone 1001 (p53<sup>R273H</sup>) est cinq fois plus élevé que parmi les cellules parentales MCF7 (P53<sup>WT</sup>). L'expression de PD-L1 a été mesurée par cytométrie en flux. La moyenne +/- écart-type du pourcentage de cellules PD-L1 positives de trois expériences indépendantes est représentée. (Ben Safta T, données non publiées).

D'autre part, les mutations de p53 peuvent influencer la reconnaissance des cellules cancéreuses par les CTL. En effet, des cellules T capables de reconnaître les néo-épitopes de p53 mutées ont été détectées dans des cancers du poumon (Fedoseyeva et al., 2000) (Malekzadeh et al., 2019). De façon similaire, dans un modèle murin, la croissance de cellules tumorales mutées pour p53 génère des CTL et des cellules T CD4<sup>+</sup> spécifiques des néo-antigènes de p53 contenant les acides aminés mutés (Noguchi et al., 1994). Ainsi, les p53 mutantes peuvent être apprêtées, présentées sur les molécules CMH-I (Couch et al., 2007), et pourraient déclencher une réponse immunitaire antitumorale spécifique. Cependant, le taux d'expression de p53 n'est pas toujours corrélé avec la reconnaissance des cellules cancéreuses par les CTL spécifiques de p53. Cela suggère que certaines mutations, contrairement à d'autres, altèrent la stabilité de p53 et modulent sa capacité à être présentée aux CTL, ce qui génère une réaction immunitaire. Cette dernière semble donc être dépendante du statut de la mutation et indépendante du niveau d'expression de p53 (Shamalov et al., 2017).

Par ailleurs, une forte corrélation entre les mutations de p53 et la présence d'auto-anticorps anti-p53 a été identifiée chez des patients atteints de cancer ovarien, du poumon et du sein (Angelopoulou et al., 1997) (Angelopoulou and Diamandis, 1997) (Houbiers et al., 1995) (Lubin et al., 1995). Ces anticorps reconnaissent principalement les épitopes issues des parties C et N terminales de p53, ne possédant pas de mutations (Schlichtholz et al., 1992), ce qui suggère que la présence de ces anticorps est due à la surexpression de p53 plutôt qu'à l'apparition de néo-épitopes à partir des p53 mutées. Malheureusement, le rôle de cette immunité générée par les cellules B dans certains cancers surexprimant une p53 mutante reste méconnu.

#### 4.6. Stratégies thérapeutiques ciblant les mutants de p53

Puisque les protéines p53 mutantes s'accumulent souvent à forte concentration et exercent un GOF contribuant à la progression tumorale, cibler les mutants de p53 est devenue une stratégie thérapeutique attractive dans les cancers exprimant une p53 mutée (Bykov et al., 2018) (Brosh and Rotter, 2009) (Gurpinar and Vousden, 2015) (Silva et al., 2020). Les principales stratégies pour cibler les mutants de p53 sont de restaurer son activité WT, réduire le taux de p53 mutantes dans les cellules cancéreuses et inhiber leurs GOF (Figure 28).

##### 4.6.1. Stratégies génétiques

Les stratégies génétiques, ou « thérapies géniques », historiquement plus anciennes, consistent à introduire par l'intermédiaire de vecteurs viraux le gène *TP53* WT au sein des cellules cancéreuses des patients. La première tentative de remplacement par un gène *TP53* WT pour traiter le cancer a impliqué l'administration directe d'un vecteur d'expression rétroviral codant pour p53 et fut un succès dans un modèle préclinique de cancer du poumon humain chez la souris (Fujiwara et al., 1994). Ces résultats ont conduit à un essai clinique dans le cancer du poumon à un stade avancé (Roth et al., 1996), mais les résultats furent mitigés bien qu'aucune toxicité majeure n'ait été identifiée. Cependant, puisque le rétrovirus s'intégrait au génome de l'hôte et induisait de la cancérogénèse, les essais cliniques avec ce vecteur furent abandonnés (Lindemann et al., 2013). Les essais cliniques suivant de thérapie génique ciblant p53 utilisèrent des vecteurs d'adénovirus non-réplicatifs (Ad-p53). Leur avantage est qu'ils ne s'intègrent pas au génome de l'hôte. Dans un essai clinique de phase I, après administration de l'Ad-p53, le taux de régression tumorale fut faible bien que l'expression de p53 fut retrouvée dans presque 50% des tumeurs traitées (Roth, 2006). Durant la phase clinique suivante, environ 10% des patients recevant le vecteur ont eu une régression tumorale complète ou partielle (Swisher et al., 1999) (Tassone et al., 2013). D'autres essais cliniques avec un Ad-p53 ont été réalisés avec, en général, pas de toxicité importante mais une efficacité limitée. (Yang et al., 2010) (Tazawa et al., 2013). Bien que Ad-p53 est maintenant disponible commercialement (Gendicine, Shenzhen SiBiono GeneTech Co) et approuvé en Chine, son approbation a été retirée par la *FDA* en 2008 (Osborne, 2008).

Afin de développer des méthodes plus efficaces de réintroduction du gène *TP53* WT dans les tumeurs et d'augmenter son activité antitumorale, de nouveaux vecteurs ont été développés tels que des adénovirus oncolytiques capables de se répliquer et de cibler spécifiquement la tumeur (Tazawa et al., 2013). Ces vecteurs utilisent un promoteur de gène associé au cancer afin de contrôler la propagation du virus d'une façon dépendante de la tumeur. Leur étude sur des modèles animaux suggère que ces nouveaux vecteurs sont sûrs et possèdent une activité antitumorale supérieure au système Ad-p53 (Tazawa et al., 2013). Enfin, un autre vecteur contenant le gène

*TP53* WT au sein de l'adénovirus ONYX-015 a été développé. Celui-ci a la capacité de se répliquer et de lyser sélectivement les cellules cancéreuses dépourvues de p53 (Bischoff et al., 1996). D'après les essais cliniques, l'ONYX-015 était efficace en combinaison avec des chimiothérapies dans plusieurs cancers (Nemunaitis et al., 2000) (Heise et al., 2000). Cependant, ce produit a été abandonné en 2003 suite à certaines controverses (Dolgin, 2015). Ces traitements par thérapie génique, en plus de leur potentielle dangerosité, se révèlent fort coûteux. D'autres approches de restauration de l'activité de p53 moins coûteuses sont ainsi en développement, faisant intervenir des petites molécules réactivatrices de p53.

#### 4.6.2. Molécules réactivatrices de p53

Les protéines p53 mutantes se stabilisent et s'accumulent seulement dans les tumeurs et pas dans les tissus normaux (Alexandrova et al., 2015) (Olive et al., 2004). Ainsi, restaurer l'activité WT de p53 peut avoir un effet ciblé sur les cellules tumorales dont la p53 est mutée en induisant leur apoptose et en inhibant leur prolifération et leur migration avec peu d'effets secondaires sur les tissus normaux contenant une p53 WT. Cette stratégie est particulièrement utile pour traiter les tumeurs de stade avancé qui ont souvent un allèle mutant et perdu l'allèle p53 WT restant. Ces tumeurs sont souvent plus agressives et résistantes au traitement. De nombreuses molécules ont la capacité de restaurer l'activité p53 WT, les principales sont présentées ci-dessous.

##### 4.6.2.1. CP-31398

CP-31398, la première molécule possédant une activité réactivatrice de p53, est une styrylquinazoline (Figure 27) identifiée par « screening *in vitro* » à partir d'une banque de 100000 agents thérapeutiques pouvant réactiver la fonction du domaine de liaison à l'ADN de certains mutants de p53 (Wischhusen et al., 2003) (Foster et al., 1999). De nombreuses études ont montré que le traitement par CP-31398 augmente l'expression de p21 et induit l'arrêt du cycle cellulaire dans de nombreuses lignées tumorales (Foster et al., 1999). De plus, CP-31398 induit la translocation mitochondriale de p53, ce qui augmente la MOMP, et donc la libération du cytochrome c et l'apoptose des cellules cancéreuses (Tang et al., 2007). D'autre part, CP-31398 pourrait re-conformer les protéines p53 mutantes dans les cellules vivantes probablement en ciblant les protéines néosynthétisées (Rippin et al., 2002). Dans des lignées d'adénocarcinome pancréatique, CP-31398 induit l'apoptose mais aussi l'autophagie (Fiorini et al., 2013).

*In vivo*, le traitement de CP-31398 inhibe drastiquement la croissance tumorale dans plusieurs modèles de cancer, comme des xénogreffes de mélanome et de cancer du côlon mutées pour p53 (Foster et al., 1999) (Jiao et al., 1986). De même, dans des modèles souris de carcinome de la peau induit par UV, CP-31389 diminue la croissance tumorale (Tang et al., 2007) et empêche

le développement de tumeurs induites par ultraviolet de type B (Tang et al., 2007). Il est également important de noter que bien que CP-31398 inhibe la croissance tumorale *in vivo*, il semble avoir un mécanisme d'action complexe. En effet, des études de résonance nucléaire magnétique n'ont pas été capables de montrer une liaison directe de CP-31398 avec p53 (Rippin et al., 2002). En conséquence, CP-31398 n'influerait ni sur la liaison p53-MDM2, ni sur la phosphorylation de p53 mais peut inhiber l'ubiquitylation de p53 et donc augmenter son expression (Wang et al., 2003). De plus, CP-31398 agit aussi sur des cellules p53 WT et p53 nulle. Ses effets peuvent donc être à la fois dépendants et indépendants de p53 en ciblant différentes voies (Wischhusen et al., 2003).

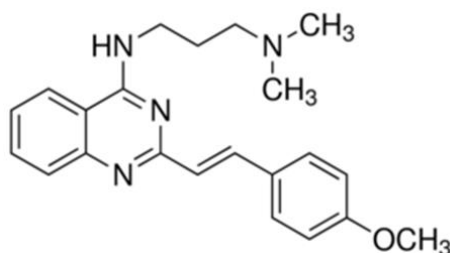


Figure 27 : Représentation topologique de CP-31398

#### 4.6.2.2. PRIMA-1 et APR246

Parmi les différentes molécules réactivatrices de p53, PRIMA-1 [2,2-bis (hydroxyméthyl)-3-quinuclidinone] (p53 reactivation and induction of massive apoptosis) est la plus étudiée et la plus prometteuse (Bykov et al., 2016) (Bykov et al., 2002a). PRIMA-1 a été identifiée par « screening » de molécules démontrant préférentiellement un effet inhibiteur de la prolifération de cellules Saos (p53<sup>null</sup>) transfectées avec en vecteur exprimant le mutant p53<sup>R175H</sup> (Bykov et al., 2002a). PRIMA-1 peut restaurer l'activité WT de p53 en changeant la conformation des protéines p53 mutantes dénaturées accumulées dans le cytoplasme (Bykov et al., 2002a) et ainsi rétablir sa capacité de liaison avec ses séquences spécifiques d'ADN conduisant à la transactivation de ses gènes cibles (Bykov et al., 2005a). Bien que p53 présente différentes mutations faux sens, il a été montré que PRIMA-1 restaure la capacité à se fixer à l'ADN de la plupart des mutants de p53 testés, l'exception étant la p53 mutée en position 176. Ainsi, PRIMA-1 semble restaurer au moins certaines caractéristiques de la p53 WT indépendamment de la localisation de la mutation ou de son type (de structure ou de contact) (Bykov et al., 2002a). Par ailleurs, l'activité pro-apoptotique et la perméabilité de la membrane de PRIMA-1 ont été grandement augmentées par l'addition d'un groupe méthyle, donnant ainsi la molécule APR-246 ou PRIMA-1<sup>MET</sup> (Bykov et al., 2005b). Ces deux molécules, PRIMA-1 et APR-246, ont la capacité d'inhiber la prolifération cellulaire, de favoriser l'apoptose dans une large variété de lignées cellulaires et d'avoir une activité anti-cancéreuse dans plusieurs modèles de tumeurs xénotreffées (Bykov et al., 2002b) (Shi et al., 2008) (Zandi et al., 2011) (Synnott et al., 2017) (Krayem et al., 2016).

Concernant le mécanisme d'action, une fois dans la cellule, PRIMA-1 et APR-246 sont converties en un métabolite, le méthylène quinuclidinone (MQ), qui réagit de façon covalente avec des groupes thiols spécifiques au niveau des p53 mutantes (Lambert et al., 2009). La fixation de la MQ engendre le repliement correct de la protéine mutante. Des preuves de ce repliement ont été identifiées grâce à un anticorps anti-p53 spécifique d'une conformation WT de p53. (Lambert et al., 2009). Néanmoins, bien que la plupart des études montrent que PRIMA-1 et APR-246 inhibent la croissance des cellules cancéreuses exprimant une p53 mutée de façon sélective, certaines études ont conclu que ces molécules peuvent agir indépendamment de p53 mutée. En effet, en plus de réactiver p53, APR-246 peut aussi se fixer et activer les homologues de p53, les protéines p63 et p73 (Saha et al., 2013) (Sobhani et al., 2015) (Rökæus et al., 2010).

D'autre part, APR-246/MQ peuvent exercer une activité anti-cancéreuse par d'autres mécanismes en diminuant la formation de glutathion et en augmentant la production de ROS (Tessoulin et al., 2014) (Ali et al., 2016) (Yoshikawa et al., 2016). En effet, dans des cellules cancéreuses d'œsophages, il a été montré que MQ réagit avec la glutathione (GSH). Il en résulte une accumulation de ROS (Liu et al., 2017a), notamment issus des mitochondries qui conduisent à la peroxydation des lipides, la perméabilisation des mitochondries, la libération du cytochrome c et le déclenchement de l'apoptose. De plus, bien que PRIMA-1 et APR-246 présentent une activité anti-cancéreuse, cette activité peut être grandement améliorée en les combinant avec d'autres traitements contre le cancer mais cela dépend des lignées cellulaires et des spécificités des molécules ajoutées en combinaison (Synnott et al., 2017).

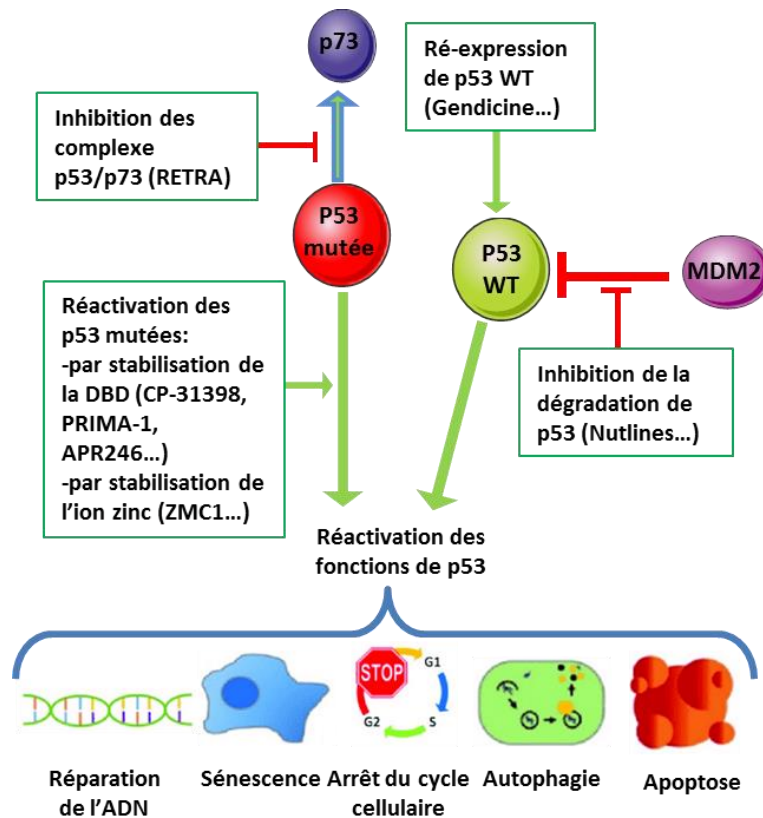
Enfin, APR-246 a été le premier agent réactivant p53 à progresser dans les essais cliniques. En phase une, APR-246 a été administré à des patients avec des cancers de la prostate ou hématologique. Globalement, la molécule fut bien tolérée (Lehmann et al., 2012). Actuellement, APR-246 est en essai clinique de phase Ib/II (PiSARRO) en combinaison avec du carboplatine et de la doxorubicine liposomale, chez des patientes avec des cancers de l'ovaire de haut grade récurrent (code de l'essai clinique, NCT02098343). Pour cet essai, les patientes ont été sélectionnées à partir d'un marquage des cellules tumorales positif pour p53. Les études préliminaires de cet essai suggèrent qu'APR-246 est bien toléré (Gourley et al., 2016) (Gourley et al., 2015).

#### 4.6.2.3. Autres molécules réactivatrices de p53

MDM2 étant le principal inhibiteur de p53 et pouvant être surexprimé dans de nombreux cancers, certaines stratégies thérapeutiques de réactivation de p53 consistent à utiliser des agents capables de bloquer MDM2 dans des tumeurs p53 WT. Parmi ces agents, il existe les antagonistes de MDM2, tels que les molécules de la famille des Nutlines, et les inhibiteurs de l'interaction MDM2-p53, MI-219 et MI-319 (Gupta et al., 2019) (Lane et al., 2010). Les Nutlines, découvertes

en 2004, sont les premières molécules à avoir été identifiées comme agoniste de MDM2. Les Nutlines (-1, -2 et -3) ont la capacité de se lier au niveau de la poche hydrophobique de MDM2 normalement réservée à la liaison avec p53, et d'empêcher l'interaction MDM2-p53, et par conséquent d'activer p53 dans les cellules cancéreuses et de déclencher l'apoptose, l'arrêt du cycle cellulaire et l'inhibition de la croissance tumorale (Vassilev et al., 2004). L'effet des Nutlines a été évalué dans les cancers hématologiques (Saha et al., 2010) (Secchiero et al., 2008), mammaires (Pechackova et al., 2016), ovariens (Zanjirband et al., 2016), nasopharyngés (Yee-Lin et al., 2018) et œsophagiens (He et al., 2018). Globalement, ces études montrent que les Nutlines induisent la réactivation des p53, l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose des cellules cancéreuses ainsi que la régression tumorale, seules ou en combinaison avec d'autres agents thérapeutiques.

Il existe également de nombreuses autres molécules ayant la capacité de réactiver les fonctions WT de p53 (Parrales and Iwakuma, 2015) (Schulz-Heddergott and Moll, 2018). Ces molécules se répartissent en plusieurs catégories : les molécules se liant et stabilisant le DBD de p53 (PRIMA-1, APR-246, COTI-2...), les molécules stabilisant le mutant p53 Y220C (PhiKan083 et PhiKan7088 (Boeckler et al., 2008) (Liu et al., 2013), les petits peptides ciblant les p53 mutantes (ReACp53) (Soragni et al., 2016) (Tal et al., 2016), les métallo-chaperonnes du zinc (ZMC1) (Yu et al., 2014) (Blanden et al., 2015), les molécules inhibant les complexes mutp53/p73 (RETRA) (Kravchenko et al., 2008) (Hong et al., 2014) et les phénéthyles isothiocyanates dérivés des végétaux de type crucifère (Aggarwal et al., 2016).



**Figure 28 : Stratégies de réactivation de p53**

Afin de déclencher l'action antitumorale de p53 dans les tumeurs déficientes en p53, de nombreuses stratégies thérapeutiques ont été développées et peuvent être classées en plusieurs catégories :

- réintroduction de p53 WT par thérapie génique (Gendicine, Advexin) dans les tumeurs où p53 est absente ou mutée
- restauration d'une conformation de p53 transcriptionnellement active (CP-31398, PRIMA-1, APR-246...)
- blocage de l'inhibition de p53 par MDM2 (Nutlines ...)
- inhibition de la formation de complexe p53/p73 (RETRA)

#### 4.6.3. Stratégies d'inhibition du gain de fonction

De plus en plus de travaux suggèrent que de nombreuses tumeurs deviennent addictives à leur p53 mutante et le GOF qui leur est associé. Le knockdown du mutant de p53 dans les cellules cancéreuses réduit drastiquement leur prolifération, la croissance tumorale et leur capacité à métastaser (Alexandrova et al., 2015). Ces observations d'addiction de p53 mutantes indiquent que certaines tumeurs dépendent de l'expression constante de leurs p53 mutantes pour continuer de croître ; et qu'éliminer leurs p53 mutantes pourrait être une stratégie thérapeutique prometteuse contre les tumeurs possédant une p53 mutée.

Par exemple, Hsp90 peut contribuer à la stabilisation et l'accumulation de p53 mutantes en inhibant la dégradation des p53 mutantes par MDM2 (Whitesell et al., 1998) (Blagosklonny et al., 1996) (Muller et al., 2008). Les inhibiteurs de Hsp90, tels que la geldanamycine, 17AAG et le Ganetespib, ont été testés en tant qu'agents thérapeutiques sur des cancers contenant des p53 mutées. Le traitement des cellules cancéreuses aux 17AAG induit la dégradation de plusieurs mutants de p53 incluant R175H, L194F, R273H et R280K, et réduit la viabilité des cellules contenant ces mutants (Li et al., 2011a). Ganetespib, un inhibiteur synthétique de HSP90, est plus efficace que

17AAG pour dégrader les p53 mutantes (mais pas les WT), et tuer les cellules cancéreuses contenant ces mutants (Alexandrova et al., 2015). Les résultats d'études in vivo utilisant des souris p53 mutée et p53 nulle ont montré que le traitement à la Ganestespib supprime la croissance tumorale et augmente la survie d'une façon dépendant de p53 mutée (Alexandrova et al., 2015). Le Ganestespib est actuellement en essai clinique dans le cancer du poumon, et a démontré sa non dangerosité chez les patients atteints de cancers (Ramalingam et al., 2015) (Goyal et al., 2015) (Jhaveri et al., 2014).

De plus, inhiber l'activité de HDAC6, un régulateur positif essentiel de Hsp90, a aussi pour conséquence de dégrader les p53 mutées (Li et al., 2011b). Les inhibiteurs d'Histone déacétylase (HDACi), tels que suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA), peuvent dégrader les p53 mutantes et induire une forte cytotoxicité chez les cellules dont la p53 est mutées en comparaison avec celles qui ont la forme WT ou qui sont déficientes pour p53 (Li et al., 2011b). D'autre part, l'acide Gambogique (GA), naturellement produit par l'arbre *Garcinia Hanburyi*, a aussi la capacité d'induire la dégradation de p53 mutée (Gu et al., 2008) en empêchant l'interaction mutant-p53/Hsp90, en augmentant l'interaction mutant-p53/Hsp70 et en contribuant à l'export de p53 mutée du noyau au cytoplasme où a lieu sa dégradation (Wang et al., 2011).

De façon intéressante, certaines molécules telles que la capsaïcine (principal composant du poivre) aurait la capacité à la fois d'entraîner la dégradation d'une partie des p53 mutantes par autophagie et de réactiver l'activité transcriptionnelle des p53 restantes (Garufi et al., 2016).



## OBJECTIFS

Comme évoqué dans l'introduction, comprendre les mécanismes de résistance tumorale à la destruction induite par le système immunitaire nécessite une étude en profondeur des mécanismes moléculaires de la mort induite par les CTL/NK, notamment via la voie PFN/GzmB, ainsi que des mécanismes d'immunosuppression dépendants des points de contrôle ou « immune checkpoint ». Dans ce contexte, le rôle de la protéine suppresseur de tumeur, dont les fonctions biologiques sont capitales pour la suppression tumorale par la régulation de l'apoptose, est particulièrement intéressant. En effet, des travaux du laboratoire ont mis en évidence le rôle de p53 WT dans la réponse immunitaire antitumorale et en particulier dans l'apoptose induite par les effecteurs cytotoxiques. Plus précisément, ces études ont montré que le GzmB, un inducteur de l'apoptose majeur utilisé par les CTL/NK, induit une activation/stabilisation rapide, par phosphorylation, de p53 dans les cellules cibles. De manière importante, l'inhibition de p53 WT par siRNAs réduit l'apoptose induite par le GzmB et les CTL. Par la suite, l'étude des mécanismes moléculaires, conduisant à l'activation de p53 par le GzmB, a montré que le GzmB induit des dommages à l'ADN très précoces grâce à l'activation de l'endonucléase CAD qui active la kinase de stress hSMG-1, en partie responsable de la phosphorylation de p53 dans les cellules cibles et de l'apoptose induite par la voie PFN/GzmB. Des travaux au sein du laboratoire ont ensuite montré qu'en réponse au GzmB ou aux CTL/NK, p53 s'accumule rapidement dans les cellules cibles au niveau des mitochondries et interagit, via sa fonction non transcriptionnelle, avec Bcl-2 ce qui prévient l'effet inhibiteur de Bcl-2 à la fois sur Bax et t-Bid et contrôle donc l'activation de Bax, la MOMP et la libération du cytochrome c. De plus, l'inhibition de l'interaction p53-Bcl2 par la pifithrin- $\mu$  bloque l'apoptose induite par le GzmB et la lyse des cellules cibles tumorales par les CTL et les NK (Ben Safta et al., 2015; Meslin et al., 2007, 2011; Thiery et al., 2015). Ces résultats ont donc mis en évidence le rôle crucial de la forme WT de p53 dans la susceptibilité tumorale à la lyse induite par les CTL et les cellules NK via la voie PFN/GzmB. Or, comme mentionné dans l'introduction, le gène *TP53* est très fréquemment muté dans les tumeurs humaines, altérant ses fonctions notamment pro-apoptotiques. Il est donc probable que ces mutations de p53 puissent également diminuer la susceptibilité tumorale aux effecteurs cytotoxiques et qu'une réactivation de ces protéines p53 mutantes puisse potentialiser la lyse de ces cellules tumorales. Dans ce cadre, **le premier objectif de ma thèse a consisté à évaluer l'impact de la réactivation pharmacologique de la fonction p53 WT sur la susceptibilité des cellules tumorales exprimant une p53 mutée à la lyse induite par les CTL et les cellules NK.** Pour ce faire, j'ai principalement utilisé des modèles d'adénocarcinome mammaire mutés pour p53 et testé l'effet de la petite molécule CP-31398 sur la fonction de p53 et sur la lyse dépendante des cellules NK. J'ai également déterminé les mécanismes moléculaires associant la réactivation de la fonction de p53 et la potentialisation de la lyse de ces cellules de tumeur du sein par les cellules NK.

D'autre part, au cours de ma thèse, je me suis intéressée à l'implication de p53 dans la régulation de l'expression du checkpoint immunitaire PD-L1. En effet, au cours des dernières années, des travaux publiés par différentes équipes ont permis de faire émerger l'idée que p53 pourrait moduler l'activité des CTL/NK via le contrôle de l'expression du checkpoint inhibiteur PD-L1. En effet, il semblerait que miR34a, une cible transcriptionnelle de p53 WT, puisse, par liaison directe avec l'ARNm de PD-L1, inhiber son expression. En ce sens, l'inhibition de p53 WT augmenterait l'expression de PD-L1 à la surface des cellules tumorales ce qui réprimerait l'activité cytotoxique des CTL (Cortez et al., 2016). Cependant, d'autres travaux ont montré à l'inverse que l'activation de p53 WT favoriserait l'expression de PD-L1 et l'immunosuppression (Yoon et al., 2015). Ainsi, le lien entre p53 WT et l'expression de PD-L1 reste controversé et requière des études supplémentaires. De plus très peu de travaux se sont intéressés à l'impact des mutations inactivatrices de p53, fréquemment retrouvées dans les tumeurs humaines, sur l'expression de PD-L1. Sur la base de résultats préliminaires du laboratoire suggérant que l'inactivation de p53 par mutation favoriserait l'expression de PD-L1 par un mécanisme qui pourrait s'apparenter à un gain de fonction, **le deuxième objectif de ma thèse a donc consisté à déterminer l'impact des mutations inactivatrices de p53 sur l'expression de PD-L1 par les cellules tumorales dont la p53 est mutée et les mécanismes moléculaires sous-jacents régulant cette expression.** Pour ce faire, j'ai utilisé plusieurs modèles tumoraux et testé l'effet de plusieurs mutations de p53 sur l'expression de PD-L1. Des travaux en cours ont également pour but d'étudier les mécanismes moléculaires associés à la régulation de l'expression de PD-L1 par les mutants de p53, notamment en lien avec un gain de fonction de ces mutants.

## RESULTATS

# **Partie 1 : Mise en évidence de l'effet potentialisateur de la restauration pharmacologique des fonctions de p53 sur la sensibilité des cellules de cancer du sein p53 mutées à la lyse induite par le granzyme B et les cellules NK**

## **Article 1:**

**“The pharmacological reactivation of p53 function improves breast tumor cell lysis by granzyme B and NK cells through induction of autophagy”**

Marie Chollat-Namy\*, Thouraya Ben Safta-Saadoun\*, Djazia Haferssas, Guillaume Meurice, Salem Chouaib and Jerome Thiery

*Cell Death and Disease 10:695, 2019*

\*co-premier auteur

## Résumé

Les lymphocytes T cytotoxiques (CTL) et les cellules NK sont des cellules effectrices clés de la réponse immune antitumorale grâce à leur capacité à éliminer les cellules tumorales, principalement via la voie d'exocytose des granules cytotoxiques contenant notamment de la perforine et du granzyme B. Malheureusement, les cellules tumorales peuvent développer des mécanismes d'échappement à l'apoptose induite par ces effecteurs cytotoxiques.

La protéine p53 exerce un rôle clé dans la suppression tumorale grâce à ses fonctions biologiques en lien avec la régulation de l'apoptose, du cycle cellulaire, de la réparation de l'ADN ou encore de l'autophagie. De manière importante, des travaux au sein de notre laboratoire ont également montré que la protéine p53, sous sa forme sauvage, est impliquée dans la régulation positive de la lyse des cellules tumorales induite par les CTL/NK via la voie PFN/GzmB (Meslin et al., 2007) (Meslin et al., 2011) (Ben Safta et al., 2015) (Thiery et al., 2015).

Cependant, le gène *TP53* est fréquemment inactivé par mutation dans les tumeurs humaines, altérant ainsi les fonctions de p53, et notamment ses capacités à induire ou réguler la mort cellulaire. Dans ce contexte, il a été émis l'hypothèse dans le laboratoire que les mutations de p53 pourraient favoriser l'échappement des cellules tumorales à l'apoptose induite par la voie PFN/GzmB et donc par les CTL/NK. Dans ce sens, des travaux non publiés du laboratoire ont montré que des clones dérivés d'une lignée de cancer du sein, exprimant une p53 mutée, étaient plus résistants à la lyse induite par les CTL/NK que les cellules tumorales parentales, exprimant une p53 sauvage. Il est donc probable que certaines mutations de p53 puissent également diminuer la sensibilité tumorale aux effecteurs cytotoxiques et qu'une réactivation de ces protéines p53 mutantes puisse potentialiser la lyse de ces cellules tumorales.

Au cours des travaux présentés ci-après, nous avons donc voulu déterminer si la réactivation de p53 dans des cellules cancéreuses possédant une p53 inactivée par mutation pouvait potentialiser la lyse tumorale par les effecteurs cytotoxiques. Plus précisément, nous avons étudié l'impact de la restauration des fonctions WT de p53 par une approche pharmacologique, dans des cellules tumorales possédant une p53 mutée, sur leur susceptibilité à la lyse induite par les cellules NK et déterminé les mécanismes moléculaires sous-jacents.

Nous avons montré que la réactivation pharmacologique de la fonction p53 WT par la petite molécule CP-31398, notamment dans la lignée de cancer du sein MDA-MB231 (p53<sup>R280K</sup>), augmente la lyse induite par les cellules NK ce qui corrèle avec la restauration de l'activité transcriptionnelle de p53. Par une analyse transcriptomique, nous avons montré que la restauration de la fonction de p53 modifie l'expression de nombreux gènes impliqués dans différentes voies moléculaires, notamment celle de l'autophagie. Ainsi, par différentes approches, nous avons validé

que CP-31398 induit de l'autophagie de façon dépendante de p53 via l'induction de l'expression de plusieurs membres du complexe ULK et de la voie Sestrine, conduisant à l'activation de la kinase AMPK et l'inhibition de mTOR. Nous avons également montré que CP-31398 induit la formation d'autophagosomes et que ces structures contiennent les protéines anti-apoptotiques Bcl-xL et XIAP. Même si l'autophagie induite par CP-31398 semble bloquée à l'étape de fusion autophagosomes/lysosomes, la séquestration spécifique de ces protéines anti-apoptotiques permet de potentialiser la perméabilisation de la membrane externe des mitochondries, le clivage des caspases 3/9 induit par le granzyme B, et donc la destruction des cellules cibles par les cellules NK.

Ces résultats définissent ainsi une nouvelle approche permettant d'augmenter la lyse de cellules tumorales mutées pour p53 par les effecteurs cytotoxiques, grâce à l'induction d'autophagie, ce qui pourrait avoir des applications potentielles en immunothérapie.

ARTICLE

Open Access

# The pharmacological reactivation of p53 function improves breast tumor cell lysis by granzyme B and NK cells through induction of autophagy

Marie Chollat-Namy<sup>1,2,3</sup>, Thouraya Ben Safta-Saadoun<sup>1,2,3</sup>, Djazia Haferssas<sup>1,2,3</sup>, Guillaume Meurice<sup>4</sup>, Salem Chouaib<sup>1,2,3,5</sup> and Jerome Thiery<sup>1,2,3</sup>

## Abstract

Cytotoxic T lymphocytes (CTL) and natural killer cells (NK)-mediated elimination of tumor cells is mostly dependent on Granzyme B apoptotic pathway, which is regulated by the wild type (wt) p53 protein. Because *TP53* inactivating mutations, frequently found in human tumors, could interfere with Granzyme B-mediated cell death, the use of small molecules developed to reactivate wtp53 function in p53-mutated tumor cells could optimize their lysis by CTL or NK cells. Here, we show that the pharmacological reactivation of a wt-like p53 function in p53-mutated breast cancer cells using the small molecule CP-31398 increases their sensitivity to NK-mediated lysis. This potentiation is dependent on p53-mediated induction of autophagy via the sestrin-AMPK-mTOR pathway and the ULK axis. This CP31398-induced autophagy sequesters in autophagosomes several anti-apoptotic proteins, including Bcl-X<sub>L</sub> and XIAP, facilitating Granzyme B-mediated mitochondrial outer membrane permeabilization, caspase-3 activation and Granzyme B- or NK cell-induced apoptosis. Together, our results define a new way to increase cytotoxic lymphocyte-mediated lysis of p53-mutated breast cancer cell, through a p53-dependent autophagy induction, with potential applications in combined immunotherapeutic approaches.

## Introduction

Cytotoxic T lymphocytes (CTL) and natural killer (NK) are important effector cells involved in the elimination of tumor cells, principally by releasing the contents of cytotoxic granules into the immune synapse<sup>1</sup>. The granule mediators of target cell lysis belong to the granzymes (Gzms) family, which induce cell death<sup>2</sup> after their delivery into target cells by the pore-forming protein perforin (PFN)<sup>3</sup>. Human Granzyme B (GzmB), one of the principal mediators of this pathway, preferentially induces target apoptosis in a mitochondria-dependent manner. Indeed, human GzmB preferentially cleaves Bid, a BH3-

only pro-apoptotic protein<sup>4</sup>. Truncated Bid (tBid) disrupts the mitochondrial outer membrane in a Bax/Bak-dependent manner, leading to the release of cytochrome c followed by caspases-9 and -3 activation and target cell apoptosis<sup>4,5</sup>. Importantly, tumor overexpression of pro-survival Bcl-2 family proteins, including Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>, or Mcl-1<sup>6–8</sup>, can block this pathway by preventing mitochondrial outer membrane permeabilization (MOMP). Moreover, inhibitor of apoptosis (IAPs), such as survivin, XIAP, cIAP-1, or cIAP-2, can also block GzmB-induced apoptosis by preventing caspase-9 or -3 activation<sup>9</sup>.

The wild type (wt) p53 tumor suppressor normally protects cells from a variety of stress and the physiologic consequence of its activation essentially leads to growth arrest or apoptosis<sup>10–12</sup>, which are particularly important in order to maintain genome integrity<sup>13</sup>. Importantly, wtp53 activation can also positively or negatively regulate autophagy<sup>14,15</sup>, which is an intracellular self-digestive

Correspondence: Jerome Thiery ([jerome.thiery@gustaveroussy.fr](mailto:jerome.thiery@gustaveroussy.fr))

<sup>1</sup>INSERM U1186, Villejuif, France

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

Full list of author information is available at the end of the article

These authors contributed equally: Marie Chollat-Namy, Thouraya Ben Safta-Saadoun

Safta-Saadoun

Edited by J.-E. Ricci

© The Author(s) 2019



**Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.



process that operates at basal level under normal circumstances but is increased under stressful conditions<sup>16</sup>. Even if numerous reports have implicated autophagy as a protective mechanism during cellular stress, autophagy can also participate to cell death induction or regulation<sup>17</sup>. Several p53-dependent mechanisms involved in autophagy induction have been described<sup>18</sup> including Sestrin-1 and -2<sup>19,20</sup> or unc-51-like kinase 1 (ULK1)<sup>21</sup> transactivation. Sestrin-1 and -2 were found to facilitate the AMP-activated protein kinase (AMPK) phosphorylation, which in turn phosphorylates and activates the TSC1–TSC2 complex, thereby inhibiting the signaling of mammalian target of rapamycin (mTOR), a major autophagy inhibitor<sup>19</sup>. The serine/threonine protein kinase ULK-1, together with ULK-2, autophagy-related gene (ATG)-101, ATG13 and focal adhesion kinase family interacting protein of 200 kDa (FIP200) form the ULK complex which drives the phagophore formation, the initial autophagosomal precursor membrane structure<sup>22</sup>. On the opposite, several studies also demonstrated that p53 could stimulate anti-autophagic responses. For example, wtp53 proteins localized in the cytosol have an inhibitory effect on autophagy<sup>15,23</sup>, as gain-of-function mutant p53 proteins<sup>24,25</sup>.

Wtp53 has also recently emerged as an important regulator of the antitumor immune response at different levels<sup>2,26</sup>. In this regard, we demonstrated that wtp53 is an important positive modulator of GzmB-induced apoptosis<sup>2,27–29</sup> and that siRNAs or drug-mediated inactivation of wtp53 significantly decrease target cells killing induced by cytotoxic effector cells or GzmB<sup>27–29</sup>. This suggests that p53 inactivating mutations frequently found in human tumors, especially in breast carcinoma, might be associated with a tumor cell resistance to killer lymphocyte-induced cell death<sup>2</sup>. Thus, the reactivation of wtp53 function in p53-mutated tumor cells could be a novel strategy to optimize CTL/NK-mediated killing. For this purpose, several novel molecules were identified during the past decade based on their properties to restore wtp53 conformation and function of mutant p53 proteins (e.g. CP-31398, APR-246...) <sup>30–32</sup>. As a proof of principles, the aim of this study was thus to investigate in vitro the effect of one of these p53-reactivating molecules on GzmB- and NK cell-mediated killing of p53-mutated breast tumor cells. We found that the reactivation of wtp53 activity using CP-31398 potentiates NK- and GzmB-mediated lysis of p53-mutated breast carcinoma cells. Mechanistically, we observed that CP-31398 induces autophagy in a p53-dependent manner through the induction of Sestrin-1 and -2 expression, leading to AMPK activation and mTOR inhibition, as well through the induction of ULK-1. We also found that CP-31398-induced autophagy is blocked at the autophagosomes/lysosomes fusion step, but is sufficient to facilitate GzmB-

and NK cell-induced MOMP and caspase-3 cleavage in target cells, mostly through the sequestration of the anti-apoptotic proteins Bcl-X<sub>L</sub> and XIAP in autophagosomes.

## Materials and methods

### Cell lines

MDA-MB231 (NCI-DTP Cat# MDA-MB-231, RRID: CVCL\_0062), T47D (NCI-DTP Cat# T-47D, RRID:CVCL\_0553), SKBR3 (ATCC Cat# HTB-30, RRID: CVCL\_0033), and MCF7 (NCI-DTP Cat# MCF7, RRID: CVCL\_0031) cell lines were grown in RPMI-1640/Glutamax™ (Gibco) supplemented with 10% FBS and 100 U/ml penicillin/streptomycin (Gibco). The NK92 (ATCC Cat# PTA-6670, RRID:CVCL\_2142) cell line and NK cells isolated from healthy donors (NKd) by positive selection (CD56 Positive Selection Kit; Stem Cell) were cultured in RPMI 1640/GlutaMax™ (Gibco) supplemented with 10% FBS and 300 U/mL rhIL2. All cell lines were originally obtained from ATCC, tested for *Mycoplasma* infection by PCR (Venor GeM OneStep; Minerva Biolabs) every 3–6 months and used at low passage (<50).

### CP-31398 treatment

Cells were treated with 7.5 µg/mL CP-31389 (Sigma-Aldrich) during 24 or 48 h. In some cases, tumor cells were co-treated with 20 µM PFT-α (Sigma-Aldrich) during 48 h or with 50 µM Chloroquine (Sigma-Aldrich) during 16 h.

### Antibodies

The following antibodies were used for either western blot, immunoprecipitation, or flow cytometry analysis:

*From Santa Cruz Bio:* anti-p53 mouse mAb (clone DO-1), anti-Bcl-2 mouse mAb (clone 100), anti-Bcl-X<sub>L</sub> mouse mAb (clone H-5), anti-Sestrin-2 mouse mAb (clone 41-K), anti-survivin mouse mAb (clone D-8), anti-Beclin1 mouse mAb (clone E-8), anti-cIAP-1 rabbit pAb (clone H-83), anti-cIAP-2 rabbit pAb (clone H-85), anti-Mcl-1 rabbit pAb (clone S-19), anti-Bax mouse mAb (clone N20). *From Cell Signaling:* anti-caspase 3 (p35) mouse mAb (clone 3G2), anti-cleaved caspase 3 (p19/p17) rabbit mAb (clone 5A1E), anti-PARP rabbit pAb (cat #9542), anti-Atg101 rabbit mAb (clone E1Z4w), anti-Atg13 rabbit mAb (clone D4P1K), anti-FIP200 rabbit mAb (clone D10D11), anti-ULK1 rabbit mAb (clone D8H5), anti-AMPKα rabbit mAb (clone D5A2), anti-Phospho-AMPKα (Thr172) rabbit mAb (clone D4D6D), anti-mTOR rabbit pAb (cat #2972), anti-Phospho-mTOR (Ser2448) rabbit pAb (cat #2971), anti-LC3B rabbit pAb (cat #2775), anti-Atg5 rabbit mAb (clone D5F5U), anti-Bid rabbit mAb (cat #2002). *From BD Bioscience:* anti-XIAP mouse mAb (clone 28/hILP). *From Merck:* anti-p21

mouse mAb (clone OP64), anti-mdm2 mouse mAb (clone 2A10). From *StressGen*: anti-mtHsp70/Grp75 mouse mAb (cat #SPA-810B). From Abcam: anti-Sestrin-1 mouse pAb (cat #ab67156). From *Sigma-Aldrich*: HRP-conjugated anti-actin mouse mAb (clone AC-74), anti-p62 rabbit pAb (cat #P0067). From *ProteinTech*: anti-NBR1 rabbit pAb (cat #16004-1-AP). From *Beckman Coulter*: FITC-conjugated anti-Fas/CD95 mouse mAb (clone UB2). From *Bio Legend*: PE-conjugated anti-DR4/CD261 mouse mAb (clone DJR1), PE-conjugated anti-DR5/CD262 mouse mAb (clone DJR2-4 (7-8)). From *R&D System*: PE-conjugated anti-ULBP-1 mouse mAb (clone 170818); APC-conjugated anti-ULBP-2/5/6 mouse mAb (clone 165903); PE-conjugated anti-ULBP-3 mouse mAb (clone 166510); PE-conjugated anti-ULBP-4 mouse mAb (clone 709116). *Generated in the laboratory*: anti-ICAM-1 (clone 25D7) mouse mAb, anti-MHC-class I mouse mAb (clone MA2.1).

#### RNA isolation and cDNA synthesis

Total RNAs were extracted from cell samples using Trizol solution (Invitrogen). The quality of RNAs was assessed using a Bio-Analyzer instrument (Agilent) and then quantified using a BioSpecNano (Shimadzu Biotech). cDNA synthesis was performed with 1 µg total RNA and a Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific).

#### RT-qPCR analysis

Gene expression was quantified by SYBR Green qPCR method using SYBR Select Master Mix on a StepOnePlus Real Time PCR system (Thermo Scientific). Relative expression was calculated using the comparative Ct method (2- $\Delta$ Ct). Transcript level of 18S was used as endogenous control. Primers were purchased from Sigma-Aldrich and their sequences (FW (5' → 3')--RV (5' → 3')) are listed below:

CDKN1A (p21): CTGCCGAAGTCAGTTCCTTGT--CATGGGTT  
VTGACGGACATC  
ULK1: GTCACACGCCACATAACAG--TCTTCTAAGTCCAAGCACA  
ULK2: TTTAAATACAGAACGACCAATGGA--GGAGGTGCCAGAACA  
CCA  
ATG5: CAACTTGTTTCACGCTATATCAGG--CACTTGTCAGTTAC-  
CAA  
CGTCA  
GABARAPL2: CCGTCGTTGTTGTTGTGCT--CTCCACGCATCTGT  
GTTCC  
ZFYVE1: ATCCCGATGACCACATG--TCATGCTTTTCTTACATCC  
AACC  
ATG12: CATAAAACACTTAGAGCAAACCTACCA--CAGATAAAA  
ACCAGAATAACTGGACA  
ATG13: AGCTGCCTTGATCTGACTGG--ATACCCCGGGGCTCTTC  
TA

SESN-1: TGGACTCTGCAGCAGAGATT--CTGATGGACGATGAGG  
TGTT  
SESN-2: TGCCTCTCTCTGACCAGTT--CCTCTTCTCTCTGCAC  
ACC  
ATG101: GAAGTGTGGACGGTCAAGGT--CACGTTATCCACCTCC  
GACT  
FIP200: CAGATGCTGAAAGTGGCAAA--GGCAATAGTTTGACGGCA  
TT

#### Microarray assay, data processing, and analysis

Quadruplicate samples from untreated (24–48 h) compared to CP-31398-treated (24–48 h) MDA-MB231 cells were analyzed. Gene expression analysis was performed with Agilent® SurePrint G3 Human GE 8 × 60K Microarray (Agilent Technologies, AMADID39494). Samples were labeled with Cy3/Cy5 using a two-color Agilent labeling kit (Low Input Quick Amp Labeling Kit; cat #5190-2306) adapted for small amount of total RNA (100 ng total RNA per reaction). Hybridization was then performed on microarray using linearly amplified labeled cRNA, following the manufacturer protocol and Agilent SureHyb Chamber. After washing in acetonitrile, slides were scanned using an Agilent G2565CA microarray scanner with defaults parameters. Microarray images were analyzed using Feature Extraction software (FES; version 10.7.3.1) from Agilent technologies. Defaults settings were used. For the data processing and analysis, raw data files from FES were imported into R with LIMMA (an R package from the Bioconductor project)<sup>33</sup>, and processed as follow: gMedianSignal data were imported, controls probes were systematically removed, and flagged probes (gIsSaturated, gIsFeatpopnOL, gIsFeatNonUnifOL) were set to NA. Inter-array normalization was performed by quantile normalization. To get a single value for each transcript, we took the mean of each replicated probes summarized data. Missing values were inferred using KNN algorithm from the package “impute” from R bioconductor. Normalized data were then analyzed. To assess differentially expressed genes between two groups, we start by fitting a linear model to the data. Then we used an empirical Bayes method to moderate the standard errors of the estimated log-fold changes. The top-ranked genes were selected based on an absolute fold-change >2 and an adjusted *p*-value (FDR) <0.05. Data have been deposited in the ArrayExpress database at EMBL-EBI ([www.ebi.ac.uk/arrayexpress](http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress)) under accession number E-MTAB-8143.

#### Western blot

Total protein extracts were prepared from cells treated or not with CP-31398 during the indicated time,  $\gamma$ -irradiated (5 Gy) or co-incubated with NKd cells at the indicated effector:target ratio during 30 min, lysed by

RIPA buffer containing a cocktail of protease and phosphatase inhibitors (Thermo Scientific). Proteins were denatured 10 min at 95 °C in Laemmli buffer before SDS-PAGE separation on 4–20% precast gels (BioRad) and transfer on nitrocellulose membrane (Thermo Scientific). Blots were probed with the indicated primary Ab and HRP-conjugated secondary Ab. Western blot quantification was performed using the Image-J densitometry software.

#### **NBR1 and p62 immunoprecipitation**

Following treatment with CP-31398, NBR1, or p62 immunoprecipitation was performed overnight at 4 °C using a classic IP kit (Pierce) and anti-p62 (cat #P0067; Sigma) or anti-NBR1 (cat #16004-1-AP; ProteinTech) rabbit pAbs, according to the manufacturer's instructions. Immune complexes were eluted and washed before boiling in Laemmli buffer. Immunoprecipitates and cell lysates (input) were run in SDS-PAGE gel (4–20% precast gel, Biorad) and immunoblotted with HRP-conjugated anti-Bcl-2, anti-BclXL, anti-XIAP, anti-LC3, anti-NBR1, or anti-p62 Abs.

#### **Flow cytometry analysis of autophagy**

To evaluate autophagy induction, MDA-MB231 ± CP-31398 (48 h) were incubated for 30 min at 37 °C in dilution buffer containing Cyto-ID-green (Cyto-ID Autophagy Detection Kit; Enzo Life Science) according to the manufacturer's instructions. Cells were then washed with dilution buffer and immediately analyzed with a BD Accuri™ C6 flow cytometer. Data analysis was performed with the FlowJo software.

#### **Flow cytometry analysis of cell surface markers**

To analyze FAS, DR4, DR5, ULBP-1, ULBP-2/5/6, ULBP-3, ULBP-4, ICAM-1, or MHC-Class I expression at the cell surface, MDA-MB231 ± CP-31398 cells were incubated 30 min at 4 °C with appropriate isotype control or one of the specific antibody indicated above. In some case, a secondary antibody conjugated to Alexa Fluor®488 (Life Technologies) was used. Cells were then fixed with PBS 1X containing 2% formaldehyde (PolySciences Inc.) before analysis with a BD Accuri™ C6 flow cytometer. Data analysis was performed with the FlowJo software.

#### **Formation of effector /target cell conjugates**

MDA-MB231 cells ± CP-31398 and NKd cells were respectively labeled during 10 min at 37 °C with the lipophilic dyes DiO or DiD (Life Technologies) and washed three times. Target cells were then incubated with NKd at the ratio effector:target of 3:1 in Ca<sup>2+</sup> free medium (HBSS containing 10 mM of Hepes pH 7,5 and 0.4% BSA) during 20 min at 37 °C to allow conjugates

formation before flow cytometry analysis (BD Accuri™ C6). The percentage of DiO<sup>+</sup> MDA-MB231 cells conjugated to DiD<sup>+</sup> NKd, corresponding to immune complex, was quantified with the FlowJo software.

#### **Fluorescence microscopy analysis**

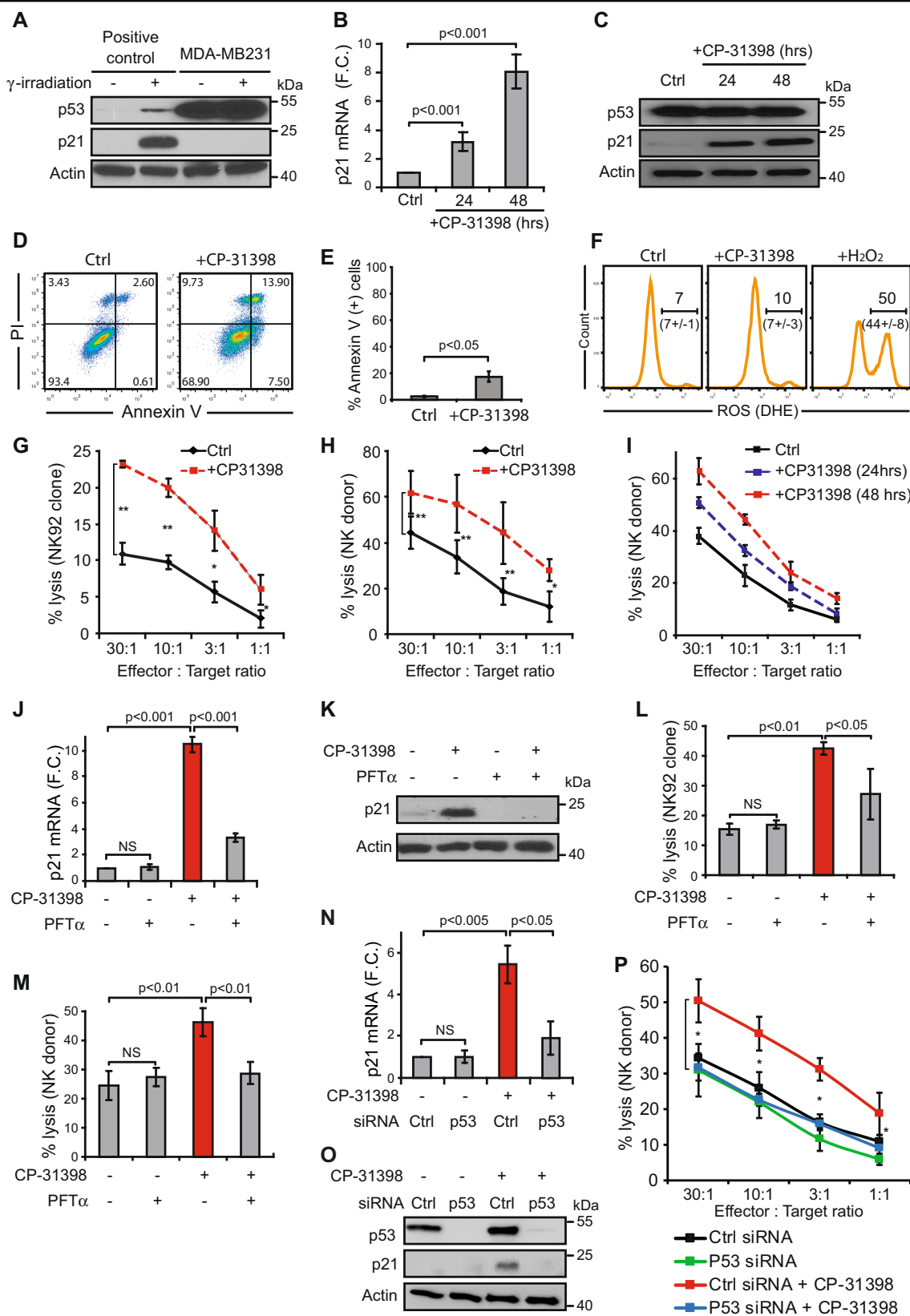
MDA-MB231 cells stably transfected with a vector encoding Tomato-LC3 using FuGENE (Promega) were grown on collagen-coated glass coverslips (Sigma). After 48 h ± CP-31398 treatment, cells were fixed and stained with the indicated primary and secondary Ab conjugated to Alexa Fluor®488 or 647 (Life Technologies). Coverslips were mounted with Vectashield/DAPI (Vector Laboratories). Image acquisition was performed with a IX83 epifluorescence microscope and data analyzed with CellSens Dimension software (Olympus). The colocalization between Tomato-LC3<sup>+</sup> autophagosomes and the protein of interest was measured and is displayed as a pearson's correlation coefficient R(r) from at least 100 cells from three independent experiments. The number of autophagosome per cell was also evaluated in at least 250 cells from three independent experiments.

#### **Transmission electron microscopy**

Cells were incubated with or without CP-31398 for 48 h or CQ for 16 h. Cell pellet were then fixed for 1 hr at 4 °C in 2% glutaraldehyde in 0.1 M Sörensen phosphate buffer, pH 7.3. Cells pellets were post-fixed for 1 h with aqueous 2% osmium tetroxide. Cells were then treated with 2% uranyl acetate in 30% methanol, dehydrated and embedded in Epoxy Embedding Medium (Sigma). Polymerization was carried out for 48 h at 65 °C. Ultrathin sections were collected and contrasted by uranyl acetate and lead citrate. For analysis, cells were observed with a FEI Tecnai 12 electron microscope using a CCD Megaview III camera and a SIS system (Olympus Soft Imaging Solutions GmbH).

#### **Monitoring of the autophagosome to autolysosome maturation by tandem sensor**

The fusion between autophagosomes and autolysosomes was measured with a Premo Autophagy Tandem Sensor RFP-eGFP-LC3B kit (Thermo Scientific) according to the manufacturer's instructions. Briefly, MDA-MB231 cells were seeded in a 6-well culture plate and infected with LC3B BacMam reagent (30 viral particles per cell) during 24 h. Cells were then treated with chloroquine (16 h) or CP-31398 (48 h). To induce starvation, cells were cultured 24 h in serum-free medium. Cells were then analyzed with a IX83 microscope and CellSens Dimension software (Olympus). Autophagosomes (in yellow) and autolysosomes (in red) were counted in at least 100 infected cells from three independent experiments.



**Fig. 1** (See legend on next page.)

(see figure on previous page)

**Fig. 1 The reactivation of p53 transcriptional activity by CP-31398 increases p53-mutated breast cancer cell susceptibility to NK-mediated lysis.** **a** MDA-MB231 cells express high level of mutated p53 (p53<sup>R280K</sup>) lacking transcriptional activity as shown by the absence of p53-dependent transactivation of its target gene p21 even after  $\gamma$ -irradiation. **b, c** 24–48 h treatment with CP-31398 reactivates p53 transcriptional activity in MDA-MB231 cells as shown by induction of p21 expression at both mRNA (**b**) and protein (**c**) levels. **d–f** CP-31398-induced apoptosis and ROS production were evaluated after 48 h treatment using AnnexinV/PI (**d, e**) or DHE (**f**) staining. **g, h** CP-31398 treatment (48 h) increases MDA-MB231 cell susceptibility to NK-mediated lysis. <sup>51</sup>Cr release assay using NK92 (**d**) or NK cells isolated from a healthy donor (**e**) co-cultured with target cells at different E:T ratios are shown. **i** CP-31398 treatment increases MDA-MB231 cell susceptibility to NK-mediated lysis in a time dependent manner. A representative <sup>51</sup>Cr release assay (from two independent experiments) using NK cells isolated from a healthy donor is shown. **j, k** PFT- $\alpha$  (an inhibitor of p53 transcriptional activity) inhibits CP-31398-dependent induction of p21 expression in MDA-MB231 cells at both mRNA (**j**) and protein (**k**) levels. **l, m** PFT- $\alpha$  inhibits the increase of MDA-MB231 lysis by NK cells observed when CP-31398 is used alone. <sup>51</sup>Cr release assay using NK92 (**l**) or NK cells extracted from a healthy donor (**m**) co-cultured with target cells at the E:T ratio of 50:1 or 30:1, respectively, are shown. **n–p** The knockdown of mutated p53 expression using siRNA inhibits CP-31398-dependent induction of p21 expression in MDA-MB231 cells at both mRNA (**n**) and protein (**o**) levels and abrogate the CP-31398-dependent increase of MDA-MB231 lysis by NK cells (**p**). Data are representative of at least three independent experiments (**a, c, d, k, o**) or are the mean  $\pm$  s.d. of three (**e–h, l, m, p**) or five (**b, j, n**) independent experiments. The p values (\* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ) were determined by unpaired two-tailed Student's *t* test (**b, e, g, h, j, l–n**) or one-way ANOVA (**p**)

### siRNAs transfection

Subconfluent MDA-M231 cells were transfected twice, at a 24 h interval, with the following siRNAs using Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen): controls siRNA (Ambion Silencer Select ID:4390843), Beclin-1 siRNA (Ambion Silencer Select ID:S16537), ATG5 siRNA (Qia-gen APG5L\_6 FlexiTube siRNA, cat #SI02655310), AMPK $\alpha$  siRNA (Sigma Mission<sup>®</sup> esiRNA, cat# EHU074041) or p53 siRNA (Ambion Silencer Select 4390824 ID:s607). Twenty-four hour after the second transfection, cells were treated or not with CP-31398 and incubated during 48 h before analysis.

### Measurement of CP-31398-induced apoptosis

To assess CP-31398-induced apoptosis, MDA-MB231 cells  $\pm$  CP-31398 (48 h) were resuspended in Annexin Buffer (150 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1.8 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM Hepes pH 7.4) containing APC-conjugated annexin V (Thermo Scientific). After 10 min incubation at room temperature, Annexin Buffer containing 10  $\mu$ g/ml propidium iodide (Sigma-Aldrich) was added. Apoptosis was immediately measured by flow cytometry (BD Accuri<sup>™</sup> C6).

### ROS monitoring by flow cytometry

To measure intracellular ROS production, MDA-MB231  $\pm$  CP-31398 (48 h) were incubated for 7 min in PBS containing 10  $\mu$ M oxidation-sensitive fluoroprobe Dihydroethidium (Thermo Scientific) according to the manufacturer's instructions. A 30 min treatment with 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was used as positive control. Cells were then immediately analyzed by flow cytometry (BD Accuri<sup>™</sup> C6).

### Measurement of mitochondrial outer membrane permeabilisation (MOMP)

MDA-MB231 cells  $\pm$  CP-31398 and pre-labeled with Vybrant DiD (Life Technologies) were incubated 30 min with NKd (effector/target ratio 5:1) or 30 min with PFN  $\pm$

GzmB and then 15 min at 37 °C with 3,3'-dihexylox-acarboyanine iodide (DioC6(3)) (Life Technologies). Labeled cells were then washed, resuspended in PBS and analyzed immediately by flow cytometry (BD Accuri<sup>™</sup> C6), focusing on DiD<sup>+</sup> cells.

### Treatment with PFN and GzmB or GzmA

Native rat PFN was purified from RNK16 cells and native hGzmB was purified from YT-Indy cells as described<sup>34</sup>. GzmA was purified as described<sup>35</sup>. MDA-MB231 cells  $\pm$  CP-31398 were resuspended in HBSS (Gibco) containing 10 mM Hepes pH 7.5, 4 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.4% BSA before adding sublytic dose of PFN  $\pm$  100 nM hGzmB or 500 nM GzmA, diluted in HBSS containing 10 mM Hepes pH7.5. To assess PFN/GzmB-induced apoptosis, cells incubated for 2 h at 37 °C with buffer or sublytic PFN  $\pm$  100 nM hGzmB were analyzed for caspase activation by flow cytometry using M30-FITC mAb staining according to the manufacturer protocol (M30 CytoDEATH, Roche) to detect an effector caspase-cleavage product of cytokeratin-18<sup>36</sup>. To assess PFN/GzmA-induced cell death, cell were analyzed by flow cytometry after Annexin-V/PI staining, as described above.

### Chromium release assay

NK cell cytotoxic activity was measured by a 4 h <sup>51</sup>Cr release assay performed in triplicate, as previously described<sup>27</sup>. Data are expressed as the percentage of specific <sup>51</sup>Cr release from target cells, calculated as (experimental release-spontaneous release)/(maximum release-spontaneous release)  $\times$  100. Inhibition of the PFN/Gzm-mediated cytotoxic pathway was performed by pre-incubating NK cells for 2 h with 100 nM concanamycin A (CMA)(Sigma-Aldrich). Functional effects of ZB4 anti-Fas neutralizing mAb was also tested by pre-incubating target cells for 2 h before the assay.

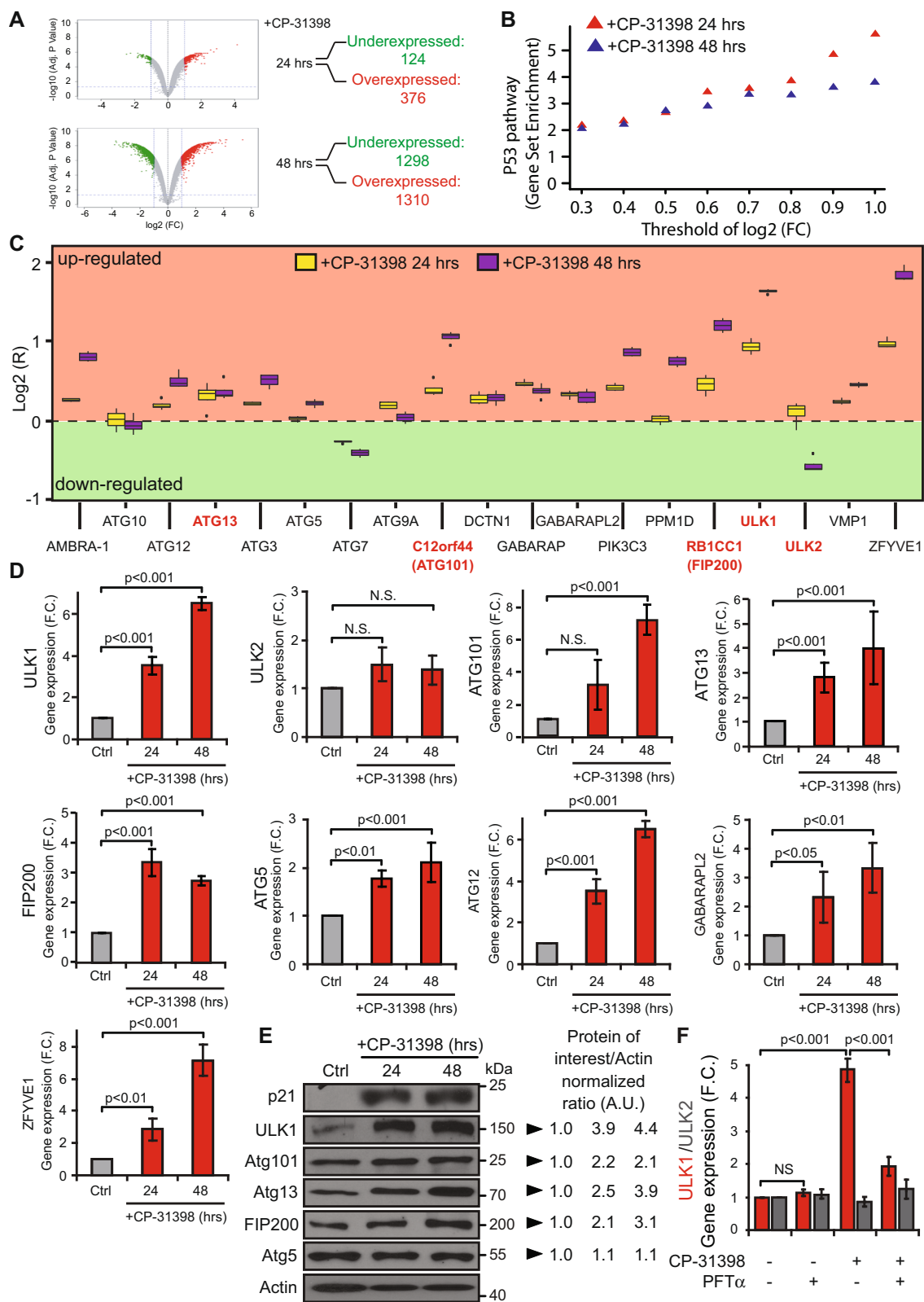


Fig. 2 (See legend on next page.)

(see figure on previous page)

**Fig. 2 The reactivation of p53 transcriptional activity by CP-31398 leads to the overexpression of genes belonging to the ULK complex and involved in autophagy initiation.** **a** Volcano-plot obtained from microarray analysis of MDA-MB231 cells treated with CP-31398. The number of overexpressed and downregulated genes (F.C. > 2;  $p < 0.05$ ) is indicated. **b** Genes belonging to the p53 pathway/network (hallmark\_P53\_pathway; GSEA) are enriched in overexpressed genes following CP-31398 treatment (24 and 48 h). **c** Targeted analysis of microarray results using a pre-established list of genes involved in autophagosomes formation. Most of these genes are upregulated following 24–48 h CP-31398 treatment. Genes indicated in red encode proteins belonging to the ULK complex. **d** RT-qPCR validation of *ULK1*, *ULK2*, *ATG101*, *ATG13*, *FIP200*, *ATG5*, *ATG12*, *GABARAPL2*, and *ZFYVE1* expression following CP-31398 treatment (24 and 48 h) compared to untreated cells (F.C. fold-change). **e** CP-31398 treatment (24–48 h) increases the expression of several proteins belonging to the ULK complex (*ULK1*, *ATG101*, *ATG13*, *FIP200*). *ATG5* was used as a control. The normalized ratio protein of interest/Actin was calculated by densitometry analysis and display. Data are representative of three independent experiments. **f** PFT- $\alpha$  (an inhibitor of p53 transcriptional activity) inhibits CP-31398-dependent induction of *ULK1* expression, while *ULK2* expression is not affected. Data (**d**, **f**) are the mean  $\pm$  s.d. of five independent RT-qPCR experiments performed in duplicate. The  $p$  values (**d**, **f**) were determined by unpaired two-tailed Student's  $t$  test. (NS non-significant)

### Statistical analysis

Data are expressed as mean from at least three independent experiments  $\pm$  standard deviation (s.d.). For comparisons between two groups, Student's  $t$  test was used. For analysis with multiple comparisons, one-way analysis of variance (ANOVA) was performed.  $P$  values < 0.05 were considered as statistically significant.

## Results

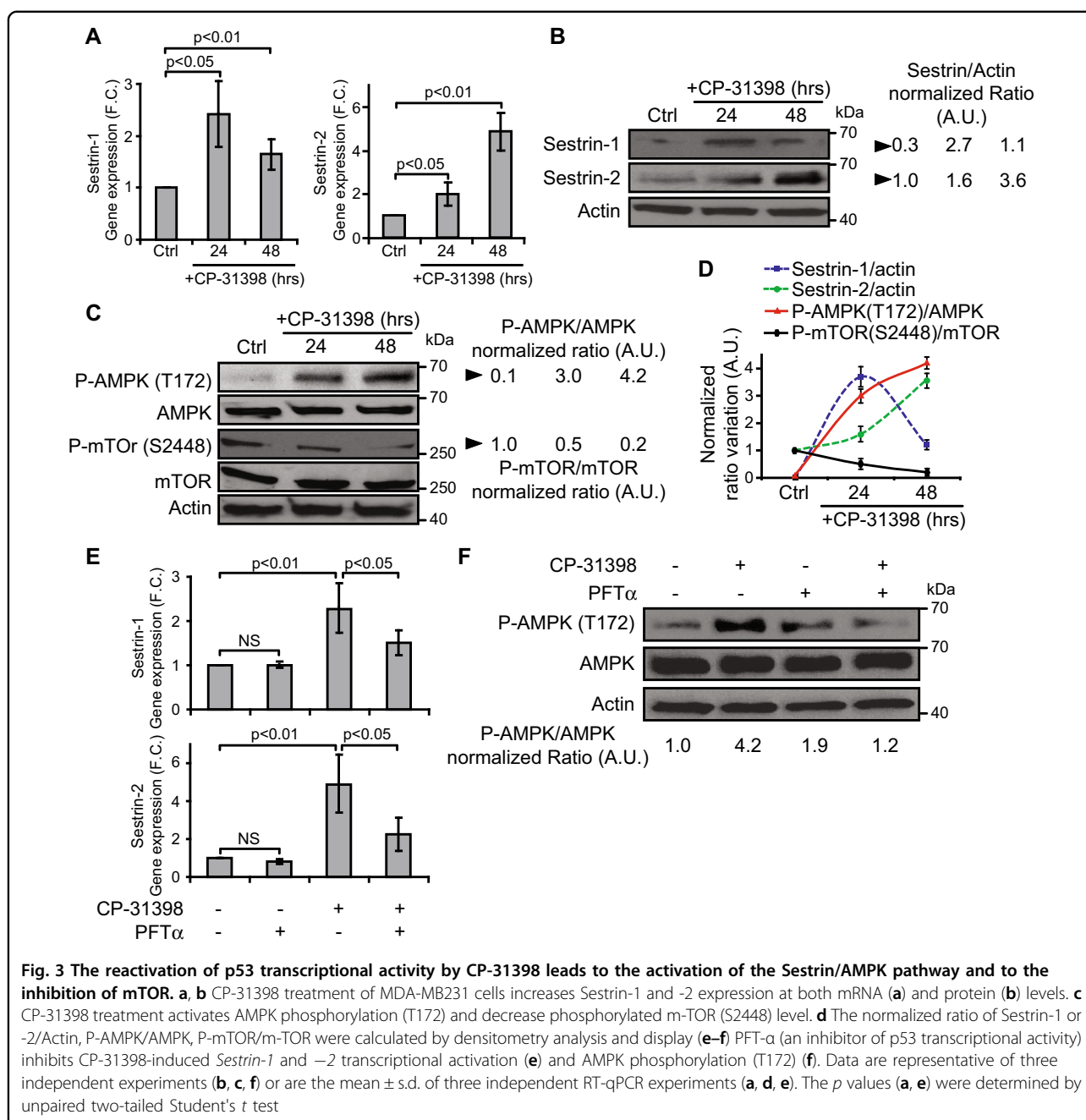
### CP-31398 reactivates a wild type-like p53 transcriptional activity in p53-mutated breast tumor cells and increases their lysis by NK cells

To evaluate the effect of wtp53 function reactivation on cytotoxic lymphocyte-mediated lysis of cells harboring a mutated p53, we used CP-31398<sup>37</sup> and the breast carcinoma cell line MDA-MB231. As previously described, these cells express a mutated p53<sup>R280K</sup> lacking transcriptional activity as shown by the absence of p21 transactivation even after  $\gamma$ -irradiation (Fig. 1a). As expected, MDA-MB231 cells treatment with CP-31398 during 24–48 h induces p21 mRNA and protein expression (Fig. 1b, c), suggesting that CP-31398 reactivates p53<sup>R280K</sup> transcriptional capacities, with only a slight increase of cell death (Fig. 1d, e) and no detectable reactive oxygen species (ROS) production (Fig. 1f). Noteworthy, the lysis of MDA-MB231 cells by NK92 or NK cells isolated from a healthy donor (NKd) was strongly increased after CP-31398 treatment (Fig. 1g, h), in a time dependent manner (Fig. 1i). Similar results were obtained using the breast tumor cells T47D (p53<sup>L194F</sup>) and SKBR3 (p53<sup>R175H</sup>) (Supplementary figure S1A–G), while CP-31398 has no effect on MCF7 (p53<sup>WT</sup>) lysis by NK cells (Supplementary figure S1H–J). We next used CP-31398 in combination with pifithrin- $\alpha$  (PFT- $\alpha$ ), which mainly blocks wtp53 transcriptional activity<sup>38</sup>. As shown in Fig. 1j, k, PFT- $\alpha$  inhibits CP-31398-dependent expression of p21 at both mRNA and protein levels, and almost completely inhibits the CP-31398-mediated increase of MDA-MB231 lysis by NK cells (Fig. 1l, m). Similar results were also obtained after the inhibition of mutant p53 expression using

siRNAs (Fig. 1n–p). Taken together, these data demonstrate that CP-31398 can increase the lysis of p53-mutated tumor cells by killer cells, probably by reactivating p53 transcriptional activity.

### CP-31398-dependent reactivation of wild type-like p53 transcriptional activity induces the expression of autophagy-related genes involved in autophagy initiation

To understand how the reactivation of p53 transcriptional activity in p53-mutated cells increases their lysis by NK cells, we first examined whether CP-31398 treatment modified the expression of known p53 targets related to NK cell activity. No significant differences were observed for ICAM-1 expression (which interacts with LFA-1 and contributes to NK cells adhesion to target cells) or for the formation of immune conjugates between NKd and MDA-MB231 cells (Supplementary figure S2A–C). Similarly, the expression of MHC-class I, ULBP1-6 (the ligands of the activating receptor NKG2D), or death receptors (FAS, DR4/DR5) were unmodified by CP-31398 (Supplementary figure S2D–G). Thus, to analyze more deeply the effect of CP-31398 treatment on MDA-MB231 cells that could explain its effect on their susceptibility to NK cell-mediated lysis, and since CP-31398 effect relies on the reactivation of p53 transcriptional activity; we next performed a transcriptomic analysis of MDA-MB231 cells treated during 24–48 h with CP-31398. The data obtained showed that several genes are overexpressed and downregulated after 24–48 h CP-31398 treatment (Fig. 2a), with an enrichment of overexpressed genes belonging to the p53 pathway (hallmark\_P53\_pathway; GSEA; M5939), as expected (Fig. 2b). Furthermore, by a targeted analysis using a pre-established list of genes involved in autophagosome formation (established by Mizushima group<sup>39</sup>), we observed a global overexpression after CP-31398 treatment (Fig. 2c). RT-qPCR validation confirmed that expression of *ULK1*, *ATG101*, *ATG13*, and *FIP200* (involved in the ULK complex formation and in early steps of autophagosome biogenesis),



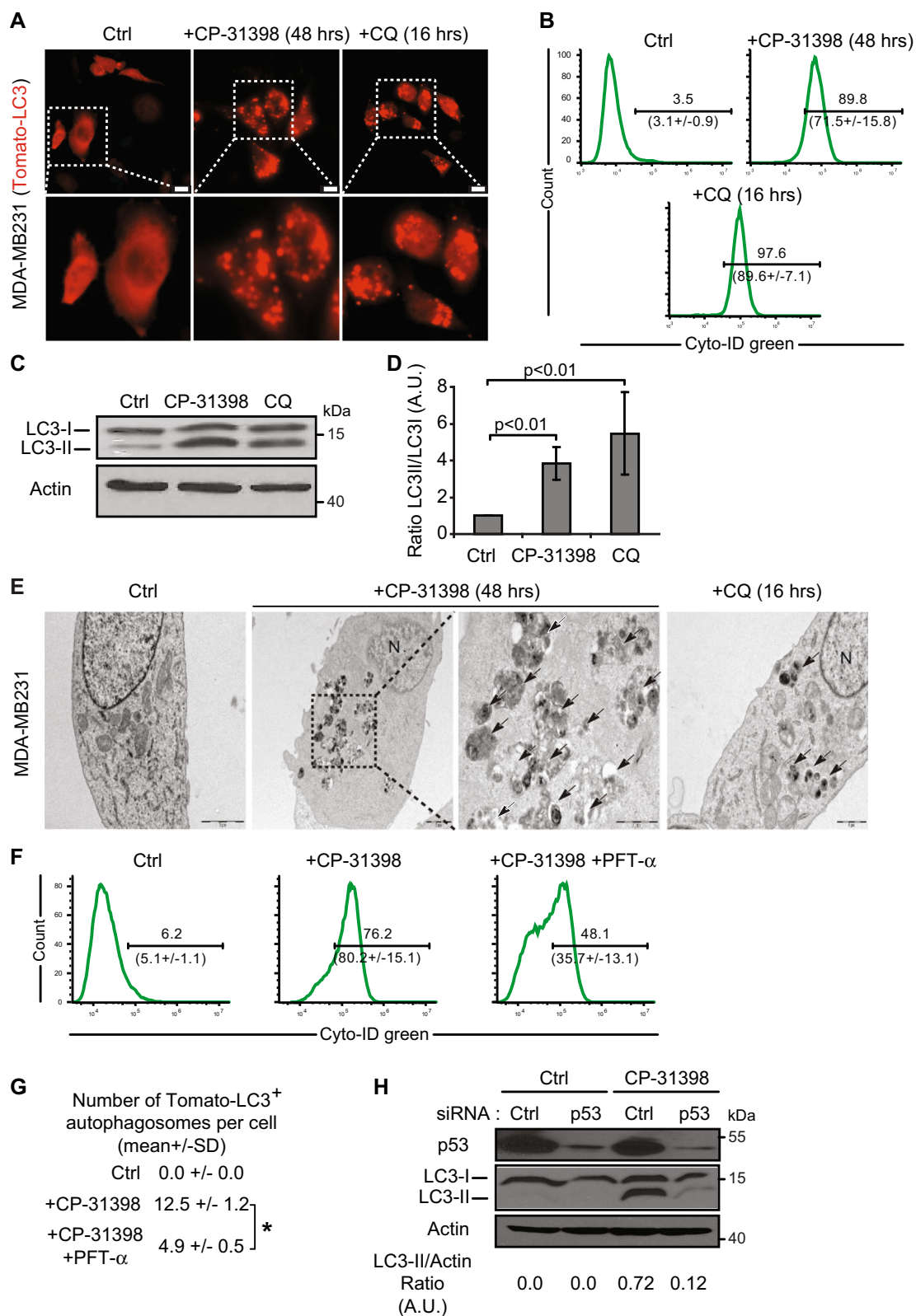
*ATG5*, *ATG12*, and *GABARAPL2* (involved in autophagosomal membrane elongation) and *ZFYVE1* (involved in autophagy initiation) were increased after CP-31398 treatment (Fig. 2d). Interestingly, ULK1 protein level, previously described as a direct p53 target<sup>21</sup>, was also highly increased by CP-31398 treatment, as ATG101, ATG13, and FIP200 but to a lower extent (Fig. 2e). Moreover, the combination of PFT- $\alpha$  with CP-31398 decrease CP-31398-induced *ULK1* overexpression, while *ULK2* expression is not affected (Fig. 2f). Taken together,

these results suggest that the reactivation of p53 transcriptional activity by CP-31398 could initiate autophagy by upregulating several proteins involved in early steps of autophagosome biogenesis, especially ULK1.

#### CP-31398-dependent reactivation of wild type-like p53 transcriptional activity activates the Sestrin-AMPK pathway resulting in mTOR inhibition

The reactivation p53 transcriptional activity could also induce autophagy by increasing the expression of other





**Fig. 4** (See legend on next page.)

(see figure on previous page)

**Fig. 4 The reactivation of p53 by CP-31398 triggers the formation of autophagosomes.** **a** Tomato-LC3 fusion protein is mostly diffuse throughout the cytoplasm of untreated cells, while punctate staining, representing autophagosomes, are observed when MDA-MB231 cells are treated with CP-31398, or chloroquine (CQ; used as positive control). Scale bars: 20  $\mu$ m. **b** CP-31398-induced autophagy was quantified by flow cytometry using CYTO-ID green, which exhibiting bright fluorescence upon incorporation into pre-autophagosomes, autophagosomes, and autophagolysosomes. The upper number indicates the percentage positive cells, and the lower number the mean  $\pm$  s.d. of three independent experiments. **c, d** Expression of the phosphatidylethanolamine-conjugated form of LC3 (or LC3-II) (**c**) and the LC3-II/LC3-I ratio (**d**) increase following CP-31398 (48 h) treatment of MDA-MB231 cells. **e** Effect of CP-31398 or chloroquine (CQ) on autophagosomes formation observed by electron microscopy. N nucleus, black arrows autophagosomes. **f, g** The inhibitor of p53 transcriptional activity PFT- $\alpha$  decreases CP-31398-induced autophagosomes formation, measured by flow cytometry using CYTO-ID green (**f**) or by counting the number of LC3-Tomato + puncta per cell in fluorescence microscopy pictures (**g**). \* $P < 0.05$  (unpaired two-tailed Student's *t* test). **h** The inhibition of p53 expression using siRNA strongly decrease CP-31398-induced LC3 lipidation (LC3-II) measured by western blot. The normalized LC3-II/Actin ratio was calculated by densitometry and display. Data are representative of three independent experiments (**a, c, e, h**) or are the mean  $\pm$  s.d. of three independent experiments (**b, d, f, g**)

key genes, not included in the pre-established list of genes used to analyze the microarray data. This includes *Sestrin-1* and *Sestrin-2*, two known p53 targets<sup>19</sup>, also found upregulated in our transcriptomic results ( $0.5 \geq FC \geq 2$  after 24–48 h CP-31398 treatment). As expected, MDA-MB231 cells treatment with CP-31398 during 24–48 h induces *Sestrin-1* and *Sestrin-2* expression at both mRNA and protein levels (Fig. 3a, b). Consequently, CP-31398 induces the phosphorylation of AMPK (Thr172), involved in AMPK activation, and the dephosphorylation of mTOR (S2448) (Fig. 3c, d), which inhibits mTOR activity and consequently could induce autophagy<sup>22</sup>. Finally, MDA-MB231 cells treatment with PFT- $\alpha$  inhibits both *Sestrin-1* and *Sestrin-2* overexpression and AMPK phosphorylation (Thr172) induced by CP-31398 (Fig. 3e, f). Together, these data show that CP-31398 modulates the AMPK/mTOR axis at a post-translational level through the transcriptional induction of *Sestrin-1* and *Sestrin-2*, which could also initiate autophagy.

#### CP-31398-dependent reactivation of p53 induces the formation of autophagosomes

Since our results demonstrated that CP-31398 could initiate autophagy, we used different approaches to evaluate the presence of autophagosomes in the treated cells. Autophagy was measured by following the distribution pattern of microtubule-associated proteins light chain 3 (MAP-LC3; referred as LC3 thereafter) fused with a Tomato fluorescent tag (Tomato-LC3). Tomato-LC3 displayed clear punctate staining in CP-31398-treated MDA-MB231 cells, suggesting the presence of autophagosomes, as in cells treated during 16 h with chloroquine (CQ) that impairs autophagosomes fusion with lysosomes, allowing LC3 accumulation in autophagosomes even under normal condition and revealing the basal autophagic flux<sup>40</sup> (Fig. 4a and Supplementary figure S3A). Similar results were obtained with a flow cytometry-based monitoring of autophagy using CYTO-ID green, a dye that allow for minimal staining of lysosomes while exhibiting bright fluorescence upon incorporation into

autophagosomes and autophagolysosomes<sup>41</sup> (Fig. 4b). This was also reflected by the increased expression of phosphatidylethanolamine (PE)-conjugated LC3 (or LC3-II) following CP-31398 treatment (Fig. 4c, d). Similar results were also obtained with SKBR3 and T47D cells (Supplementary figure S4A). Finally, transmission electron microscopy analysis also revealed the presence of autophagosomes in CP-31398 treated MDA-MB231 cells (Fig. 4e and supplementary figure S3B) further demonstrating that CP-31398 induces autophagy, most likely through the reactivation of p53 transcriptional activity. To examine this last point, MDA-MB231 cells were treated with CP-31398 in combination with PFT- $\alpha$  before examining autophagosomes formation. As expected, PFT- $\alpha$  decreases the percentage CYTO-ID green positive cells and the number of Tomato-LC3<sup>+</sup> autophagosomes per cell after CP-31398 treatment (Fig. 4f, g). Similarly, the inhibition of mutant p53 expression using siRNA strongly decrease LC3-II expression in MDA-MB231 cells after CP-31398 treatment (Fig. 4h). Of note, in wt p53 MCF7 breast cancer cells, CP-31398 has a minor effect on LC3-II induction, compared to CQ treatment (Supplementary figure S4B). Together, these data demonstrate that the reactivation of p53 transcriptional activity in MDA-MB231 cells using CP-31398 triggers the formation of autophagosomes.

#### Autophagy is responsible for the CP-31398-dependent potentiation of p53-mutated breast tumor cell lysis by NK cells

We next aimed to validate that CP-31398-induced autophagy is responsible for the observed increased of tumor cell susceptibility to NK-mediated killing. For this purpose, we inhibited the expression of ATG5 (involved in autophagosomal membrane elongation) and Beclin-1 (involved in the regulation of autophagy through its interaction with Bcl-2)<sup>42</sup> in MDA-MB231 cells using siRNAs, alone or in combination (Fig. 5a). As expected, the combination of ATG5 and Beclin-1 siRNAs strongly reduces CP-31398-induced LC3-II expression and

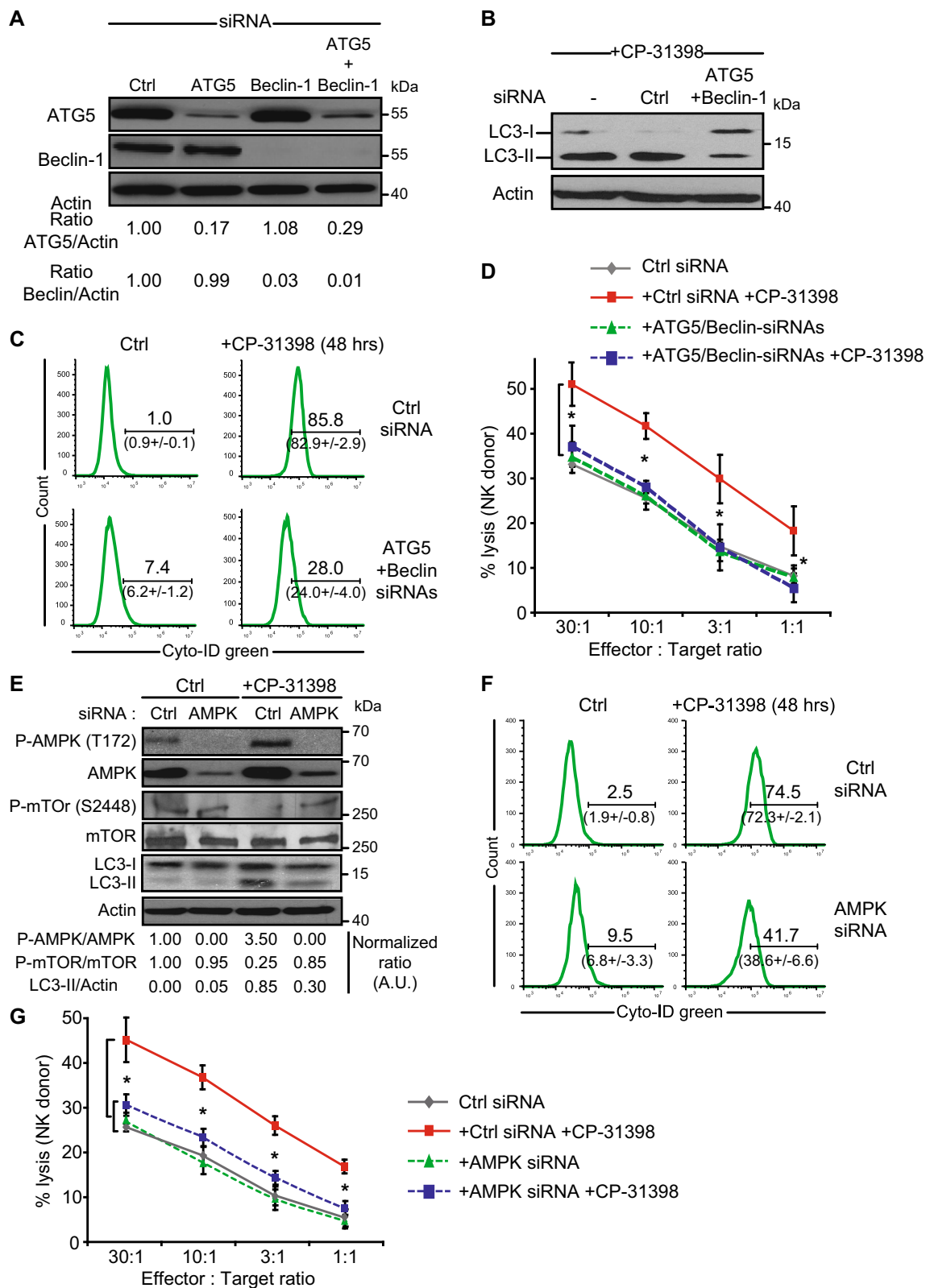


Fig. 5 (See legend on next page.)

(see figure on previous page)

**Fig. 5 CP-31398-dependent induction of autophagy is crucial for the potentiation of NK-mediated lysis.** **a** MDA-MB231 cells were transfected with siRNAs to inhibit two key proteins involved in autophagy, Atg5 and Beclin-1. The normalized ratio of Atg5 or Beclin-1/Actin were calculated by densitometry and display. **b, c** The double knockdown of Atg5 and Beclin-1 decreases CP-31398-induced autophagosomes formation, measured by evaluating the phosphatidylethanolamine conjugation of LC3 (or LC3-II) (**b**) or by flow cytometry using CYTO-ID green (**c**). Numbers indicate the percentage positive cells in the displayed representative flow cytometry histograms and the mean  $\pm$  s.d. from three independent experiments. **d** The inhibition of autophagy using Atg5 and Beclin-1 siRNAs inhibits CP-31398-induced increase of MDA-MB231 lysis by NK cells. **e** MDA-MB231 cells transfection with AMPK siRNAs decreases CP-31398-induced AMPK phosphorylation (T172) and m-TOR dephosphorylation (S2448), leading to a decrease of LC3 lipidation (LC3-II). **f** The knockdown of AMPK decreases CP-31398-induced autophagosomes formation, measured by flow cytometry using CYTO-ID green. **g** The inhibition of autophagy using AMPK siRNAs strongly decrease CP-31398-induced potentiation of MDA-MB231 lysis by NK cells. <sup>51</sup>Cr release assay using NK cells isolated from a healthy donor (**d–g**) co-cultured with target cells at different E:T ratios are shown. Data are representative of at least three independent experiments (**a, b, e**) or are the mean  $\pm$  s.d. of at least three independent experiments (**c, d, f, g**). The p values (**d, g**) were determined using one-way ANOVA. \**P* < 0.05

autophagosome formation, measured using CYTO-ID green staining (Fig. 5b, c). Importantly, the use of ATG5 and Beclin-1 siRNAs totally abrogates the CP-31398-dependent potentiation of MDA-MB231 lysis by NK cells (Fig. 5d). Similarly, the use of AMPK siRNAs to interfere with the AMPK-mTOR pathway inhibits CP-31398-induced AMPK phosphorylation, mTOR dephosphorylation and LC3-II induction (Fig. 5e). AMPK siRNAs also inhibit autophagy induction, measured by flow cytometry (Fig. 5f) and prevent CP-31398-mediated potentiation of the NK-mediated lysis (Fig. 5g). Together, these results clearly demonstrate that the induction of autophagy by CP-31398 is responsible for the observed potentiation of p53-mutated tumor cells lysis by NK cells.

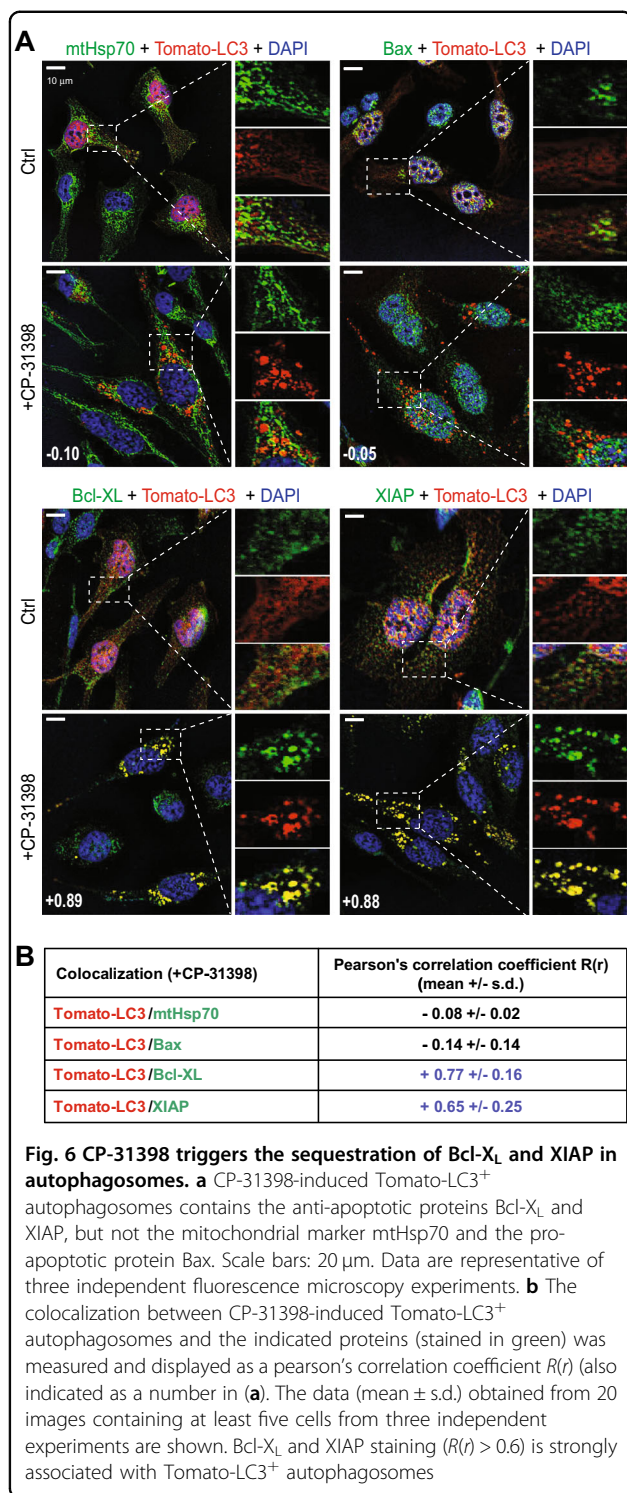
#### CP-31398 triggers a p62 and NBR1-independent selective sequestration of anti-apoptotic proteins in autophagosomes

We then aimed to investigate the mechanisms linking the induction of autophagy by CP-31398 and the potentiation of p53-mutated breast tumor cells lysis by NK cells. The killing of MDA-MB231 by NK cells is mostly dependent on the PFN/GzmB pathway, as shown by the almost complete inhibition of NK-mediated lysis in presence of concanamycin A (CMA) (a Ca<sup>2+</sup> chelator that inhibits cytotoxic granules exocytosis) (Supplementary figure S5). We thus hypothesized that CP-31398-induced autophagy improves the lysis of tumor cells through the sequestration/degradation of key negative regulators of the GzmB apoptotic pathway. Fluorescence microscopy results demonstrate that the mitochondrial marker mtHsp70, the pro-apoptotic protein Bax (used as controls) or the anti-apoptotic proteins Mcl-1 and cIAP-2 were not present in CP-31398-induced Tomato-LC3<sup>+</sup> autophagosomes. On the opposite, Bcl-X<sub>L</sub> and XIAP were strongly associated with CP-31398-induced autophagosomes. Regarding Bcl-2, cIAP-1 and survivin, their internalization in autophagosomes seems to be less evident (Fig. 6a and Supplementary figure S6A). To further quantify these results, we measured the colocalization

between CP-31398-induced Tomato-LC3<sup>+</sup> autophagosomes and the protein of interest, displayed as a Pearson's correlation coefficient *R*(*r*). The data confirmed that CP-31398-induced Tomato-LC3<sup>+</sup> autophagosomes mostly contains Bcl-X<sub>L</sub> and XIAP (*R*(*r*) > 0.5) while Bcl-2, cIAP-1 and survivin can be internalized in autophagosomes but at a lower level (*R*(*r*) < 0.5) (Fig. 6b and Supplementary figure S6B). Importantly, this Bcl-X<sub>L</sub> and XIAP internalization in autophagosomes in response to CP-31398 was greatly impaired in p53 siRNAs transfected MDA-MB231 cells, which decreases the number of CP-31398-induced Tomato-LC3<sup>+</sup> autophagosomes (Supplementary figure S7A–C). Of note, Bcl-X<sub>L</sub> and XIAP were mostly not internalized in CQ-induced autophagosomes and CQ treatment was not associated with a potentiation of MDA-MB231 cell killing by NK cells (Supplementary figure S8A, B), further demonstrating the importance of a selective Bcl-X<sub>L</sub> and XIAP internalization in autophagosomes for the CP-31398 effect on NK-mediated killing. Selectivity in autophagy is conferred by cargo receptor proteins<sup>43</sup>, such as Sequestosome-1 (p62/SQSTM1) and Neighbor of BRCA1 gene 1 (NBR1). Using fluorescence microscopy, we observed that both p62 and NBR1 relocalize to CP-31398-induced autophagosomes (Supplementary figure S9A, B). However, immunoprecipitation experiments showed that neither p62 nor NBR1 interact with Bcl-X<sub>L</sub> or XIAP in response to CP-31398, while these proteins cargo interacts with LC3-II, used as a positive control (Supplementary figure S9C, D). Together, these data demonstrate that p53-reactivation using CP-31398 induces a p62 and NBR1-independent selective autophagy leading to Bcl-X<sub>L</sub> and XIAP (and probably other anti-apoptotic proteins) internalization in autophagosomes.

#### CP-31398-induced autophagy is blocked, interfering with the degradation of the internalized anti-apoptotic proteins

We then studied whether CP-31398-induced autophagy leads to the degradation of the internalized anti-apoptotic proteins. Western blot analysis of CP-31398-treated MDA-MB231 cells surprisingly did not reveal any

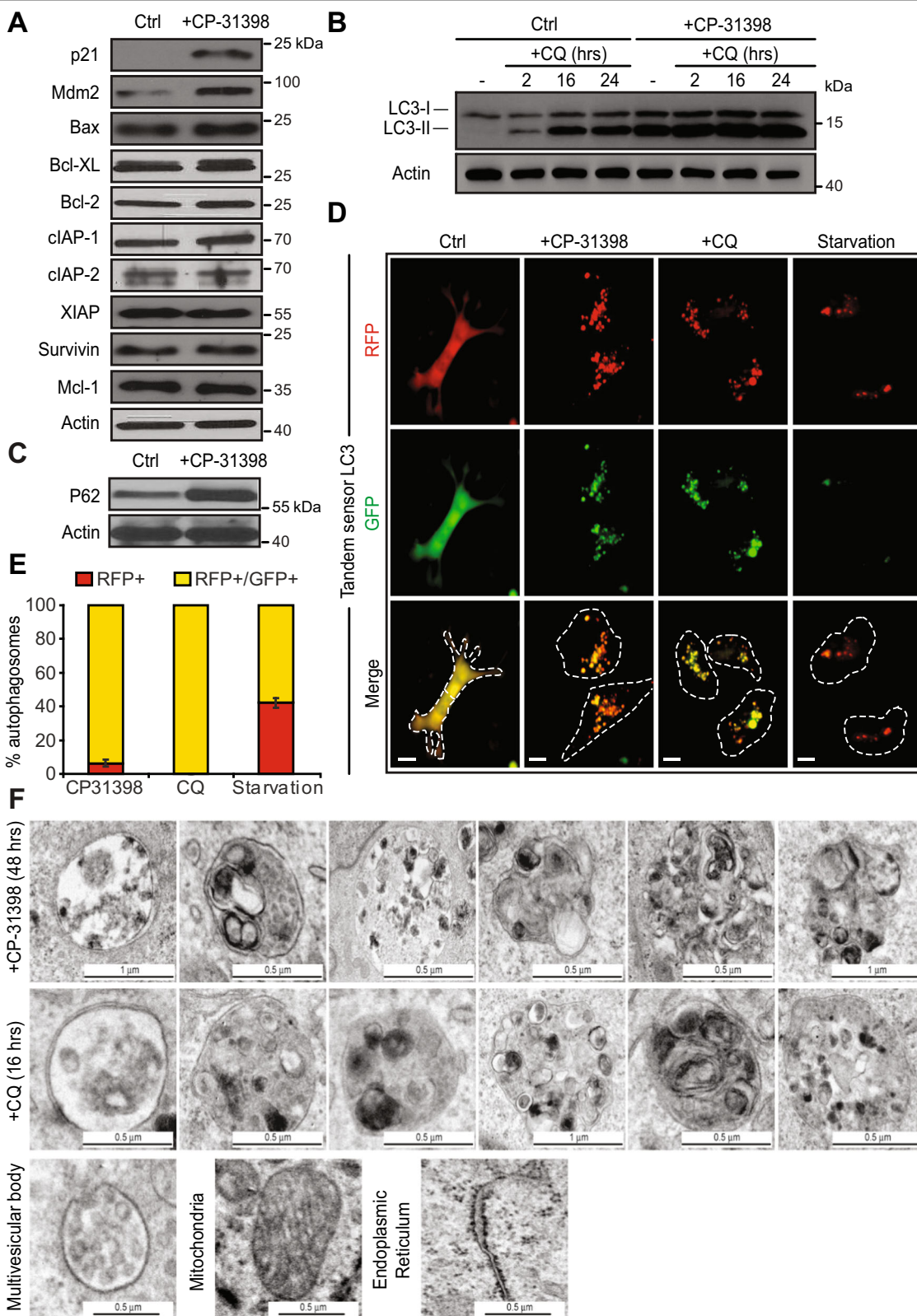


change in Bcl-X<sub>L</sub>, XIAP, Bcl-2, cIAP-1 or survivin amount (or in Bax, Mcl-1, or cIAP-2 protein level used as control) (Fig. 7a). We thus hypothesized that the CP-31398-induced autophagic flux (defined as the autophagic degradation activity<sup>44</sup>) is blocked and that the absence of degradation could be due to the absence of fusion

between autophagosomes and lysosomes. To validate this hypothesis, we performed a LC3 turnover assay using western blot and CQ. Indeed, in response to CQ, which inhibits lysosome acidification and autophagosome-lysosome fusion, LC3-II accumulates even under normal conditions because the turnover/degradation of LC3-II by basal autophagy is blocked. Accordingly, the differences for LC3-II level between samples in the presence and absence of CQ represent the amount of LC3 that is degraded into autolysosomes, allowing the measurement of the autophagic flux<sup>40</sup>. As expected, CQ alone induces a time dependent LC3-II accumulation in MDA-MB231 cells, suggesting that basal autophagy is functional. However, when CP-31398 was combined with CQ, no additional LC3-II accumulation was observed as compare to CP-31398 alone (Fig. 7b). These results suggest that the autophagy induced by CP-31398 is blocked at the autophagosome-lysosome fusion step, which is also reflected by the accumulation of p62 in response to CP-31398 treatment (Fig. 7c). To further validate this point, we used a microscopy approach based on a LC3 fusion protein tagged with acid-sensitive eGFP and acid-insensitive RFP. This fusion protein allows monitoring the change from an autophagosome (neutral pH) to an autolysosome (acidic pH) by visualizing the specific loss of the GFP fluorescence upon acidification of the autophagosome following lysosomal fusion. As shown in Fig. 7d, e, serum starvation (positive control) induces autophagy with the loss of eGFP signal reflecting the fusion of autophagosomes with lysosomes. On the opposite, CQ blocks autophagy through neutralization of lysosomal pH and as a result, fluorescence was observed from both eGFP and RFP channels. Interestingly, fluorescence was also seen from both eGFP and RFP channels during CP-31398-triggered autophagy, suggesting a block. Finally, CP-31398-induced autophagosomes observed by electron microscopy are very similar to CQ-triggered autophagosomes, where autophagosome-lysosome fusion is blocked, with a frequent irregular shape and large amount of undigested content (Fig. 7f). Together, these data demonstrate that CP-31398 both induces autophagy and blocks the autophagosomes/lysosomes fusion step, which interferes with the degradation of the anti-apoptotic proteins sequestered in autophagosomes.

#### CP-31398-induced sequestration of anti-apoptotic proteins in autophagosomes correlates with an increase of granzyme B-induced cell death

We finally examined whether the sequestration without degradation of Bcl-X<sub>L</sub> and XIAP in CP-31398-induced autophagosomes leads to an increase of the well-known apoptotic signaling triggered by PFN/GzmB through the mitochondrial and effector caspases pathway<sup>45</sup>, which would explain the observed potentiation of NK-mediated



**Fig. 7** (See legend on next page.)

(see figure on previous page)

**Fig. 7 CP-31398-induced autophagic flux is blocked at the autophagosome-lysosome fusion step.** **a** CP-31398 treatment (48 h) increases p21 and Mdm2 expression by MDA-MB231 cells, does not alter Bax level (used as control) and does not induce the degradation of Bcl-X<sub>L</sub>, XIAP, Bcl-2, Mcl-1, cIAP-1, IAP-2, or survivin. **b** The differences in the amount of LC3-II between samples in the presence and absence of chloroquine (CQ), representing the amount of LC3 that is degraded into autolysosomes, and allowing the measurement of the autophagic flux is represented. No additional LC3-II accumulation is observed when CP-31398 (48 h) is used in combination with CQ (2–24 h), showing that the autophagic flux induced by CP-31398 is blocked at the autophagosome-lysosome fusion step. **c** P62 expression level increases following 48 h treatment with CP-31398. **d, e** MDA-MB231 cells were transduced with LC3 fusion protein tagged with acid-sensitive eGFP and acid-insensitive RFP to monitor the specific loss of eGFP fluorescence upon acidification of the RFP<sup>+</sup> autophagosome following lysosomal fusion. Serum starvation induces autophagy with the loss of eGFP signal reflecting the fusion of autophagosomes with lysosomes. Fluorescence is seen from both eGFP and RFP channels after CP-31398 treatment, similarly to CQ that blocks autophagy through neutralization of lysosomal pH, demonstrating that CP-31398-induced autophagy flux is blocked at the autophagosomes/lysosomes fusion step. Dashed lines: plasma membrane. Scale bars: 10 μm (**c**). The percentage RFP<sup>+</sup> or RFP<sup>+</sup>/GFP<sup>+</sup> autophagosomes was evaluated in 100 cells after the indicated treatment (**d**). **f** Representative electron microscopy images of the autophagosomes containing undigested material presents in CP-31398 or chloroquine (CQ)-treated cells. Representative images of multivesicular bodies, mitochondria and endoplasmic reticulum are displayed as control. Data are representative of three independent experiments (**a–d, f**) or are the mean ± s.d. of three independent experiments (**e**)

lysis. We first evaluated NK cell-induced MOMP in MDA-MB231 cells ± CP-31398, using DioC6(3). Flow cytometry analysis revealed that CP-31398 potentiates MOMP induced by NK cells (Fig. 8a, b). Furthermore, CP-31398 potentiated the cleavage of caspase-9 and -3 and PARP in response to NK cells (Fig. 8c). Similarly, CP-31398 increased MOMP and caspase-9 and -3 activation induced by PFN/GzmB (Fig. 8d, e). Importantly, Bid cleavage in response to PFN/GzmB was not affected by CP-31398, further demonstrating that CP-31398 treatment only affects downstream events. Consequently, CP-31398 was associated with a potentiation of PFN/GzmB-induced apoptosis (Fig. 8f). Of note, granzyme A (GzmA)-induced cell death, which rely on ROS and on the SET complex, but is caspases, Bax/Bak, Bcl-2/Bcl-X<sub>L</sub> and cytochrome c independent<sup>46–49</sup>, was not increased following CP-31398 treatment (Fig. 8g). Together, these results indicate that the sequestration in CP-31398-induced autophagosomes of several anti-apoptotic proteins, including Bcl-X<sub>L</sub> and XIAP, which normally prevent GzmB-induced MOMP and effector caspases cleavage, potentiates GzmB- and NK-dependent apoptosis of p53-mutated cells, without the need of degradation in autophagosomes.

## Discussion

Here, we demonstrated that the pharmacological reactivation of a wt-like p53 transcriptional function in p53-mutated breast cancer cells using the small molecule CP-31398 increases their susceptibility to NK cell-mediated lysis by an autophagy-dependent mechanism. In particular, we found that CP-31398 treatment induces the expression of Sestrin-1 and Sestrin-2, two known p53 targets<sup>19</sup>, which in turn facilitates AMPK phosphorylation and consequently leads to mTOR inhibition. In parallel, we observed that CP-31398 strongly increases ULK1 expression in a p53-dependent manner. Consequently, the inhibition of mTOR activity and the increase ULK1

availability, leads to the formation of autophagosomes in CP-31398 treated cells, as confirmed by the effect of siRNA-based AMPK inhibition on CP-31398-dependent induction of autophagy. It was also conceivable that some of the observed effect of CP-31398 on autophagy and NK cell-mediated lysis could be independent of p53 transcriptional activity reactivation, as previously described<sup>37,50,51</sup>. However, we excluded this possibility since the knockdown of mutant p53 expression with siRNA or the inhibition of p53 transcriptional activity with PFT-α block both the CP-31398-dependent autophagosomes formation in p53-mutated cells and the potentiation of their killing by NK cells. Of note, a previous study demonstrated that CP-31398 could unspecifically activate autophagy in wt p53 pancreatic tumor cells<sup>52</sup>. However, using the wt p53 MCF7 breast cancer cells, we only observed a minor LC3-II induction in response to CP-31398 in comparison to p53-mutated cells, which seems to be insufficient to increase MCF7 lysis by NK cells and suggesting that the induction of autophagy using this small compound is mostly effective in p53-mutated cells. Several reports have also shown that CP-31398 can induce oxidative stress<sup>53,54</sup> which in turn could induce autophagy<sup>55,56</sup>. However, we did not observed any significant ROS production following CP-31398 treatment in our model.

Importantly, our findings also clearly demonstrate that CP-31398-mediated autophagosome formation in p53-mutated breast cancer cells is the main event involved in the potentiation of their lysis by GzmB and NK cells. This phenomenon is linked to the autophagosomal sequestration of anti-apoptotic proteins, especially Bcl-X<sub>L</sub> and XIAP, in CP-31398-induced autophagosomes, and is associated with an increased MOMP and caspase-9 and -3 cleavage in response to both GzmB and NK cells. Indeed, the sequestration of anti-apoptotic proteins like Bcl-X<sub>L</sub> and XIAP probably prevents their inhibitory interaction with pro-apoptotic partners, facilitating apoptosis

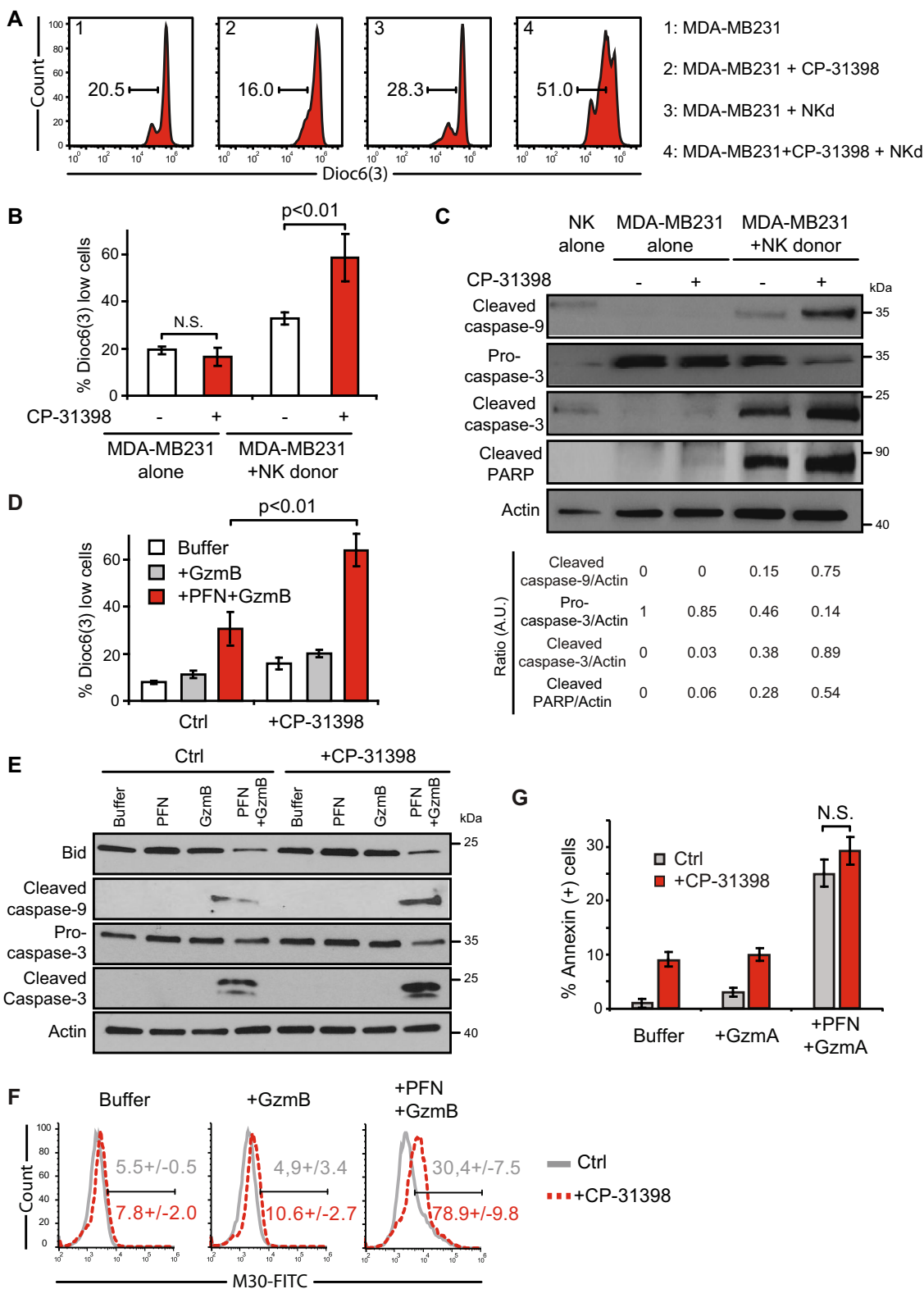


Fig. 8 (See legend on next page.)



(see figure on previous page)

**Fig. 8 CP-31398-induced sequestration of several anti-apoptotic proteins in autophagosomes potentiates granzyme B-induced MOMP and caspase-3 cleavage.** **a, b** CP-31398 improves mitochondrial outer membrane permeabilization (MOMP) measured by Dioc6(3) staining in MDA-MB231 cells incubated with NK cells isolated from a healthy donor (NKd) at the E:T ratio of 5:1. **c** CP-31398 increases caspase-3 cleavage in MDA-MB231 cells incubated with NK cells isolated from a healthy donor (NKd) at the E:T ratio of 3:1. The normalized ratio of full length or cleaved caspase-3, -9 or PARP/Actin was calculated by densitometry analysis. **d, e** CP-31398 increases MOMP measured by Dioc6(3) staining (**c**) and caspases-9 and -3 cleavage (**d**) in MDA-MB231 cells treated 30 min with PFN/GzmB. **f** CP-31398 increases PFN/GzmB-induced apoptosis, measured by flow cytometry using M30 mAb staining (which recognizes a cytokeratin-18 epitope, revealed after effector caspase cleavage). Representative flow cytometry histograms are shown. Numbers indicate the percentage M30 positive cells (mean  $\pm$  s.d. from three independent experiments). **g** PFN/GzmA-induced cell death, measured by Annexin-V staining, is unaltered following CP-31398 treatment. Data are representative of three independent experiments (**a, c, e**) or are the mean  $\pm$  s.d. of three independent experiments (**b, d, g**). The *p* values (**b, d, g**) were determined by unpaired two-tailed Student's *t* test. *NS* non-significant

induction by additional external stimuli that trigger MOMP and effector caspase activation, such as GzmB and NK cells, but not GzmA which induces cell death in a caspases and Bcl-2 family members-independent manner. Interestingly, we also observed that Bcl-2, cIAP-1 and survivin internalization seems possible at a lower extend, but not cIAP-2, Mcl-1. This apparent selectivity in CP-31398-induced autophagy seems to be independent from p62 and NBR1 cargo receptors, classically involved in different selective autophagy pathways<sup>43</sup>. Importantly, we also observed that autophagosomes accumulation in response to CQ is not associated with a Bcl-X<sub>L</sub> and XIAP sequestration within these structures and consequently with an increase of NK cell-dependent cytotoxicity. Thus, the selective addressing of Bcl-X<sub>L</sub> and XIAP to autophagosomes is also an important feature to explain the effect of CP-31398 on NK/GzmB-mediated lysis. This selectivity could also explain apparent contradictory observations regarding the role of autophagy in NK cell-mediated lysis. Indeed, several reports have shown that autophagy induction can protect tumor cells against NK cell-mediated killing<sup>57–60</sup>. Thus, the selectivity in the cargo internalized in autophagosomes in response to specific stimuli, could either protect or sensitize cells to external cell death inducers, such as NK cells, even if this point clearly needs further experimental validation.

During this study, we also demonstrated that CP-31398-induced autophagy was not fully functional and that the autophagosomes-lysosomes fusion process was most likely dysfunctional, explaining the absence of degradation of the internalized anti-apoptotic proteins. In this regard, previous studies have shown that the fusion of autophagosomes with lysosomes requires the conventional cellular fusion machinery involving proteins such as syntaxin<sup>61</sup>. Interestingly, our microarray results indicate that several syntaxin expression (including *syntaxin-2, -7, -8, -10*) was downregulated following CP-31398 treatment (data not shown). Similarly, we observed a strong down-regulation of *CLN6* expression (data not shown) following CP-31398 treatment. *CLN6* is an endoplasmic-associated protein and despite its location, contributes to lysosomal

function by an unknown mechanism. Moreover, *CLN6* mutations/deficiency are associated to lysosomal function disorders and to a disruption of the autophagy-lysosome degradation pathway<sup>62</sup>. Thus, the CP-31398-mediated blockage of autophagy might result from several alterations of the autophagosomes-lysosomes fusion machinery, potentially involving syntaxins and *CLN6*. However, this point clearly needs further validation, in particular to determine whether this block is p53-dependent or a CP-31398 “side effect”.

In conclusion, this study emphasizes that the use of p53-reactivating molecules can potentiate the lysis of p53-mutated breast cancer cells by NK cells though autophagy induction. Furthermore, these findings can probably be extended to other tumor types with high p53 mutation rate such as lung cancer and to CTL-mediated lysis because both NK cell and CTL mainly used the same PFN/GzmB pathway to kill their target cells. Thus, our results could define a new way to increase cytotoxic lymphocyte-mediated lysis of p53-mutated cancer cells, with potential application in immunotherapeutic approaches. Indeed, the development of effective p53-reactivating small molecules, such as APR-246<sup>63</sup>, could open the way of combined treatments between these molecules and immunotherapeutic approaches such as immune checkpoint blockade or CAR-T cells treatment. These points will be analyzed in future in vivo studies.

#### Acknowledgements

The authors thank Denis Martinvalet (University of Padova, Italy) for the granzymes, Gerard Pierron and Sylvie Souquere (Gustave Roussy cellular imaging facility) for the electron microscopy analysis, Gustave Roussy Genomic platform members (Villejuif, France) for the microarray analysis, Bassam Janji (Luxembourg Institute of Health) and Agnete Engelsen (University of Bergen, Norway) for helpful discussions. This work was supported by INSERM, the french “Ligue Nationale Contre Le Cancer” (Equipe labellisée) and by PhD fellowships from the french “Ligue Nationale Contre Le Cancer” (M.C.N) and the “Association pour la Recherche sur le Cancer” (T.B.S.). The “taxe d'apprentissage” program (Direction de la Recherche-Gustave Roussy) supported the microarray analysis.

#### Author details

<sup>1</sup>INSERM U1186, 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>Bioinformatic Core Facility, INSERM US23/CNRS UMS3655, Gustave Roussy

Cancer Campus, Villejuif, France. <sup>5</sup>Thumby Research Institute of Precision Medicine, Gulf Medical University, Ajman, United Arab Emirates

#### Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

#### Publisher's note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

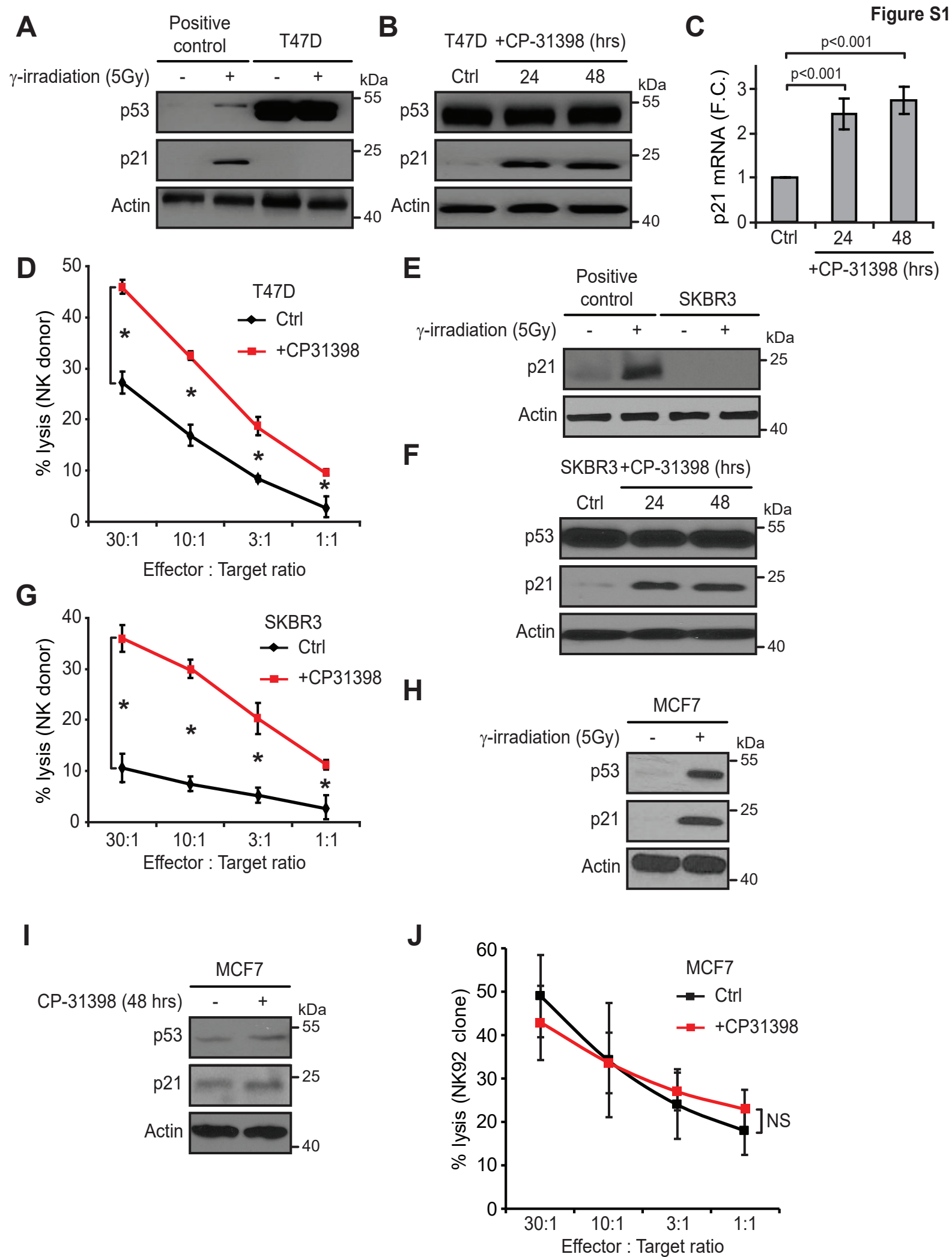
**Supplementary Information** accompanies this paper at (<https://doi.org/10.1038/s41419-019-1950-1>).

Received: 2 May 2019 Revised: 29 July 2019 Accepted: 2 September 2019  
Published online: 20 September 2019

#### References

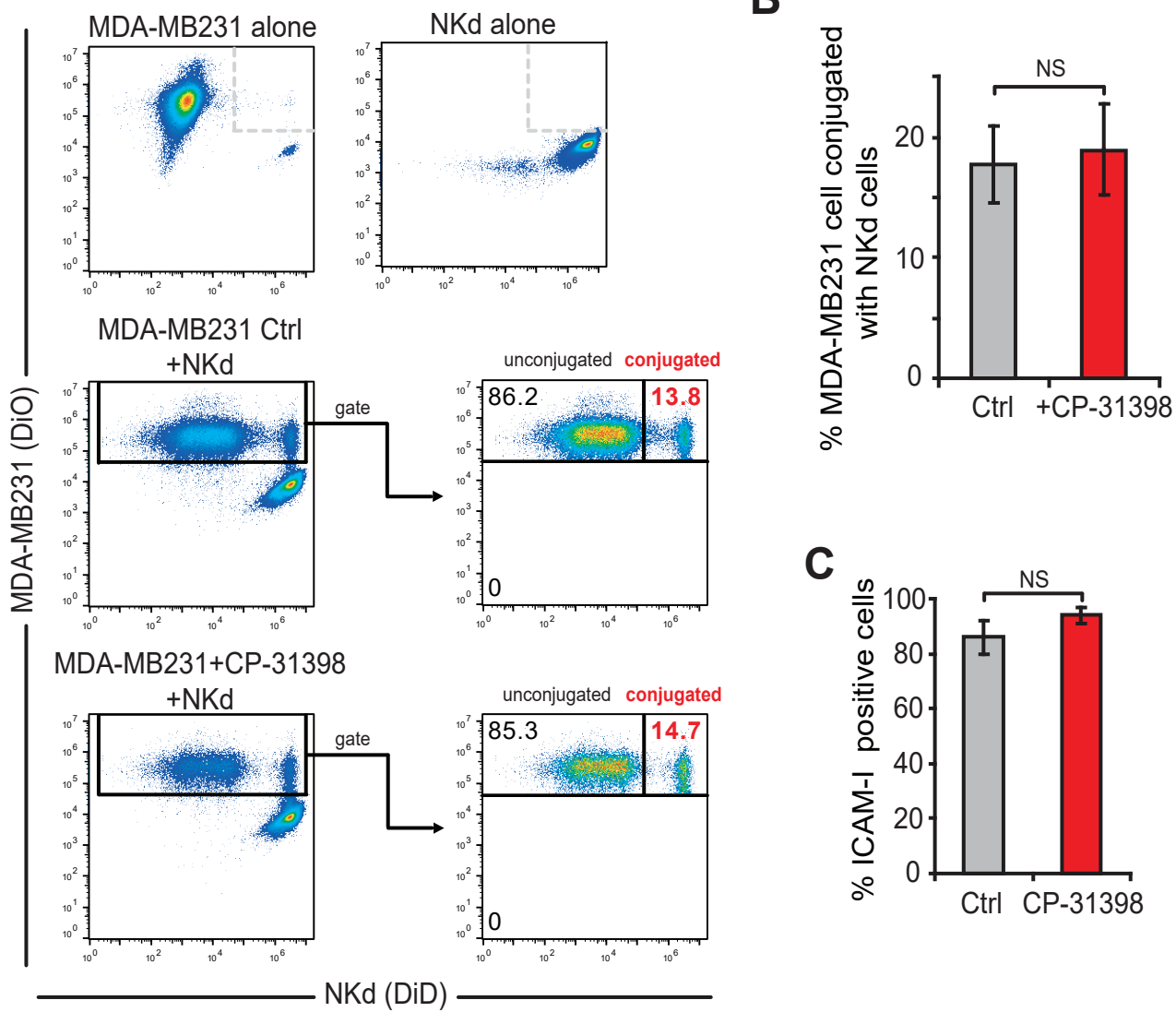
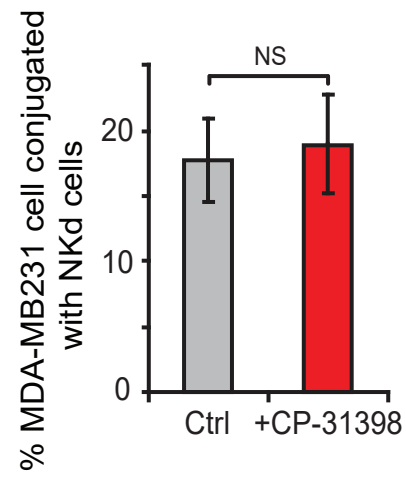
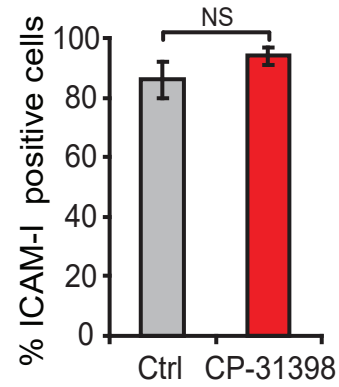
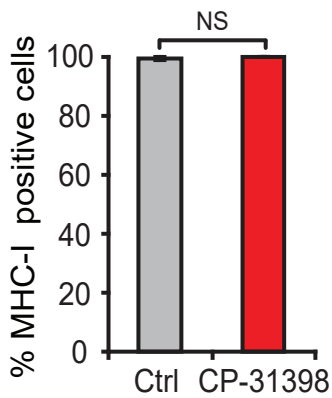
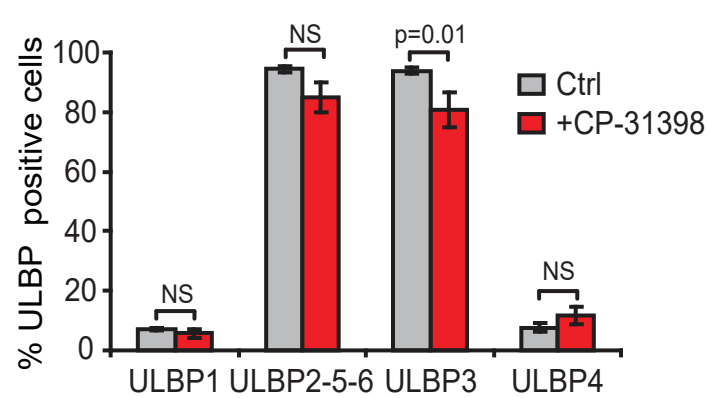
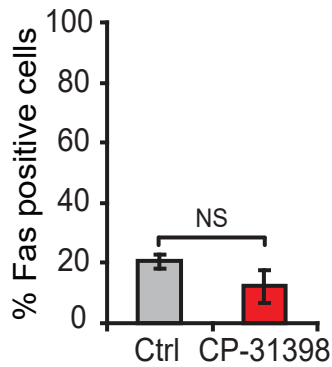
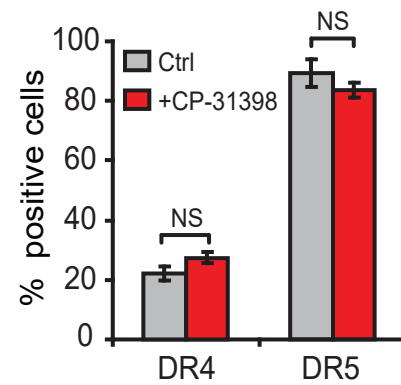
- Voskoboinik, I., Whisstock, J. C. & Trapani, J. A. Perforin and granzymes: function, dysfunction and human pathology. *Nat. Rev. Immunol.* **15**, 388–400 (2015).
- Thiery, J., Safta, T. B., Ziani, L. & Chouaib, S. Mechanisms of cytotoxic lymphocyte-mediated apoptosis and relationship with the tumor suppressor p53. *Crit. Rev. Immunol.* **35**, 433–449 (2015).
- Thiery, J. & Lieberman, J. Perforin: a key pore-forming protein for immune control of viruses and cancer. *Subcell. Biochem.* **80**, 197–220 (2014).
- Heibein, J. A. et al. Granzyme B-mediated cytochrome c release is regulated by the Bcl-2 family members bid and Bax. *J. Exp. Med.* **192**, 1391–1402 (2000).
- Wang, G. Q. et al. Resistance to granzyme B-mediated cytochrome c release in Bak-deficient cells. *J. Exp. Med.* **194**, 1325–1337 (2001).
- Han, J., Goldstein, L. A., Gastman, B. R., Rabinovitz, A. & Rabinowich, H. Disruption of Mcl-1/Bim complex in granzyme B-mediated mitochondrial apoptosis. *J. Biol. Chem.* **280**, 16383–16392 (2005).
- MacDonald, G., Shi, L., Vande Velde, C., Lieberman, J. & Greenberg, A. H. Mitochondria-dependent and -independent regulation of Granzyme B-induced apoptosis. *J. Exp. Med.* **189**, 131–144 (1999).
- Pinkoski, M. J. et al. Granzyme B-mediated apoptosis proceeds predominantly through a Bcl-2-inhibitible mitochondrial pathway. *J. Biol. Chem.* **276**, 12060–12067 (2001).
- Sutton, V. R., Wowk, M. E., Cancilla, M. & Trapani, J. A. Caspase activation by granzyme B is indirect, and caspase autoprocessing requires the release of proapoptotic mitochondrial factors. *Immunity* **18**, 319–329 (2003).
- Chipuk, J. E. et al. Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. *Science* **303**, 1010–1014 (2004).
- Mihara, M. et al. p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. *Mol. Cell* **11**, 577–590 (2003).
- Pietsch, E. C., Sykes, S. M., McMahon, S. B. & Murphy, M. E. The p53 family and programmed cell death. *Oncogene* **27**, 6507–6521 (2008).
- Brady, C. A. & Attardi, L. D. p53 at a glance. *J. Cell Sci.* **123**, 2527–2532 (2010).
- Fullgrabe, J., Ghislat, G., Cho, D. H. & Rubinsztein, D. C. Transcriptional regulation of mammalian autophagy at a glance. *J. Cell Sci.* **129**, 3059–3066 (2016).
- Tasdemir, E. et al. Regulation of autophagy by cytoplasmic p53. *Nat. Cell Biol.* **10**, 676–687 (2008).
- Galluzzi, L. et al. Molecular definitions of autophagy and related processes. *EMBO J* **36**, 1811–1836 (2017).
- Marino, G., Niso-Santano, M., Baehrecke, E. H. & Kroemer, G. Self-consumption: the interplay of autophagy and apoptosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15**, 81–94 (2014).
- Tang, J., Di, J., Cao, H., Bai, J. & Zheng, J. p53-mediated autophagic regulation: a prospective strategy for cancer therapy. *Cancer Lett.* **363**, 101–107 (2015).
- Budanov, A. V. & Karin, M. p53 target genes sestrin1 and sestrin2 connect genotoxic stress and mTOR signaling. *Cell* **134**, 451–460 (2008).
- Maiuri, M. C. et al. Stimulation of autophagy by the p53 target gene Sestrin2. *Cell Cycle* **8**, 1571–1576 (2009).
- Gao, W., Shen, Z., Shang, L. & Wang, X. Upregulation of human autophagy-initiation kinase ULK1 by tumor suppressor p53 contributes to DNA-damage-induced cell death. *Cell Death Differ.* **18**, 1598–1607 (2011).
- Alers, S., Loffler, A. S., Wesselborg, S. & Stork, B. Role of AMPK-mTOR-Ulk1/2 in the regulation of autophagy: cross talk, shortcuts, and feedbacks. *Mol. Cell Biol.* **32**, 2–11 (2012).
- Mrakovcic, M. & Frohlich, L. F. p53-Mediated molecular control of autophagy in tumor cells. *Biomolecules* **8**, E14 (2018).
- Cordani, M. et al. Mutant p53 proteins counteract autophagic mechanism sensitizing cancer cells to mTOR inhibition. *Mol. Oncol.* **10**, 1008–1029 (2016).
- Morselli, E. et al. Mutant p53 protein localized in the cytoplasm inhibits autophagy. *Cell Cycle* **7**, 3056–3061 (2008).
- Munoz-Fontela, C., Mandinova, A., Aaronson, S. A. & Lee, S. W. Emerging roles of p53 and other tumour-suppressor genes in immune regulation. *Nat. Rev. Immunol.* **16**, 741–750 (2016).
- Ben Safta, T. et al. Granzyme B-activated p53 interacts with Bcl-2 to promote cytotoxic lymphocyte-mediated apoptosis. *J. Immunol.* **194**, 418–428 (2015).
- Meslin, F. et al. hSMG-1 is a granzyme B-associated stress-responsive protein kinase. *J. Mol. Med. (Berl., Ger.)* **89**, 411–421 (2011).
- 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.* **282**, 32991–32999 (2007).
- Li, Y. et al. Salvation of the fallen angel: reactivating mutant p53. *Br. J. Pharmacol.* **176**, 817–831 (2019).
- Bykov, V. J. N., Eriksson, S. E., Bianchi, J. & Wiman, K. G. Targeting mutant p53 for efficient cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* **18**, 89–102 (2018).
- Blander, A. R., Yu, X., Loh, S. N., Levine, A. J. & Carpizo, D. R. Reactivating mutant p53 using small molecules as zinc metallochaperones: awakening a sleeping giant in cancer. *Drug Disco. Today* **20**, 1391–1397 (2015).
- Smyth, G. K. Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat. Appl. Genet. Mol. Biol.* **3**, Article3 (2004).
- Thiery, J., Walch, M., Jensen, D. K., Martinvalet, D. & Lieberman, J. Isolation of cytotoxic T cell and NK granules and purification of their effector proteins. *Curr. Protoc. Cell Biol.* **Chapter 3**, Unit 3.37 (2010).
- Dotiwala, F. et al. A high yield and cost-efficient expression system of human granzymes in mammalian cells. *J. Vis. Exp.* **100**, e52911 (2015).
- Leers, M. P. et al. Immunocytochemical detection and mapping of a cyto-keratin 18 neo-epitope exposed during early apoptosis. *J. Pathol.* **187**, 567–572 (1999).
- Foster, B. A., Coffey, H. A., Morin, M. J. & Rastinejad, F. Pharmacological rescue of mutant p53 conformation and function. *Science* **286**, 2507–2510 (1999).
- Komarov, P. G. et al. A chemical inhibitor of p53 that protects mice from the side effects of cancer therapy. *Science* **285**, 1733–1737 (1999).
- Itakura, E. & Mizushima, N. Characterization of autophagosome formation site by a hierarchical analysis of mammalian Atg proteins. *Autophagy* **6**, 764–776 (2010).
- Mizushima, N., Yoshimori, T. & Levine, B. Methods in mammalian autophagy research. *Cell* **140**, 313–326 (2010).
- Marx, V. Autophagy: eat thyself, sustain thyself. *Nat. Methods* **12**, 1121–1125 (2015).
- Kang, R., Zeh, H. J., Lotze, M. T. & Tang, D. The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis. *Cell Death Differ.* **18**, 571–580 (2011).
- Stolz, A., Ernst, A. & Dikic, I. Cargo recognition and trafficking in selective autophagy. *Nat. Cell Biol.* **16**, 495–501 (2014).
- Loos, B., du Toit, A. & Hofmeyr, J. H. Defining and measuring autophagosome flux-concept and reality. *Autophagy* **10**, 2087–2096 (2014).
- Rousalova, I. & Krepela, E. Granzyme B-induced apoptosis in cancer cells and its regulation (review). *Int. J. Oncol.* **37**, 1361–1378 (2010).
- Martinvalet, D., Zhu, P. & Lieberman, J. Granzyme A induces caspase-independent mitochondrial damage, a required first step for apoptosis. *Immunity* **22**, 355–370 (2005).
- Martinvalet, D., Dykxhoorn, D. M., Ferrini, R. & Lieberman, J. Granzyme A cleaves a mitochondrial complex I protein to initiate caspase-independent cell death. *Cell* **133**, 681–692 (2008).
- Beresford, P. J., Xia, Z., Greenberg, A. H. & Lieberman, J. Granzyme A loading induces rapid cytolysis and a novel form of DNA damage independently of caspase activation. *Immunity* **10**, 585–594 (1999).
- Pardo, J. et al. Apoptotic pathways are selectively activated by granzyme A and/or granzyme B in CTL-mediated target cell lysis. *J. Cell Biol.* **167**, 457–468 (2004).
- Rippin, T. M. et al. Characterization of the p53-rescue drug CP-31398 in vitro and in living cells. *Oncogene* **21**, 2119–2129 (2002).

51. Wischhusen, J., Naumann, U., Ohgaki, H., Rastinejad, F. & Weller, M. CP-31398, a novel p53-stabilizing agent, induces p53-dependent and p53-independent glioma cell death. *Oncogene* **22**, 8233–8245 (2003).
52. Fiorini, C. et al. Autophagy induced by p53-reactivating molecules protects pancreatic cancer cells from apoptosis. *Apoptosis* **18**, 337–346 (2013).
53. Arihara, Y. et al. Small molecule CP-31398 induces reactive oxygen species-dependent apoptosis in human multiple myeloma. *Oncotarget* **8**, 65889–65899 (2017).
54. Xu, J. et al. Targeting wild-type and mutant p53 with small molecule CP-31398 blocks the growth of rhabdomyosarcoma by inducing reactive oxygen species-dependent apoptosis. *Cancer Res.* **70**, 6566–6576 (2010).
55. Filomeni, G., De Zio, D. & Cecconi, F. Oxidative stress and autophagy: the clash between damage and metabolic needs. *Cell Death Differ.* **22**, 377–388 (2015).
56. Li, L., Tan, J., Miao, Y., Lei, P. & Zhang, Q. ROS and autophagy: interactions and molecular regulatory mechanisms. *Cell Mol. Neurobiol.* **35**, 615–621 (2015).
57. Baginska, J. et al. Granzyme B degradation by autophagy decreases tumor cell susceptibility to natural killer-mediated lysis under hypoxia. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **110**, 17450–17455 (2013).
58. Messai, Y. et al. ITPR1 protects renal cancer cells against natural killer cells by inducing autophagy. *Cancer Res.* **74**, 6820–6832 (2014).
59. Messai, Y. et al. The autophagy sensor ITPR1 protects renal carcinoma cells from NK-mediated killing. *Autophagy* **0**. <https://doi.org/10.1080/15548627.2015.1017194> (2015).
60. Tittarelli, A., Janji, B., Van Moer, K., Noman, M. Z. & Chouaib, S. The selective degradation of synaptic connexin 43 protein by hypoxia-induced autophagy impairs natural killer cell-mediated tumor cell killing. *J. Biol. Chem.* **290**, 23670–23679 (2015).
61. Zhao, Y. G. & Zhang, H. Autophagosome maturation: an epic journey from the ER to lysosomes. *J. Cell. Biol.* **218**, 757–770 (2018).
62. Thelen, M. et al. Disruption of the autophagy-lysosome pathway is involved in neuropathology of the nclf mouse model of neuronal ceroid lipofuscinosis. *PLoS ONE* **7**, e35493 (2012).
63. Perdrix, A. et al. PRIMA-1 and PRIMA-1(Met) (APR-246): from mutant/wild type p53 reactivation to unexpected mechanisms underlying their potent anti-tumor effect in combinatorial therapies. *Cancers (Basel)* **9**, E172 (2017).



**Figure S1. The reactivation of p53 transcriptional activity by CP-31398 increases T47D and SKBR3 breast cancer cell susceptibility to NK-mediated lysis**

(A,E) T47D and SKBR3 cells express high level of mutated p53 (p53<sup>L194F</sup> and p53<sup>R175H</sup> respectively) lacking transcriptional activity as shown by the absence of p53-dependent transactivation of its target gene p21 even after  $\gamma$ -irradiation. (B-C,F) 24-48 hrs treatment with CP-31398 reactivates p53 transcriptional activity in T47D and SKBR3 cells as shown by induction of p21 expression at mRNA (C) and protein (B-F) levels. (D,G) CP-31398 treatment (48 hrs) increases T47D and SKBR3 cells susceptibility to NK-mediated lysis. <sup>51</sup>Cr release assays using NK cells isolated from a healthy donor co-cultured with target cells at different E:T ratios are shown. (H-J) MCF7 cells express a transcriptionally active wt p53 as shown by transactivation of its target gene p21 after  $\gamma$ -irradiation (H). CP-31398 did not induce p21 expression in these cells (I) neither potentiate their lysis by NK cells (NK92) (J). Data are representative of three independent experiments (A-B, E-F, H-I) or are the mean  $\pm$  s.d. of three (D, G, J) or five (C) independent experiments. The p values (C-D, G, J) were determined by unpaired two-tailed Student t test. NS: non-significant. \**P* < 0.05.

**B****C****D****E****F****G**

**Figure S2. The reactivation of p53 transcriptional activity by CP-31398 does not improve the formation of conjugates between target and NK cells or increase death receptor expression**

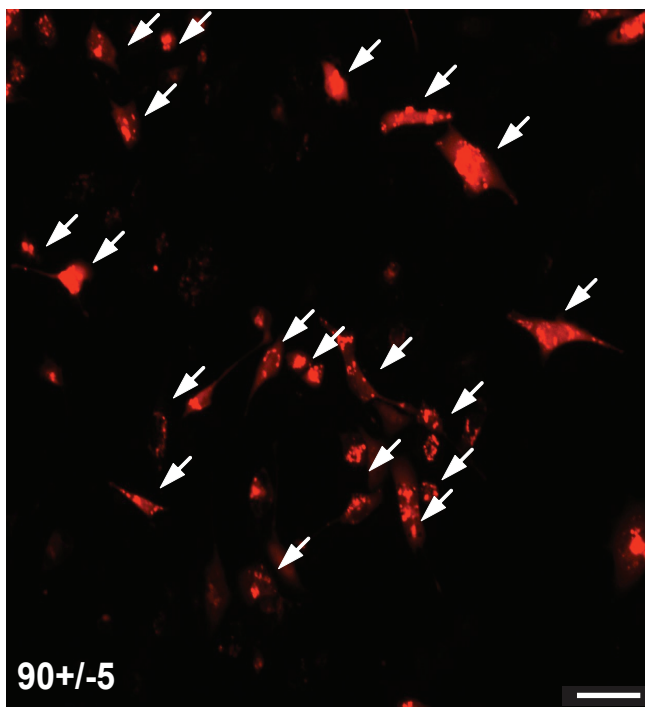
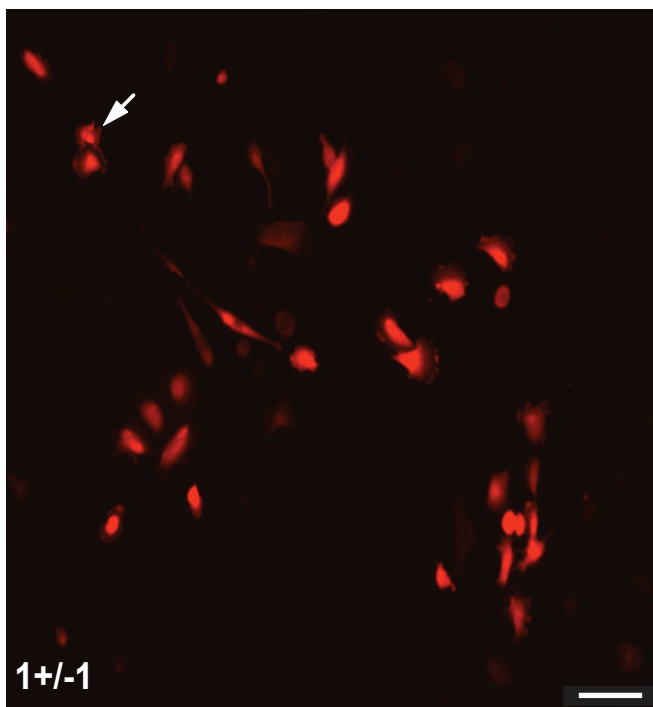
(A-B) MDA-MB231 cells  $\pm$  CP-31398 (48 hrs) stained with the lipophilic dyes DiO were incubated with NKd effector cells, stained with the lipophilic dyes DiD, at the effector:target ratio of 3:1 during 20 min before measuring immune conjugates formation by flow cytometry. Isolated MDA-MB231 and NKd were used as control to identify the two separated populations. The percentage of MDA-MB231 cells conjugated with NKd cells was calculated by gating on target cells and on measuring the percentage of DiO/DiD double positive population representing the immune conjugates, and indicated in red. Representative flow cytometry dot plots (A) and mean  $\pm$  s.d. of percentage MDA-MB231 cells conjugated with NKd cells (B) from three independent experiments are shown. (C-G) ICAM-1, MHC-class I, ULBPs, FAS, DR4 and DR5 expression is not modulated by CP-31398 treatment of MDA-MB231 cells. Data (C-G) are the mean  $\pm$  s.d. from three independent flow cytometry experiments. The p values (B-G) were determined by unpaired two-tailed Student t test. NS: non-significant.

**A**

Ctrl

+CP-31398 (48 hrs)

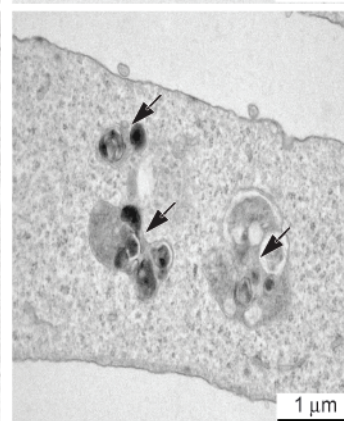
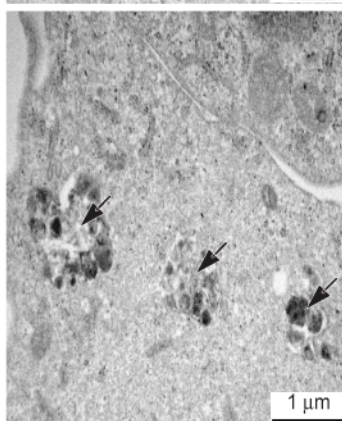
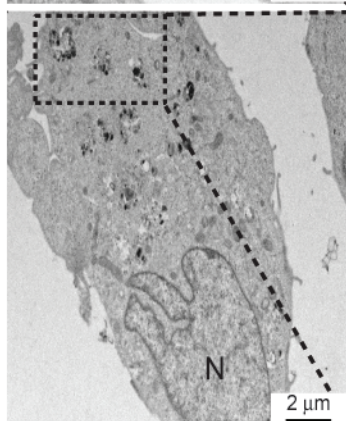
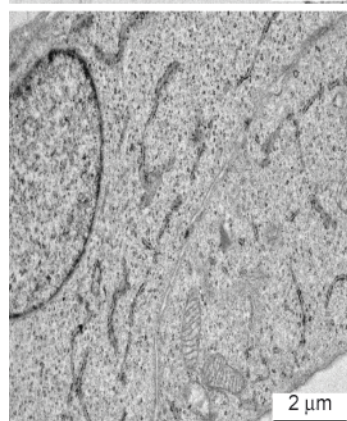
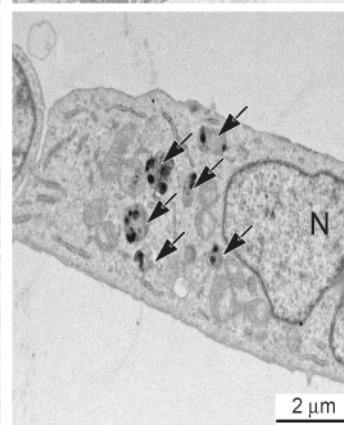
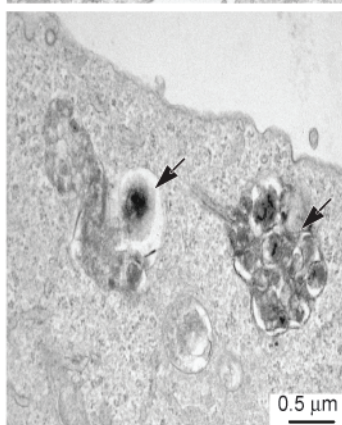
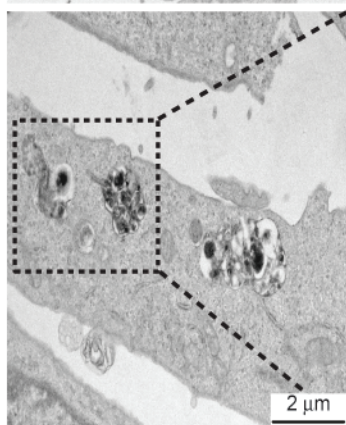
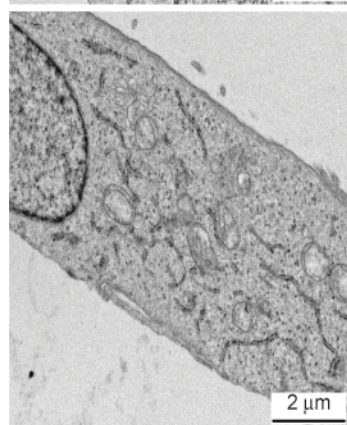
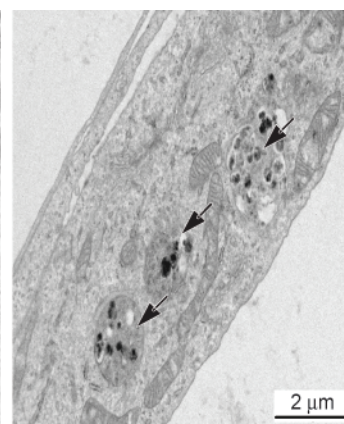
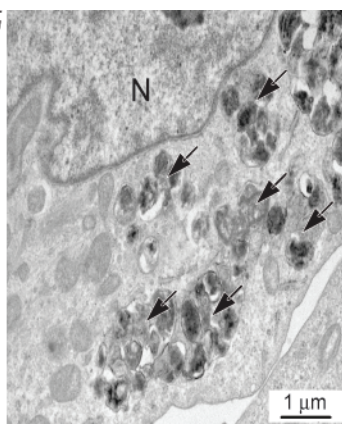
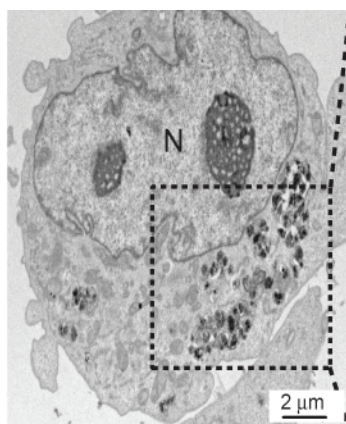
MDA-MB231 (Tomato-LC3)

**B**

Ctrl

+CP-31398 (48 hrs)

+CQ



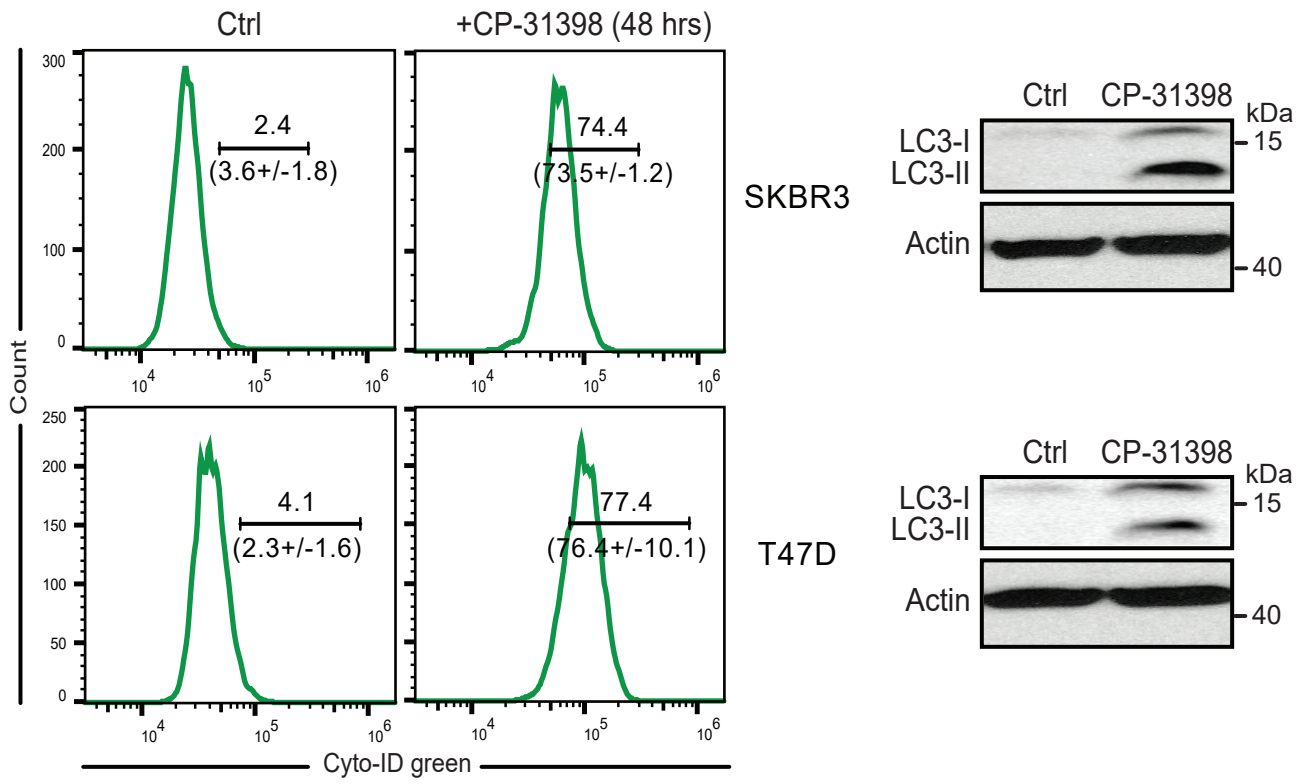
MDA-MB231



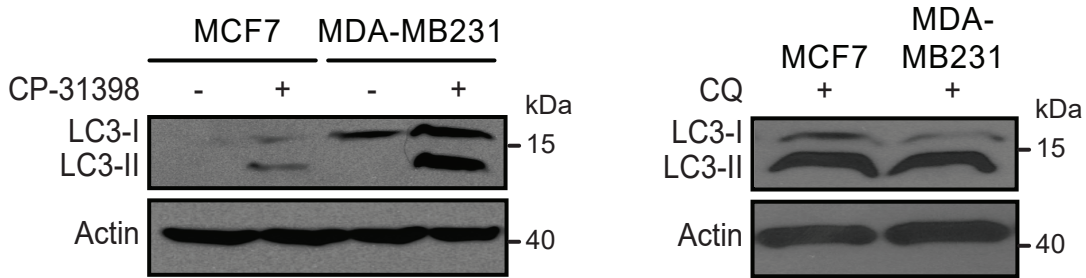
**Figure S3. CP-31398 induces the formation of autophagosomes in MDA-MB231 cells**

(A) Tomato-LC3 fusion protein is mostly diffuse throughout the cytoplasm of untreated cells, while punctate staining, representing autophagosomes, are observed when MDA-MB231 cells are treated with CP-31398 (48 hrs). Scale bars: 100  $\mu$ m. White arrows indicates cells with autophagosomes. Numbers indicate the percentage cell with autophagosomes (mean  $\pm$  s.d. from three independent experiments). (B) Effect of CP-31398 or chloroquine (CQ) on autophagosomes formation observed by electron microscopy. N: nucleus; black arrows: autophagosomes. Data are (A-B) representative of three independent experiments

**A**

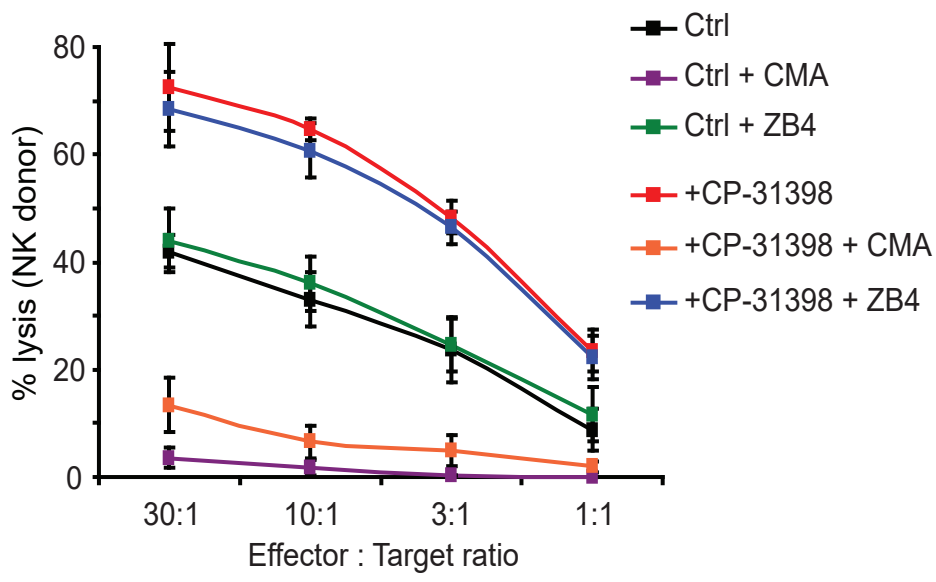


**B**



**Figure S4. CP-31398 triggers autophagy in SKBR3 and T47D breast tumor cells**

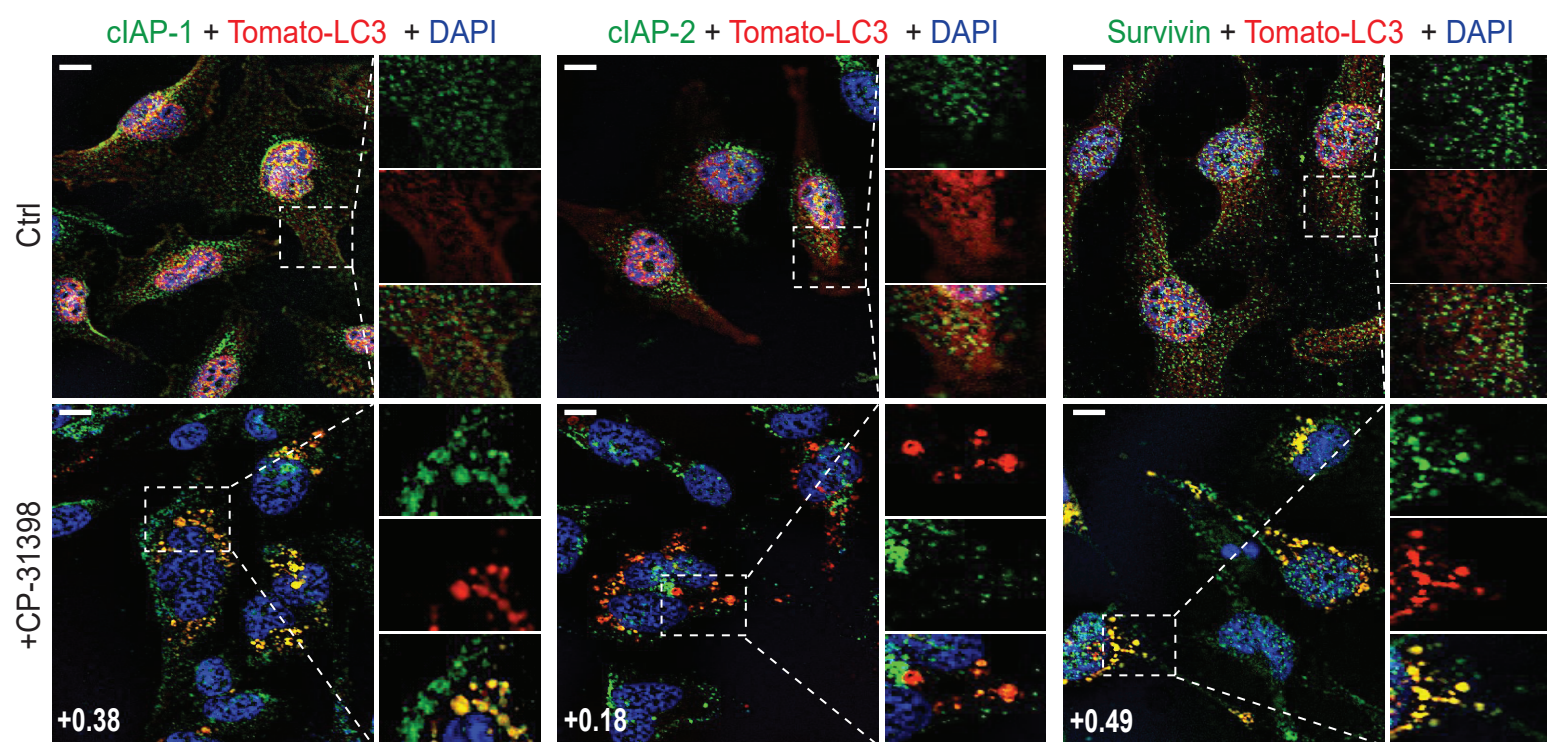
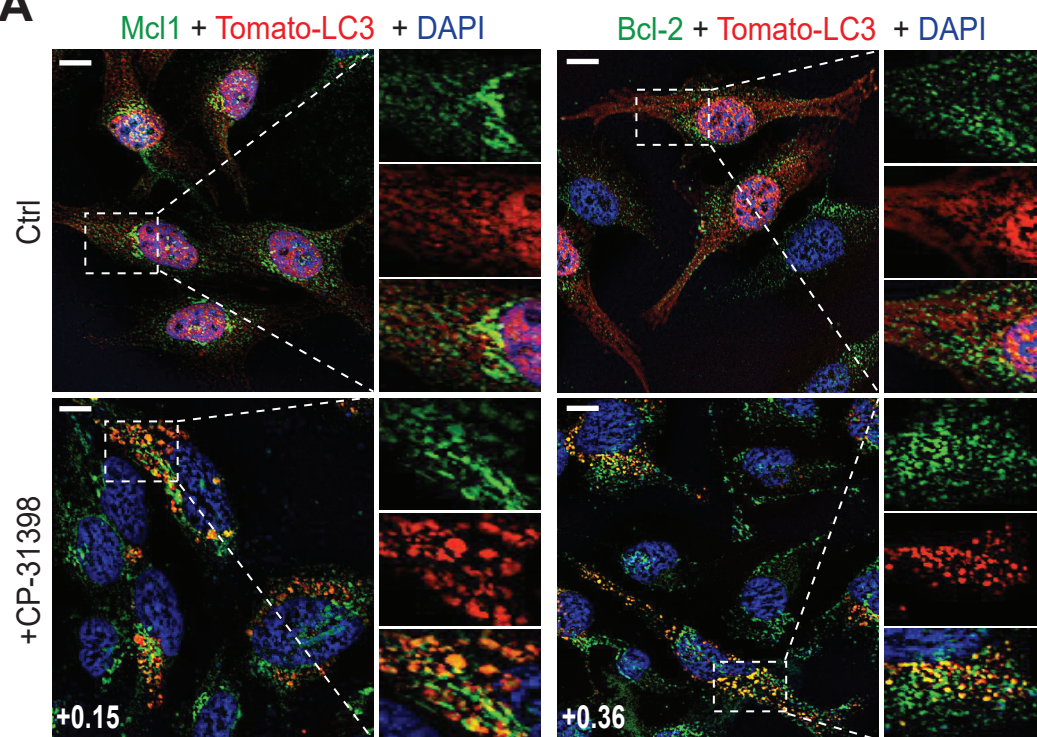
(A) CP-31398 induces autophagy in p53-mutated T47D and SKBR3 cells measured by flow cytometry using CYTO-ID green or by western blot to quantify LC3-II. (B) Western blot quantification of LC3-II induction in wtp53 MCF7 cells in response to CP-31398 treatment (48 hrs), compared to MDA-MB231 cells (left panel). Chloroquine (CQ) was used as positive control (right panel). Data are representative of three independent experiments (A-B) or are the mean  $\pm$  s.d. of three independent experiments (A; left panel).



**Figure S5. MDA-MB231 target cells are killed by NK cells through the Perforin/Granzymes pathway**

MDA-MB231 lysis by NK cells is dependent on Perforin/Granzymes pathway, indistinctly of CP-31398 treatment, as shown by the almost complete inhibition of NK-mediated lysis in presence of the  $\text{Ca}^{2+}$  chelator concanamycin A (CMA) (that inhibits cytotoxic granules exocytosis). The Fas blocking antibody ZB4 was used as control. Data are the mean  $\pm$  s.d. of two independent  $^{51}\text{Cr}$  release assay using NK cells isolated from a healthy donor co-cultured with target cells at different E:T ratios.

A



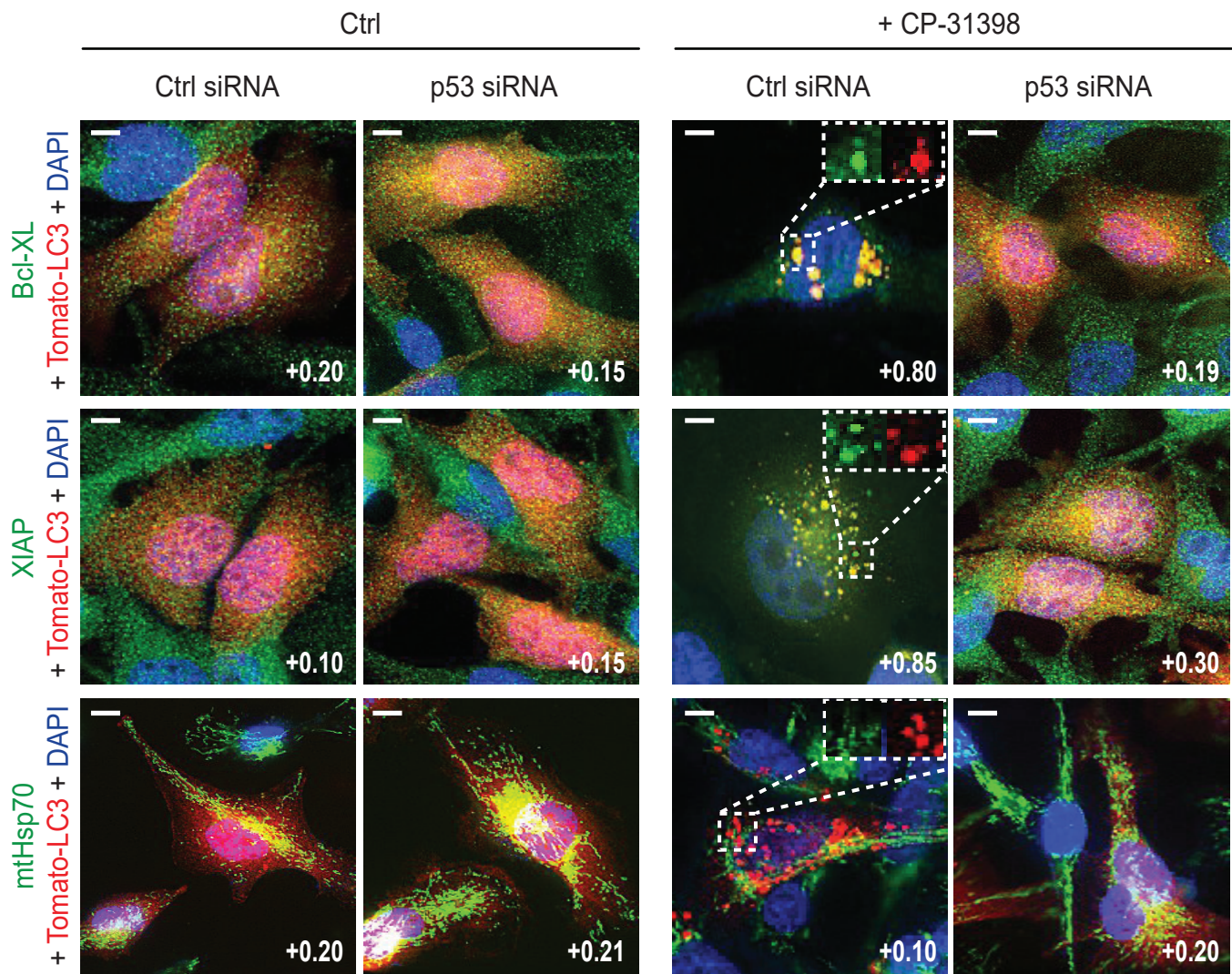
B

Colocalization (+CP-31398)	Pearson's correlation coefficient R(r) (mean +/- s.d.)
Tomato-LC3 /Mcl1	+ 0.10 +/- 0.05
TomatoLC3 /Bcl-2	+ 0.40 +/- 0.10
Tomato-LC3 /cIAP-1	+ 0.33 +/- 0.19
Tomato-LC3 /cIAP-2	+ 0.16 +/- 0.12
Tomato-LC3 /Survivin	+ 0.38+/- 0.11

**Figure S6. CP-31398-induced autophagosomes can contain other anti-apoptotic proteins**

(A) CP-31398-induced Tomato-LC3<sup>+</sup> autophagosomes do not contain the anti-apoptotic proteins Mcl-1 and cIAP-2, but can contain Bcl-2, cIAP-1 and Survivin at a lower level than Bcl-X<sub>L</sub> and XIAP. Scale bars: 20 μm. Data are representative of three independent fluorescence microscopy experiments. (B) The colocalization between CP-31398-induced Tomato-LC3<sup>+</sup> autophagosomes and the indicated proteins (stained in green) was measured and displayed as a pearson's correlation coefficient R(r) (also indicated as a number in (A)). The data (mean ± s.d.) obtained from 20 images from three independent experiments are shown.

A



B

Number of Tomato-LC3 <sup>+</sup> autophagosomes per cell (mean $\pm$ SD)		
Ctrl siRNA	0.2 $\pm$ 0.2	N.S.
P53 siRNA	1.3 $\pm$ 0.3	
Ctrl siRNA +CP-31398	18.3 $\pm$ 8.9	*
P53 siRNA +CP-31398	3.9 $\pm$ 2.5	

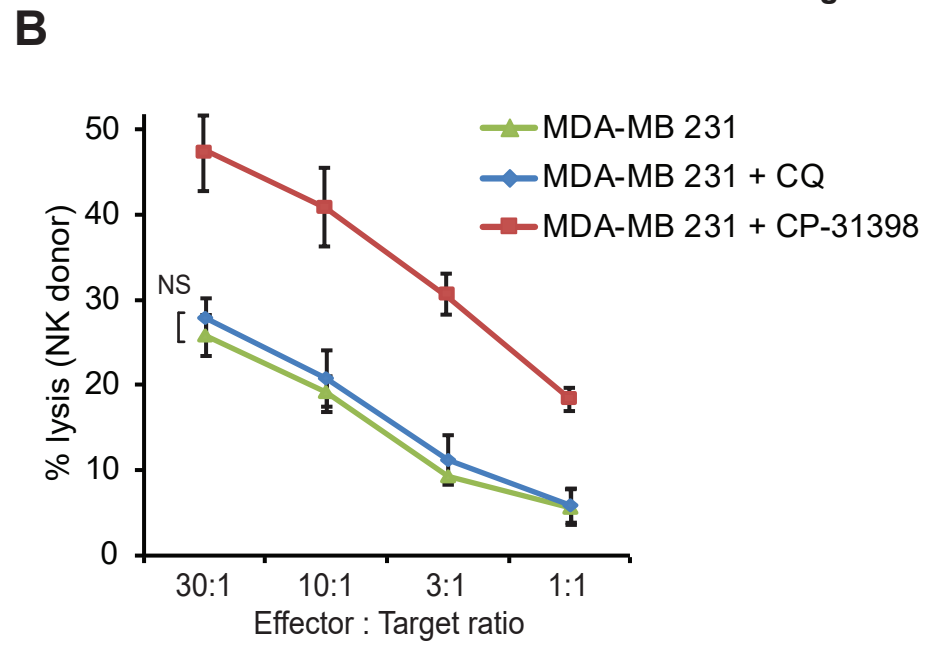
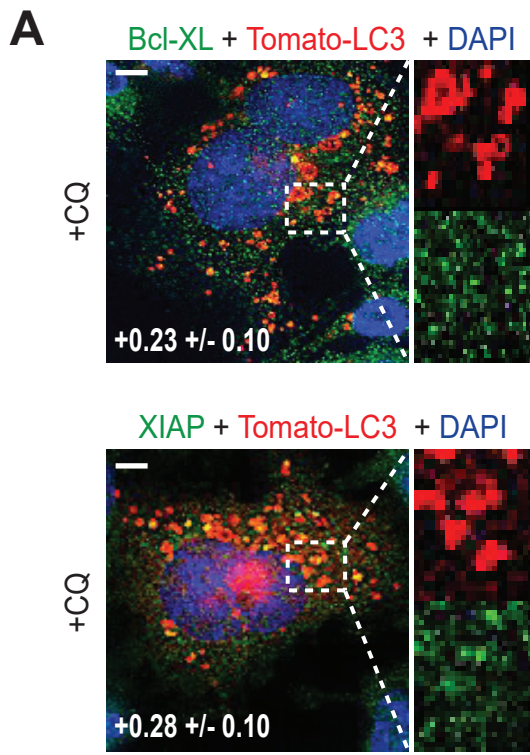
C

Colocalization (+CP-31398)		Pearson's correlation coefficient R(r) (mean $\pm$ s.d.)	
Tomato-LC3/Bcl-XL	Ctrl siRNA	+ 0.85 $\pm$ 0.05	*
	p53 siRNA	+ 0.28 $\pm$ 0.10	
Tomato-LC3/XIAP	Ctrl siRNA	+ 0.75 $\pm$ 0.15	*
	p53 siRNA	+ 0.23 $\pm$ 0.13	
Tomato-LC3/mtHsp70	Ctrl siRNA	+ 0.25 $\pm$ 0.15	N.S.
	p53 siRNA	+ 0.27 $\pm$ 0.12	



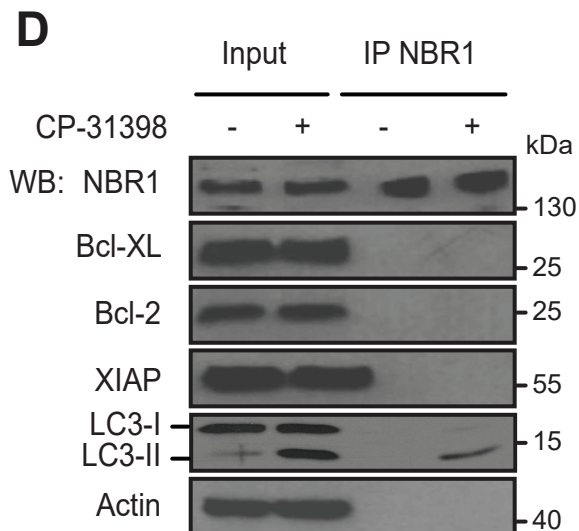
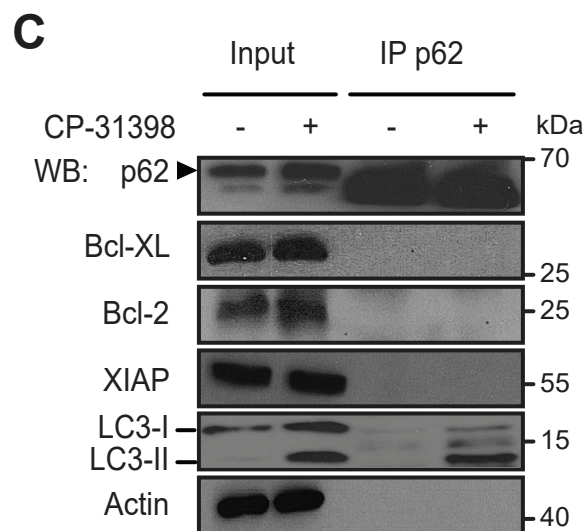
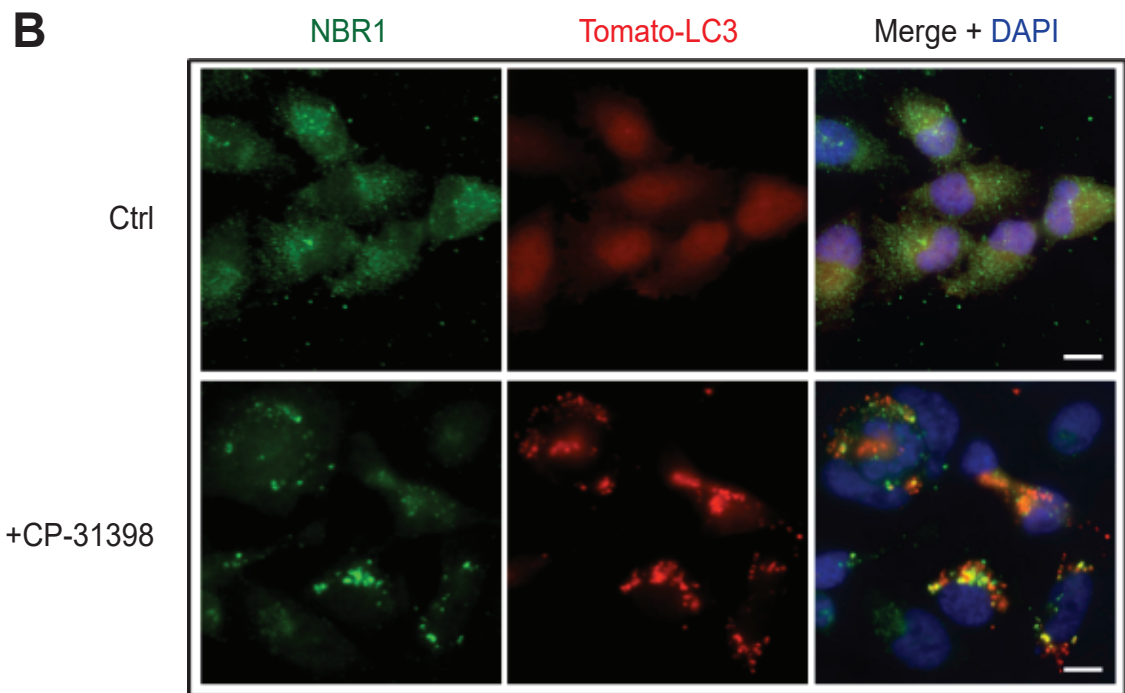
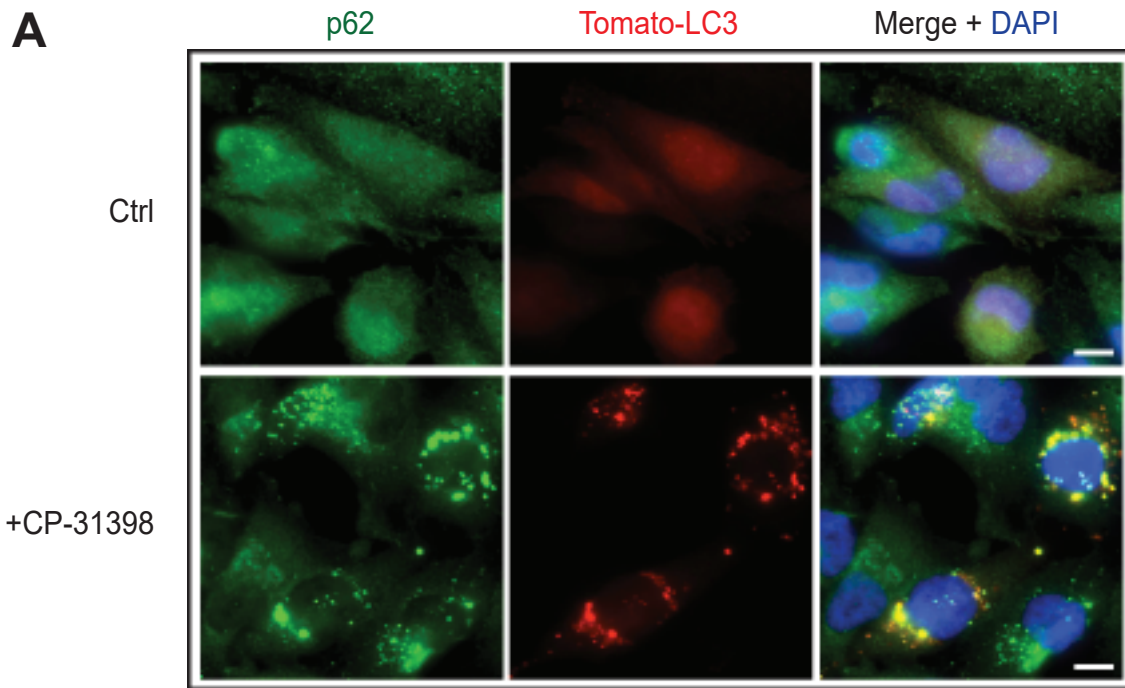
**Figure S7. CP-31398 induced sequestration of Bcl-X<sub>L</sub> and XIAP in autophagosomes is inhibited in p53 siRNA treated cells**

(A) CP-31398-induced Tomato-LC3<sup>+</sup> autophagosomes contains the anti-apoptotic proteins Bcl-X<sub>L</sub> and XIAP, but not the mitochondrial marker mtHsp70, in control siRNA-treated cells. After mutant p53 knockdown using siRNA, autophagosomes are mostly undetectable in response to CP-31398 and Bcl-X<sub>L</sub> and XIAP are no longer associated with LC3<sup>+</sup> structures. Scale bars: 20 μm. Data are representative of three independent fluorescence microscopy experiments. (B) The inhibition of p53 expression using siRNA strongly decrease the number of LC3-Tomato<sup>+</sup> autophagosomes formed after CP-31398 treatment, counted from microscopy images (100 cells for each conditions) (C) The colocalization between CP-31398-induced Tomato-LC3<sup>+</sup> autophagosomes and the indicated proteins (stained in green) was measured and displayed as a pearson's correlation coefficient R(r) (also indicated as a number in (A)). The data (mean ± s.d.) obtained from 20 images containing at least 5 cells from three independent experiments are shown. Bcl-X<sub>L</sub> and XIAP staining (R(r) > 0.6) is strongly associated with Tomato-LC3<sup>+</sup> autophagosomes. Data are representative of three independent experiments (A) or are the mean ± s.d. of three independent experiments (B-C). The p values (B-C) were determined by unpaired two-tailed Student t test. \**P* < 0.05.



**Figure S8. Chloroquine-induced autophagosomes do not sequester Bcl-X<sub>L</sub> and XIAP and do not increase MDA-MB231 cell susceptibility to NK-mediated lysis**

(A) Chloroquine (CQ)-induced Tomato-LC3<sup>+</sup> autophagosomes do not contain the anti-apoptotic proteins Bcl-X<sub>L</sub> and XIAP. Scale bars: 20 μm. Data are representative of two independent fluorescence microscopy experiments. The colocalization between CQ-induced Tomato-LC3<sup>+</sup> autophagosomes and the indicated proteins (stained in green) was measured and displayed as a Pearson's correlation coefficient R(r) (mean ± s.d. of two independent experiments). (B) CQ pre-treatment (16 hrs) does not increase MDA-MB231 cell susceptibility to NK-mediated lysis. <sup>51</sup>Cr release assay using NK cells isolated from a healthy donor co-cultured with target cells at different E:T ratios is shown. Data are the mean ± s.d. of two independent experiments performed in triplicate. The p values (NS: non-significant) were determined by unpaired two-tailed Student t test.



**Figure S9. The autophagosomal sequestration of Bcl-X<sub>L</sub>, Bcl-2 and XIAP in response to CP-31398 is independent of p62 and NBR1**

**(A-B)** P62 and NBR1 relocalize to LC3-Tomato<sup>+</sup> autophagosomes formed in response to CP-31398 treatment (48 hrs). Representative fluorescence microscopy images from two independent experiments are displayed. Scale bars: 10 μm. **(C-D)** P62 or NBR1 do not interact with Bcl-X<sub>L</sub>, Bcl-2 and XIAP in response to CP-31398. P62 and NBR1 were independently immuno-precipitated from MDA-MB231 cells after 24 hrs treatment with CP-31398 before western-blot analysis of Bcl-X<sub>L</sub>, Bcl-2 and XIAP. Immunoblotting for LC3-II was used as a positive control. Data are representative of three independent experiments.

## **Partie 2 : Etude du lien potentiel entre mutations de p53 et expression de PD-L1**

**Travaux en cours :**

**“ Mutant P53 gain of function stimulates PD-L1 expression”**

Marie Chollat-Namy, Célia Gardet, Jerome Thiery

Parmi les mécanismes d'échappement au système immunitaire, l'expression par les cellules tumorales de ligands des points de contrôle immunitaire ou « immune checkpoints » constitue un mécanisme déterminant dans l'altération de la réponse immune antitumorale. En effet, la reconnaissance par les CTL de leur cellules cibles tumorales dépend en grande partie de la liaison de leur TCR au complexe CMH-I/peptide. Cependant, l'activation des CTL, leur prolifération, leur survie ou encore leur activité cytotoxique peuvent être inhibées par l'expression et l'activation de checkpoints immunitaires (CI) tels que PD-1, Tim-3, CTLA-4 ou LAG-3. Lorsque ces checkpoints immunitaires, comme PD-1, se lient à leurs ligands respectifs présents à la surface des cellules tumorales (comme PD-L1), cela contrecarre les signaux positifs provenant du TCR (Freeman et al., 2000) et participe à l'épuisement des cellules immunitaires, qui se caractérise par l'arrêt de leur prolifération et également la perte de leurs capacités cytotoxiques. Ce phénomène peut être réversé par le blocage de PD-1 ce qui réactive les fonctions effectrices des cellules T épuisées (Barber et al., 2006). PD-L1, exprimé à la surface de nombreuses cellules cancéreuses (Xie et al., 2016) (Xiang et al., 2018), est principalement induit par la stimulation par l'IFN- $\gamma$ . Néanmoins, son expression est aussi contrôlée au niveau transcriptionnel par différents facteurs de transcription comme STAT3, NF- $\kappa$ B, PTEN, JAK2/STAT1, MAPK et HIF-1 $\alpha$  (Wang et al., 2018) et au niveau post-transcriptionnel par plusieurs micro ARN (miRNA) (Wang et al., 2017) qui se lient et dégradent son ARNm. De plus, plusieurs mécanismes au niveau traductionnel et post-traductionnel modulent la stabilité et la durée de vie de l'ARNm de PD-L1 (Wang et al., 2018) (Zhang et al., 2018).

Au cours des cinq dernières années, des études publiées par différentes équipes ont également suggéré que le suppresseur de tumeur p53 pourrait moduler l'activité des effecteurs cytotoxiques en modulant l'expression de PD-L1. En effet, il semblerait que miR34a, une cible transcriptionnelle de p53 WT, puisse, par liaison directe avec l'ARNm de PD-L1, inhiber son expression. En ce sens, l'inhibition de p53 WT augmenterait l'expression de PD-L1 à la surface des cellules tumorales ce qui réprimerait l'activité cytotoxique des CTL (Cortez et al., 2016). Cependant, d'autres travaux ont montré à l'inverse que l'activation de p53 WT favoriserait l'expression de PD-L1 (Yoon et al., 2015). Ainsi, le lien entre p53 WT et l'expression de PD-L1 nécessite des études supplémentaires.

De plus, il est important de noter que très peu de travaux se sont intéressés à l'impact des mutations inactivatrices de p53, fréquemment retrouvées dans les tumeurs humaines, sur l'expression de PD-L1. En effet, plus de 50% des tumeurs humaines présentent des mutations inactivatrices du gène de p53. Celles-ci sont principalement localisées dans le domaine de liaison à

l'ADN, et conduisent à la stabilisation et l'accumulation de haut niveau de p53 « défectueuse », et causent une perte de la fonction transcriptionnelles de p53. Ainsi, les mutations de p53 engendrent une perte de ses fonctions biologiques (apoptose, arrêt du cycle cellulaire...), ce qui favorise le développement tumoral.

Sur la base de travaux préliminaires du laboratoire (voir figure 26), nous nous sommes intéressés à l'impact de certains mutants de p53 sur l'expression du ligand de checkpoint immunitaire PD-L1. Pour ce faire, nous avons utilisé plusieurs lignées cancéreuses pulmonaires et mammaires pour tester l'effet de plusieurs mutations de p53 (notamment les « hotspots » de mutations p53<sup>R280K</sup>, p53<sup>R280I</sup>, p53<sup>R175H</sup>, p53<sup>R248W</sup>, p53<sup>R249S</sup> et p53<sup>R273H</sup>) sur l'expression de PD-L1.

Même si ces travaux sont toujours en cours à l'heure actuelle, nos résultats ont montré que l'inhibition de l'expression des mutants de p53 testés, par une approche de siRNA, réduit fortement l'expression de PD-L1. En parallèle, nous avons montré que la ré-expression de différents mutants de p53, au sein de cellules tumorales p53<sup>NULL</sup>, induit une augmentation de leur expression de PD-L1, bien que ces protéines p53 mutées soient transcriptionnellement inactives. Sur la base de ces résultats, nous avons donc émis l'hypothèse que certains mutants de p53 pourraient réguler positivement l'expression de PD-L1, par un ou plusieurs mécanismes dépendants d'un gain de fonction de ces mutants, indépendamment de toutes fonctions transcriptionnelles directes. Ainsi, afin de déterminer les mécanismes moléculaires associés à la régulation indirecte de l'expression de PD-L1 par ces mutants de p53, nous avons étudié l'interactome de p53 par spectrométrie de masse. Cette analyse nous a permis d'identifier différentes protéines cibles, interagissant fortement avec les mutants de p53 utilisés et pouvant potentiellement intervenir dans la modulation de l'expression de PD-L1 (notamment les protéines Nucléoline et Alyref). La validation de l'interaction de ces protéines avec les mutants de p53 et l'impact de cette interaction sur l'expression de PD-L1 est en cours.



## Matériel et méthodes

- Culture cellulaire et traitement

Les lignées d'adénocarcinome mammaire MDA-MB231, 1001, MDA-MB468, BT-549, BT-20 ont été cultivées dans du milieu RMPI 1640/Glutamax (Gibco) contenant 10% de sérum de veau foetal (SVF), 1% de pyruvate de sodium (Gibco) et 1% de pénicilline/streptomycine (Gibco). Les lignées de cancer du poumon Bla2 et H1299 ont été cultivées dans du milieu DMEM/Glutamax (Gibco) contenant 10% de SVF, 1% de pyruvate de sodium (Gibco), 1% d'Ultroser (PALL Life Science) et 1% de pénicilline/streptomycine (Gibco). Toutes les cellules ont été maintenues en culture dans un incubateur à 37°C, sous atmosphère humide contenant 5% de CO<sub>2</sub>.

- Western blot

Les extraits cellulaires totaux ont été préparés en lysant des cellules dans un tampon de type RIPA (Thermo-Fisher Scientific) contenant un mélange d'inhibiteurs de protéases et de phosphatases (Thermo-Fisher Scientific). Les cellules ont été ensuite lavées et des extraits protéiques totaux ont été préparés pour l'analyse. La concentration protéique des échantillons a été déterminée par spectrophotométrie selon la technique BCA (BioRad protein assay, Biorad). Les protéines (10 à 40 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 10 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 indiqué, 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) et un Chemidoc Imaging System (Biorad). Les anticorps utilisés sont les suivants : anti-p53 (clone DO-1), anti-p21 (clone OP64), anti-NCL (clone D4C7O), anti-Alyref (clone 11G5) et anti-actine conjugué à HRP (Sigma-Aldrich). La quantification des niveaux d'expression des protéines en western blot a été effectuée en utilisant le logiciel de densitométrie ImageJ.

- RT-qPCR

Les cellules cibles ont été lysées et les ARN ont été purifiés en utilisant un kit de purification d'ARN totaux (Norgen Cat. #17200). 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 de 0.8 µg d'ARN en utilisant un kit Maxima First Strand cDNA *Synthesis* pour RT-qPCR avec dsDNase (Thermo Scientific). La réaction de polymérisation a été réalisée dans un thermocycleur Gene Amp PCR system 9700, pendant 10 minutes à 25°C, puis 15 minutes à 50 °C et enfin 5 minutes à 85°C. La PCR quantitative a été réalisée à partir de 1 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 (SYBR Green Master Mix Thermo Scientific). 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 ( $2^{-\Delta CT}$ ).

Les séquences d'amorces utilisées (5'--> 3') sont les suivantes :

18-S : Primer\_F : CGGACAGGATTGACAGATTG ; Primer\_R: CAAATCGCTCCACCAACTAA  
PD-L1: Primer\_F : TGCTTGTCAGATGACTTCG ; Primer\_R:  
TATGGTGGTGCCGACTACAA

- Cytométrie en flux

L'analyse des cellules tumorales a été réalisée par immunofluorescence.

Marquage de PD-L1 : après lavage PBS,  $5 \times 10^5$  cellules ont été incubées pendant 20 min à température ambiante en présence du contrôle isotopique approprié ou d'un anticorps anti-PD-L1 (29E2A3 ; Biolegend). Les cellules ont ensuite été lavées avec du PBS.

Marquage de p53 : après lavage PBS,  $5 \times 10^5$  cellules ont été incubées pendant 20 min à température ambiante dans une solution de fixation (Thermo scientifique). Puis perméabilisées dans une solution de perméabilisation (Thermo scientifique) pendant 20 min à température ambiante. Les cellules ont ensuite été incubées pendant 20 min avec l'anticorps primaire anti-p53 (clone DO-1), lavées au PBS, puis incubées pendant 20 min avec l'anticorps secondaire approprié couplé à de l'Alexa Fluor®488 (Life Technologies), puis lavées au PBS. 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.

- Transfection des siRNA et des plasmides codant pour des mutants de p53

L'inhibition de p53 par interférence ARN (siRNA) (Ambion Silencer Select) a été réalisée en utilisant des siRNA contrôles (Ambion Silencer Select #1) ou ciblant spécifiquement p53 (s607), NCL (s9312) et ALYREF (s19853). Les cellules ont été transfectées par ces siRNA à l'aide de Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen). L'expression de différents mutants de p53 a été obtenue en transfectant les cellules H1299 par différents vecteurs plasmidiques (10 µg d'ADN par puits de

plaque 6 puits) provenant de Addgen (pCMV-Neo-Bam p53 R273H/R248W/R249S/R273H) à l'aide de Lipofectamine 2000 (Thermo scientifique) (10 µL par puit).

- Immunoprécipitation de p53 :

Un kit d'immunoprécipitation (Pierce) avec bille d'agarose a été utilisé. Après un lavage au PBS, les cellules H1299 transfectées ou non ont été lysées avec du tampon de lyse IP durant 5 minutes sur de la glace. Après élimination des débris cellulaires par centrifugation, la concentration protéique des échantillons a été déterminée par la technique BCA (BioRad protein assay, Biorad). Les échantillons ont ensuite été passés à travers une colonne de résine d'agarose contrôle afin d'éliminer les protéines se fixant de façon non spécifique à l'agarose. Les échantillons protéiques ont ensuite été incubés avec l'anticorps anti-p53 (clone DO-1) à 4°C pendant la nuit avant d'être passés à travers une colonne d'agarose retenant de façon spécifique les anticorps dans la colonne. Après plusieurs lavages, les colonnes contenant les complexes immunes (les anticorps anti-p53, les protéines p53 et les protéines auxquelles elles se fixent) ont été éluées puis analysées par western blot ou spectrométrie de masse.

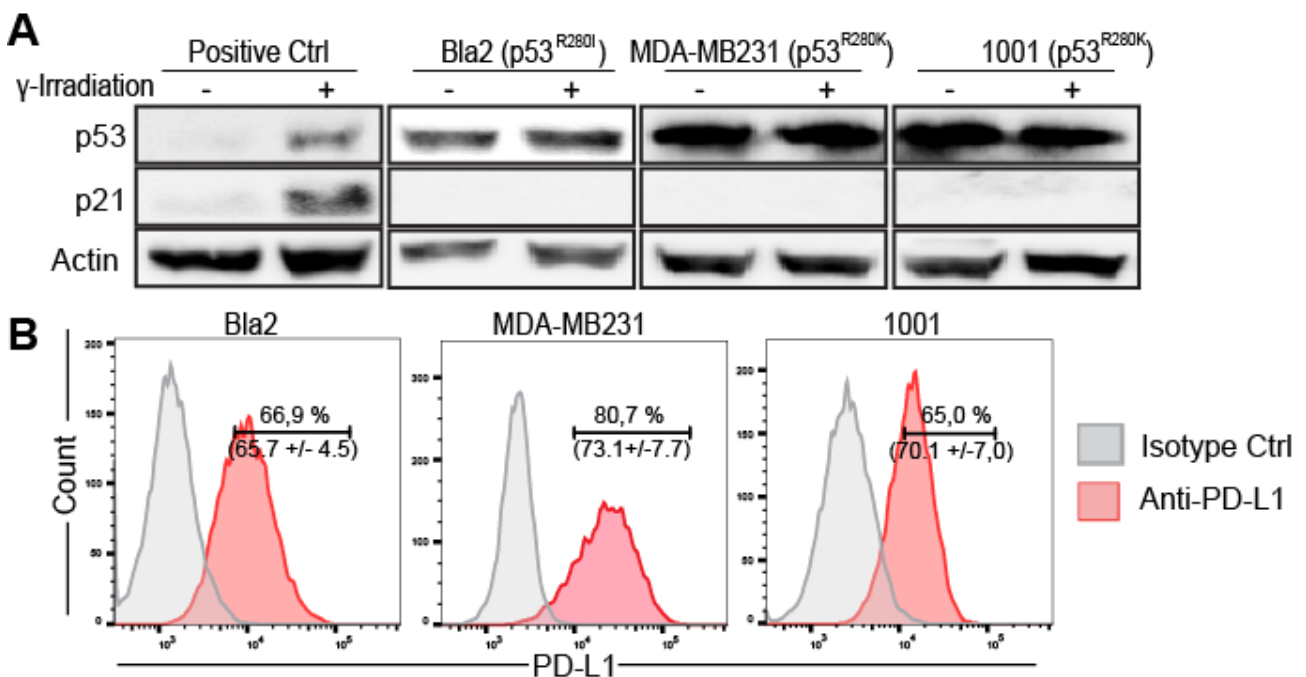
- Spectrométrie de masse :

Acquisition : les échantillons d'immunoprécipitation contenant les protéines ont été digérés avec de la trypsine (0.2 µg/µL) dans un tampon de NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> à 25mM pendant une nuit à 37°C. Les échantillons ont été déssalés avec du ZipTip C18 Pipette Tips (Thermo Fisher Scientific) et analysés par un spectromètre de masse (Orbitrap Qexactive plus) en mode positif couplé à un Nano-LC Proxeon 1000 équipé avec une source d'ion NSI EASY-spray (Thermo Fisher Scientific). Les peptides ont été séparés par chromatographie liquide avec les paramètres suivants : Acclaim PepMap100 C18 pré-colonne en phase inversée (2 cm, 3 µm, 100 Å), EASY-spray C18 colonne en phase inversée (50 cm, 75 µm i.d., 2 µm, 100 Å), débit du flux 300 nl/min, gradient de 95 % solvant A (eau, 0.1 % acide formique) à 40 % solvant B (80 % acetonitrile, 0.1% acide formique) durant 110 minutes, suivit par une colonne de régénération de 10 min donnant un temps total de 120 minutes. Les peptides ont été analysés dans une cellule Orbitrap, en mode scan ionique total, à une résolution de 70000 avec une gamme de masse de m/z 350-1500 et une cible AGC de 3x10<sup>6</sup>. Les fragments ont été obtenus avec par une activation Higher-energy C-trap Dissociation (HCD) avec une énergie collisionnelle de 27%, et une fenêtre d'isolation quadropole de 1.4 m/z. Les données MS/MS ont été acquises par une cellule Orbitrap à une résolution de 17500, avec une cible AGC de 2x10<sup>5</sup> et une exclusion dynamique de 30 secondes. Les MS/MS des plus intenses précurseurs ont été acquis en premier. Le temps d'accumulation du maximum d'ion a été établi à 50 ms pour l'acquisition MS et de 35ms pour l'acquisition MS/MS.

Traitement des données LC-MS/MS : les données ont été traitées avec le logiciel Proteome Discoverer 2.4 (Thermo Fisher Scientific). L'identification des protéines a été effectuée avec le serveur de recherche « Mascot de Proteome Discoverer ». La tolérance de masse des fragments d'ions a été établie à 6 ppm pour la tolérance de masse des précurseurs et à 0.02 Da pour la tolérance de masse des fragments. L'identification des peptides typiques reliés aux protéines a été réalisée sur la base de données Uniprot Refseq homo sapiens taxonomy. Le nombre maximum de mauvais clivages a été limité à 2 par digestion à la trypsine. Les p-values des peptides ont été calculées en utilisant l'algorithme percolateur et un filtre de 1% a été appliqué comme un seuil de taux de faux positifs.

L'inhibition de l'expression de certains mutants de p53 diminue l'expression de PD-L1 à la surface des cellules tumorales.

Dans le but d'étudier le lien entre les mutants de p53 et l'expression de PD-L1, nous avons utilisé les lignées cellulaires de cancer du sein MDA-MB231 (p53<sup>R280K</sup>) et 1001 (p53<sup>R280K</sup>) et de cancer du poumons Bla2 (p53<sup>R280K</sup>). Comme décrit dans la littérature, ces mutations de p53 sont associées avec une accumulation d'une p53 transcriptionnellement inactive, comme le montre leur incapacité à induire l'expression de leur gène cible p21 après  $\gamma$ -irradiation (Figure 1A). De manière importante, ces trois lignées cancéreuses expriment fortement PD-L1 à leur surface (Figure 1B).

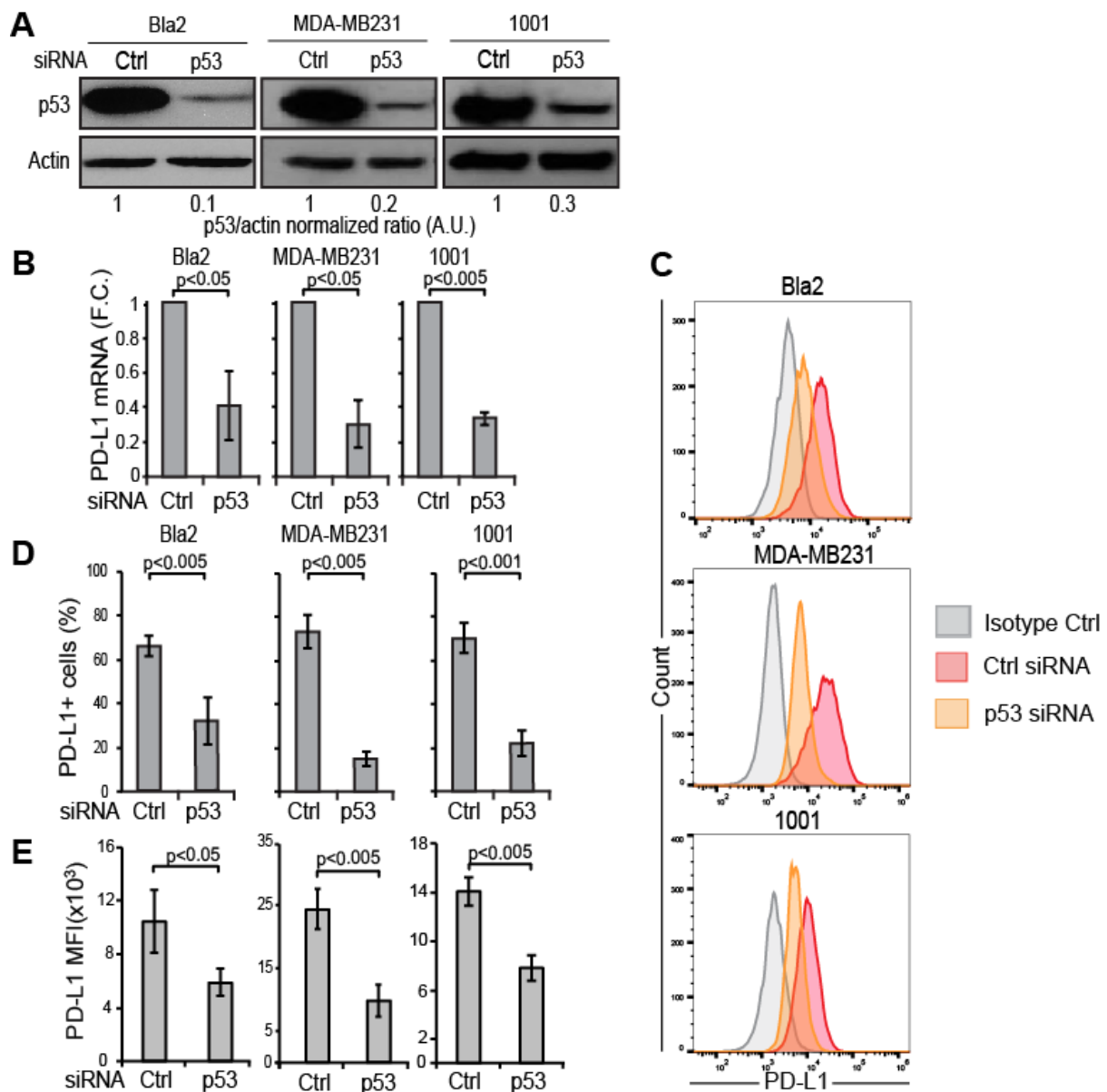


**Figure 1 : Les cellules Bla2, MDA-MB231 et 1001, exprimant une p53 mutée transcriptionnellement inactive, expriment fortement PD-L1 à leur surface.**

(A) Les cellules Bla2 (p53<sup>R280I</sup>), MDA-MB231 (p53<sup>R280K</sup>) et 1001(p53<sup>R280K</sup>) expriment une p53 transcriptionnellement inactive comme le montre l'absence d'induction de p21 (mesurée par western blot) après irradiation  $\gamma$  (5 Gy). Un contrôle positif a été réalisé à partir de cellules MCF7 (p53<sup>WT</sup>). (B) Les cellules tumorales Bla2, MDA-MB231 et 1001 présentent un fort niveau d'expression de PD-L1 à leur surface. Les cellules ont été marquées par un contrôle isotypique ou un anticorps anti-PD-L1 puis analysées par cytométrie en flux. Une expérience représentative est représentée pour chaque lignée. Le pourcentage de cellules exprimant PD-L1 par rapport au contrôle isotypique pour l'expérience représentée est indiqué ainsi que la moyenne de trois expériences indépendantes +/- écart-types.

Afin de déterminer l'impact de ces mutants de p53 sur l'expression de PD-L1, nous avons inhibé leur expression grâce à un traitement par des siRNA ciblant spécifiquement p53. L'efficacité de l'inhibition a été mesurée par western blot et évaluée à 70-90% selon les lignées (Figure 2A). De

manière intéressante, nous avons observé que cette inhibition de l'expression des mutants de p53 étudiés est associée avec une diminution de l'expression de PD-L1 de plus de 50% par rapport aux cellules transfectées par des siRNA contrôle, et ce aussi bien au niveau ARNm (Figure 2B) qu'au niveau de la protéine PD-L1 exprimée à la surface des cellules (Figure 2C-E). En effet, l'inhibition de l'expression des mutants de p53 par siRNA diminuent à la fois le pourcentage de cellules exprimant PD-L1 (Figure 2C-D) et le niveau moyen d'expression par cellule (mesuré grâce à l'intensité moyenne de fluorescence) (Figure 2E).

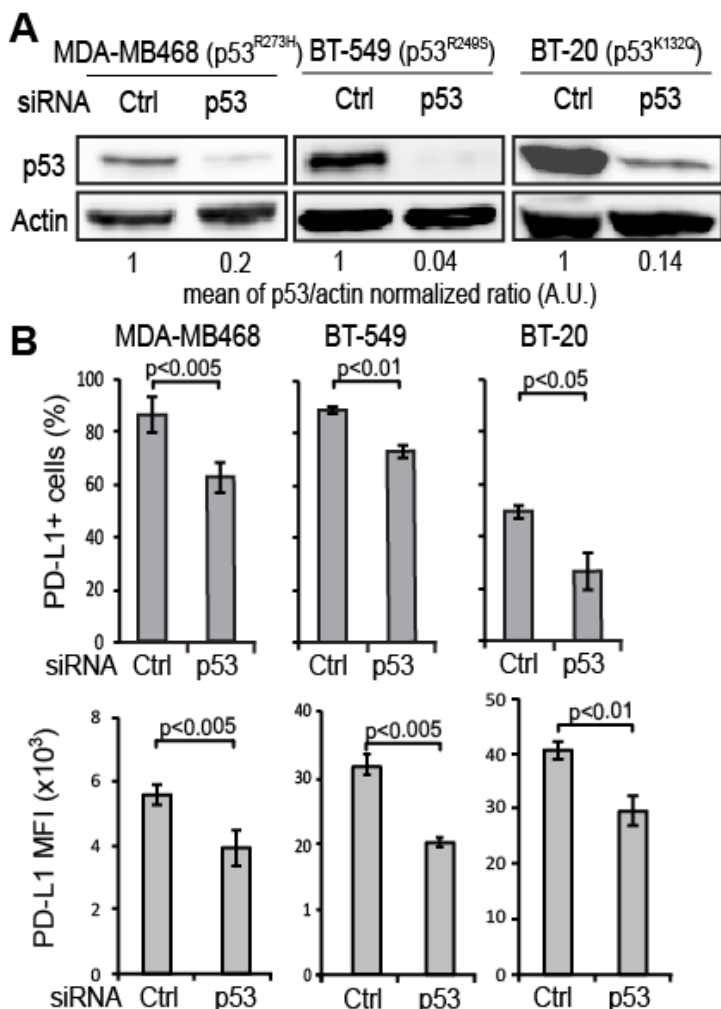


**Figure 2 : L'inhibition de l'expression des mutants de p53 diminue l'expression de PD-L1**

(A) L'efficacité du traitement par siRNA ciblant p53, afin de diminuer l'expression des p53 mutants dans les cellules Bla2, MDA-MB231 et 1001 a été analysée par western blot. Une expérience représentative est représentée ainsi que le ratio p53/actine normalisé. (B) L'inhibition de l'expression des p53 mutants diminue la transcription de l'ARNm de PD-L1, mesurée par RT-qPCR. Les résultats sont représentés sous forme de moyennes +/- écart-types, provenant de trois expériences indépendantes. (C-E) L'inhibition de l'expression des mutants de p53 diminue l'expression de PD-L1 à la surface des cellules tumorales Bla2, MDA-MB231 et 1001. Des histogrammes représentatifs de cytométrie en flux montrant la diminution

d'expression de PD-L1 en réponse aux siRNA ciblant p53 (C) ainsi que le pourcentage de cellules PD-L1+ (D) et la moyenne d'intensité de fluorescence (MFI) (E) mesurées à partir de trois expériences indépendantes sont indiqués. Les résultats (D-E) sont représentés sous forme de moyennes +/- écart-types de trois expériences indépendantes. Les p-values ont été déterminées par un test de Student.

Des résultats similaires ont été obtenus en utilisant les lignées cancéreuses MDA-MB468 (p53<sup>R273H</sup>), BT-549 (p53<sup>R249S</sup>) et BT-20 (p53<sup>K132Q</sup>) bien que l'effet de l'inhibition des mutants de p53 sur l'expression de PD-L1 soit moins marqué (Figure 3A, B).



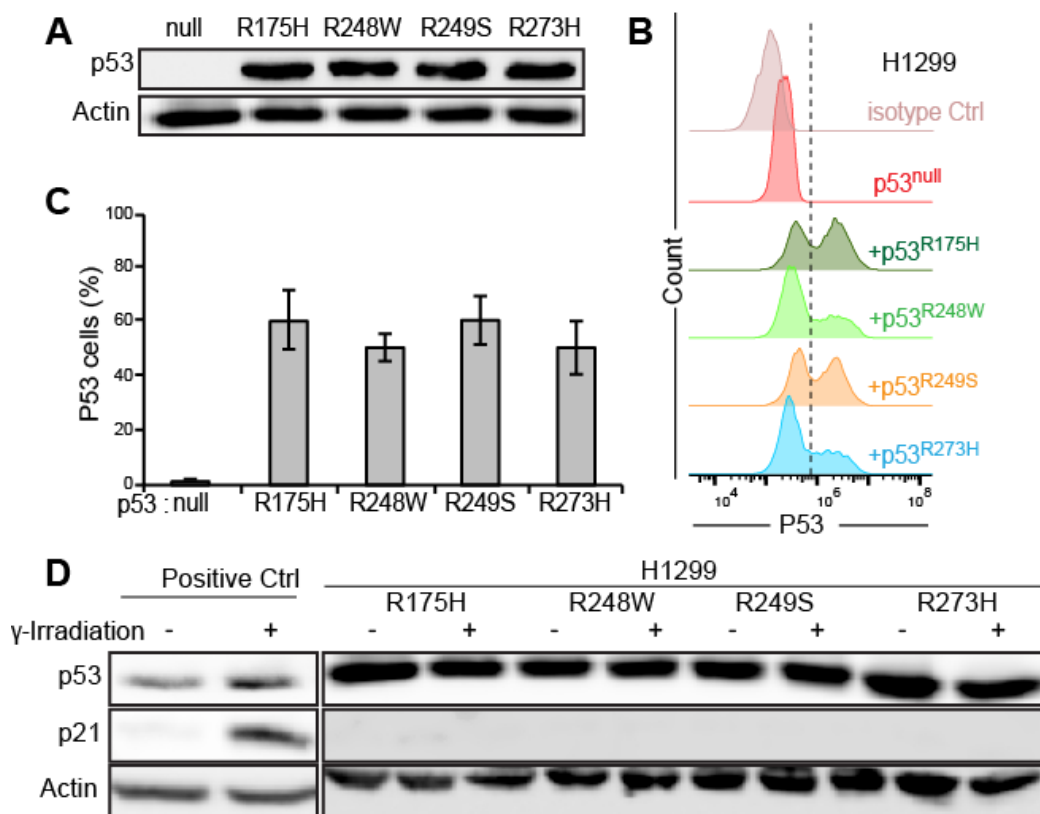
**Figure 3 : L'inhibition des mutants de p53 mutées dans les lignées tumorales MDA-MB468, BT-549 et BT20 diminue légèrement leur expression de PD-L1**

(A) L'efficacité du traitement par siRNA ciblant p53 afin de diminuer l'expression des p53 mutantes dans les cellules Bla2, MDA-MB231 et 1001 a été analysée par western blot. Une expérience représentative est représentée ainsi que le ratio p53/actine normalisé (B-C) Le pourcentage de cellules PD-L1+ (B) et la moyenne d'intensité de fluorescence (MFI) (C), mesurés par cytométrie en flux à partir de trois expériences indépendantes, sont indiqués. Les p-values ont été déterminées par un test de Student.

Ces résultats suggèrent que l'expression des mutants de p53 testés est associée à une forte expression de PD-L1 et que l'inhibition de l'expression du mutant de p53 exprimé par les cellules tumorales étudiées induit une diminution significative de leur expression de PD-L1, aussi bien au niveau ARNm que protéique.

L'expression des mutants p53<sup>R175H</sup>, p53<sup>R248W</sup>, p53<sup>R249S</sup> et p53<sup>R273H</sup> dans des cellules tumorales p53<sup>NULL</sup> augmente leur expression de PD-L1

Afin de valider que les protéines p53 mutées ont la capacité d'induire l'expression de PD-L1, nous avons étudié l'effet de la ré-expression de certains mutants de p53 dans la lignée tumorale de poumon H1299 p53<sup>NULL</sup>. Pour cela, nous avons transfecté les cellules H1299 avec des vecteurs plasmidiques codant pour les « hotspots » de mutation suivants : p53<sup>R175H</sup>, p53<sup>R248W</sup>, p53<sup>R249S</sup> et p53<sup>R273H</sup> (Figure 4A). Le pourcentage de cellules transfectées par ces différents mutants de p53 a été mesuré par cytométrie en flux et évalué à environ 50% en moyenne (Figure 4B, C). Comme décrit dans la littérature, ces mutations de p53 sont associées avec une accumulation, dans les cellules H1299 transfectées, d'une p53 inactive transcriptionnellement, comme le montre leur incapacité à induire l'expression de leur gène cible p21 après  $\gamma$ -irradiation (Figure 4D).

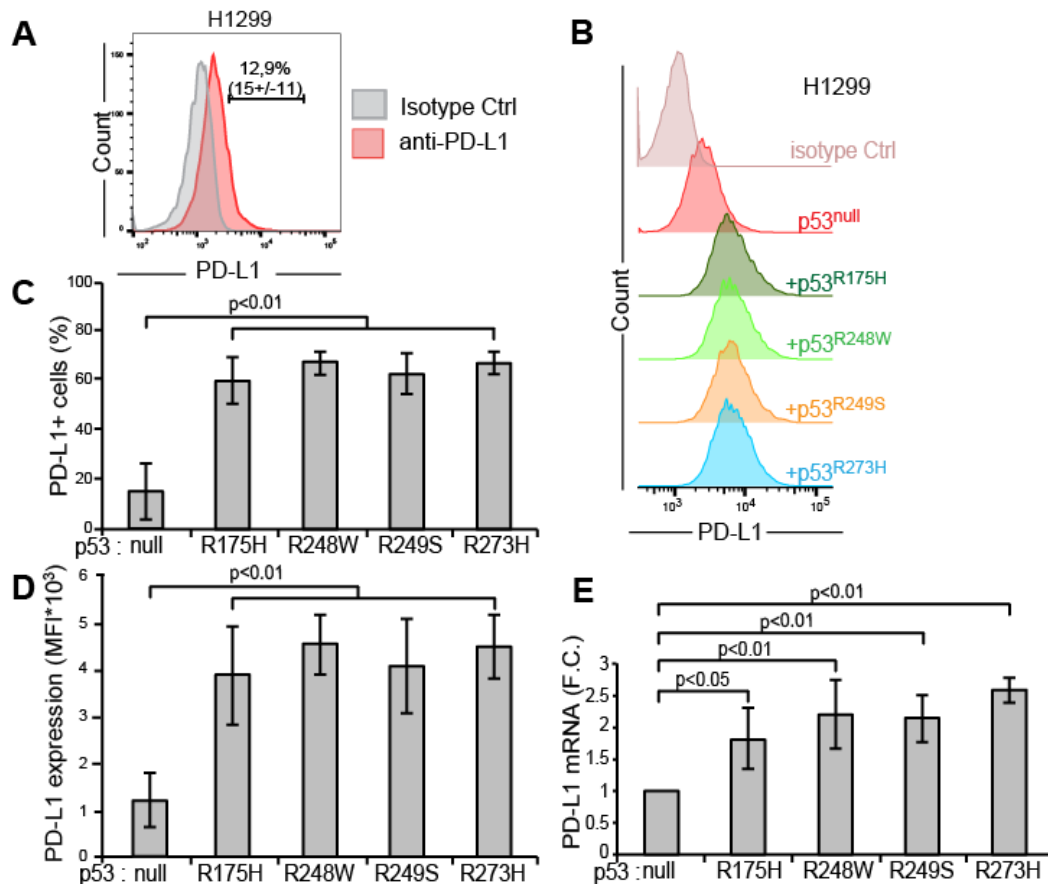


**Figure 4 : Transfection des cellules H1299 (p53<sup>null</sup>) par des vecteurs plasmidiques codant pour les mutants p53<sup>R175H</sup>, p53<sup>R248W</sup>, p53<sup>R249S</sup> et p53<sup>R273H</sup>.**

(A-C) L'efficacité de la transfection des cellules H1299 par des vecteurs codant pour les mutants p53<sup>R175H</sup>, p53<sup>R248W</sup>, p53<sup>R249S</sup> et p53<sup>R273H</sup> a été évaluée par western blot (A), ou par cytométrie en flux (B, C). Une expérience représentative est représentée pour chaque condition (B). La moyenne de trois expériences indépendantes +/- écart-types du pourcentage de cellules exprimant p53 par rapport au contrôle isotypique est indiquée (C). (D) Les p53 mutantes exprimées dans les H1299 sont transcriptionnellement inactives. L'expression de p53 et sa cible p21 ont été mesurées par western blot dans chaque clone avant et après irradiation  $\gamma$  (5 Gy). Un contrôle positif a été réalisé à partir de cellules MCF7 (p53<sup>WT</sup>).



De manière importante, alors que les cellules H1299 non transfectées n'expriment que faiblement PD-L1 à leur surface (Figure 5A), l'expression des mutants p53<sup>R175H</sup>, p53<sup>R248W</sup>, p53<sup>R249S</sup> et p53<sup>R273H</sup> augmente très fortement l'expression de PD-L1 à la membrane (Figure 5B-D). De plus, l'expression de ces mutants dans les cellules H1299 est également associée à une augmentation du niveau d'expression de l'ARNm de PD-L1 (Figure 5E).



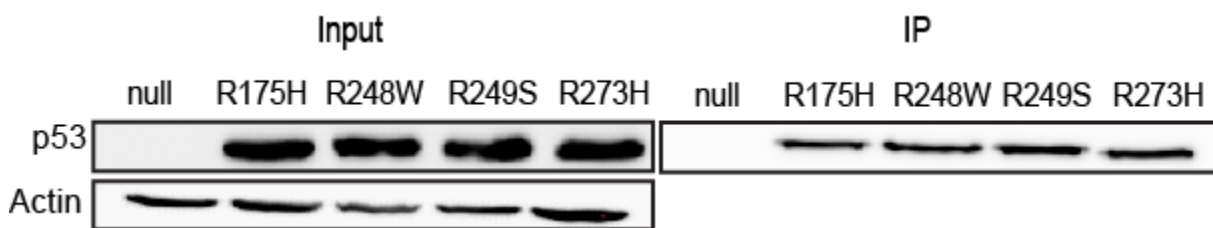
**Figure 5 : L'expression des mutants p53<sup>R175H</sup>, p53<sup>R248W</sup>, p53<sup>R249S</sup> et p53<sup>R273H</sup> dans les cellules tumorales H1299 (p53<sup>NULL</sup>) augmente leur expression de PD-L1**

(A) Les cellules H1299 expriment faiblement PD-L1 à leur surface. Une expérience représentative est représentée. Le pourcentage de cellules exprimant PD-L1 par rapport au contrôle isotypique pour l'expérience représentée est indiqué ainsi que la moyenne de trois expériences indépendantes +/- écart-types. (B-D) L'expression de PD-L1 a été mesurée par cytométrie en flux après transfection des cellules H1299 par des vecteurs codant les mutants p53<sup>R175H</sup>, p53<sup>R248W</sup>, p53<sup>R249S</sup> et p53<sup>R273H</sup>. Des histogrammes représentatifs de cytométrie en flux sont indiqués (B) ainsi que la moyenne +/- écart-types pour trois expériences indépendantes quantifiant le pourcentage de cellules PD-L1+ (C) ou l'intensité moyenne de fluorescence de PD-L1 (D). (E) L'expression des p53 mutants module le niveau d'expression de l'ARNm de PD-L1, mesurée par RT-qPCR dans les cellules H1299 transfectées. Les résultats présentés sont les moyennes +/- écart-types des trois expériences réalisées normalisées par rapport aux H1299 non transfectées. Les p-values ont été déterminées par un test de Student.

Ces résultats valident donc que l'expression de certains mutants de p53, pourtant inactifs transcriptionnellement, favorisent l'expression de PD-L1 et suggèrent également que les mécanismes permettant aux mutants de stimuler l'expression de PD-L1 pourraient agir sur la transcription de PD-L1 ou sur une autre étape permettant son expression protéique à la membrane.

## Etude de l'interactome des mutants p53<sup>R175H</sup>, p53<sup>R248W</sup>, p53<sup>R249S</sup> et p53<sup>R273H</sup> par spectrométrie de masse

Compte tenu des résultats obtenus et du fait que des mutants de p53 transcriptionnellement inactifs sont capables de réguler l'expression de PD-L1, nous avons émis l'hypothèse qu'un gain de fonction (GOF) de ces mutants pourrait expliquer l'effet observé. Etant donné que le GOF des mutant de p53 est essentiellement dépendant de son interaction avec d'autres protéines, et afin de déterminer les mécanismes expliquant l'influence de ces mutants sur l'expression de PD-L1, nous avons évalué leur interactome. Pour ce faire, nous avons utilisé les cellules H1299 transfectées par les mutants p53<sup>R175H</sup>, p53<sup>R248W</sup>, p53<sup>R249S</sup> et p53<sup>R273H</sup>. Ces protéines mutantes ont ensuite été immunoprécipitées (Figure 6), puis leur interactome analysé par spectrométrie de masse (grâce à la plateforme de protéomique structurale et fonctionnelle de l'Institut Jacques Monod). Nous avons également utilisé comme contrôle des cellules H1299 non transfectées, ce qui a permis de prendre en compte les protéines se fixant de façon non spécifique à l'anticorps anti-p53 ou aux billes d'agarose utilisées pour l'immunoprécipitation.



**Figure 6 : Immunoprécipitation des mutants p53<sup>R175H</sup>, p53<sup>R248W</sup>, p53<sup>R249S</sup> et p53<sup>R273H</sup> exprimés dans les cellules tumorales H1299**

L'efficacité de l'immunoprécipitation (IP) des p53 exprimées dans les cellules H1299 (p53<sup>null</sup>) transfectées par des vecteurs plasmidiques codant pour les mutants p53<sup>R175H</sup>, p53<sup>R248W</sup>, p53<sup>R249S</sup> et p53<sup>R273H</sup> a été analysée par western blot.

Les résultats obtenus ont permis d'identifier 651 protéines interagissant avec les différents mutants de p53 utilisés (résultats non présentés). A partir de ces résultats, une analyse préliminaire grâce à l'outil DAVID nous a permis de mettre en évidence que de nombreuses protéines identifiées étaient impliquées dans la biologie des ARNm (processing, épissage, stabilisation, transport...) ou des microARN, la traduction, la formation des ribosomes ou l'assemblage des granules de stress (résultats non présentés). A partir de ces observations, nous avons sélectionné les protéines significativement présentes dans les échantillons provenant des cellules H1299 transfectées par les mutants p53<sup>R175H</sup>, p53<sup>R248W</sup>, p53<sup>R249S</sup> et p53<sup>R273H</sup> (score mascot supérieur à 40) et présentant un score mascot moyen au minimum deux fois supérieurs à celui du contrôle (Figure 7). Parmi les protéines identifiées lors de cette analyse, qui reste toutefois très préliminaire, nous nous sommes par la suite focalisés sur Alyref et la Nucléoline (NCL).

Protein	Score Mascot					mean score	Pathways
	Ctrl	p53 <sup>R175H</sup>	p53 <sup>R248W</sup>	p53 <sup>R249S</sup>	p53 <sup>R273H</sup>		
<b>TP53</b>	1	115	43	42	36	59	
EIF2S3	17	47	79	55	41	55,5	translation factor
<b>NCL</b>	41	286	197	65	299	211,75	RNA processing
PCBP2	26	133	137	48	59	94,25	RNA Processing
G3BP1	36	166	91	115	73	111,25	Stress granules assembly
CIRBP	87	204	176	189	137	176,5	Stress granules assembly
<b>ALYREF</b>	1	220	164	180	99	165,75	Spliceosome; RNA transport
HSPA1	18	100	48	60	101	77,25	Spliceosome
IGF2BP1	1	36	77	91	155	89,75	MicroRNAs in cancer
RPL11	1	89	86	68	77	80	Ribosome

**Figure 7 : Liste non exhaustive des protéines interagissant avec les mutants p53<sup>R175H</sup>, p53<sup>R248W</sup>, p53<sup>R249S</sup> et p53<sup>R273H</sup>**

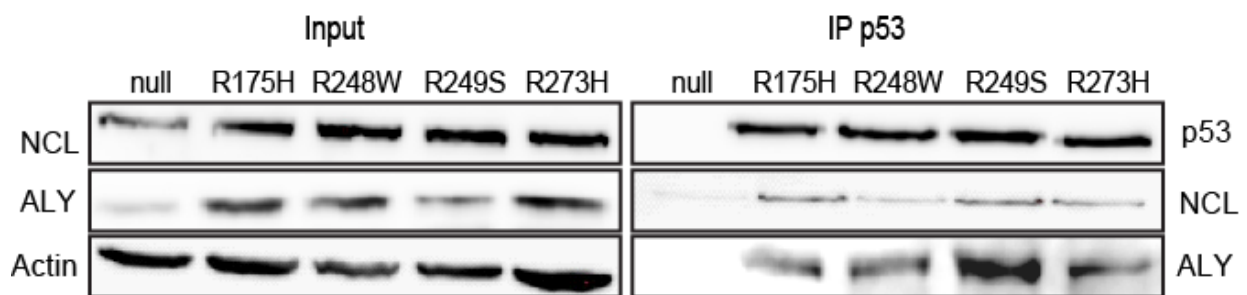
Des échantillons d'immunoprécipitation des mutants p53<sup>R175H</sup>, p53<sup>R248W</sup>, p53<sup>R249S</sup> et p53<sup>R273H</sup> exprimés dans les H1299 ont été analysés par spectrométrie de masse. A chaque protéine détectée dans l'échantillon est attribué un score mascot correspondant à  $-10 \log(p\text{-value de la probabilité de présence de la protéine dans l'échantillon})$ . Un échantillon représentatif des protéines possédant un score mascot supérieur à 40 et présentant un score mascot moyen au minimum deux fois supérieurs à celui du contrôle est représenté.

Alyref (ALY; THO complex subunit 4, Tho4; RNA and export factor binding protein 1, Rfbp1) est une protéine nucléaire pouvant se lier aux ARNm grâce à un motif de reconnaissance spécifique. Cette protéine est impliquée dans la formation des complexes TREX (TRanscription-EXport), en interaction avec l'hélicase UAP56 et le sous complexe THO, et favorise l'export d'ARNm, ayant subi ou non une étape d'épissage, vers le cytoplasme (Cheng et al., 2006) (Luo et al., 2001). La nucléoline (NCL) est une protéine multi fonctionnelle impliquée dans la transcription, la traduction, la réplication, la recombinaison et la réparation de l'ADN (Mongelard and Bouvet, 2007). Cette protéine non ribosomale, la plus abondante dans le noyau, affecte la synthèse d'ARN ribosomal, leur traitement et leur transport (Ginisty et al., 1999). De manière importante, il a aussi été montré qu'en réponse à un stress, la nucléoline peut se fixer aux ARNm (possédant typiquement des éléments AU-rich et/ou G-rich) et selon les cas les stabiliser, promouvoir leur dégradation (Yang et al., 2002) (Zhang et al., 2008) ou réguler positivement ou négativement leur traduction (Fähling et al., 2006) (Abdelmohsen and Gorospe, 2012).

Ainsi, nous avons émis l'hypothèse que l'interaction des mutants de p53 utilisés avec la Nucléoline et/ou Alyref pourrait éventuellement être impliquée dans la modulation de l'expression de PD-L1, par exemple en contrôlant l'export, la stabilité et/ou la traduction de l'ARNm de PD-L1. Nous avons donc vérifié dans un premier temps que ALY et NCL interagissent bien avec les mutants p53<sup>R175H</sup>, p53<sup>R248W</sup>, p53<sup>R249S</sup> et p53<sup>R273H</sup>. Après immunoprécipitation de p53 à partir des cel-

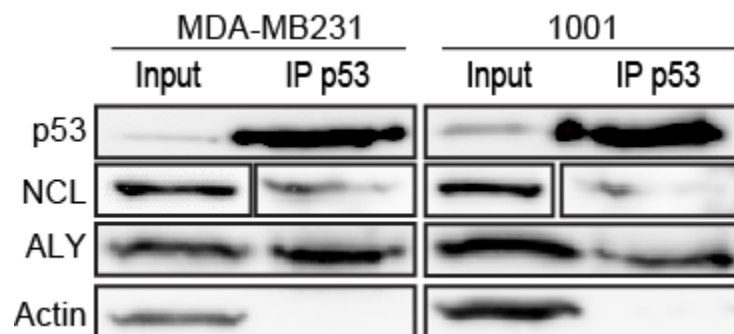
lules H1299 transfectées avec les différents mutants p53<sup>R175H</sup>, p53<sup>R248W</sup>, p53<sup>R249S</sup> et p53<sup>R273H</sup>, un western blot pour la NCL et ALY a été réalisé (Figure 8). Les résultats très préliminaires obtenus montrent que NCL et ALY interagissent effectivement avec les mutants p53<sup>R175H</sup>, p53<sup>R248W</sup>, p53<sup>R249S</sup> et p53<sup>R273H</sup>. Des résultats préliminaires similaires ont été obtenus avec les lignées MDA-MB231 et 1001 (p53<sup>R280K</sup>) (Figure 9).

L'ensemble de ces résultats suggèrent donc que les mutants de p53 testés interagissent bien avec les protéines ALY et NCL, ce qui pourrait modifier leur capacité éventuelle à réguler l'export, la stabilité et/ou la traduction de l'ARNm de PD-L1.



**Figure 8 : Les protéines Alyref et Nucléoline interagissent avec les mutants p53<sup>R175H</sup>, p53<sup>R248W</sup>, p53<sup>R249S</sup> et p53<sup>R273H</sup> exprimés dans les cellules tumorales H1299.**

La présence des protéines Alyref (ALY), Nucléoline (NCL) et p53 dans les échantillons d'immunoprécipitation (IP) de p53 obtenus à partir de cellules H1299 (p53<sup>null</sup>) transfectées par des vecteurs plasmidiques codant pour les mutants p53<sup>R175H</sup>, p53<sup>R248W</sup>, p53<sup>R249S</sup> et p53<sup>R273H</sup>, a été analysée par western blot.

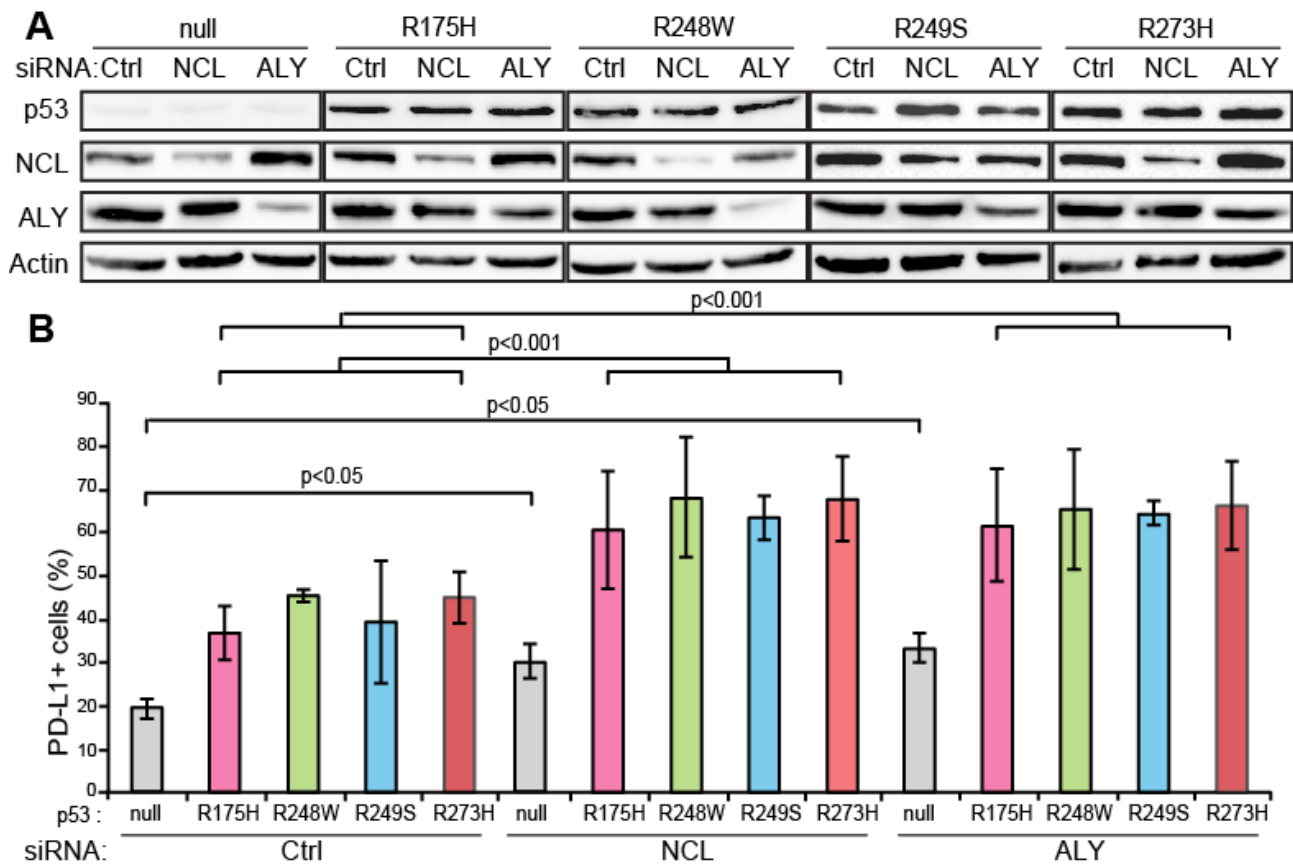


**Figure 9 : Les protéines Alyref et Nucléoline interagissent avec le mutant p53<sup>R280K</sup> exprimé dans les cellules tumorales MDA-MB213 et 1001.**

La présence des protéines Alyref (ALY), Nucléoline (NCL) et p53 dans les échantillons d'immunoprécipitation (IP) de p53 obtenus à partir de cellules MDA-MB213 et 1001, a été analysée par western blot.

### L'inhibition de la Nucléoline et d'Alyref augmente l'expression de PD-L1 de la même façon que la ré-expression de certains mutants de p53

Afin d'établir le rôle de l'interaction p53<sup>mut</sup>/ALY ou p53<sup>mut</sup>/NCL sur l'expression de PD-L1, nous avons dans un premier temps déterminé si l'inhibition de l'expression de NCL et ALY module l'expression de PD-L1. Pour ce faire, nous avons utilisé des siRNA ciblant ces deux protéines qui ont été transfectées dans les cellules H1299 exprimant ou non les mutants p53<sup>R175H</sup>, p53<sup>R248W</sup>, p53<sup>R249S</sup> et p53<sup>R273H</sup>. Les résultats préliminaires obtenus suggèrent que dans les cellules H1299, indépendamment de l'expression des mutants de p53, l'inhibition partielle de ALY ou de NCL, évaluée à environ 65% par western blot (66% ± 14% pour NCL, 67% ± 24% pour ALY) (Figure 10A), induit une augmentation de l'expression de PD-L1, de l'ordre de 20% (22% ± 8% pour NCL, 23% ± 10% pour ALY) par rapport à la condition contrôle (Figure 10B). Ainsi, il semble que NCL, comme ALY, modulent négativement l'expression de PD-L1 dans les cellules H1299 de façon indépendante de p53. De manière importante, nous avons observé que l'inhibition de NCL ou ALY concomitante à l'expression des mutants de p53 exerce un effet cumulatif sur l'augmentation de l'expression de PD-L1 (Figure 10B). Ainsi, l'ensemble de ces résultats suggèrent que l'inhibition de ALY ou NCL exerce le même effet que l'expression des mutants de p53 sur l'expression de PD-L1, ce qui suggèrent que l'interaction p53<sup>mut</sup>/ALY ou NCL pourrait inhiber l'activité négative de ALY ou NCL sur l'expression de PD-L1.



**Figure 10 : L'inhibition de Alyref et Nucléoline, tout comme la ré-expression des mutants p53<sup>R175H</sup>, p53<sup>R248W</sup>, p53<sup>R249S</sup> et p53<sup>R273H</sup>, augmente l'expression de PD-L1 dans les cellules tumorales H1299.**

(A) L'efficacité du traitement par siRNA anti-NCL ou anti-ALY dans les cellules H1299 exprimant les différents mutants de p53 étudiés a été évaluée par western blot. (B) L'expression de PD-L1 a été mesurée par cytométrie en flux 48h post-transfection des cellules H1299 ( $\pm$  mutants de p53) par des siRNA contrôle, anti-ALY ou anti-NCL. Le pourcentage moyen de cellules PD-L1+ ( $\pm$  SD) de deux expériences indépendantes, est indiqué. Les p-values ont été déterminées par un test de Student.

## Conclusion

Au cours de ce travail, nous avons étudié l'impact de certains mutants de p53 sur l'expression du ligand de checkpoint immunitaire PD-L1 en utilisant différentes lignées cancéreuses pulmonaires et mammaires. Nous avons montré que l'inhibition à l'aide de siRNA de l'expression des mutants p53<sup>R280I</sup>, p53<sup>R280K</sup>, p53<sup>R273H</sup>, p53<sup>R249S</sup> et p53<sup>K132Q</sup>, réduit fortement l'expression de PD-L1 par les cellules exprimant ces mutants. Néanmoins, il serait utile de valider ces résultats en utilisant un panel plus important de lignées cancéreuses provenant d'autres types tissulaires et exprimant d'autres mutations de p53.

De plus, il est à noter que l'expression des différents mutants de p53 n'a pas été totalement inhibée dans nos expériences. Nous envisageons ainsi de valider si l'inhibition totale de l'expression des différents mutants de p53, en optimisant les transfections de siRNA ou en utilisant des shRNA, permet d'inhiber totalement l'expression de PD-L1, ceci dans le but de déterminer si la forte expression constitutive de PD-L1 dans nos lignées cellulaires est exclusivement due aux mutants de p53 ou non.

Nous avons également validé que l'expression ectopique de différents « hotspots » de mutation de p53, codant pour des protéines transcriptionnellement inactives (p53<sup>R175H</sup>, p53<sup>K132Q</sup>, p53<sup>R248W</sup>, p53<sup>R249S</sup> et p53<sup>R273H</sup>), au sein de cellules tumorales p53<sup>NULL</sup>, induit une augmentation de leur expression de PD-L1. Cependant, il est important de noter que seule 50% des cellules transfectées expriment les mutants de p53 utilisés, ce qui réduit sûrement l'effet observé sur l'expression de PD-L1. Nous envisageons donc d'établir des clones de H1299 exprimant les différents mutants de p53 utilisés de manière stable afin entre autres de déterminer si ces clones expriment plus de PD-L1 que lors des transfections transitoires. En parallèle, il serait aussi intéressant de vérifier, en transfectant les cellules H1299 avec une quantité graduelle de plasmide codant pour p53<sup>mut</sup>, si l'on observe bien une corrélation entre le taux d'expression de p53<sup>mut</sup> et celui de PD-L1.

Compte tenu de nos résultats, nous avons émis l'hypothèse que ces mutants de p53 pourraient réguler positivement l'expression de PD-L1 grâce à un ou plusieurs mécanismes de gain de fonction. Afin de valider cette hypothèse, nous avons étudié l'interactome des p53 mutées par spectrométrie de masse. Grâce à cette analyse, nous avons pu identifier différentes protéines cibles interagissant avec les mutants de p53 utilisés et pouvant potentiellement intervenir dans la modulation de l'expression de PD-L1 telles que les protéines NCL et ALY qui sont impliquées dans la stabilisation, l'épissage et le transport des ARNm. Nous avons validé que ces deux protéines interagissaient bien avec les mutants de p53 par immunoprécipitation. De plus, nos résultats, encore préliminaires, semblent montrer que NCL et ALY, sont potentiellement des régulateurs négatifs de l'expression de PD-L1 dans les cellules H1299 indépendamment de p53. De manière intéressante,

nous avons également montré que l'inhibition de ces deux protéines en parallèle avec l'expression ectopique de p53<sup>mut</sup> exerçait un effet cumulatif sur l'expression de PD-L1. De plus, il est important de noter que le taux de cellules H1299 transfectées exprimant les différents mutants de p53 n'est que de 60% et que les siRNA utilisés n'inhibent les expressions de NCL et ALY qu'à 65%, ce qui pourrait minimiser l'effet observé. Il sera donc important à l'avenir d'optimiser ces différentes transfections afin d'obtenir des résultats plus probants.

Cependant, nos résultats actuels suggèrent que certains mutants de p53 interagissent avec NCL et ALY, ce qui inhiberait leur activité et empêcherait ces deux protéines d'inhiber l'expression de PD-L1, probablement au niveau ARNm. Pour vérifier cette hypothèse, nous envisageons dans un premier temps d'immunoprécipiter NCL et ALY dans nos échantillons de cellules H1299 exprimant ou non les différents mutants de p53 et de quantifier par RT-qPCR la présence d'ARNm de PD-L1, ce qui validerait que ALY et NCL interagissent bien avec l'ARNm de PD-L1. De plus, il serait intéressant de déterminer si l'inhibition simultanée de ALY et NCL par siRNA augmente l'expression de PD-L1 de façon cumulative ou non.

En conclusion, nos travaux en cours semblent montrer que l'expression de mutants de p53 favorise l'expression de PD-L1 en interagissant avec deux régulateurs négatifs de PD-L1, NCL et ALY. Cependant, ces résultats restent très préliminaires, à valider de manière plus formelle, et d'autres protéines sont sûrement impliquées dans le contrôle de l'expression de PD-L1 par p53<sup>mut</sup>. De plus, l'approfondissement de ces travaux pourrait permettre, d'un point de vue fondamental, de mieux comprendre comment l'expression de PD-L1 est régulée et d'autre part d'améliorer les approches d'immunothérapies ciblant PD-L1 en agissant sur les mutants de p53 qui sont une cible thérapeutique intéressante.



## DISCUSSION

Du fait du manque d'efficacité relative des thérapies anti-cancéreuses conventionnelles, il est urgent de développer de nouvelles approches thérapeutiques antitumorales. Durant cette dernière décennie, l'immunothérapie est en plein essor grâce aux succès prometteurs de différentes approches telles que le transfert de cellules CAR-T capables de mieux reconnaître les cellules tumorales de façon spécifique ou l'injection d'anticorps monoclonaux, seule ou en combinaison, inhibant les checkpoints immunitaires, comme PD-1, ou leurs ligands, comme PD-L1. Cette approche thérapeutique visant les checkpoints immunitaires est la plus utilisée et la plus efficace, pouvant être appliquée dans de nombreux types de cancers. Cependant, cette approche présente des limites, certaines tumeurs résistent au traitement et continuent de croître. En effet, les cellules tumorales peuvent développer des mécanismes de résistance qui sont d'ailleurs sélectionnés et favorisés par la destruction par les effecteurs cytotoxiques des cellules cibles les plus reconnaissables et les moins résistantes. La résistance à la lyse par les lymphocytes cytotoxiques et la surexpression de ligands de checkpoints immunitaires sont deux des principaux mécanismes d'échappement au système immunitaire. Mieux connaître les mécanismes moléculaires altérant la voie PFN/GzmB, la principale voie apoptotique utilisée par les CTL/NK pour détruire leurs cellules cibles, et ceux impliqués dans le contrôle de l'expression des ligands de checkpoints immunitaires constitue à la fois un intérêt fondamental mais aussi un élément essentiel pour lutter contre les mécanismes de résistance aux CTL/NK par de nouvelles thérapies.

L'instabilité génétique, caractérisée par l'apparition de mutations, de gain ou de perte de fractions du génome des cellules cancéreuses, favorise ces mécanismes de résistance et contribue souvent au développement tumoral. C'est particulièrement le cas lorsque les mutations ont lieu sur le gène codant pour la protéine suppresseur de tumeur p53, ce qui arrive dans plus de la moitié des cancers humains. En effet, les fonctions antitumorales de p53, comme l'arrêt du cycle cellulaire, la réparation des dommages à l'ADN, l'apoptose et l'autophagie, sont connues et étudiées depuis plusieurs décennies. Mais son rôle dans le contrôle de la tumeur par le système immunitaire et l'échappement tumoral au système immunitaire, en particulier lorsque cette protéine est mutée, est encore mal connu, même si quelques études ont déjà mise en évidence certaines fonctions immunologiques de p53<sup>WT</sup>. De plus, cibler p53 lorsqu'elle est dysfonctionnelle pourrait se révéler bénéfique pour certaines approches d'immunothérapie, à condition que le lien entre les mutations de p53, son ciblage pharmacologique, et la réponse immunitaire antitumorale soit clarifié. Dans ce contexte, la finalité de mes travaux de thèse a été de déterminer si la réactivation pharmacologique de p53 peut lever les résistances des cellules cancéreuses p53 mutées à la lyse par les effecteurs cytotoxiques et si les mutations de p53 sont impliquées dans l'immunosuppression des CTL/NK par l'expression de PD-L1.

Comme décrit dans la première partie des résultats, nous avons démontré que la réactivation pharmacologique de la fonction WT de p53 dans des cellules cancéreuses du sein p53 mutées en utilisant la molécule CP-31398 augmente leur sensibilité à la lyse induite par les cellules NK. Même si CP-31398 peut induire l'apoptose par lui-même (entre 10-20% des cellules dans notre modèle), cette molécule sensibilise aussi les cellules au granzyme B, un puissant inducteur de l'apoptose, de façon dépendante de la réactivation de l'activité transcriptionnelle de p53. En effet, bien que CP-31398 possède une activité indépendante de p53 (Foster et al., 1999) (Rippin et al., 2002) (Wischhusen et al., 2003), c'est bien la réactivation de p53 par CP-31398 qui sensibilise les cellules tumorales à la lyse par les cellules NK puisque la déplétion des mutants de p53 par siRNA ou l'inhibition de l'activité transcriptionnelle de p53 « réactivée », par la PFT- $\alpha$ , bloque l'effet de CP-31398 sur l'induction de p21 et sur la lyse induite par les cellules NK dans notre modèle.

De plus, nous avons démontré que le traitement CP-31398 induit de façon dépendante de p53 l'expression de Sestrine-1 et Sestrine-2, deux cibles de p53 (Budanov and Karin, 2008), qui favorise la phosphorylation de AMPK et engendre l'inhibition de mTOR par déphosphorylation. En parallèle, nous avons observé que CP-31398 augmente fortement l'expression de ULK1 de manière dépendante de p53. Ainsi, l'inhibition de l'activité de mTOR par CP-31398 et l'augmentation de la disponibilité en ULK1 engendrent la formation d'autophagosomes dans les cellules traitées par CP-31398, ce qui est appuyé par l'effet inhibiteur de siRNA anti-AMPK sur l'induction de la formation d'autophagosomes dépendante de CP-31398. De manière intéressante, nous avons aussi observé une augmentation du niveau d'expression des protéines ATG101, ATG13 et FIP200 après la réactivation de p53, même si celle-ci est moindre que celle de ULK1. ATG101, ATG13 et FIP200 sont des composants clés du complexe ULK et jouent un rôle crucial dans l'initiation de l'autophagie, mais ne sont pas décrites comme des cibles directes de p53. Le mécanisme par lequel CP-31398 régule l'expression de ces protéines et leur importance dans l'autophagie induite par CP-31398 sont donc inconnus. On peut néanmoins supposer que cette légère hausse de l'expression de ATG101, ATG13 et FIP200 est induite soit de façon indirecte par p53, soit de façon directe. Afin de valider cette dernière hypothèse, il serait nécessaire de valider ou non la présence d'éléments de réponse à p53 dans les promoteurs des gènes correspondants.

L'étude transcriptomique des cellules MDA-MB231 traitées par CP-31398 a également révélé une augmentation de l'expression des gènes tels que *ATG12*, *ATG5*, *GABARAPL2*, codant pour des protéines essentielles à l'élongation et à la maturation des autophagosomes, mais aussi DRAM-1, une cible directe de p53 impliquée à la fois dans l'autophagie et dans l'apoptose induite par p53 (Crighton et al., 2006). La surexpression de cette protéine DRAM-1 pourrait être, dans une moindre mesure, impliquée dans l'induction de l'autophagie par CP-31398. Il est aussi possible que

certaines des effets de CP-31398 observés sur le transcriptome des cellules traitées soit indépendants de la réactivation transcriptionnelle de p53. Cependant, l'induction de l'autophagie par CP-31398 est principalement dépendante de p53 puisque l'inhibition de l'expression de p53 mutée par siRNA ou de son activité transcriptionnelle par la PFT- $\alpha$  bloque l'induction de LC3-II et la formation d'autophagosomes dans les cellules traitées par CP-31398. A noter qu'une autre étude a déjà montrée que CP-31398 pouvait activer l'autophagie dans des cellules de tumeurs pancréatiques p53<sup>WT</sup>. Cependant, seule une faible augmentation de LC3-II en réponse à CP-31398 a été observée dans les cellules MCF7 p53<sup>WT</sup> comparée aux MDA-MB213, ce qui semble insuffisant pour sensibiliser ces cellules MCF7 à la lyse par les cellules NK. Ces résultats suggèrent que l'induction de l'autophagie par CP-31398 a principalement lieu dans les cellules p53 mutées. De plus, même si plusieurs études ont montré que CP-31398 pouvait induire un stress oxydatif (Arihara et al., 2017) (Xu et al., 2010), qui pourrait déclencher un processus d'autophagie (Filomeni et al., 2015) (Li et al., 2015), nous n'avons observé aucune génération de ROS après traitement par CP-31398 dans notre modèle.

De manière importante, nos travaux démontrent clairement que l'induction de l'autophagie générée par CP-31398 dans les cellules cancéreuses du sein est principalement responsable de la hausse de sensibilité des cellules traitées à la lyse par le GzmB et les cellules NK. Cette hausse de sensibilité à l'apoptose est liée à la séquestration, sans dégradation, de protéines anti-apoptotiques dans les autophagosomes formés par la réactivation de p53 par CP-31398, et est associée avec une augmentation de la MOMP et du clivage des caspases-3 en réponse au GzmB et aux cellules NK. En effet, nous avons observé que Bcl-xL et XIAP sont presque complètement internalisées dans les autophagosomes après traitement par CP-31398. De plus, Bcl-2, cIAP-1 et la survivine sont également internalisées dans les autophagosomes induits par CP-31398, mais à un niveau moindre. Par contre cIAP-2, Mcl-1 et la protéine pro-apoptotique Bax ne sont pas du tout internalisées dans les autophagosomes. Cette autophagie sélective induite par CP-31398 semble indépendante des protéines cargo p62 et NBR1, impliquées dans plusieurs voies d'autophagie sélective (Stolz et al., 2014). Ainsi, les mécanismes par lesquels l'autophagie induite par la réactivation de p53 par CP-31398 internalise de façon sélective certaines protéines anti-apoptotiques demeurent inconnus. Il est néanmoins possible que cette internalisation fasse intervenir d'autres protéines cargos impliquées dans l'autophagie sélective de protéines, par exemple OPTN, TOLLIP (Khaminets et al., 2016), NDP52 ou BNIP3 (Zaffagnini and Martens, 2016). Cette hypothèse pourrait être vérifiée, comme pour p62 et NBR1, en déterminant si ces protéines interagissent avec Bcl-XL, XIAP et LC3-II par immunoprécipitation après traitement par CP-31398.

Cependant, quel que soit le mécanisme mis en jeu, nous pensons que cette internalisation des protéines anti-apoptotiques dans les autophagosomes de façon dépendante de p53 pourrait être

un mécanisme important dans la régulation de l'apoptose induite par p53. En effet, de nombreux stimuli qui déclenchent la mort cellulaire déclenchent aussi l'autophagie, qui se manifeste souvent bien avant l'apoptose (Mariño et al., 2014). Dans notre cas, nous pensons que la simple séquestration des protéines anti-apoptotiques Bcl-xL et XIAP empêche leur interaction inhibitrice avec des cibles pro-apoptotiques, et pourrait faciliter l'apoptose dépendante de p53 par la voie mitochondriale et l'apoptose induite par d'autres stimuli externes comme les cellules NK. D'ailleurs, le traitement par CP-31398 n'augmente pas l'apoptose induite par le granzyme A, dont l'induction de la mort cellulaire repose sur la production de ROS par les mitochondries et le complexe SET et pas sur la MOMP et l'activation des caspases. Cela montre bien que l'effet de potentialisation de la lyse de CP-31398 passe par la séquestration de protéines anti-apoptotiques impliquées dans la régulation négative de la MOMP et du clivage des caspases. D'autre part, il est probable que CP-31398 augmente la lyse induite par les CTL des cellules tumorales p53 mutées puisque les CTL et les NK utilisent la voie PFN/GzmB pour détruire leurs cellules cibles.

Nous avons aussi montré que l'autophagie induite par CP-31398 était bloquée et que le processus de fusion autophagosomes-lysosomes était dysfonctionnel, expliquant l'absence de dégradation des protéines anti-apoptotiques internalisées. Des études précédentes ont montré que la fusion d'autophagosomes avec les lysosomes nécessitait une machinerie de fusion constituée de Rab GTPases et de SNAREs (N-Ethylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein Receptors), telles que les syntaxines (Zhao and Zhang, 2019). Les syntaxines appartiennent à une famille de protéines membranaires appelées « SNAREs » impliquées dans l'exocytose, l'endocytose, l'autophagie et le trafic de membrane au sein de la cellule (Chen et al., 2010) (Teng et al., 2001). Il a été notamment montré récemment que les syntaxines 16 et 17, étaient essentielles à la fusion autophagosomes/lysosomes (Tang, 2019) (Itakura et al., 2012). Dans ce cadre, et de manière intéressante, nos résultats de transcriptomique indiquent que l'expression de plusieurs syntaxines était diminuée après traitement par CP-31398, notamment les syntaxines 2, 7, 8 et 10. Même si aucune étude n'a montré l'implication de ces syntaxines dans le processus autophagique, il n'est pas impossible qu'elles y participent. Pour valider cette hypothèse, il serait par exemple intéressant de déterminer si la sur-expression de ces syntaxines « débloquent » la dernière étape de l'autophagie induite par CP-31398 en rétablissant la fusion autophagosomes/lysosomes. De manière similaire, nos résultats de transcriptomique indiquent qu'après traitement par CP-31398, l'expression de CLN6 est diminuée. CLN6 est une protéine endoplasmique et malgré sa localisation contribue à la fonction des lysosomes par un mécanisme inconnu. De plus, les mutations ou déficiences de CLN6 sont associées à des perturbations des fonctions lysosomales et de la voie de dégradation par l'autophagie (Thelen et al., 2012). Ainsi, le blocage de l'autophagie induit par CP-31398 pourrait résulter de plusieurs altérations de la machinerie de fusion autophagosomes-lysosomes impliquant

les syntaxines et CLN6. Ce point pourrait être clarifié en vérifiant si l'autophagie induite par CP-31398 n'est plus bloquée lorsqu'on ré-exprime CLN6 dans les cellules traitées. A noter que le blocage de l'autophagie par la chloroquine n'entraîne ni la séquestration de Bcl-xL et de XIAP dans les autophagosomes, ni la potentialisation des cellules cibles à la lyse NK. Ainsi le simple blocage de l'autophagie par CP-31398 ne peut expliquer en lui-même son effet sur la sensibilité des cellules cibles à la lyse NK.

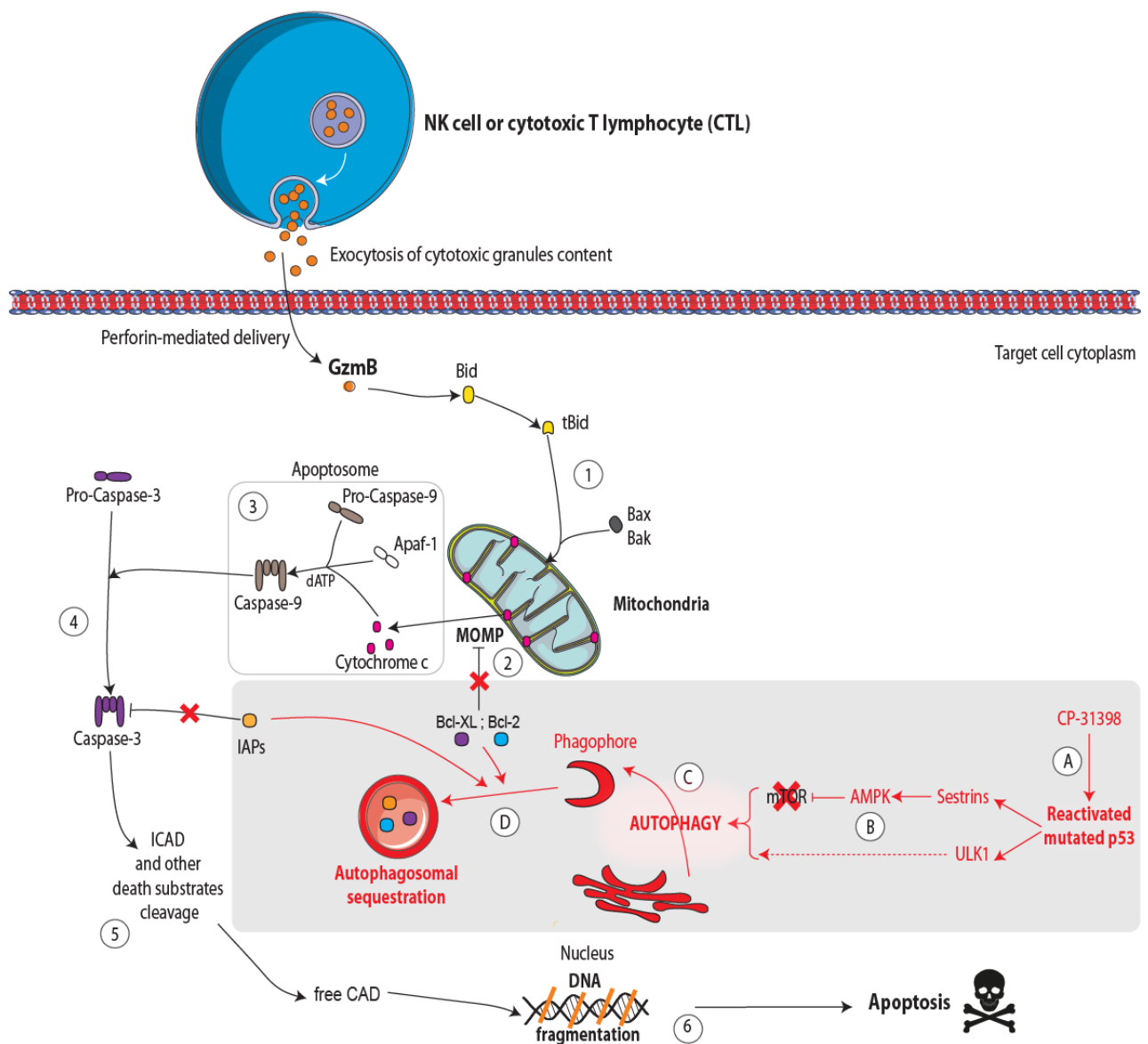
De plus, il est important de noter que plusieurs études ont montré que l'induction de l'autophagie peut protéger les cellules cancéreuses de la lyse induite par les cellules NK, en particulier en réponse à l'hypoxie (Messai et al., 2014) (Messai et al., 2015). En effet, il a été montré que certaines cellules du cancer du sein en condition hypoxique pouvaient dégrader le granzyme B, libéré par les cellules NK, dans leurs autophagosomes et que la suppression de Beclin1 ou ATG5 dans ces cellules les re-sensibilisait à la lyse par les cellules NK (Baginska et al., 2013). De même, l'autophagie induite par l'hypoxie dans des cellules de mélanome augmente la dégradation de leur protéine de jonction Connexine 43, impliquée dans l'interaction entre les cellules effectrices et leurs cellules cibles. Dans ce modèle, l'inhibition de l'autophagie augmente le taux de Connexine 43 et donc l'activité cytotoxique des cellules NK (Tittarelli et al., 2015). Ces observations, en apparence contradictoires avec nos travaux, pourraient probablement être expliquées par la sélectivité des protéines internalisées dans les autophagosomes en réponse à des stimuli spécifiques. Cette sélectivité semble donc être responsable du double rôle de l'autophagie dans le contrôle de la mort cellulaire.

D'ailleurs, et de façon plus générale, l'autophagie a longtemps été considérée comme un processus protecteur de la mort cellulaire et favorisant la résistance des cellules cancéreuses aux agents thérapeutiques (Auberger and Puissant, 2017) (Sui et al., 2013), mais de nombreux travaux ont démontré son rôle pro-apoptotique (Liu et al., 2017b) (D'Arcy, 2019) et les récents travaux publiés dans la littérature font clairement la part entre ces deux rôles opposés de l'autophagie (Singh et al., 2018) (Yun and Lee, 2018). En conséquence, l'utilisation de molécules thérapeutiques inhibant l'autophagie (Morel et al., 2017), nécessite de prendre en compte le contexte tumoral et de cibler la bonne étape du processus autophagique. En effet, puisque l'accumulation d'autophagosomes semble favoriser l'apoptose dans certaines circonstances (Goodall et al., 2016), il serait judicieux de bloquer la dégradation des autophagosomes plutôt que d'inhiber leur formation, comme le fait l'hydroxychloroquine (Levy et al., 2017) et CP-31398. Ainsi, dans un contexte où p53 est mutée, on peut envisager que CP-31398, à l'instar de l'hydroxychloroquine, inhibe la dernière étape de l'autophagie, celle qui favorise la résistance des cellules cancéreuses, mais en même temps stimule l'initiation de l'autophagie favorisant l'apoptose induite par le GzmB et peut-être par d'autres molécules.

Enfin, il a été montré au sein du laboratoire que les cellules NK et le GzmB induisent une stabilisation et une activation rapide de p53<sup>WT</sup> au sein des cellules cibles (Meslin et al., 2007) et que p53, activée par le GzmB, transloque à la membrane externe des mitochondries de la cellule cible pour interagir avec la protéine anti-apoptotique Bcl-2. Cette interaction empêche l'effet inhibiteur de Bcl-2 à la fois sur Bax et Bid tronqué, facilitant la MOMP induite par le GzmB (Ben Safta et al., 2015). Ainsi, dans les cellules cibles exprimant des p53<sup>WT</sup>, la p53 activée par le GzmB favorise la mort induite par les cellules effectrices grâce à son activité non transcriptionnelle, alors que dans les cellules p53 mutées, la restauration de la fonction WT de p53 facilite la lyse médiée par le GzmB et les cellules tueuses via son activité transcriptionnelle et l'induction de l'autophagie. Donc, même si ces résultats semblent contradictoires, ses deux mécanismes convergent pour inhiber les principaux régulateurs négatifs de la MOMP et de l'activation des caspases (Bcl2, Bcl-X<sub>L</sub>, XIAP).

En conclusion, ces travaux indiquent que l'utilisation de molécules réactivatrices de p53 peut potentialiser la lyse des cellules de cancer mammaire p53 mutées par les cellules NK grâce à l'induction de l'autophagie (Figure 29). Néanmoins, seule CP-31398 a été utilisée pour réactiver p53 dans cette étude. Cependant, cette molécule présente des effets « off target » et sa spécificité a déjà été mise en doute (Rippin et al., 2002), ce qui explique peut-être que les essais cliniques de cette molécule ne se soient pas poursuivis. De fait, CP-31398 a été utilisée dans nos travaux comme un outil pour montrer que la réactivation de p53 mutée peut améliorer la lyse des cellules tumorales par les cellules NK. Cette étude a été pensée comme une preuve de concept, qui pourrait être appliquée avec d'autres molécules réactivatrices de p53 actuellement en cours d'études cliniques. En effet, il existe de nombreuses autres molécules capables de restaurer la fonction de p53 dont il serait pertinent de vérifier si elles engendrent le même effet que CP-31398 sur la réponse antitumorale. Les précédents travaux sur ces molécules se sont concentrés sur leur effets non immunologiques. En améliorant la compréhension des effets de la réactivation de p53 sur l'immunologie antitumorale, ces agents thérapeutiques pourraient être précieux pour optimiser les approches immunothérapeutiques actuelles. D'ailleurs, nous avons commencé une étude préliminaire tendant à montrer que APR-246, comme CP-31398, induit aussi l'autophagie et augmente la sensibilité des cellules MDA-MB231 à la lyse NK. APR-246 est d'ailleurs en cours d'essais cliniques de phase Ib/II en combinaison avec du carboplatine et de la doxorubicine liposomale chez des patientes avec des cancers de l'ovaire de haut grade. Cette preuve de concept peut aussi potentiellement être étendue à d'autres types de tumeur avec un fort taux de mutation de p53 tels que le cancer du poumon et à la lyse médiée par les CTL car la voie de lyse PFN/GzmB est commune aux CTL et aux cellules NK. Nous envisageons d'ailleurs de réaliser des tests de cytotoxicité avec des cellules de cancer du poumon p53 mutées traitées par APR-246 et des clones de lymphocyte T spécifiques de ses cellules.

Ainsi, nos résultats définissent une nouvelle façon d'augmenter la lyse induite par les lymphocytes cytotoxiques des cellules cancéreuses p53 mutées avec de potentielles applications dans les approches d'immunothérapies. Cependant, il est nécessaire à l'avenir de valider ses résultats *in vivo* en étudiant les effets de la restauration des fonctions de p53 sur la croissance des tumeurs humaines p53 mutées et de leur résistance au système immunitaire en modèle murin. Finalement, il est clair de nos jours que les approches combinatoires, qui à la fois sensibilisent les tumeurs et stimulent la réponse immune antitumorale sont plus efficaces que les monothérapies (Kroemer et al., 2013) (Zitvogel et al., 2008). Le développement de petites molécules réactivant p53 de façon efficace pourrait alors ouvrir la voie à des traitements de combinaison entre ces molécules et des approches immunothérapeutiques telles que le blocage des checkpoints immunitaires ou le transfert de « CAR-T cells ».



**Figure 29 : Schéma récapitulatif de l'effet du traitement de cellules p53 mutée par CP-31398 sur l'apoptose induite par les effecteurs cytotoxiques**



(A) CP-31398 réactive l'activité transcriptionnelle des mutants p53, ce qui (B) active la voie ULK et Sestrin/AMPK/mTOR et (C) induit un processus d'autophagie (D) séquestrant de façon spécifique Bcl-XL, Bcl-2 et des IAPs. (1) Le granzyme B, à la suite de l'exocytose de granules cytotoxiques par les CTL/NK et après son internalisation dans la cellule cible, clive Bid qui induit la MOMP de façon Bax/Bac dépendante. (2) La MOMP n'est pas inhibée par Bcl-XL et Bcl-2 puisque ces protéines sont séquestrées dans les autophagosomes. (3) La libération du cytochrome c déclenche l'apoptosome qui (4) active la caspase 3 qui n'est pas inhibée par les IAPs, cela permet (5) le clivage de ICAD et d'autres substrats pro-apoptotiques et induit enfin (6) l'apoptose.

Dans la seconde partie des résultats, nous avons étudié l'impact de certains mutants de p53 sur l'expression du ligand de checkpoint immunitaire PD-L1. Nous avons montré que l'expression de p53 mutée en position 280 dans trois lignées de cellules cancéreuses différentes est associée avec une forte expression de PD-L1. De plus, nos résultats montrent que l'inhibition de l'expression de ces mutants induit une diminution significative de l'expression de PD-L1, au niveau ARNm et protéique. Cet effet a été retrouvé dans trois autres lignées cancéreuses exprimant les mutants p53<sup>R273H</sup>, p53<sup>R249S</sup> et p53<sup>K132Q</sup> mais de façon moins marquée. Il semble donc que certaines p53 mutantes puissent stimuler plus ou moins fortement l'expression de PD-L1.

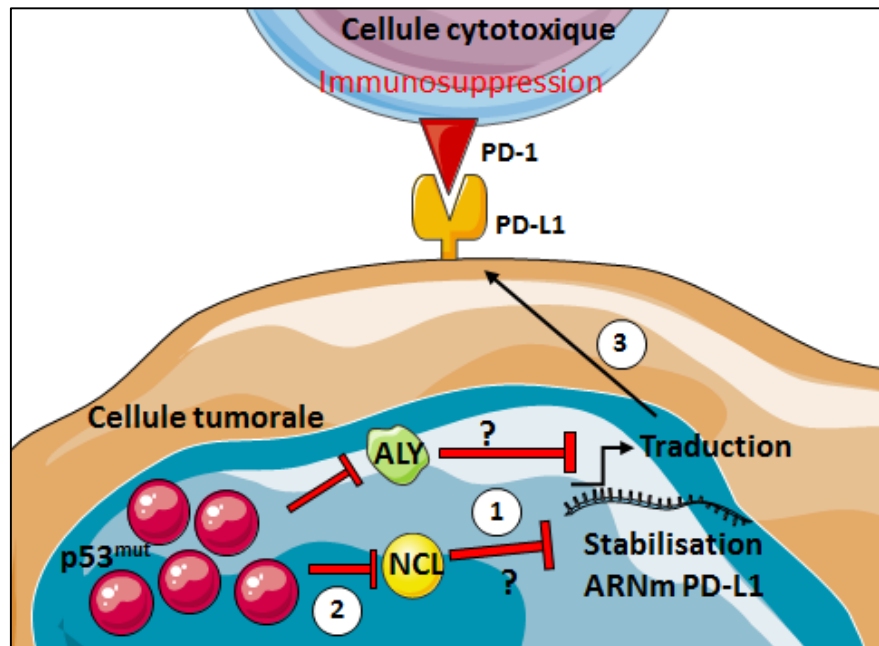
De plus, nos résultats montrent que l'expression ectopique de p53<sup>R175H</sup>, p53<sup>R248W</sup>, p53<sup>R249S</sup> et p53<sup>R273H</sup> au sein de cellules tumorales p53<sup>NULL</sup>, augmente le niveau d'expression de l'ARNm de PD-L1 et induit une forte augmentation de leur expression de PD-L1 à leur surface. Cela suggère que les mécanismes permettant aux différents mutants de stimuler l'expression de PD-L1 pourraient agir par exemple sur la transcription/traduction de PD-L1 ou sur une autre étape permettant son expression protéique à la membrane. Ainsi, nous avons émis l'hypothèse que les mutations de p53 étudiées confèrent à p53 un gain de fonction lui permettant de réguler positivement l'expression de PD-L1 via un ou plusieurs mécanismes. Afin de valider cette hypothèse, nous avons étudié l'interactome de p53 par spectrométrie de masse. Cette analyse nous a permis d'identifier différentes protéines interagissant avec les mutants de p53 utilisés et possédant potentiellement la capacité de moduler l'expression de PD-L1 en agissant sur son ARNm. En effet, nous avons retrouvé dans cette analyse de nombreuses protéines impliquées dans l'épissage d'ARNm, leur transport, leur stabilité, leur dégradation et leur traduction.

Cependant, cette étude de l'interactome des mutants de p53 a été réalisée une seule fois, et il est clairement nécessaire de répéter cette analyse afin d'obtenir des résultats plus solides. En attendant, nous nous sommes intéressés plus particulièrement aux protéines nucléoline et Alyref du fait de leur interaction avec les mutants de p53 étudiés et de leur implication dans la stabilisation/dégradation, le transport et la traduction des ARNm. En effet, il a été montré que la nucléoline peut se fixer aux ARNm possédant des éléments AU-rich et/ou G-rich et d'une part

affecter positivement ou négativement leur stabilité, et d'autre part inhiber ou favoriser leur traduction (Abdelmohsen and Gorospe, 2012). De manière intéressante, l'ARNm de PD-L1 présente des éléments AU-rich dans sa partie 3' UTR, auxquels la nucléoline pourrait se fixer (Coelho et al., 2017; Guo et al., 2018; Ma and Mayr, 2018; Yang et al., 2020). Ainsi, la nucléoline pourrait inhiber la traduction et/ou diminuer la stabilité de l'ARNm de PD-L1 par interaction directe. De même, il est aussi possible que Alyref puisse moduler l'export nucléaire de l'ARNm de PD-L1 ou modifier son épissage et donc influencer sur la stabilité de l'ARNm de PD-L1 et agir sur sa traduction. Selon notre hypothèse, les mutants de p53 étudiés interagiraient avec NCL et ALY ce qui inhiberait l'activité de ces dernières sur l'ARNm de PD-L1 et induirait ainsi une augmentation de l'expression de PD-L1. Nous avons alors vérifié par immunoprécipitation que Alyref et NCL interagissaient bien avec les mutants de p53 étudiés. De plus, nos premiers résultats semblent montrer que NCL et ALY régulent négativement de l'expression de PD-L1, ce qui conforte notre hypothèse supposant que ALY et NCL serait des régulateurs négatifs de l'expression de PD-L1. Cependant, ces résultats ont clairement besoins d'être confirmés.

Afin de valider notre hypothèse, nous pourrions en particulier déterminer s'il existe effectivement une interaction entre l'ARNm de PD-L1 et NCL/ALY en réalisant une immunoprécipitation de ces protéines, suivie d'une quantification de l'ARNm de PD-L1. Afin de déterminer si la modulation de la stabilité des ARNm de PD-L1 causée par la présence de p53 mutées, est effectivement responsable de l'augmentation d'expression de PD-L1, il serait intéressant de mesurer la stabilité des ARNm de PD-L1 en quantifiant par RT-qPCR l'ARNm de PD-L1 dans nos modèles cellulaires +/- p53<sup>mut</sup> à différents temps après traitement par l'actinomycine D, un inhibiteur de la transcription. Nous pourrions aussi également évaluer les conséquences de la sur-expression de NCL ou de ALY sur l'expression de PD-L1 dans les cellules H1299 +/- mutants de p53. Selon notre hypothèse, la sur-expression de ces deux protéines devrait diminuer l'expression de PD-L1.

En résumé, nous avons montré que certains mutants de p53 induisent une sur-expression de PD-L1 selon un mécanisme de gain de fonction qui consiste potentiellement à inhiber NCL et ALY, des régulateurs négatifs de l'expression de PD-L1 (Figure 30).



**Figure 30 : Schéma récapitulatif de l'effet hypothétique de certains mutants de p53 sur l'expression de PD-L1**

Dans notre modèle, (1) ALY et NCL régulent négativement l'expression de PD-L1, selon des mécanismes encore indéfinis : soit en dégradant l'ARNm de PD-L1, soit en inhibant sa traduction par épissage, séquestration ou blocage de son export nucléaire. (2) Certains mutants de p53 inhiberaient l'activité inhibitrice de NCL et ALY par interaction directe, ce qui (3) provoquerait une augmentation de l'expression de PD-L1.

L'étude de l'interactome des mutants de p53 étudiés a aussi révélé que ces mutants interagissent avec de nombreuses protéines présentes dans les granules de stress ou impliquées dans leur formation. Les granules de stress sont des agrégations denses dans le cytosol (et aussi dans le noyau) composées de protéines et d'ARN, qui apparaissent en particulier lorsque la cellule est stressée. Ces granules auraient pour fonction de protéger les molécules d'ARN des altérations et de stopper leur traduction (Ivanov et al., 2019) (Chantarachot and Bailey-Serres, 2018). Les granules de stress pourraient aussi servir de « point de décision » pour le devenir des ARNm (stockage, dégradation ou traduction) (Anderson and Kedersha, 2002).

De manière intéressante, nos résultats actuels semblent montrer que dans notre modèle, les mutants de p53 utilisés se fixent à G3BP1 (déjà connu pour interagir avec p53 (Kim et al., 2007)) et à PABPC1, toutes deux impliquées dans l'initiation de la formation des granules de stress. Il est donc possible qu'une éventuelle formation de granules de stress causée par l'expression de p53 mutée soit impliquée dans la modulation de l'expression de PD-L1. Cependant la présence de ces granules dans nos modèles reste à prouver. Pour cela, il serait nécessaire dans un premier temps de vérifier par immunofluorescence si la répartition de G3BP1 est ponctiforme (ce qui reflèterait la présence de granule de stress) dans nos modèles cellulaires transfectés par les différents mutants de

p53 à notre disposition. Finalement nous avons retrouvé dans notre analyse de l'interactome des mutants de p53 de nombreuses sous unités ribosomales, des facteurs de transcription, des facteurs d'épissage, des protéines se fixant à l'ARN et des protéines du cytosquelette, cet ensemble de protéines se retrouve aussi au sein des granules de stress (Youn et al., 2019), ce qui pourrait renforcer l'hypothèse d'une implication de ces structures dans la régulation de l'expression de PD-L1 par les mutants de p53.

Néanmoins, il est important de noter qu'une ambiguïté demeure concernant l'aspect spécifique des mutants de p53 dans l'augmentation de l'expression de PD-L1 que nous observons. En effet, nous n'avons pas analysé l'interactome dans le cas où notre lignée p53<sup>null</sup> est transfectée par un vecteur codant pour une p53<sup>WT</sup>, ni mesurer l'effet de cette ré-expression de p53<sup>WT</sup> sur l'expression de PD-L1. Il n'est pas impossible que l'effet de nos p53 mutantes sur l'expression de PD-L1 soit plutôt causé par la surexpression de p53 (WT ou mutée), naturellement retrouvée dans les tumeurs dont la p53 est stabilisée par sa mutation, plutôt que directement causé par les mutants de p53. Cela pourrait coïncider avec le fait que l'augmentation de l'expression de p53<sup>WT</sup> dans les cellules MCF7 grâce à un traitement par Nutline induit l'expression de PD-L1 (Yoon et al., 2015). Cependant, étudier des cellules exprimant fortement p53<sup>WT</sup> est difficile puisque cette expression induit rapidement la mort des cellules transfectées du fait des propriétés pro-apoptotiques de p53<sup>WT</sup>.

De plus, à l'heure actuelle, nous n'avons pas validé les résultats obtenus d'un point de vue plus fonctionnel. Ainsi, nous envisageons dans un futur proche de déterminer l'effet physiologique de la diminution de PD-L1 induit par la suppression de p53 mutée sur la fonction des cellules cytotoxiques, par exemple en mesurant l'activation et la prolifération des CTL exprimant PD-1 lorsqu'elles sont mises en contact avec leur cible exprimant ou pas p53 mutée. Si un effet négatif de la suppression des p53 mutées sur l'activité des CTL est observé, nous envisageons de valider *in vivo* cet effet, et de déterminer l'impact de la déplétion de p53 mutée sur l'immunosuppression et le contrôle de la croissance tumorale par les cellules cytotoxiques. En effet, étant donné qu'il existe à l'heure actuelle des agents pharmacologiques capables de diminuer l'expression de p53 mutée, il serait intéressant de déterminer si ces agents ont aussi la capacité de diminuer l'expression de PD-L1 dans nos modèles. En particulier, il a été montré que certaines statines, couramment utilisées pour lutter contre les maladies cardiovasculaires et l'hypercholestérolémie, peuvent inhiber l'expression de p53 mutantes (Chou et al., 2019). De même, le traitement par la molécule SAHA entraîne la dégradation de certaines p53 mutantes en inhibant les protéines chaperonnes HDAC6-Hsp90 essentielles dans la stabilisation des p53 mutées (Li et al., 2011b) (Wang et al., 2016). De la même façon, les inhibiteurs de la protéine chaperonne Hsp90, comme 17AAG et Ganetespib, libèrent les p53 mutantes de leur interaction avec Hsp90 et favorisent leur dégradation (Alexandrova et al., 2015) (Li et al., 2011a). Si ces molécules présentes effectivement une capacité

à diminuer l'expression de PD-L1 par la diminution de l'expression des p53 mutées dans notre modèle, il sera nécessaire de valider ces résultats *in vivo* en montrant que le traitement par ces molécules diminue l'immunosuppression et augmente le contrôle de la croissance tumorale de tumeurs humaines p53 mutées, xénogreffées dans des souris, par les CTL. Cela serait particulièrement relevant puisque ces molécules, comme les statines, sont bien connues et déjà utilisées pour soigner diverses autres pathologies et ne présentent pas ou peu d'effets indésirables.

En conclusion, au cours de cette thèse, nous avons approfondie la connaissance du lien entre les mutations de p53 et la réponse immunitaire antitumorale. Nous avons démontré dans un premier temps que la réactivation de p53 mutées sensibilise les cellules tumorales à la lyse par la voie PFN/GzmB commune aux deux types de cellules cytotoxiques. Dans un deuxième temps, nos résultats en cours d'étude semblent montrer que l'inhibition des p53 mutées diminue l'expression de PD-L1 et peut-être même l'immunosuppression. Sur la base de ses travaux, nous pouvons imaginer qu'un traitement combinant des agents thérapeutiques diminuant l'expression des p53 mutées et réactivant l'activité transcriptionnelle des p53 mutées restantes pourrait à la fois sensibiliser les cellules tumorales à la lyse par les effecteurs cytotoxiques tout en les empêchant d'inhiber ses cellules immunitaires par l'axe PD1/PD-L1.

## BIBLIOGRAPHIE

- Aas, T., Børresen, A.L., Geisler, S., Smith-Sørensen, B., Johnsen, H., Varhaug, J.E., Akslen, L.A., and Lønning, P.E. (1996). Specific P53 mutations are associated with de novo resistance to doxorubicin in breast cancer patients. *Nat. Med.* 2, 811–814.
- Abdelmohsen, K., and Gorospe, M. (2012). RNA-binding protein nucleolin in disease. *RNA Biol.* 9, 799–808.
- Abdrakhmanov, A., Gogvadze, V., and Zhivotovsky, B. (2020). To Eat or to Die: Deciphering Selective Forms of Autophagy. *Trends Biochem. Sci.* 45, 347–364.
- 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.
- Abril-Rodriguez, G., and Ribas, A. (2017). SnapShot: Immune Checkpoint Inhibitors. *Cancer Cell* 31, 848–848.e1.
- Addadi, Y., Moskovits, N., Granot, D., Lozano, G., Carmi, Y., Apte, R.N., Neeman, M., and Oren, M. (2010). p53 status in stromal fibroblasts modulates tumor growth in an SDF1-dependent manner. *Cancer Res.* 70, 9650–9658.
- Adorno, M., Cordenonsi, M., Montagner, M., Dupont, S., Wong, C., Hann, B., Solari, A., Bobisse, S., Rondina, M.B., Guzzardo, V., et al. (2009). A Mutant-p53/Smad complex opposes p63 to empower TGFbeta-induced metastasis. *Cell* 137, 87–98.
- Adrain, C., Murphy, B.M., and Martin, S.J. (2005). Molecular ordering of the caspase activation cascade initiated by the cytotoxic T lymphocyte/natural killer (CTL/NK) protease granzyme B. *J. Biol. Chem.* 280, 4663–4673.
- 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. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 8493–8497.
- Aggarwal, M., Saxena, R., Sinclair, E., Fu, Y., Jacobs, A., Dyba, M., Wang, X., Cruz, I., Berry, D., Kallakury, B., et al. (2016). Reactivation of mutant p53 by a dietary-related compound phenethyl isothiocyanate inhibits tumor growth. *Cell Death Differ.* 23, 1615–1627.
- Aguilar-Lemarroy, A., Gariglio, P., Whitaker, N.J., Eichhorst, S.T., zur Hausen, H., Krammer, P.H., and Rösl, F. (2002). Restoration of p53 expression sensitizes human papillomavirus type 16 immortalized human keratinocytes to CD95-mediated apoptosis. *Oncogene* 21, 165–175.
- Ahmadzadeh, M., and Rosenberg, S.A. (2005). TGF-beta 1 attenuates the acquisition and expression of effector function by tumor antigen-specific human memory CD8 T cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 174, 5215–5223.
- Ahmadzadeh, M., Johnson, L.A., Heemskerk, B., Wunderlich, J.R., Dudley, M.E., White, D.E., and Rosenberg, S.A. (2009). Tumor antigen-specific CD8 T cells infiltrating the tumor express high levels of PD-1 and are functionally impaired. *Blood* 114, 1537–1544.
- Alexandrova, E.M., Yallowitz, A.R., Li, D., Xu, S., Schulz, R., Proia, D.A., Lozano, G., Dobbelstein, M., and Moll, U.M. (2015). Improving survival by exploiting tumour dependence on stabilized mutant p53 for treatment. *Nature* 523, 352–356.
- Alexandrova, E.M., Mirza, S.A., Xu, S., Schulz-Heddergott, R., Marchenko, N.D., and Moll, U.M. (2017). p53 loss-of-heterozygosity is a necessary prerequisite for mutant p53 stabilization and gain-of-function in vivo. *Cell Death Dis.* 8, e2661.

- Ali, D., Mohammad, D.K., Mujahed, H., Jonson-Videsäter, K., Nore, B., Paul, C., and Lehmann, S. (2016). Anti-leukaemic effects induced by APR-246 are dependent on induction of oxidative stress and the NFE2L2/HMOX1 axis that can be targeted by PI3K and mTOR inhibitors in acute myeloid leukaemia cells. *Br. J. Haematol.* *174*, 117–126.
- Alimonti, J.B., Shi, L.F., Baijal, P.K., and Greenberg, A.H. (2001). Granzyme B Induces Bid-Mediated Cytochrome C Release and Mitochondrial Permeability Transition. *ScientificWorldJournal* *1*, 49.
- Aloni-Grinstein, R., Charni-Natan, M., Solomon, H., and Rotter, V. (2018). p53 and the Viral Connection: Back into the Future ‡. *Cancers* *10*.
- Alsner, J., Jensen, V., Kyndi, M., Offersen, B.V., Vu, P., Børresen-Dale, A.-L., and Overgaard, J. (2008). A comparison between p53 accumulation determined by immunohistochemistry and TP53 mutations as prognostic variables in tumours from breast cancer patients. *Acta Oncol. Stockh. Swed.* *47*, 600–607.
- Amelio, I., Mancini, M., Petrova, V., Cairns, R.A., Vikhрева, P., Nicolai, S., Marini, A., Antonov, A.A., Le Quesne, J., Baena Acevedo, J.D., et al. (2018). p53 mutants cooperate with HIF-1 in transcriptional regulation of extracellular matrix components to promote tumor progression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *115*, E10869–E10878.
- Anderluh, G., Kisovec, M., Kraševac, N., and Gilbert, R.J.C. (2014). Distribution of MACPF/CDC proteins. *Subcell. Biochem.* *80*, 7–30.
- Anderson, P., and Kedersha, N. (2002). Stressful initiations. *J. Cell Sci.* *115*, 3227–3234.
- Andrade, F., Fellows, E., Jenne, D.E., Rosen, A., and Young, C.S.H. (2007). Granzyme H destroys the function of critical adenoviral proteins required for viral DNA replication and granzyme B inhibition. *EMBO J.* *26*, 2148–2157.
- Angelopoulou, K., and Diamandis, E.P. (1997). Detection of the TP53 tumour suppressor gene product and p53 auto-antibodies in the ascites of women with ovarian cancer. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl.* *1990* *33*, 115–121.
- Angelopoulou, K., Stratis, M., and Diamandis, E.P. (1997). Humoral immune response against p53 protein in patients with colorectal carcinoma. *Int. J. Cancer* *70*, 46–51.
- Anikeeva, N., Somersalo, K., Sims, T.N., Thomas, V.K., Dustin, M.L., and Sykulev, Y. (2005). Distinct role of lymphocyte function-associated antigen-1 in mediating effective cytolytic activity by cytotoxic T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 6437–6442.
- Arihara, Y., Takada, K., Kamihara, Y., Hayasaka, N., Nakamura, H., Murase, K., Ikeda, H., Iyama, S., Sato, T., Miyanishi, K., et al. (2017). Small molecule CP-31398 induces reactive oxygen species-dependent apoptosis in human multiple myeloma. *Oncotarget* *8*, 65889–65899.
- 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. *J. Biol. Chem.* *280*, 19166–19176.
- Arina, A., Murillo, O., Dubrot, J., Azpilikueta, A., Alfaro, C., Pérez-Gracia, J.L., Bendandi, M., Palencia, B., Hervás-Stubbs, S., and Melero, I. (2007). Cellular liaisons of natural killer lymphocytes in immunology and immunotherapy of cancer. *Expert Opin. Biol. Ther.* *7*, 599–615.
- Artis, D., and Spits, H. (2015). The biology of innate lymphoid cells. *Nature* *517*, 293–301.
- Ashcroft, M., Kubbutat, M.H., and Vousden, K.H. (1999). Regulation of p53 function and stability by phosphorylation. *Mol. Cell. Biol.* *19*, 1751–1758.



- Ashkenazi, A., and Salvesen, G. (2014). Regulated cell death: signaling and mechanisms. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *30*, 337–356.
- Auberger, P., and Puissant, A. (2017). Autophagy, a key mechanism of oncogenesis and resistance in leukemia. *Blood* *129*, 547–552.
- Austen, B., Powell, J.E., Alvi, A., Edwards, I., Hooper, L., Starczynski, J., Taylor, A.M.R., 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.
- Azijli, K., Weyhenmeyer, B., Peters, G.J., de Jong, S., and Kruyt, F. a. E. (2013). Non-canonical kinase signaling by the death ligand TRAIL in cancer cells: discord in the death receptor family. *Cell Death Differ.* *20*, 858–868.
- Bacon, L., Eagle, R.A., Meyer, M., Easom, N., Young, N.T., and Trowsdale, J. (2004). Two human ULBP/RAET1 molecules with transmembrane regions are ligands for NKG2D. *J. Immunol. Baltim. Md* *1950* *173*, 1078–1084.
- Badovinac, V.P., Hamilton, S.E., and Harty, J.T. (2003). Viral infection results in massive CD8+ T cell expansion and mortality in vaccinated perforin-deficient mice. *Immunity* *18*, 463–474.
- Baginska, J., Viry, E., Berchem, G., Poli, A., Noman, M.Z., van Moer, K., Medves, S., Zimmer, J., Oudin, A., Niclou, S.P., et al. (2013). Granzyme B degradation by autophagy decreases tumor cell susceptibility to natural killer-mediated lysis under hypoxia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *110*, 17450–17455.
- Bakalkin, G., Yakovleva, T., Selivanova, G., Magnusson, K.P., Szekeley, 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. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *91*, 413–417.
- Baker, S.J., Preisinger, A.C., Jessup, J.M., Paraskeva, C., Markowitz, S., Willson, J.K., Hamilton, S., and Vogelstein, B. (1990). p53 gene mutations occur in combination with 17p allelic deletions as late events in colorectal tumorigenesis. *Cancer Res.* *50*, 7717–7722.
- 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. *J. Exp. Med.* *196*, 493–503.
- Balsamo, M., Scordamaglia, F., Pietra, G., Manzini, C., Cantoni, C., Boitano, M., Queirolo, P., Vermi, W., Facchetti, F., Moretta, A., et al. (2009). Melanoma-associated fibroblasts modulate NK cell phenotype and antitumor cytotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 20847–20852.
- Ban, H.S., Kim, B.-K., Lee, H., Kim, H.M., Harmalkar, D., Nam, M., Park, S.-K., Lee, K., Park, J.-T., Kim, I., et al. (2017). The novel hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  inhibitor IDF-11774 regulates cancer metabolism, thereby suppressing tumor growth. *Cell Death Dis.* *8*, e2843.
- Banjara, S., Suraweera, C.D., Hinds, M.G., and Kvensakul, M. (2020). The Bcl-2 Family: Ancient Origins, Conserved Structures, and Divergent Mechanisms. *Biomolecules* *10*.
- Baran, K., Ciccone, A., Peters, C., Yagita, H., Bird, P.I., Villadangos, J.A., and Trapani, J.A. (2006). Cytotoxic T lymphocytes from cathepsin B-deficient mice survive normally in vitro and in vivo after encountering and killing target cells. *J. Biol. Chem.* *281*, 30485–30491.
- Baran, K., Dunstone, M., Chia, J., Ciccone, A., Browne, K.A., Clarke, C.J.P., Lukoyanova, N., Saibil, H., Whisstock, J.C., Voskoboinik, I., et al. (2009). The molecular basis for perforin oligomerization and transmembrane pore assembly. *Immunity* *30*, 684–695.
- Barber, D.L., Wherry, E.J., Masopust, D., Zhu, B., Allison, J.P., Sharpe, A.H., Freeman, G.J., and Ahmed, R. (2006). Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature* *439*, 682–687.

- Bargonetti, J., Chicas, A., White, D., and Prives, C. (1997). p53 represses Sp1 DNA binding and HIV-LTR directed transcription. *Cell. Mol. Biol. Noisy--Gd. Fr.* *43*, 935–949.
- Barnhart, B.C., Alappat, E.C., and Peter, M.E. (2003). The CD95 type I/type II model. *Semin. Immunol.* *15*, 185–193.
- Bartek, J., Iggo, R., Gannon, J., and Lane, D.P. (1990). Genetic and immunochemical analysis of mutant p53 in human breast cancer cell lines. *Oncogene* *5*, 893–899.
- Bauer, S., Groh, V., Wu, J., Steinle, A., Phillips, J.H., Lanier, L.L., and Spies, T. (1999). Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science* *285*, 727–729.
- Baugh, E.H., Ke, H., Levine, A.J., Bonneau, R.A., and Chan, C.S. (2018). Why are there hotspot mutations in the TP53 gene in human cancers? *Cell Death Differ.* *25*, 154–160.
- 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. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *194*, 418–428.
- 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. *J. Biol. Chem.* *276*, 43285–43293.
- Bergh, J., Norberg, T., Sjögren, S., Lindgren, A., and Holmberg, L. (1995). Complete sequencing of the p53 gene provides prognostic information in breast cancer patients, particularly in relation to adjuvant systemic therapy and radiotherapy. *Nat. Med.* *1*, 1029–1034.
- Bernard, X., Robinson, P., Nominé, Y., Masson, M., Charbonnier, S., Ramirez-Ramos, J.R., Deryckere, F., Travé, G., and Orfanoudakis, G. (2011). Proteasomal degradation of p53 by human papillomavirus E6 oncoprotein relies on the structural integrity of p53 core domain. *PLoS One* *6*, e25981.
- Bharatham, N., Chi, S.-W., and Yoon, H.S. (2011). Molecular Basis of Bcl-XL-p53 Interaction: Insights from Molecular Dynamics Simulations. *PLoS ONE* *6*.
- Biegging, K.T., Mello, S.S., and Attardi, L.D. (2014). Unravelling mechanisms of p53-mediated tumour suppression. *Nat. Rev. Cancer* *14*, 359–370.
- Bingle, L., Brown, N.J., and Lewis, C.E. (2002). The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies. *J. Pathol.* *196*, 254–265.
- Binnemars-Postma, K., Bansal, R., Storm, G., and Prakash, J. (2018). Targeting the Stat6 pathway in tumor-associated macrophages reduces tumor growth and metastatic niche formation in breast cancer. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *32*, 969–978.
- Binnewies, M., Roberts, E.W., Kersten, K., Chan, V., Fearon, D.F., Merad, M., Coussens, L.M., Gaborit, D.I., Ostrand-Rosenberg, S., Hedrick, C.C., et al. (2018). Understanding the tumor immune microenvironment (TIME) for effective therapy. *Nat. Med.* *24*, 541–550.
- Bischoff, J.R., Kirn, D.H., Williams, A., Heise, C., Horn, S., Muna, M., Ng, L., Nye, J.A., Sampson-Johannes, A., Fattaey, A., et al. (1996). An adenovirus mutant that replicates selectively in p53-deficient human tumor cells. *Science* *274*, 373–376.
- Biton, J., Mansuet-Lupo, A., Pécuchet, N., Alifano, M., Ouakrim, H., Arrondeau, J., Boudou-Rouquette, P., Goldwasser, F., Leroy, K., Goc, J., et al. (2018). TP53, STK11, and EGFR Mutations Predict Tumor Immune Profile and the Response to Anti-PD-1 in Lung Adenocarcinoma. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *24*, 5710–5723.

- Blagih, J., Zani, F., Chakravarty, P., Hennequart, M., Pilley, S., Hobor, S., Hock, A.K., Walton, J.B., Morton, J.P., Gronroos, E., et al. (2020). Cancer-Specific Loss of p53 Leads to a Modulation of Myeloid and T Cell Responses. *Cell Rep.* *30*, 481-496.e6.
- Blagosklonny, M.V., Toretsky, J., Bohen, S., and Neckers, L. (1996). Mutant conformation of p53 translated in vitro or in vivo requires functional HSP90. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *93*, 8379–8383.
- Blanden, A.R., Yu, X., Wolfe, A.J., Gilleran, J.A., Augeri, D.J., O'Dell, R.S., Olson, E.C., Kimball, S.D., Emge, T.J., Movileanu, L., et al. (2015). Synthetic metallochaperone ZMC1 rescues mutant p53 conformation by transporting zinc into cells as an ionophore. *Mol. Pharmacol.* *87*, 825–831.
- Bode, A.M., and Dong, Z. (2004). Post-translational modification of p53 in tumorigenesis. *Nat. Rev. Cancer* *4*, 793–805.
- Boeckler, F.M., Joerger, A.C., Jaggi, G., Rutherford, T.J., Veprintsev, D.B., and Fersht, A.R. (2008). Targeted rescue of a destabilized mutant of p53 by an in silico screened drug. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 10360–10365.
- Boissonnas, A., Scholer-Dahirel, A., Simon-Blancal, V., Pace, L., Valet, F., Kissenpfennig, A., Sparwasser, T., Malissen, B., Fetler, L., and Amigorena, S. (2010). Foxp3<sup>+</sup> T cells induce perforin-dependent dendritic cell death in tumor-draining lymph nodes. *Immunity* *32*, 266–278.
- Borghaei, H., Paz-Ares, L., Horn, L., Spigel, D.R., Steins, M., Ready, N.E., Chow, L.Q., Vokes, E.E., Felip, E., Holgado, E., et al. (2015). Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Non-squamous Non-small Cell Lung Cancer. *N. Engl. J. Med.* *373*, 1627–1639.
- Borst, J., Ahrends, T., Bąbała, N., Melief, C.J.M., and Kastenmüller, W. (2018). CD4<sup>+</sup> T cell help in cancer immunology and immunotherapy. *Nat. Rev. Immunol.* *18*, 635–647.
- Bosco, M.C., and Varesio, L. (2012). Dendritic cell reprogramming by the hypoxic environment. *Immunobiology* *217*, 1241–1249.
- 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.A., Quadir, R., Broekhuizen, R., Damen, J.M.A., Froelich, C.J., Slijper, M., and Kummer, J.A. (2008). NK cell protease granzyme M targets alpha-tubulin and disorganizes the microtubule network. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *180*, 8184–8191.
- Boya, P., Reggiori, F., and Codogno, P. (2013). Emerging regulation and functions of autophagy. *Nat. Cell Biol.* *15*, 713–720.
- Brady, C.A., and Attardi, L.D. (2010). p53 at a glance. *J. Cell Sci.* *123*, 2527–2532.
- Brahmer, J.R., Tykodi, S.S., Chow, L.Q.M., Hwu, W.-J., Topalian, S.L., Hwu, P., Drake, C.G., Camacho, L.H., Kauh, J., Odunsi, K., et al. (2012). Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. *N. Engl. J. Med.* *366*, 2455–2465.
- Bronte, V., and Zanovello, P. (2005). Regulation of immune responses by L-arginine metabolism. *Nat. Rev. Immunol.* *5*, 641–654.
- Bronte, V., Chappell, D.B., Apolloni, E., Cabrelle, A., Wang, M., Hwu, P., and Restifo, N.P. (1999). Unopposed production of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by tumors inhibits CD8<sup>+</sup> T cell responses by dysregulating antigen-presenting cell maturation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *162*, 5728–5737.

- 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. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *170*, 270–278.
- Brosh, R., and Rotter, V. (2009). When mutants gain new powers: news from the mutant p53 field. *Nat. Rev. Cancer* *9*, 701–713.
- Browne, K.A., Johnstone, R.W., Jans, D.A., and Trapani, J.A. (2000). Filamin (280-kDa actin-binding protein) is a caspase substrate and is also cleaved directly by the cytotoxic T lymphocyte protease granzyme B during apoptosis. *J. Biol. Chem.* *275*, 39262–39266.
- Brugarolas, J., Chandrasekaran, C., Gordon, J.I., Beach, D., Jacks, T., and Hannon, G.J. (1995). Radiation-induced cell cycle arrest compromised by p21 deficiency. *Nature* *377*, 552–557.
- 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. *Mol. Cell* *14*, 585–598.
- Bubeník, J. (2003). Tumour MHC class I downregulation and immunotherapy (Review). *Oncol. Rep.* *10*, 2005–2008.
- Budanov, A.V., and Karin, M. (2008). p53 target genes sestrin1 and sestrin2 connect genotoxic stress and mTOR signaling. *Cell* *134*, 451–460.
- Budczies, J., Bockmayr, M., Denkert, C., Klauschen, F., Gröschel, S., Darb-Esfahani, S., Pfarr, N., Leichsenring, J., Onozato, M.L., Lennerz, J.K., et al. (2016). Pan-cancer analysis of copy number changes in programmed death-ligand 1 (PD-L1, CD274) - associations with gene expression, mutational load, and survival. *Genes. Chromosomes Cancer* *55*, 626–639.
- Burnet, M. (1957). Cancer; a biological approach. I. The processes of control. *Br. Med. J.* *1*, 779–786.
- Buzza, M.S., Zamurs, L., Sun, J., Bird, C.H., Smith, A.I., Trapani, J.A., Froelich, C.J., Nice, E.C., and Bird, P.I. (2005). Extracellular matrix remodeling by human granzyme B via cleavage of vitronectin, fibronectin, and laminin. *J. Biol. Chem.* *280*, 23549–23558.
- Bykov, V.J.N., Issaeva, N., Shilov, A., Hultcrantz, M., Pugacheva, E., Chumakov, P., Bergman, J., Wiman, K.G., and Selivanova, G. (2002a). Restoration of the tumor suppressor function to mutant p53 by a low-molecular-weight compound. *Nat. Med.* *8*, 282–288.
- Bykov, V.J.N., Issaeva, N., Selivanova, G., and Wiman, K.G. (2002b). Mutant p53-dependent growth suppression distinguishes PRIMA-1 from known anticancer drugs: a statistical analysis of information in the National Cancer Institute database. *Carcinogenesis* *23*, 2011–2018.
- Bykov, V.J.N., Issaeva, N., Zache, N., Shilov, A., Hultcrantz, M., Bergman, J., Selivanova, G., and Wiman, K.G. (2005a). Reactivation of mutant p53 and induction of apoptosis in human tumor cells by maleimide analogs. *J. Biol. Chem.* *280*, 30384–30391.
- Bykov, V.J.N., Zache, N., Stridh, H., Westman, J., Bergman, J., Selivanova, G., and Wiman, K.G. (2005b). PRIMA-1(MET) synergizes with cisplatin to induce tumor cell apoptosis. *Oncogene* *24*, 3484–3491.
- Bykov, V.J.N., 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. *Front. Oncol.* *6*, 21.
- Bykov, V.J.N., Eriksson, S.E., Bianchi, J., and Wiman, K.G. (2018). Targeting mutant p53 for efficient cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* *18*, 89–102.

- Cao, X., Cai, S.F., Fehniger, T.A., Song, J., Collins, L.I., Piwnica-Worms, D.R., and Ley, T.J. (2007). Granzyme B and perforin are important for regulatory T cell-mediated suppression of tumor clearance. *Immunity* 27, 635–646.
- Carr, S.M., Munro, S., and La Thangue, N.B. (2012). Lysine methylation and the regulation of p53. *Essays Biochem.* 52, 79–92.
- Castriconi, R., Cantoni, C., Della Chiesa, M., Vitale, M., Marcenaro, E., Conte, R., Biassoni, R., Bottino, C., Moretta, L., and Moretta, A. (2003). Transforming growth factor beta 1 inhibits expression of NKG2D and NKG2D receptors: consequences for the NK-mediated killing of dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 4120–4125.
- Cerwenka, A., and Lanier, L.L. (2001). Natural killer cells, viruses and cancer. *Nat. Rev. Immunol.* 1, 41–49.
- Cha, Y.J., Kim, H.R., Lee, C.Y., Cho, B.C., and Shim, H.S. (2016). Clinicopathological and prognostic significance of programmed cell death ligand-1 expression in lung adenocarcinoma and its relationship with p53 status. *Lung Cancer Amst. Neth.* 97, 73–80.
- 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. *J. Biol. Chem.* 270, 25014–25019.
- Chantarachot, T., and Bailey-Serres, J. (2018). Polysomes, Stress Granules, and Processing Bodies: A Dynamic Triumvirate Controlling Cytoplasmic mRNA Fate and Function. *Plant Physiol.* 176, 254–269.
- Chao, C.C.-K. (2015). Mechanisms of p53 degradation. *Clin. Chim. Acta Int. J. Clin. Chem.* 438, 139–147.
- Chen, L., and Flies, D.B. (2013). Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nat. Rev. Immunol.* 13, 227–242.
- Chen, J., Jiang, C.C., Jin, L., and Zhang, X.D. (2016). Regulation of PD-L1: a novel role of pro-survival signalling in cancer. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* 27, 409–416.
- Chen, J.-Y., Li, C.-F., Kuo, C.-C., Tsai, K.K., Hou, M.-F., and Hung, W.-C. (2014a). Cancer/stroma interplay via cyclooxygenase-2 and indoleamine 2,3-dioxygenase promotes breast cancer progression. *Breast Cancer Res. BCR* 16, 410.
- Chen, L., Gibbons, D.L., Goswami, S., Cortez, M.A., Ahn, Y.-H., Byers, L.A., Zhang, X., Yi, X., Dwyer, D., Lin, W., et al. (2014b). Metastasis is regulated via microRNA-200/ZEB1 axis control of tumour cell PD-L1 expression and intratumoral immunosuppression. *Nat. Commun.* 5, 5241.
- 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.
- Chen, Y., Gan, B.Q., and Tang, B.L. (2010). Syntaxin 16: unraveling cellular physiology through a ubiquitous SNARE molecule. *J. Cell. Physiol.* 225, 326–332.
- Cheng, H., Dufu, K., Lee, C.-S., Hsu, J.L., Dias, A., and Reed, R. (2006). Human mRNA export machinery recruited to the 5' end of mRNA. *Cell* 127, 1389–1400.
- Chiarugi, P., and Giannoni, E. (2008). Anoikis: a necessary death program for anchorage-dependent cells. *Biochem. Pharmacol.* 76, 1352–1364.
- Chicas, A., Molina, P., and Bargonetti, J. (2000). Mutant p53 forms a complex with Sp1 on HIV-LTR DNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 279, 383–390.
- Chin, K.V., Ueda, K., Pastan, I., and Gottesman, M.M. (1992). Modulation of activity of the promoter of the human MDR1 gene by Ras and p53. *Science* 255, 459–462.

- Chipuk, J.E., and Green, D.R. (2008). How do BCL-2 proteins induce mitochondrial outer membrane permeabilization? *Trends Cell Biol.* *18*, 157–164.
- 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.
- 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., 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., Moldoveanu, T., Llambi, F., Parsons, M.J., and Green, D.R. (2010). The BCL-2 family reunion. *Mol. Cell* *37*, 299–310.
- Chittenden, T., Flemington, C., Houghton, A.B., Ebb, R.G., Gallo, G.J., Elangovan, B., Chinnadurai, G., and Lutz, R.J. (1995). A conserved domain in Bak, distinct from BH1 and BH2, mediates cell death and protein binding functions. *EMBO J.* *14*, 5589–5596.
- Chiusolo, V., Jacquemin, G., Yonca Bassoy, E., Vinet, L., Liguori, L., Walch, M., Kozjak-Pavlovic, V., and Martinvalet, D. (2017). Granzyme B enters the mitochondria in a Sam50-, Tim22- and mtHsp70-dependent manner to induce apoptosis. *Cell Death Differ.* *24*, 747–758.
- Cho, D.-H., Kim, Y.S., Jo, D.S., Choe, S.-K., and Jo, E.-K. (2018). Pexophagy: Molecular Mechanisms and Implications for Health and Diseases. *Mol. Cells* *41*, 55–64.
- Cho, Y., Gorina, S., Jeffrey, P.D., and Pavletich, N.P. (1994). Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: understanding tumorigenic mutations. *Science* *265*, 346–355.
- Chong, A.S., Boussy, I.A., Jiang, X.L., Lamas, M., and Graf, L.H. (1994). CD54/ICAM-1 is a costimulator of NK cell-mediated cytotoxicity. *Cell. Immunol.* *157*, 92–105.
- Chou, C.-W., Lin, C.-H., Hsiao, T.-H., Lo, C.-C., Hsieh, C.-Y., Huang, C.-C., and Sher, Y.-P. (2019). Therapeutic effects of statins against lung adenocarcinoma via p53 mutant-mediated apoptosis. *Sci. Rep.* *9*, 20403.
- Chouaib, S., Messai, Y., Couve, S., Escudier, B., Hasmim, M., and Noman, M.Z. (2012). Hypoxia promotes tumor growth in linking angiogenesis to immune escape. *Front. Immunol.* *3*, 21.
- 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. *Mol. Cell* *23*, 133–142.
- Choy, J.C., Hung, V.H.Y., Hunter, A.L., Cheung, P.K., Motyka, B., Goping, I.S., Sawchuk, T., Bleackley, R.C., Podor, T.J., McManus, B.M., et al. (2004). Granzyme B induces smooth muscle cell apoptosis in the absence of perforin: involvement of extracellular matrix degradation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *24*, 2245–2250.
- Christiansen, A.J., Dieterich, L.C., Ohs, I., Bachmann, S.B., Bianchi, R., Proulx, S.T., Hollmén, M., Aebischer, D., and Detmar, M. (2016). Lymphatic endothelial cells attenuate inflammation via suppression of dendritic cell maturation. *Oncotarget* *7*, 39421–39435.
- Cicchini, M., Karantza, V., and Xia, B. (2015). Molecular pathways: autophagy in cancer--a matter of timing and context. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *21*, 498–504.
- 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.

- Clayton, A., Mitchell, J.P., Court, J., Linnane, S., Mason, M.D., and Tabi, Z. (2008). Human tumor-derived exosomes down-modulate NKG2D expression. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *180*, 7249–7258.
- 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. *Nat. Struct. Biol.* *2*, 321–333.
- Coelho, M.A., de Carné Trécesson, S., Rana, S., Zecchin, D., Moore, C., Molina-Arcas, M., East, P., Spencer-Dene, B., Nye, E., Barnouin, K., et al. (2017). Oncogenic RAS Signaling Promotes Tumor Immuno-resistance by Stabilizing PD-L1 mRNA. *Immunity* *47*, 1083-1099.e6.
- Collison, L.W., Workman, C.J., Kuo, T.T., Boyd, K., Wang, Y., Vignali, K.M., Cross, R., Sehy, D., Blumberg, R.S., and Vignali, D.A.A. (2007). The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature* *450*, 566–569.
- 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. *J. Natl. Cancer Inst.* *108*.
- Cosman, D., Müllberg, J., Sutherland, C.L., Chin, W., Armitage, R., Fanslow, W., Kubin, M., and Chalupny, N.J. (2001). ULBPs, novel MHC class I-related molecules, bind to CMV glycoprotein UL16 and stimulate NK cytotoxicity through the NKG2D receptor. *Immunity* *14*, 123–133.
- Couch, M.E., Ferris, R.L., Brennan, J.A., Koch, W.M., Jaffee, E.M., Leibowitz, M.S., Nepom, G.T., Erlich, H.A., and Sidransky, D. (2007). Alteration of cellular and humoral immunity by mutant p53 protein and processed mutant peptide in head and neck cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *13*, 7199–7206.
- Coudert, J.D., Zimmer, J., Tomasello, E., Cebecauer, M., Colonna, M., Vivier, E., and Held, W. (2005). Altered NKG2D function in NK cells induced by chronic exposure to NKG2D ligand-expressing tumor cells. *Blood* *106*, 1711–1717.
- Coxon, C.H., Geer, M.J., and Senis, Y.A. (2017). ITIM receptors: more than just inhibitors of platelet activation. *Blood* *129*, 3407–3418.
- Crichton, 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.
- Curiel, T.J., Wei, S., Dong, H., Alvarez, X., Cheng, P., Mottram, P., Krzysiek, R., Knutson, K.L., Daniel, B., Zimmermann, M.C., et al. (2003). Blockade of B7-H1 improves myeloid dendritic cell-mediated antitumor immunity. *Nat. Med.* *9*, 562–567.
- Dai, Y., Dent, P., and Grant, S. (2003). Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) promotes mitochondrial dysfunction and apoptosis induced by 7-hydroxystaurosporine and mitogen-activated protein kinase kinase inhibitors in human leukemia cells that ectopically express Bcl-2 and Bcl-xL. *Mol. Pharmacol.* *64*, 1402–1409.
- Damo, M., and Joshi, N.S. (2019). Treg cell IL-10 and IL-35 exhaust CD8+ T cells in tumors. *Nat. Immunol.* *20*, 674–675.
- D’Arcy, M.S. (2019). Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biol. Int.* *43*, 582–592.
- Darvin, P., Toor, S.M., Sasidharan Nair, V., and Elkord, E. (2018). Immune checkpoint inhibitors: recent progress and potential biomarkers. *Exp. Mol. Med.* *50*, 1–11.

- 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. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *76*, 2420–2424.
- Dell’Orso, S., Fontemaggi, G., Stambolsky, P., Goeman, F., Voellenkle, C., Levrero, M., Strano, S., Rotter, V., Oren, M., and Blandino, G. (2011). ChIP-on-chip analysis of in vivo mutant p53 binding to selected gene promoters. *Omics J. Integr. Biol.* *15*, 305–312.
- Delon, J., Kaibuchi, K., and Germain, R.N. (2001). Exclusion of CD43 from the immunological synapse is mediated by phosphorylation-regulated relocation of the cytoskeletal adaptor moesin. *Immunity* *15*, 691–701.
- 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.
- Deng, X., Gao, F., Flagg, T., Anderson, J., and May, W.S. (2006). Bcl2’s flexible loop domain regulates p53 binding and survival. *Mol. Cell. Biol.* *26*, 4421–4434.
- Desagher, S., Osen-Sand, A., Nichols, A., Eskes, R., Montessuit, S., Lauper, S., Maundrell, K., Antonsson, B., and Martinou, J.C. (1999). Bid-induced conformational change of Bax is responsible for mitochondrial cytochrome c release during apoptosis. *J. Cell Biol.* *144*, 891–901.
- Di Agostino, S., Strano, S., Emiliozzi, V., Zerbini, V., Mottolose, M., Sacchi, A., Blandino, G., and Piaggio, G. (2006). Gain of function of mutant p53: the mutant p53/NF-Y protein complex reveals an aberrant transcriptional mechanism of cell cycle regulation. *Cancer Cell* *10*, 191–202.
- Di Agostino, S., Sorrentino, G., Ingallina, E., Valenti, F., Ferraiuolo, M., Bicciato, S., Piazza, S., Strano, S., Del Sal, G., and Blandino, G. (2016). YAP enhances the pro-proliferative transcriptional activity of mutant p53 proteins. *EMBO Rep.* *17*, 188–201.
- Di Santo, J.P., and Vosshenrich, C.A.J. (2006). Bone marrow versus thymic pathways of natural killer cell development. *Immunol. Rev.* *214*, 35–46.
- 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.
- Dikov, M.M., Ohm, J.E., Ray, N., Tchekneva, E.E., Burlison, J., Moghanaki, D., Nadaf, S., and Carbone, D.P. (2005). Differential roles of vascular endothelial growth factor receptors 1 and 2 in dendritic cell differentiation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *174*, 215–222.
- Dolgin, E. (2015). Oncolytic viruses get a boost with first FDA-approval recommendation. *Nat. Rev. Drug Discov.* *14*, 369–371.
- Donatelli, S.S., Zhou, J.-M., Gilvary, D.L., Eksioglu, E.A., Chen, X., Cress, W.D., Haura, E.B., Schabath, M.B., Coppola, D., Wei, S., et al. (2014). TGF- $\beta$ -inducible microRNA-183 silences tumor-associated natural killer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *111*, 4203–4208.
- Dong, H., Zhu, G., Tamada, K., and Chen, L. (1999). B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion. *Nat. Med.* *5*, 1365–1369.
- 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. *Nat. Med.* *8*, 793–800.



- Dong, P., Ihira, K., Hamada, J., Watari, H., Yamada, T., Hosaka, M., Hanley, S.J.B., 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.
- Dong, P., Xiong, Y., Yu, J., Chen, L., Tao, T., Yi, S., Hanley, S.J.B., Yue, J., Watari, H., and Sakuragi, N. (2018). Control of PD-L1 expression by miR-140/142/340/383 and oncogenic activation of the OCT4-miR-18a pathway in cervical cancer. *Oncogene* 37, 5257–5268.
- Dong, Z.-Y., Zhong, W.-Z., Zhang, X.-C., Su, J., Xie, Z., Liu, S.-Y., Tu, H.-Y., Chen, H.-J., Sun, Y.-L., Zhou, Q., et al. (2017). Potential Predictive Value of TP53 and KRAS Mutation Status for Response to PD-1 Blockade Immunotherapy in Lung Adenocarcinoma. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 23, 3012–3024.
- Dooley, H.C., Razi, M., Polson, H.E.J., 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. *Mol. 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 granulysin, perforin and granzymes to kill intracellular parasites. *Nat. Med.* 22, 210–216.
- 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.
- Duan, J., and Nilsson, L. (2006). Effect of Zn<sup>2+</sup> on DNA recognition and stability of the p53 DNA-binding domain. *Biochemistry* 45, 7483–7492.
- Dunn, G.P., Bruce, A.T., Ikeda, H., Old, L.J., and Schreiber, R.D. (2002). Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat. Immunol.* 3, 991–998.
- Dustin, M.L. (2014). The immunological synapse. *Cancer Immunol. Res.* 2, 1023–1033.
- 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.
- Ehrhardt, H., Fulda, S., Schmid, I., Hiscott, J., Debatin, K.-M., and Jeremias, I. (2003). TRAIL induced survival and proliferation in cancer cells resistant towards TRAIL-induced apoptosis mediated by NF-kappaB. *Oncogene* 22, 3842–3852.
- Eickhoff, S., Brewitz, A., Gerner, M.Y., Klauschen, F., Komander, K., Hemmi, H., Garbi, N., Kaisho, T., Germain, R.N., and Kastenmüller, W. (2015). Robust Anti-viral Immunity Requires Multiple Distinct T Cell-Dendritic Cell Interactions. *Cell* 162, 1322–1337.
- Ekkens, M.J., Shedlock, D.J., Jung, E., Troy, A., Pearce, E.L., Shen, H., and Pearce, E.J. (2007). Th1 and Th2 Cells Help CD8 T-Cell Responses. *Infect. Immun.* 75, 2291–2296.
- 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.
- Emamzadah, S., Tropia, L., and Halazonetis, T.D. (2011). Crystal structure of a multidomain human p53 tetramer bound to the natural CDKN1A (p21) p53-response element. *Mol. Cancer Res. MCR* 9, 1493–1499.
- Eskes, R., Desagher, S., Antonsson, B., and Martinou, J.C. (2000). Bid induces the oligomerization and insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane. *Mol. Cell. Biol.* 20, 929–935.

- Ewen, C.L., Kane, K.P., and Bleackley, R.C. (2012). A quarter century of granzymes. *Cell Death Differ.* *19*, 28–35.
- Fader, C.M., Sánchez, D., Furlán, M., and Colombo, M.I. (2008). Induction of autophagy promotes fusion of multivesicular bodies with autophagic vacuoles in k562 cells. *Traffic Cph. Den.* *9*, 230–250.
- Fähling, M., Mrowka, R., Steege, A., Nebrich, G., Perlewitz, A., Persson, P.B., and Thiele, B.J. (2006). Translational control of collagen prolyl 4-hydroxylase- $\alpha$ (I) gene expression under hypoxia. *J. Biol. Chem.* *281*, 26089–26101.
- Fallarino, F., Grohmann, U., Vacca, C., Bianchi, R., Orabona, C., Spreca, A., Fioretti, M.C., and Puccetti, P. (2002). T cell apoptosis by tryptophan catabolism. *Cell Death Differ.* *9*, 1069–1077.
- 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. *Nat. Immunol.* *4*, 145–153.
- Fedoseyeva, E.V., Boisgérault, F., Anosova, N.G., Wollish, W.S., Arlotta, P., Jensen, P.E., Ono, S.J., and Benichou, G. (2000). CD4+ T cell responses to self- and mutated p53 determinants during tumorigenesis in mice. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *164*, 5641–5651.
- 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. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *162*, 4511–4520.
- Feili-Hariri, M., Falkner, D.H., and Morel, P.A. (2005). Polarization of naive T cells into Th1 or Th2 by distinct cytokine-driven murine dendritic cell populations: implications for immunotherapy. *J. Leukoc. Biol.* *78*, 656–664.
- 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., Zhang, H., Levine, A.J., and Jin, S. (2005). The coordinate regulation of the p53 and mTOR pathways in cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 8204–8209.
- 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 Res.* *67*, 3043–3053.
- Fernández-Messina, L., Reyburn, H.T., and Valés-Gómez, M. (2012). Human NKG2D-ligands: cell biology strategies to ensure immune recognition. *Front. Immunol.* *3*, 299.
- Ferrandina, G., Legge, F., Martinelli, E., Ranelletti, F.O., Zannoni, G.F., Lauriola, L., Gessi, M., Gallotta, V., and Scambia, G. (2005). Survivin expression in ovarian cancer and its correlation with clinico-pathological, surgical and apoptosis-related parameters. *Br. J. Cancer* *92*, 271–277.
- Feske, S., Wulff, H., and Skolnik, E.Y. (2015). Ion channels in innate and adaptive immunity. *Annu. Rev. Immunol.* *33*, 291–353.
- Filomeni, G., De Zio, D., and Cecconi, F. (2015). Oxidative stress and autophagy: the clash between damage and metabolic needs. *Cell Death Differ.* *22*, 377–388.
- Finlay, C.A., Hinds, P.W., and Levine, A.J. (1989). The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation. *Cell* *57*, 1083–1093.

- Fiorini, C., Menegazzi, M., Padroni, C., Dando, I., Dalla Pozza, E., Gregorelli, A., Costanzo, C., Palmieri, M., and Donadelli, M. (2013). Autophagy induced by p53-reactivating molecules protects pancreatic cancer cells from apoptosis. *Apoptosis Int. J. Program. Cell Death* *18*, 337–346.
- Flavell, R.A., Sanjabi, S., Wrzesinski, S.H., and Licona-Limón, P. (2010). The polarization of immune cells in the tumour environment by TGFbeta. *Nat. Rev. Immunol.* *10*, 554–567.
- 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.
- Foley, E.J. (1953). Antigenic properties of methylcholanthrene-induced tumors in mice of the strain of origin. *Cancer Res.* *13*, 835–837.
- Fontenot, J.D., Rasmussen, J.P., Gavin, M.A., and Rudensky, A.Y. (2005). A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells. *Nat. Immunol.* *6*, 1142–1151.
- Ford, J.M., and Hanawalt, P.C. (1995). Li-Fraumeni syndrome fibroblasts homozygous for p53 mutations are deficient in global DNA repair but exhibit normal transcription-coupled repair and enhanced UV resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *92*, 8876–8880.
- Fortin, C., Huang, X., and Yang, Y. (2012). NK cell response to vaccinia virus is regulated by myeloid-derived suppressor cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *189*, 1843–1849.
- 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. *Semin. Cell Dev. Biol.* *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. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 3232–3237.
- Freed-Pastor, W.A., and Prives, C. (2012). Mutant p53: one name, many proteins. *Genes Dev.* *26*, 1268–1286.
- Freed-Pastor, W.A., Mizuno, H., Zhao, X., Langerød, A., Moon, S.-H., Rodriguez-Barrueco, R., Barsotti, A., Chicas, A., Li, W., Polotskaia, A., et al. (2012). Mutant p53 disrupts mammary tissue architecture via the mevalonate pathway. *Cell* *148*, 244–258.
- Freeman, G.J., Long, A.J., Iwai, Y., Bourque, K., Chernova, T., Nishimura, H., Fitz, L.J., Malenkovich, N., Okazaki, T., Byrne, M.C., et al. (2000). Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J. Exp. Med.* *192*, 1027–1034.
- Freiberg, B.A., Kupfer, H., Maslanik, W., Delli, J., Kappler, J., Zaller, D.M., and Kupfer, A. (2002). Staging and resetting T cell activation in SMACs. *Nat. Immunol.* *3*, 911–917.
- Fujita, N., Itoh, T., Omori, H., Fukuda, M., Noda, T., and Yoshimori, T. (2008a). The Atg16L complex specifies the site of LC3 lipidation for membrane biogenesis in autophagy. *Mol. Biol. Cell* *19*, 2092–2100.
- Fujita, N., Hayashi-Nishino, M., Fukumoto, H., Omori, H., Yamamoto, A., Noda, T., and Yoshimori, T. (2008b). An Atg4B mutant hampers the lipidation of LC3 paralogues and causes defects in autophagosome closure. *Mol. Biol. Cell* *19*, 4651–4659.
- Fujita, Y., Yagishita, S., Hagiwara, K., Yoshioka, Y., Kosaka, N., Takeshita, F., Fujiwara, T., Tsuta, K., Nokihara, H., Tamura, T., et al. (2015). The clinical relevance of the miR-197/CKS1B/STAT3-mediated PD-L1 network in chemoresistant non-small-cell lung cancer. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* *23*, 717–727.

- Fujiwara, T., Cai, D.W., Georges, R.N., Mukhopadhyay, T., Grimm, E.A., and Roth, J.A. (1994). Therapeutic effect of a retroviral wild-type p53 expression vector in an orthotopic lung cancer model. *J. Natl. Cancer Inst.* *86*, 1458–1462.
- Funderburk, S.F., Wang, Q.J., and Yue, Z. (2010). The Beclin 1-VPS34 complex--at the crossroads of autophagy and beyond. *Trends Cell Biol.* *20*, 355–362.
- Gabrilovich, D., Ishida, T., Oyama, T., Ran, S., Kravtsov, V., Nadaf, S., and Carbone, D.P. (1998). Vascular endothelial growth factor inhibits the development of dendritic cells and dramatically affects the differentiation of multiple hematopoietic lineages in vivo. *Blood* *92*, 4150–4166.
- Gabrilovich, D.I., Chen, H.L., Girgis, K.R., Cunningham, H.T., Meny, G.M., Nadaf, S., Kavanaugh, D., and Carbone, D.P. (1996). Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells. *Nat. Med.* *2*, 1096–1103.
- Gaiddon, C., Lokshin, M., Ahn, J., Zhang, T., and Prives, C. (2001). A subset of tumor-derived mutant forms of p53 down-regulate p63 and p73 through a direct interaction with the p53 core domain. *Mol. Cell. Biol.* *21*, 1874–1887.
- 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 Differ.* *18*, 1598–1607.
- Garufi, A., Pistrutto, G., Cirone, M., and D’Orazi, G. (2016). Reactivation of mutant p53 by capsaicin, the major constituent of peppers. *J. Exp. Clin. Cancer Res. CR* *35*, 136.
- Gasser, S., Orsulic, S., Brown, E.J., and Raulet, D.H. (2005). The DNA damage pathway regulates innate immune system ligands of the NKG2D receptor. *Nature* *436*, 1186–1190.
- Gattoni-Celli, S., Kirsch, K., Timpane, R., and Isselbacher, K.J. (1992). Beta 2-microglobulin gene is mutated in a human colon cancer cell line (HCT) deficient in the expression of HLA class I antigens on the cell surface. *Cancer Res.* *52*, 1201–1204.
- Ghiotto, M., Gauthier, L., Serriari, N., Pastor, S., Truneh, A., Nunès, J.A., and Olive, D. (2010). PD-L1 and PD-L2 differ in their molecular mechanisms of interaction with PD-1. *Int. Immunol.* *22*, 651–660.
- Giaccia, A.J., and Kastan, M.B. (1998). The complexity of p53 modulation: emerging patterns from divergent signals. *Genes Dev.* *12*, 2973–2983.
- Ginisty, H., Sicard, H., Roger, B., and Bouvet, P. (1999). Structure and functions of nucleolin. *J. Cell Sci.* *112 ( Pt 6)*, 761–772.
- Giurisato, E., Cella, M., Takai, T., Kurosaki, T., Feng, Y., Longmore, G.D., Colonna, M., and Shaw, A.S. (2007). Phosphatidylinositol 3-kinase activation is required to form the NKG2D immunological synapse. *Mol. Cell. Biol.* *27*, 8583–8599.
- Glimcher, L.H., Townsend, M.J., Sullivan, B.M., and Lord, G.M. (2004). Recent developments in the transcriptional regulation of cytolytic effector cells. *Nat. Rev. Immunol.* *4*, 900–911.
- Gondek, D.C., Lu, L.-F., Quezada, S.A., Sakaguchi, S., and Noelle, R.J. (2005). Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4+CD25+ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *174*, 1783–1786.
- Gong, A.-Y., Zhou, R., Hu, G., Li, X., Splinter, P.L., O’Hara, S.P., LaRusso, N.F., Soukup, G.A., Dong, H., and Chen, X.-M. (2009). MicroRNA-513 regulates B7-H1 translation and is involved in IFN-gamma-induced B7-H1 expression in cholangiocytes. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *182*, 1325–1333.

- Goodall, M.L., Fitzwalter, B.E., Zahedi, S., Wu, M., Rodriguez, D., Mulcahy-Levy, J.M., Green, D.R., Morgan, M., Cramer, S.D., and Thorburn, A. (2016). The Autophagy Machinery Controls Cell Death Switching between Apoptosis and Necroptosis. *Dev. Cell* 37, 337–349.
- Goping, I.S., Barry, M., Liston, P., Sawchuk, T., Constantinescu, G., Michalak, K.M., Shostak, I., Roberts, D.L., Hunter, A.M., Korneluk, R., et al. (2003). Granzyme B-induced apoptosis requires both direct caspase activation and relief of caspase inhibition. *Immunity* 18, 355–365.
- Gorelik, L., and Flavell, R.A. (2001). Immune-mediated eradication of tumors through the blockade of transforming growth factor-beta signaling in T cells. *Nat. Med.* 7, 1118–1122.
- Gorgoulis, V.G., Zacharatos, P., Kotsinas, A., Kletsas, D., Mariatos, G., Zoumpourlis, V., Ryan, K.M., Kitas, C., and Papavassiliou, A.G. (2003). p53 activates ICAM-1 (CD54) expression in an NF- $\kappa$ B-independent manner. *EMBO J.* 22, 1567–1578.
- Gourley, C., Gabra, H., Vergote, I., Basu, B., Brenton, J., Von Euler, M., Björklund, U., Smith, A.M., and Green, J. (2015). EUTROC PISARRO: A phase Ib study combining APR-246 with standard chemotherapy in platinum sensitive relapsed high grade serous ovarian carcinoma (HGSOC). *J. Clin. Oncol.* 33, TPS5605–TPS5605.
- Gourley, C., Green, J., Gabra, H., Vergote, I., Basu, B., Brenton, J.D., Björklund, U., Smith, A.M., and Von Euler, M. (2016). PISARRO: A EUTROC phase Ib study of APR-246 in combination with carboplatin (C) and pegylated liposomal doxorubicin (PLD) in platinum sensitive relapsed high grade serous ovarian cancer (HGSOC). *J. Clin. Oncol.* 34, 5571–5571.
- Gowrishankar, K., Gunatilake, D., Gallagher, S.J., Tiffen, J., Rizos, H., and Hersey, P. (2015). Inducible but not constitutive expression of PD-L1 in human melanoma cells is dependent on activation of NF- $\kappa$ B. *PLoS One* 10, e0123410.
- Goyal, L., Wadlow, R.C., Blaszkowsky, L.S., Wolpin, B.M., Abrams, T.A., McCleary, N.J., Sheehan, S., Sundaram, E., Karol, M.D., Chen, J., et al. (2015). A phase I and pharmacokinetic study of ganetespib (STA-9090) in advanced hepatocellular carcinoma. *Invest. New Drugs* 33, 128–137.
- 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? *J. Clin. Invest.* 115, 2610–2617.
- Gregory, C.D., Murray, R.J., Edwards, C.F., and Rickinson, A.B. (1988). Downregulation of cell adhesion molecules LFA-3 and ICAM-1 in Epstein-Barr virus-positive Burkitt's lymphoma underlies tumor cell escape from virus-specific T cell surveillance. *J. Exp. Med.* 167, 1811–1824.
- Grimshaw, M.J., Naylor, S., and Balkwill, F.R. (2002). Endothelin-2 is a hypoxia-induced autocrine survival factor for breast tumor cells. *Mol. Cancer Ther.* 1, 1273–1281.
- Grivnenkov, S.I., Wang, K., Mucida, D., Stewart, C.A., Schnabl, B., Jauch, D., Taniguchi, K., Yu, G.-Y., Osterreicher, C.H., Hung, K.E., et al. (2012). Adenoma-linked barrier defects and microbial products drive IL-23/IL-17-mediated tumour growth. *Nature* 491, 254–258.
- Groh, V., Wu, J., Yee, C., and Spies, T. (2002). Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation. *Nature* 419, 734–738.
- Grujic, M., Braga, T., Lukinius, A., Eloranta, M.-L., Knight, S.D., Pejler, G., and Abrink, M. (2005). Ser-glycin-deficient cytotoxic T lymphocytes display defective secretory granule maturation and granzyme B storage. *J. Biol. Chem.* 280, 33411–33418.

- Gu, H., Wang, X., Rao, S., Wang, J., Zhao, J., Ren, F.L., Mu, R., Yang, Y., Qi, Q., Liu, W., et al. (2008). Gambogic acid mediates apoptosis as a p53 inducer through down-regulation of mdm2 in wild-type p53-expressing cancer cells. *Mol. Cancer Ther.* 7, 3298–3305.
- Gu, J., Kawai, H., Nie, L., Kitao, H., Wiederschain, D., Jochemsen, A.G., Parant, J., Lozano, G., and Yuan, Z.-M. (2002). Mutual dependence of MDM2 and MDMX in their functional inactivation of p53. *J. Biol. Chem.* 277, 19251–19254.
- Guo, J., Qu, H., Shan, T., Chen, Y., Chen, Y., and Xia, J. (2018). Tristetraprolin Overexpression in Gastric Cancer Cells Suppresses PD-L1 Expression and Inhibits Tumor Progression by Enhancing Antitumor Immunity. *Mol. Cells* 41, 653–664.
- Guo, Y., Chen, J., Zhao, T., and Fan, Z. (2008). Granzyme K degrades the redox/DNA repair enzyme Ape1 to trigger oxidative stress of target cells leading to cytotoxicity. *Mol. Immunol.* 45, 2225–2235.
- Gupta, A., Shah, K., Oza, M.J., and Behl, T. (2019). Reactivation of p53 gene by MDM2 inhibitors: A novel therapy for cancer treatment. *Biomed. Pharmacother. Biomedecine Pharmacother.* 109, 484–492.
- Gurpinar, E., and Vousden, K.H. (2015). Hitting cancers' weak spots: vulnerabilities imposed by p53 mutation. *Trends Cell Biol.* 25, 486–495.
- Haase, C., Jørgensen, T.N., and Michelsen, B.K. (2002). Both exogenous and endogenous interleukin-10 affects the maturation of bone-marrow-derived dendritic cells in vitro and strongly influences T-cell priming in vivo. *Immunology* 107, 489–499.
- 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. *J. Biol. Chem.* 285, 3439–3450.
- Hamada, M., Fujiwara, T., Hizuta, A., Gochi, A., Naomoto, Y., Takakura, N., Takahashi, K., Roth, J.A., Tanaka, N., and Orita, K. (1996). The p53 gene is a potent determinant of chemosensitivity and radiosensitivity in gastric and colorectal cancers. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 122, 360–365.
- 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.
- Hamid, O., Robert, C., Daud, A., Hodi, F.S., Hwu, W.-J., Kefford, R., Wolchok, J.D., Hersey, P., Joseph, R.W., Weber, J.S., et al. (2013). Safety and tumor responses with lambrolizumab (anti-PD-1) in melanoma. *N. Engl. J. Med.* 369, 134–144.
- Han, J., Goldstein, L.A., Gastman, B.R., Froelich, C.J., Yin, X.-M., and Rabinowich, H. (2004). Degradation of Mcl-1 by granzyme B: implications for Bim-mediated mitochondrial apoptotic events. *J. Biol. Chem.* 279, 22020–22029.
- Han, J., Goldstein, L.A., Gastman, B.R., Rabinovitz, A., and Rabinowich, H. (2005). Disruption of Mcl-1.Bim complex in granzyme B-mediated mitochondrial apoptosis. *J. Biol. Chem.* 280, 16383–16392.
- Han, J., Goldstein, L.A., Hou, W., Froelich, C.J., Watkins, S.C., and Rabinowich, H. (2010a). Deregulation of mitochondrial membrane potential by mitochondrial insertion of granzyme B and direct Hax-1 cleavage. *J. Biol. Chem.* 285, 22461–22472.
- Han, J., Goldstein, L.A., Hou, W., Gastman, B.R., and Rabinowich, H. (2010b). Regulation of mitochondrial apoptotic events by p53-mediated disruption of complexes between antiapoptotic Bcl-2 members and Bim. *J. Biol. Chem.* 285, 22473–22483.
- Hardie, D.G. (2007). AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 774–785.

- Harizi, H. (2013). Reciprocal crosstalk between dendritic cells and natural killer cells under the effects of PGE2 in immunity and immunopathology. *Cell. Mol. Immunol.* *10*, 213–221.
- 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. *J. Biol. Chem.* *283*, 9999–10014.
- Haupt, Y., Maya, R., Kazaz, A., and Oren, M. (1997). Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature* *387*, 296–299.
- He, T., Guo, J., Song, H., Zhu, H., Di, X., Min, H., Wang, Y., Chen, G., Dai, W., Ma, J., et al. (2018). Nutlin-3, an Antagonist of MDM2, Enhances the Radiosensitivity of Esophageal Squamous Cancer with Wild-Type p53. *Pathol. Oncol. Res. POR* *24*, 75–81.
- 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. *J. Exp. Med.* *192*, 1391–1402.
- Heinemann, A., Zhao, F., Pechlivanis, S., Eberle, J., Steinle, A., Diederichs, S., Schadendorf, D., and Paschen, A. (2012). Tumor suppressive microRNAs miR-34a/c control cancer cell expression of ULBP2, a stress-induced ligand of the natural killer cell receptor NKG2D. *Cancer Res.* *72*, 460–471.
- Heise, C., Lemmon, M., and Kim, D. (2000). Efficacy with a replication-selective adenovirus plus cisplatin-based chemotherapy: dependence on sequencing but not p53 functional status or route of administration. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *6*, 4908–4914.
- Hermeking, H. (2012). MicroRNAs in the p53 network: micromanagement of tumour suppression. *Nat. Rev. Cancer* *12*, 613–626.
- Hildebrand, D., Bode, K.A., Rieß, D., Cerny, D., Waldhuber, A., Römmler, F., Strack, J., Korten, S., Orth, J.H.C., Miethke, T., et al. (2014). Granzyme A produces bioactive IL-1 $\beta$  through a nonapoptotic inflammasome-independent pathway. *Cell Rep.* *9*, 910–917.
- Hinshaw, D.C., and Shevde, L.A. (2019). The Tumor Microenvironment Innately Modulates Cancer Progression. *Cancer Res.* *79*, 4557–4566.
- 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.
- Hirao, M., Onai, N., Hiroishi, K., Watkins, S.C., Matsushima, K., Robbins, P.D., Lotze, M.T., and Tahara, H. (2000). CC chemokine receptor-7 on dendritic cells is induced after interaction with apoptotic tumor cells: critical role in migration from the tumor site to draining lymph nodes. *Cancer Res.* *60*, 2209–2217.
- Hodi, F.S., O’Day, S.J., McDermott, D.F., Weber, R.W., Sosman, J.A., Haanen, J.B., Gonzalez, R., Robert, C., Schadendorf, D., Hassel, J.C., et al. (2010). Improved Survival with Ipilimumab in Patients with Metastatic Melanoma. *N. Engl. J. Med.* *363*, 711–723.
- Hogan, P.G., Chen, L., Nardone, J., and Rao, A. (2003). Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT. *Genes Dev.* *17*, 2205–2232.
- 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. *Nat. Genet.* *23*, 176–184.
- Hong, B., Prabhu, V.V., Zhang, S., van den Heuvel, A.P.J., Dicker, D.T., Kopelovich, L., and El-Deiry, W.S. (2014). Prodigiosin rescues deficient p53 signaling and antitumor effects via upregulating p73 and disrupting its interaction with mutant p53. *Cancer Res.* *74*, 1153–1165.

- 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 Differ.* *10*, 356–364.
- Horio, Y., Takahashi, T., Kuroishi, T., Hibi, K., Suyama, M., Niimi, T., Shimokata, K., Yamakawa, K., Nakamura, Y., and Ueda, R. (1993). Prognostic significance of p53 mutations and 3p deletions in primary resected non-small cell lung cancer. *Cancer Res.* *53*, 1–4.
- Houbiers, J.G., van der Burg, S.H., van de Watering, L.M., Tollenaar, R.A., Brand, A., van de Velde, C.J., and Melief, C.J. (1995). Antibodies against p53 are associated with poor prognosis of colorectal cancer. *Br. J. Cancer* *72*, 637–641.
- Hua, G., Wang, S., Zhong, C., Xue, P., and Fan, Z. (2009). Ignition of p53 bomb sensitizes tumor cells to granzyme K-mediated cytotoxicity. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *182*, 2152–2159.
- Huang, D.C., and Strasser, A. (2000). BH3-Only proteins-essential initiators of apoptotic cell death. *Cell* *103*, 839–842.
- Huang, B., Pan, P.-Y., Li, Q., Sato, A.I., Levy, D.E., Bromberg, J., Divino, C.M., and Chen, S.-H. (2006). Gr-1+CD115+ immature myeloid suppressor cells mediate the development of tumor-induced T regulatory cells and T-cell anergy in tumor-bearing host. *Cancer Res.* *66*, 1123–1131.
- Huang, K., O'Neill, K.L., Li, J., Zhou, W., Han, N., Pang, X., Wu, W., Struble, L., Borgstahl, G., Liu, Z., et al. (2019). BH3-only proteins target BCL-xL/MCL-1, not BAX/BAK, to initiate apoptosis. *Cell Res.* *29*, 942–952.
- Huang, X., Zhang, Y., Tang, Y., Butler, N., Kim, J., Guessous, F., Schiff, D., Mandell, J., and Abounader, R. (2013). A novel PTEN/mutant p53/c-Myc/Bcl-XL axis mediates context-dependent oncogenic effects of PTEN with implications for cancer prognosis and therapy. *Neoplasia N. Y. N* *15*, 952–965.
- Huang, Y., Yu, P., Li, W., Ren, G., Roberts, A.I., Cao, W., Zhang, X., Su, J., Chen, X., Chen, Q., et al. (2014). p53 regulates mesenchymal stem cell-mediated tumor suppression in a tumor microenvironment through immune modulation. *Oncogene* *33*, 3830–3838.
- Hwang, C.-I., Matoso, A., Corney, D.C., Flesken-Nikitin, A., Körner, S., Wang, W., Boccaccio, C., Thorgeirsson, S.S., Comoglio, P.M., Hermeking, H., et al. (2011). Wild-type p53 controls cell motility and invasion by dual regulation of MET expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 14240–14245.
- Inoki, K., and Guan, K.-L. (2006). Complexity of the TOR signaling network. *Trends Cell Biol.* *16*, 206–212.
- Irmler, M., Hertig, S., MacDonald, H.R., Sadoul, R., Becherer, J.D., Proudfoot, A., Solari, R., and Tschopp, J. (1995). Granzyme A is an interleukin 1 beta-converting enzyme. *J. Exp. Med.* *181*, 1917–1922.
- Itakura, E., and Mizushima, N. (2010). Characterization of autophagosome formation site by a hierarchical analysis of mammalian Atg proteins. *Autophagy* *6*, 764–776.
- Itakura, E., Kishi-Itakura, C., and Mizushima, N. (2012). The hairpin-type tail-anchored SNARE syntaxin 17 targets to autophagosomes for fusion with endosomes/lysosomes. *Cell* *151*, 1256–1269.
- Ivanov, P., Kedersha, N., and Anderson, P. (2019). Stress Granules and Processing Bodies in Translational Control. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *11*.
- Jäättelä, M., Benedict, M., Tewari, M., Shayman, J.A., and Dixit, V.M. (1995). Bcl-x and Bcl-2 inhibit TNF and Fas-induced apoptosis and activation of phospholipase A2 in breast carcinoma cells. *Oncogene* *10*, 2297–2305.



- 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. *Eur. J. Immunol.* *31*, 3121–3127.
- Jacquemin, G., Margiotta, D., Kasahara, A., Basso, E.Y., Walch, M., Thiery, J., Lieberman, J., and Martinvalet, D. (2015). Granzyme B-induced mitochondrial ROS are required for apoptosis. *Cell Death Differ.* *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 Cph. Den.* *9*, 574–587.
- 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.
- Jenne, D.E., and Tschopp, J. (1988). Granzymes, a family of serine proteases released from granules of cytolytic T lymphocytes upon T cell receptor stimulation. *Immunol. Rev.* *103*, 53–71.
- Jhaveri, K., Chandarlapaty, S., Lake, D., Gilewski, T., Robson, M., Goldfarb, S., Drullinsky, P., Sugarman, S., Wasserheit-Leiblich, C., Fasano, J., et al. (2014). A phase II open-label study of ganetespib, a novel heat shock protein 90 inhibitor for patients with metastatic breast cancer. *Clin. Breast Cancer* *14*, 154–160.
- Ji, L., Xu, J., Liu, J., Amjad, A., Zhang, K., Liu, Q., Zhou, L., Xiao, J., and Li, X. (2015). Mutant p53 promotes tumor cell malignancy by both positive and negative regulation of the transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) pathway. *J. Biol. Chem.* *290*, 11729–11740.
- Jia, L., Xi, Q., Wang, H., Zhang, Z., Liu, H., Cheng, Y., Guo, X., Zhang, J., Zhang, Q., Zhang, L., et al. (2017). miR-142-5p regulates tumor cell PD-L1 expression and enhances anti-tumor immunity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *488*, 425–431.
- Jiang, T., Shi, T., Zhang, H., Hu, J., Song, Y., Wei, J., Ren, S., and Zhou, C. (2019). Tumor neoantigens: from basic research to clinical applications. *J. Hematol. Oncol.* *12*, 93.
- Jiao, S., Kameda, K., Matsuzawa, Y., Kubo, M., Nonaka, K., and Tarui, S. (1986). Influence of endogenous hyperinsulinism on high density lipoprotein2 level in type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus and impaired glucose tolerance. *Atherosclerosis* *60*, 279–286.
- Jj, L., De, B., M, K., Mh, H., C, L., T, L., and Cb, T. (2005). Growth Factor Regulation of Autophagy and Cell Survival in the Absence of Apoptosis (Cell).
- Joerger, A.C., Ang, H.C., and Fersht, A.R. (2006). Structural basis for understanding oncogenic p53 mutations and designing rescue drugs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 15056–15061.
- Jürgensmeier, J.M., Xie, Z., Deveraux, Q., Ellerby, L., Bredesen, D., and Reed, J.C. (1998). Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *95*, 4997–5002.
- Kaech, S.M., Wherry, E.J., and Ahmed, R. (2002). Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development. *Nat. Rev. Immunol.* *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. *Mol. Biol. 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.

- Kägi, D., Ledermann, B., Bürki, K., Seiler, P., Odermatt, B., Olsen, K.J., Podack, E.R., Zinkernagel, R.M., and Hengartner, H. (1994). Cytotoxicity mediated by T cells and natural killer cells is greatly impaired in perforin-deficient mice. *Nature* 369, 31–37.
- Kaiser, A.M., and Attardi, L.D. (2018). Deconstructing networks of p53-mediated tumor suppression in vivo. *Cell Death Differ.* 25, 93–103.
- 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. *J. Cell Biol.* 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.
- Kao, S.C., Cheng, Y.Y., Williams, M., Kirschner, M.B., Madore, J., Lum, T., Sarun, K.H., Linton, A., McCaughan, B., Klebe, S., et al. (2017). Tumor Suppressor microRNAs Contribute to the Regulation of PD-L1 Expression in Malignant Pleural Mesothelioma. *J. Thorac. Oncol. Off. Publ. Int. Assoc. Study Lung Cancer* 12, 1421–1433.
- Kärre, K., Ljunggren, H.G., Piontek, G., and Kiessling, R. (1986). Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy. *Nature* 319, 675–678.
- Kastan, M.B., Zhan, Q., el-Deiry, W.S., Carrier, F., Jacks, T., Walsh, W.V., Plunkett, B.S., Vogelstein, B., and Fornace, A.J. (1992). A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-telangiectasia. *Cell* 71, 587–597.
- Kastenhuber, E.R., and Lowe, S.W. (2017). Putting p53 in Context. *Cell* 170, 1062–1078.
- Kataoka, T., Schröter, 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. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 161, 3936–3942.
- Kawasaki, Y., Saito, T., Shiota-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. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 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.
- Keir, M.E., Butte, M.J., Freeman, G.J., and Sharpe, A.H. (2008). PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu. Rev. Immunol.* 26, 677–704.
- 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. *J. Biol. Chem.* 279, 22236–22242.
- Kennedy, R., and Celis, E. (2008). Multiple roles for CD4+ T cells in anti-tumor immune responses. *Immunol. Rev.* 222, 129–144.
- Kenter, G.G., Welters, M.J.P., Valentijn, A.R.P.M., Lowik, M.J.G., Berends-van der Meer, D.M.A., Vloon, A.P.G., Essahsah, F., Fathors, L.M., Offringa, R., Drijfhout, J.W., et al. (2009). Vaccination against HPV-16 oncoproteins for vulvar intraepithelial neoplasia. *N. Engl. J. Med.* 361, 1838–1847.
- Kenzelmann Broz, D., Spano Mello, S., Biegging, 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 Dev.* 27, 1016–1031.

- Kern, S.E., Kinzler, K.W., Bruskin, A., Jarosz, D., Friedman, P., Prives, C., and Vogelstein, B. (1991). Identification of p53 as a sequence-specific DNA-binding protein. *Science* 252, 1708–1711.
- Kern, S.E., Pietenpol, J.A., Thiagalingam, S., Seymour, A., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (1992). Oncogenic forms of p53 inhibit p53-regulated gene expression. *Science* 256, 827–830.
- Khaminets, A., Behl, C., and Dikic, I. (2016). Ubiquitin-Dependent And Independent Signals In Selective Autophagy. *Trends Cell Biol.* 26, 6–16.
- Kholoussi, N.M., El-Nabi, S.E.H., Esmail, N.N., Abd El-Bary, N.M., and El-Kased, A.F. (2014). Evaluation of Bax and Bak Gene Mutations and Expression in Breast Cancer. *BioMed Res. Int.* 2014.
- Khoury, M.P., and Bourdon, J.-C. (2010). The isoforms of the p53 protein. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2, a000927.
- Kiessling, R., Klein, E., Pross, H., and Wigzell, H. (1975). “Natural” killer cells in the mouse. II. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Characteristics of the killer cell. *Eur. J. Immunol.* 5, 117–121.
- Kim, M.P., and Lozano, G. (2018). Mutant p53 partners in crime. *Cell Death Differ.* 25, 161–168.
- Kim, J., Kundu, M., Viollet, B., and Guan, K.-L. (2011). AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat. Cell Biol.* 13, 132–141.
- Kim, M.M., Wiederschain, D., Kennedy, D., Hansen, E., and Yuan, Z.-M. (2007). Modulation of p53 and MDM2 activity by novel interaction with Ras-GAP binding proteins (G3BP). *Oncogene* 26, 4209–4215.
- Kimura, S., Noda, T., and Yoshimori, T. (2008). Dynein-dependent movement of autophagosomes mediates efficient encounters with lysosomes. *Cell Struct. Funct.* 33, 109–122.
- Kiss, B., Skuginna, V., Fleischmann, A., Bell, R.H., Collins, C., Thalmann, G.N., and Seiler, R. (2015). Bcl-2 predicts response to neoadjuvant chemotherapy and is overexpressed in lymph node metastases of urothelial cancer of the bladder. *Urol. Oncol.* 33, 166.e1-8.
- Kluck, R.M., Bossy-Wetzler, E., Green, D.R., and Newmeyer, D.D. (1997). The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* 275, 1132–1136.
- Knights, C.D., Catania, J., Di Giovanni, S., Muratoglu, S., Perez, R., Swartzbeck, A., Quong, A.A., Zhang, X., Beerman, T., Pestell, R.G., et al. (2006). Distinct p53 acetylation cassettes differentially influence gene-expression patterns and cell fate. *J. Cell Biol.* 173, 533–544.
- Kobie, J.J., Shah, P.R., Yang, L., Rebhahn, J.A., Fowell, D.J., and Mosmann, T.R. (2006). T regulatory and primed uncommitted CD4 T cells express CD73, which suppresses effector CD4 T cells by converting 5'-adenosine monophosphate to adenosine. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 177, 6780–6786.
- Köchler, R., Hu, X.W., Chan, E.Y.W., and Tooze, S.A. (2006). Microtubules facilitate autophagosome formation and fusion of autophagosomes with endosomes. *Traffic Cph. Den.* 7, 129–145.
- Kong, L., Zhou, Y., Bu, H., Lv, T., Shi, Y., and Yang, J. (2016). Deletion of interleukin-6 in monocytes/macrophages suppresses the initiation of hepatocellular carcinoma in mice. *J. Exp. Clin. Cancer Res. CR* 35, 131.
- 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. *Br. J. 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. *J. Mol. Model.* 19, 5545–5559.

- Kravchenko, J.E., Ilyinskaya, G.V., Komarov, P.G., Agapova, L.S., Kochetkov, D.V., Strom, E., Frolova, E.I., Kovriga, I., Gudkov, A.V., Feinstein, E., et al. (2008). Small-molecule RETRA suppresses mutant p53-bearing cancer cells through a p73-dependent salvage pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 6302–6307.
- Krayem, M., Journe, F., Wiedig, M., Morandini, R., Najem, A., Salès, F., van Kempen, L.C., Sibille, C., Awada, A., Marine, J.-C., et al. (2016). p53 Reactivation by PRIMA-1(Met) (APR-246) sensitises (V600E/K)BRAF melanoma to vemurafenib. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl.* *1990* *55*, 98–110.
- Kress, M., May, E., Cassingena, R., and May, P. (1979). Simian virus 40-transformed cells express new species of proteins precipitable by anti-simian virus 40 tumor serum. *J. Virol.* *31*, 472–483.
- Kroemer, G., Galluzzi, L., Kepp, O., and Zitvogel, L. (2013). Immunogenic cell death in cancer therapy. *Annu. Rev. Immunol.* *31*, 51–72.
- Krzewski, K., Gil-Krzewska, A., Watts, J., Stern, J.N.H., and Strominger, J.L. (2011). VAMP4- and VAMP7-expressing vesicles are both required for cytotoxic granule exocytosis in NK cells. *Eur. J. Immunol.* *41*, 3323–3329.
- Kubbutat, M.H., Jones, S.N., and Vousden, K.H. (1997). Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature* *387*, 299–303.
- Laidlaw, B.J., Craft, J.E., and Kaech, S.M. (2016). The multifaceted role of CD4(+) T cells in CD8(+) T cell memory. *Nat. Rev. Immunol.* *16*, 102–111.
- Lamb, P., and Crawford, L. (1986). Characterization of the human p53 gene. *Mol. Cell. Biol.* *6*, 1379–1385.
- Lamb, C.A., Yoshimori, T., and Tooze, S.A. (2013). The autophagosome: origins unknown, biogenesis complex. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *14*, 759–774.
- Lambert, J.M.R., Gorzov, P., Veprintsev, D.B., Söderqvist, M., Segerbäck, D., Bergman, J., Fersht, A.R., Hainaut, P., Wiman, K.G., and Bykov, V.J.N. (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.
- Lane, D.P., Cheok, C.F., and Lain, S. (2010). p53-based cancer therapy. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *2*, a001222.
- Laouar, Y., Sutterwala, F.S., Gorelik, L., and Flavell, R.A. (2005). Transforming growth factor-beta controls T helper type 1 cell development through regulation of natural killer cell interferon-gamma. *Nat. Immunol.* *6*, 600–607.
- Larkin, J., Chiarion-Sileni, V., Gonzalez, R., Grob, J.J., Cowey, C.L., Lao, C.D., Schadendorf, D., Dummer, R., Smylie, M., Rutkowski, P., et al. (2015). Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Previously Untreated Melanoma. *N. Engl. J. Med.* *373*, 23–34.
- Latchman, Y., Wood, C.R., Chernova, T., Chaudhary, D., Borde, M., Chernova, I., Iwai, Y., Long, A.J., Brown, J.A., Nunes, R., et al. (2001). PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nat. Immunol.* *2*, 261–268.
- Law, R.H.P., Lukyanova, 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 Floch, A., Jalil, A., Franciszkiewicz, K., Validire, P., Vergnon, I., and Mami-Chouaib, F. (2011). Minimal engagement of CD103 on cytotoxic T lymphocytes with an E-cadherin-Fc molecule triggers lytic granule polarization via a phospholipase Cgamma-dependent pathway. *Cancer Res.* *71*, 328–338.
- Lee, J.M., and Bernstein, A. (1993). p53 mutations increase resistance to ionizing radiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *90*, 5742–5746.
- Lehmann, S., Bykov, V.J.N., Ali, D., Andr n, O., Cherif, H., Tidefelt, U., Uggl , 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. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *30*, 3633–3639.
- Lelis, F.J.N., Jaufmann, J., Singh, A., Fromm, K., Teschner, A.C., P schel, S., Sch fer, I., Beer-Hammer, S., Rieber, N., and Hartl, D. (2017). Myeloid-derived suppressor cells modulate B-cell responses. *Immunol. Lett.* *188*, 108–115.
- Leu, J.I.-J., Dumont, P., Hafey, M., Murphy, M.E., and George, D.L. (2004). Mitochondrial p53 activates Bak and causes disruption of a Bak-Mcl1 complex. *Nat. Cell Biol.* *6*, 443–450.
- Levine, A.J., and Oren, M. (2009). The first 30 years of p53: growing ever more complex. *Nat. Rev. Cancer* *9*, 749–758.
- Levine, B., and Kroemer, G. (2008). Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell* *132*, 27–42.
- Levrero, 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 Differ.* *6*, 1146–1153.
- Levy, J.M.M., Towers, C.G., and Thorburn, A. (2017). Targeting autophagy in cancer. *Nat. Rev. Cancer* *17*, 528–542.
- Li, Q., and Lozano, G. (2013). Molecular pathways: targeting Mdm2 and Mdm4 in cancer therapy. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *19*, 34–41.
- Li, D., Marchenko, N.D., Schulz, R., Fischer, V., Velasco-Hernandez, T., Talos, F., and Moll, U.M. (2011a). Functional inactivation of endogenous MDM2 and CHIP by HSP90 causes aberrant stabilization of mutant p53 in human cancer cells. *Mol. Cancer Res. MCR* *9*, 577–588.
- Li, D., Marchenko, N.D., and Moll, U.M. (2011b). SAHA shows preferential cytotoxicity in mutant p53 cancer cells by destabilizing mutant p53 through inhibition of the HDAC6-Hsp90 chaperone axis. *Cell Death Differ.* *18*, 1904–1913.
- Li, H., Lakshmikanth, T., Garofalo, C., Enge, M., Spinnler, C., Anichini, A., Szekely, L., K rre, K., Carbone, E., and Selivanova, G. (2011c). Pharmacological activation of p53 triggers anticancer innate immune response through induction of ULBP2. *Cell Cycle Georget. Tex* *10*, 3346–3358.
- Li, L., Tan, J., Miao, Y., Lei, P., and Zhang, Q. (2015). ROS and Autophagy: Interactions and Molecular Regulatory Mechanisms. *Cell. Mol. Neurobiol.* *35*, 615–621.
- Li, T., Yang, Y., Hua, X., Wang, G., Liu, W., Jia, C., Tai, Y., Zhang, Q., and Chen, G. (2012). Hepatocellular carcinoma-associated fibroblasts trigger NK cell dysfunction via PGE2 and IDO. *Cancer Lett.* *318*, 154–161.

- Li, T., Yi, S., Liu, W., Jia, C., Wang, G., Hua, X., Tai, Y., Zhang, Q., and Chen, G. (2013). Colorectal carcinoma-derived fibroblasts modulate natural killer cell phenotype and antitumor cytotoxicity. *Med. Oncol. Northwood Lond. Engl.* *30*, 663.
- Li, Y.-L., Zhao, H., and Ren, X.-B. (2016). Relationship of VEGF/VEGFR with immune and cancer cells: staggering or forward? *Cancer Biol. Med.* *13*, 206–214.
- Linares, L.K., Hengstermann, A., Ciechanover, A., Müller, S., and Scheffner, M. (2003). HdmX stimulates Hdm2-mediated ubiquitination and degradation of p53. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 12009–12014.
- Lindau, D., Gielen, P., Kroesen, M., Wesseling, P., and Adema, G.J. (2013). The immunosuppressive tumour network: myeloid-derived suppressor cells, regulatory T cells and natural killer T cells. *Immunology* *138*, 105–115.
- Lindemann, D., Steffen, I., and Pöhlmann, S. (2013). Cellular entry of retroviruses. *Adv. Exp. Med. Biol.* *790*, 128–149.
- 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. *Mol. Cell* *6*, 1389–1399.
- Lindström, 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.
- Liu, X., and Marmorstein, R. (2006). When viral oncoprotein meets tumor suppressor: a structural view. *Genes Dev.* *20*, 2332–2337.
- Liu, D.S., Duong, C.P., Haupt, S., Montgomery, K.G., House, C.M., Azar, W.J., Pearson, H.B., Fisher, O.M., Read, M., Guerra, G.R., et al. (2017a). Inhibiting the system xC<sup>-</sup>/glutathione axis selectively targets cancers with mutant-p53 accumulation. *Nat. Commun.* *8*, 14844.
- Liu, G., Pei, F., Yang, F., Li, L., Amin, A.D., Liu, S., Buchan, J.R., and Cho, W.C. (2017b). Role of Autophagy and Apoptosis in Non-Small-Cell Lung Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* *18*.
- Liu, X., Kim, C.N., Yang, J., Jemmerson, R., and Wang, X. (1996a). 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 Res.* *64*, 5078–5083.
- Liu, X., Wilcken, R., Joerger, A.C., Chuckowree, I.S., Amin, J., Spencer, J., and Fersht, A.R. (2013). Small molecule induced reactivation of mutant p53 in cancer cells. *Nucleic Acids Res.* *41*, 6034–6044.
- Liu, Z.G., Hsu, H., Goeddel, D.V., and Karin, M. (1996b). Dissection of TNF receptor 1 effector functions: JNK activation is not linked to apoptosis while NF-kappaB activation prevents cell death. *Cell* *87*, 565–576.
- Llambi, F., Moldoveanu, T., Tait, S.W.G., 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. *Mol. Cell* *44*, 517–531.
- Lo, W., Parkhurst, M., Robbins, P.F., Tran, E., Lu, Y.-C., Jia, L., Gartner, J.J., Pasetto, A., Deniger, D., Malekzadeh, P., et al. (2019). Immunologic Recognition of a Shared p53 Mutated Neoantigen in a Patient with Metastatic Colorectal Cancer. *Cancer Immunol. Res.* *7*, 534–543.
- Loeb, C.R.K., Harris, J.L., and Craik, C.S. (2006). Granzyme B proteolyzes receptors important to proliferation and survival, tipping the balance toward apoptosis. *J. Biol. Chem.* *281*, 28326–28335.

- 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. *Eur. J. Immunol.* *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.
- Lowe, S.W., Bodis, S., McClatchey, A., Remington, L., Ruley, H.E., Fisher, D.E., Housman, D.E., and Jacks, T. (1994). p53 status and the efficacy of cancer therapy in vivo. *Science* *266*, 807–810.
- Lu, H., and Levine, A.J. (1995). Human TAFII31 protein is a transcriptional coactivator of the p53 protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *92*, 5154–5158.
- 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. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *177*, 1171–1178.
- Lu, T., Ramakrishnan, R., Altiok, S., Youn, J.-I., Cheng, P., Celis, E., Pisarev, V., Sherman, S., Sporn, M.B., and Gabrilovich, D. (2011). Tumor-infiltrating myeloid cells induce tumor cell resistance to cytotoxic T cells in mice. *J. Clin. Invest.* *121*, 4015–4029.
- Lubin, R., Zalcman, G., Bouchet, L., Trédanel, J., Legros, Y., Cazals, D., Hirsch, A., and Soussi, T. (1995). Serum p53 antibodies as early markers of lung cancer. *Nat. Med.* *1*, 701–702.
- Luo, M.L., Zhou, Z., Magni, K., Christoforides, C., Rappsilber, J., Mann, M., and Reed, R. (2001). Pre-mRNA splicing and mRNA export linked by direct interactions between UAP56 and Aly. *Nature* *413*, 644–647.
- Ma, W., and Mayr, C. (2018). A Membraneless Organelle Associated with the Endoplasmic Reticulum Enables 3'UTR-Mediated Protein-Protein Interactions. *Cell* *175*, 1492-1506.e19.
- Mace, T.A., Ameen, Z., Collins, A., Wojcik, S., Mair, M., Young, G.S., Fuchs, J.R., Eubank, T.D., Frankel, W.L., Bekaii-Saab, T., et al. (2013). Pancreatic cancer-associated stellate cells promote differentiation of myeloid-derived suppressor cells in a STAT3-dependent manner. *Cancer Res.* *73*, 3007–3018.
- Magnusson, S., Gisselsson, D., Wiebe, T., Kristoffersson, U., Borg, Å., 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. *Pediatr. Blood Cancer* *59*, 846–853.
- Maiuri, M.C., Galluzzi, L., Morselli, E., Kepp, O., Malik, S.A., and Kroemer, G. (2010). Autophagy regulation by p53. *Curr. Opin. Cell Biol.* *22*, 181–185.
- Maki, C.G., and Howley, P.M. (1997). Ubiquitination of p53 and p21 is differentially affected by ionizing and UV radiation. *Mol. Cell. Biol.* *17*, 355–363.
- Malekzadeh, P., Pasetto, A., Robbins, P.F., Parkhurst, M.R., Paria, B.C., Jia, L., Gartner, J.J., Hill, V., Yu, Z., Restifo, N.P., et al. (2019). Neoantigen screening identifies broad TP53 mutant immunogenicity in patients with epithelial cancers. *J. Clin. Invest.* *129*, 1109–1114.
- Malkin, D., Li, F.P., Strong, L.C., Fraumeni, J.F., Nelson, C.E., Kim, D.H., Kassel, J., Gryka, M.A., Bischoff, F.Z., and Tainsky, M.A. (1990). Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. *Science* *250*, 1233–1238.
- Mantovani, A., Marchesi, F., Malesci, A., Laghi, L., and Allavena, P. (2017). Tumour-associated macrophages as treatment targets in oncology. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* *14*, 399–416.

- Marchenko, N.D., Wolff, S., Erster, S., Becker, K., and Moll, U.M. (2007). Monoubiquitylation promotes mitochondrial p53 translocation. *EMBO J.* *26*, 923–934.
- Marchiq, I., and Pouyssegur, J. (2016). Hypoxia, cancer metabolism and the therapeutic benefit of targeting lactate/H(+) symporters. *J. Mol. Med. Berl. Ger.* *94*, 155–171.
- 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. *Adv. Immunol.* *74*, 181–273.
- Mariño, G., Niso-Santano, M., Baehrecke, E.H., and Kroemer, G. (2014). Self-consumption: the interplay of autophagy and apoptosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *15*, 81–94.
- Marsters, S.A., Pitti, R.A., Sheridan, J.P., and Ashkenazi, A. (1999). Control of apoptosis signaling by Apo2 ligand. *Recent Prog. Horm. Res.* *54*, 225–234.
- Martín-Caballero, J., Flores, J.M., García-Palencia, P., and Serrano, M. (2001). Tumor susceptibility of p21(Waf1/Cip1)-deficient mice. *Cancer Res.* *61*, 6234–6238.
- Martinvalet, D. (2015). ROS signaling during granzyme B-mediated apoptosis. *Mol. Cell. Oncol.* *2*, e992639.
- 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.
- Marzec, M., Zhang, Q., Goradia, A., Raghunath, P.N., Liu, X., Paessler, M., Wang, H.Y., Wysocka, M., Cheng, M., Ruggeri, B.A., et al. (2008). Oncogenic kinase NPM/ALK induces through STAT3 expression of immunosuppressive protein CD274 (PD-L1, B7-H1). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 20852–20857.
- Masson, D., Zamai, M., and Tschopp, J. (1986). Identification of granzyme A isolated from cytotoxic T-lymphocyte-granules as one of the proteases encoded by CTL-specific genes. *FEBS Lett.* *208*, 84–88.
- Mathew, R., and White, E. (2011). Autophagy, stress, and cancer metabolism: what doesn't kill you makes you stronger. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* *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. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *168*, 689–695.
- McNeil, P.L., and Kirchhausen, T. (2005). An emergency response team for membrane repair. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *6*, 499–505.
- Meijer, A., Kruijt, F. a. E., van der Zee, A.G.J., Hollema, H., Le, P., ten Hoor, K.A., Groothuis, G.M.M., Quax, W.J., de Vries, E.G.E., and de Jong, S. (2013). Nutlin-3 preferentially sensitises wild-type p53-expressing cancer cells to DR5-selective TRAIL over rhTRAIL. *Br. J. Cancer* *109*, 2685–2695.
- Meisel, R., Zibert, A., Laryea, M., Göbel, U., Däubener, W., and Dilloo, D. (2004). Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation. *Blood* *103*, 4619–4621.
- 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. *Mol. Biol. Cell* *21*, 2241–2256.
- 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. *J. Biol. Chem.* *282*, 32991–32999.



- 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. *J. Mol. Med. Berl. Ger.* 89, 411–421.
- Messai, Y., Noman, M.Z., Hasmim, M., Janji, B., Tittarelli, A., Boutet, M., Baud, V., Viry, E., Billot, K., Nanbakhsh, A., et al. (2014). ITPR1 protects renal cancer cells against natural killer cells by inducing autophagy. *Cancer Res.* 74, 6820–6832.
- Messai, Y., Noman, M.Z., Janji, B., Hasmim, M., Escudier, B., and Chouaib, S. (2015). The autophagy sensor ITPR1 protects renal carcinoma cells from NK-mediated killing. *Autophagy* 0.
- Metkar, S.S., Marchioretto, M., Antonini, V., Lunelli, L., Wang, B., Gilbert, R.J.C., Anderlueh, G., Roth, R., Pooga, M., Pardo, J., et al. (2015). Perforin oligomers form arcs in cellular membranes: a locus for intracellular delivery of granzymes. *Cell Death Differ.* 22, 74–85.
- Mezzadra, R., Sun, C., Jae, L.T., Gomez-Eerland, R., de Vries, E., Wu, W., Logtenberg, M.E.W., Slagter, M., Rozeman, E.A., Hofland, I., et al. (2017). Identification of CMTM6 and CMTM4 as PD-L1 protein regulators. *Nature* 549, 106–110.
- 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. *Mol. Cell* 11, 577–590.
- Milner, J., and Medcalf, E.A. (1991). Cotranslation of activated mutant p53 with wild type drives the wild-type p53 protein into the mutant conformation. *Cell* 65, 765–774.
- 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. *Curr. Opin. Immunol.* 27, 16–25.
- Mittal, S.K., Cho, K.-J., Ishido, S., and Roche, P.A. (2015). Interleukin 10 (IL-10)-mediated Immunosuppression: MARCH-I INDUCTION REGULATES ANTIGEN PRESENTATION BY MACROPHAGES BUT NOT DENDRITIC CELLS. *J. Biol. Chem.* 290, 27158–27167.
- Mittendorf, E.A., Philips, A.V., Meric-Bernstam, F., Qiao, N., Wu, Y., Harrington, S., Su, X., Wang, Y., Gonzalez-Angulo, A.M., Akcakanat, A., et al. (2014). PD-L1 expression in triple-negative breast cancer. *Cancer Immunol. Res.* 2, 361–370.
- Miwa, K., Miyamoto, S., Kato, H., Imamura, T., Nishida, M., Yoshikawa, Y., Nagata, Y., and Wake, N. (1995). The role of p53 inactivation in human cervical cell carcinoma development. *Br. J. Cancer* 71, 219–226.
- Miyashita, T., and Reed, J.C. (1995). Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* 80, 293–299.
- Miyashita, T., Krajewski, S., Krajewska, M., Wang, H.G., Lin, H.K., Liebermann, D.A., Hoffman, B., and Reed, J.C. (1994). Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene* 9, 1799–1805.
- Miyashita, T., Kawakami, A., Nakashima, T., Yamasaki, S., Tamai, M., Tanaka, F., Kamachi, M., Ida, H., Migita, K., Origuchi, T., et al. (2004). Osteoprotegerin (OPG) acts as an endogenous decoy receptor in tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-mediated apoptosis of fibroblast-like synovial cells. *Clin. Exp. Immunol.* 137, 430–436.
- Mizushima, N., Yamamoto, A., Hatano, M., Kobayashi, Y., Kabeya, Y., Suzuki, K., Tokuhiya, T., Ohsumi, Y., and Yoshimori, T. (2001). Dissection of autophagosome formation using Apg5-deficient mouse embryonic stem cells. *J. Cell Biol.* 152, 657–668.

- 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. *J. Cell Sci.* *116*, 1679–1688.
- Mocellin, S., Wang, E., and Marincola, F.M. (2001). Cytokines and immune response in the tumor microenvironment. *J. Immunother. Hagerstown Md 1997* *24*, 392–407.
- 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.
- Mongelard, F., and Bouvet, P. (2007). Nucleolin: a multiFACeTed protein. *Trends Cell Biol.* *17*, 80–86.
- Monks, C.R., Freiberg, B.A., Kupfer, H., Sciaky, N., and Kupfer, A. (1998). Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells. *Nature* *395*, 82–86.
- Morel, E., Mehrpour, M., Botti, J., Dupont, N., Hamai, A., Nascimbeni, A.C., and Codogno, P. (2017). Autophagy: A Druggable Process. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* *57*, 375–398.
- Moretta, L., Bottino, C., Pende, D., Castriconi, R., Mingari, M.C., and Moretta, A. (2006). Surface NK receptors and their ligands on tumor cells. *Semin. Immunol.* *18*, 151–158.
- Morselli, E., Shen, S., Ruckstuhl, C., Bauer, M.A., Mariño, 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 Georget. Tex* *10*, 2763–2769.
- Mrakovcic, M., and Fröhlich, L.F. (2018). p53-Mediated Molecular Control of Autophagy in Tumor Cells. *Biomolecules* *8*.
- Muller, P.A.J., and Vousden, K.H. (2013). p53 mutations in cancer. *Nat. Cell Biol.* *15*, 2–8.
- Muller, P., Hrstka, R., Coomber, D., Lane, D.P., and Vojtesek, B. (2008). Chaperone-dependent stabilization and degradation of p53 mutants. *Oncogene* *27*, 3371–3383.
- Muñoz-Fontela, C., Mandinova, A., Aaronson, S.A., and Lee, S.W. (2016). Emerging roles of p53 and other tumour-suppressor genes in immune regulation. *Nat. Rev. Immunol.* *16*, 741–750.
- 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.
- Murphy, B.M., Creagh, E.M., and Martin, S.J. (2004). Interchain proteolysis, in the absence of a dimerization stimulus, can initiate apoptosis-associated caspase-8 activation. *J. Biol. Chem.* *279*, 36916–36922.
- 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 Differ.* *13*, 962–972.
- Nagaraj, S., Gupta, K., Pisarev, V., Kinarsky, L., Sherman, S., Kang, L., Herber, D.L., Schneck, J., and Gabilovich, D.I. (2007). Altered recognition of antigen is a mechanism of CD8+ T cell tolerance in cancer. *Nat. Med.* *13*, 828–835.
- Nagaraj, S., Youn, J.-I., and Gabilovich, D.I. (2013). Reciprocal relationship between myeloid-derived suppressor cells and T cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *191*, 17–23.
- 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.

- Nakano, K., and Vousden, K.H. (2001). PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol. Cell* 7, 683–694.
- 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. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 458–467.
- Narendran, A., Ganjavi, H., Morson, N., Connor, A., Barlow, J.W., Keystone, E., Malkin, D., and Freedman, M.H. (2003). Mutant p53 in bone marrow stromal cells increases VEGF expression and supports leukemia cell growth. *Exp. Hematol.* 31, 693–701.
- Narni-Mancinelli, E., Jaeger, B.N., Bernat, C., Fenis, A., Kung, S., De Gassart, A., Mahmood, S., Gut, M., Heath, S.C., Estellé, J., et al. (2012). Tuning of natural killer cell reactivity by Nkp46 and Helios calibrates T cell responses. *Science* 335, 344–348.
- Neefjes, J.J., Momburg, F., and Hämmerling, G.J. (1993). Selective and ATP-dependent translocation of peptides by the MHC-encoded transporter. *Science* 261, 769–771.
- Nemunaitis, J., Ganly, I., Khuri, F., Arseneau, J., Kuhn, J., McCarty, T., Landers, S., Maples, P., Romel, L., Randlev, B., et al. (2000). Selective replication and oncolysis in p53 mutant tumors with ONYX-015, an E1B-55kD gene-deleted adenovirus, in patients with advanced head and neck cancer: a phase II trial. *Cancer Res.* 60, 6359–6366.
- Nixon, R.A. (2013). The role of autophagy in neurodegenerative disease. *Nat. Med.* 19, 983–997.
- Noguchi, Y., Chen, Y.T., and Old, L.J. (1994). A mouse mutant p53 product recognized by CD4+ and CD8+ T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 3171–3175.
- Noman, M.Z., and Chouaib, S. (2014). Targeting hypoxia at the forefront of anticancer immune responses. *Oncoimmunology* 3, e954463.
- Noman, M.Z., Janji, B., Kaminska, B., Van Moer, K., Pierson, S., Przanowski, P., Buart, S., Berchem, G., Romero, P., Mami-Chouaib, F., et al. (2011). Blocking hypoxia-induced autophagy in tumors restores cytotoxic T-cell activity and promotes regression. *Cancer Res.* 71, 5976–5986.
- Noman, M.Z., Hasmim, M., Messai, Y., Terry, S., Kieda, C., Janji, B., and Chouaib, S. (2015). Hypoxia: a key player in antitumor immune response. A Review in the Theme: Cellular Responses to Hypoxia. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 309, C569-579.
- Nowak, D.G., Cho, H., Herzka, T., Watrud, K., DeMarco, D.V., Wang, V.M.Y., Senturk, S., Fellmann, C., Ding, D., Beinortas, T., et al. (2015). MYC Drives Pten/Trp53-Deficient Proliferation and Metastasis due to IL6 Secretion and AKT Suppression via PHLPP2. *Cancer Discov.* 5, 636–651.
- Oda, E., Ohki, R., Murasawa, H., Nemoto, J., Shibue, T., Yamashita, T., Tokino, T., Taniguchi, T., and Tanaka, N. (2000). Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science* 288, 1053–1058.
- Ohl, K., and Tenbrock, K. (2018). Reactive Oxygen Species as Regulators of MDSC-Mediated Immune Suppression. *Front. Immunol.* 9.
- Olive, K.P., Tuveson, D.A., Ruhe, Z.C., Yin, B., Willis, N.A., Bronson, R.T., Crowley, D., and Jacks, T. (2004). Mutant p53 gain of function in two mouse models of Li-Fraumeni syndrome. *Cell* 119, 847–860.
- Olivier, M., Hussain, S.P., Caron de Fromentel, C., Hainaut, P., and Harris, C.C. (2004). TP53 mutation spectra and load: a tool for generating hypotheses on the etiology of cancer. *IARC Sci. Publ.* 247–270.

- Olivier, M., Hollstein, M., and Hainaut, P. (2010). TP53 mutations in human cancers: origins, consequences, and clinical use. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2, a001008.
- Oltvai, Z.N., Millman, C.L., and Korsmeyer, S.J. (1993). Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 74, 609–619.
- Oppenheim, D.E., Roberts, S.J., Clarke, S.L., Filler, R., Lewis, J.M., Tigelaar, R.E., Girardi, M., and Hayday, A.C. (2005). Sustained localized expression of ligand for the activating NKG2D receptor impairs natural cytotoxicity in vivo and reduces tumor immunosurveillance. *Nat. Immunol.* 6, 928–937.
- Oren, M., and Rotter, V. (2010). Mutant p53 gain-of-function in cancer. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2, a001107.
- Orimo, A., Gupta, P.B., Sgroi, D.C., Arenzana-Seisdedos, F., Delaunay, T., Naeem, R., Carey, V.J., Richardson, A.L., and Weinberg, R.A. (2005). Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell* 121, 335–348.
- Osborne, R. (2008). Ark floats gene therapy's boat, for now. *Nat. Biotechnol.* 26, 1057–1059.
- 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., and Kruzel, E. (1995). Wild-type human p53 and a temperature-sensitive mutant induce Fas/APO-1 expression. *Mol. Cell. Biol.* 15, 3032–3040.
- Oztürk, S., Schleich, K., and Lavrik, I.N. (2012). Cellular FLICE-like inhibitory proteins (c-FLIPs): fine-tuners of life and death decisions. *Exp. Cell Res.* 318, 1324–1331.
- Park, Y.P., Choi, S.-C., Kiesler, P., Gil-Krzewska, A., Borrego, F., Weck, J., Krzewski, K., and Coligan, J.E. (2011). Complex regulation of human NKG2D-DAP10 cell surface expression: opposing roles of the  $\gamma$ c cytokines and TGF- $\beta$ 1. *Blood* 118, 3019–3027.
- Parrales, A., and Iwakuma, T. (2015). Targeting Oncogenic Mutant p53 for Cancer Therapy. *Front. Oncol.* 5.
- Patsoukis, N., Sari, D., and Boussiotis, V.A. (2012). PD-1 inhibits T cell proliferation by upregulating p27 and p15 and suppressing Cdc25A. *Cell Cycle Georget. Tex* 11, 4305–4309.
- Patsoukis, N., Bardhan, K., Chatterjee, P., Sari, D., Liu, B., Bell, L.N., Karoly, E.D., Freeman, G.J., Petkova, V., Seth, P., et al. (2015). PD-1 alters T-cell metabolic reprogramming by inhibiting glycolysis and promoting lipolysis and fatty acid oxidation. *Nat. Commun.* 6, 6692.
- Pauken, K.E., and Wherry, E.J. (2015). Overcoming T cell exhaustion in infection and cancer. *Trends Immunol.* 36, 265–276.
- 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. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 189, 1104–1111.
- Pechackova, S., Burdova, K., Benada, J., Kleiblova, P., Jenikova, G., and Macurek, L. (2016). Inhibition of WIP1 phosphatase sensitizes breast cancer cells to genotoxic stress and to MDM2 antagonist nutlin-3. *Oncotarget* 7, 14458–14475.
- Perišić Nanut, M., Sabotič, J., Jewett, A., and Kos, J. (2014). Cysteine cathepsins as regulators of the cytotoxicity of NK and T cells. *Front. Immunol.* 5, 616.
- 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 Lett.* 559, 171–174.
- Petrova, V., Annicchiarico-Petruzzelli, M., Melino, G., and Amelio, I. (2018). The hypoxic tumour microenvironment. *Oncogenesis* 7, 10.

- Pfister, N.T., and Prives, C. (2017). Transcriptional Regulation by Wild-Type and Cancer-Related Mutant Forms of p53. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 7.
- Pfister, N.T., Fomin, V., Regunath, K., Zhou, J.Y., Zhou, W., Silwal-Pandit, L., Freed-Pastor, W.A., Laptenko, O., Neo, S.P., Bargonetti, J., et al. (2015). Mutant p53 cooperates with the SWI/SNF chromatin remodeling complex to regulate VEGFR2 in breast cancer cells. *Genes Dev.* 29, 1298–1315.
- Pietra, G., Manzini, C., Rivara, S., Vitale, M., Cantoni, C., Petretto, A., Balsamo, M., Conte, R., Benelli, R., Minghelli, S., et al. (2012). Melanoma cells inhibit natural killer cell function by modulating the expression of activating receptors and cytolytic activity. *Cancer Res.* 72, 1407–1415.
- Piette, J., Neel, H., and Maréchal, V. (1997). Mdm2: keeping p53 under control. *Oncogene* 15, 1001–1010.
- Pitolli, C., Wang, Y., Mancini, M., Shi, Y., Melino, G., and Amelio, I. (2019). Do Mutations Turn p53 into an Oncogene? *Int. J. Mol. Sci.* 20.
- Platten, M., Wick, W., and Van den Eynde, B.J. (2012). Tryptophan catabolism in cancer: beyond IDO and tryptophan depletion. *Cancer Res.* 72, 5435–5440.
- Polotskaia, A., Xiao, G., Reynoso, K., Martin, C., Qiu, W.-G., Hendrickson, R.C., and Bargonetti, J. (2015). Proteome-wide analysis of mutant p53 targets in breast cancer identifies new levels of gain-of-function that influence PARP, PCNA, and MCM4. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, E1220-1229.
- Pommier, A., Audemard, A., Durand, A., Lengagne, R., Delpoux, A., Martin, B., Douguet, L., Le Campion, A., Kato, M., Avril, M.-F., et al. (2013). Inflammatory monocytes are potent antitumor effectors controlled by regulatory CD4+ T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 13085–13090.
- Powell, D.R., and Huttenlocher, A. (2016). Neutrophils in the Tumor Microenvironment. *Trends Immunol.* 37, 41–52.
- Praper, T., Sonnen, A., Viero, G., Kladnik, A., Froelich, C.J., Anderluh, G., Dalla Serra, M., and Gilbert, R.J.C. (2011). Human perforin employs different avenues to damage membranes. *J. Biol. Chem.* 286, 2946–2955.
- Qian, B.-Z., and Pollard, J.W. (2010). Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell* 141, 39–51.
- Qian, Y., and Chen, X. (2013). Senescence Regulation by the p53 Protein Family. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 965, 37–61.
- Quigley, M., Pereyra, F., Nilsson, B., Porichis, F., Fonseca, C., Eichbaum, Q., Julg, B., Jesneck, J.L., Brosnahan, K., Imam, S., et al. (2010). Transcriptional analysis of HIV-specific CD8+ T cells shows that PD-1 inhibits T cell function by upregulating BATF. *Nat. Med.* 16, 1147–1151.
- Ramalingam, S., Goss, G., Rosell, R., Schmid-Bindert, G., Zaric, B., Andric, Z., Bondarenko, I., Komov, D., Ceric, T., Khuri, F., et al. (2015). A randomized phase II study of ganetespib, a heat shock protein 90 inhibitor, in combination with docetaxel in second-line therapy of advanced non-small cell lung cancer (GAL-AXY-1). *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* 26, 1741–1748.
- Rasper, D.M., Vaillancourt, J.P., Hadano, S., Houtzager, V.M., Seiden, I., Keen, S.L., Tawa, P., Xanthoudakis, S., Nasir, J., Martindale, D., et al. (1998). Cell death attenuation by “Usurpin”, a mammalian DED-caspase homologue that precludes caspase-8 recruitment and activation by the CD-95 (Fas, APO-1) receptor complex. *Cell Death Differ.* 5, 271–288.
- Ravikumar, B., Acevedo-Arozena, A., Imarisio, S., Berger, Z., Vacher, C., O’Kane, C.J., Brown, S.D.M., and Rubinsztein, D.C. (2005). Dynein mutations impair autophagic clearance of aggregate-prone proteins. *Nat. Genet.* 37, 771–776.

- Ray, M., Hostetter, D.R., Loeb, C.R.K., Simko, J., and Craik, C.S. (2012). Inhibition of Granzyme B by PI-9 protects prostate cancer cells from apoptosis. *The Prostate* 72, 846–855.
- Razi, M., Chan, E.Y.W., and Tooze, S.A. (2009). Early endosomes and endosomal coatomer are required for autophagy. *J. Cell Biol.* 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.
- Reefman, E., Kay, J.G., Wood, S.M., Offenhäuser, 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. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 184, 4852–4862.
- Reiman, J.M., Kmiecik, M., Manjili, M.H., and Knutson, K.L. (2007). Tumor immunoediting and immunosculpting pathways to cancer progression. *Semin. Cancer Biol.* 17, 275–287.
- Reiners, K.S., Topolar, D., Henke, A., Simhadri, V.R., Kessler, J., Sauer, M., Bessler, M., Hansen, H.P., Tawadros, S., Herling, M., et al. (2013). Soluble ligands for NK cell receptors promote evasion of chronic lymphocytic leukemia cells from NK cell anti-tumor activity. *Blood* 121, 3658–3665.
- 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. *J. Natl. Cancer Inst.* 88, 100–108.
- Restifo, N.P., Dudley, M.E., and Rosenberg, S.A. (2012). Adoptive immunotherapy for cancer: harnessing the T cell response. *Nat. Rev. Immunol.* 12, 269–281.
- Ribas, A., and Wolchok, J.D. (2018). Cancer immunotherapy using checkpoint blockade. *Science* 359, 1350–1355.
- Rippin, T.M., Bykov, V.J.N., Freund, S.M.V., 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.
- Rodríguez, J.A. (2017). HLA-mediated tumor escape mechanisms that may impair immunotherapy clinical outcomes via T-cell activation. *Oncol. Lett.* 14, 4415–4427.
- Rodríguez, O.C., Choudhury, S., Kolukula, V., Vietsch, E.E., Catania, J., Preet, A., Reynoso, K., Bargonetti, J., Wellstein, A., Albanese, C., et al. (2012). Dietary downregulation of mutant p53 levels via glucose restriction: mechanisms and implications for tumor therapy. *Cell Cycle Georget. Tex* 11, 4436–4446.
- Rökaeus, N., Shen, J., Eckhardt, I., Bykov, V.J.N., Wiman, K.G., and Wilhelm, M.T. (2010). PRIMA-1(MET)/APR-246 targets mutant forms of p53 family members p63 and p73. *Oncogene* 29, 6442–6451.
- 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 Differ.* 16, 340–348.
- Rosado, C.J., Buckle, A.M., Law, R.H.P., 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.
- Roth, J.A. (2006). Adenovirus p53 gene therapy. *Expert Opin. Biol. Ther.* 6, 55–61.
- Roth, J.A., Nguyen, D., Lawrence, D.D., Kemp, B.L., Carrasco, C.H., Ferson, D.Z., Hong, W.K., Komaki, R., Lee, J.J., Nesbitt, J.C., et al. (1996). Retrovirus-mediated wild-type p53 gene transfer to tumors of patients with lung cancer. *Nat. Med.* 2, 985–991.

- 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 Res.* *65*, 10139–10144.
- Rousalova, I., Krepela, E., Prochazka, J., Cermak, J., and Benkova, K. (2010). Expression of proteinase inhibitor-9/serpinB9 in non-small cell lung carcinoma cells and tissues. *Int. J. Oncol.* *36*, 275–283.
- Rowan, S., Ludwig, R.L., Haupt, Y., Bates, S., Lu, X., Oren, M., and Vousden, K.H. (1996). Specific loss of apoptotic but not cell-cycle arrest function in a human tumor derived p53 mutant. *EMBO J.* *15*, 827–838.
- Ruddell, A., Kelly-Spratt, K.S., Furuya, M., Parghi, S.S., and Kemp, C.J. (2008). p19/Arf and p53 suppress sentinel lymph node lymphangiogenesis and carcinoma metastasis. *Oncogene* *27*, 3145–3155.
- Ruiz de Almodóvar, C., Ruiz-Ruiz, C., Rodríguez, A., Ortiz-Ferrón, G., Redondo, J.M., and López-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. *J. Biol. Chem.* *279*, 4093–4101.
- Rydzynski, C., Daniels, K.A., Karmele, E.P., Brooks, T.R., Mahl, S.E., Moran, M.T., Li, C., Sutiwisesak, R., Welsh, R.M., and Waggoner, S.N. (2015). Generation of cellular immune memory and B-cell immunity are impaired by natural killer cells. *Nat. Commun.* *6*, 6375.
- Saha, M.N., Micallef, J., Qiu, L., and Chang, H. (2010). Pharmacological activation of the p53 pathway in haematological malignancies. *J. Clin. Pathol.* *63*, 204–209.
- Saha, M.N., Jiang, H., Yang, Y., Reece, D., and Chang, H. (2013). PRIMA-1Met/APR-246 displays high antitumor activity in multiple myeloma by induction of p73 and Noxa. *Mol. Cancer Ther.* *12*, 2331–2341.
- Salih, H.R., Rammensee, H.-G., and Steinle, A. (2002). Cutting edge: down-regulation of MICA on human tumors by proteolytic shedding. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *169*, 4098–4102.
- Sánchez-Paulete, A.R., Teijeira, A., Cueto, F.J., Garasa, S., Pérez-Gracia, J.L., Sánchez-Arráez, A., Sancho, D., and Melero, I. (2017). Antigen cross-presentation and T-cell cross-priming in cancer immunology and immunotherapy. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* *28*, xii44–xii55.
- Sang, M., Lian, Y., Zhou, X., and Shan, B. (2011). MAGE-A family: attractive targets for cancer immunotherapy. *Vaccine* *29*, 8496–8500.
- Sanjabi, S., Mosaheb, M.M., and Flavell, R.A. (2009). Opposing effects of TGF-beta and IL-15 cytokines control the number of short-lived effector CD8+ T cells. *Immunity* *31*, 131–144.
- 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 Lett.* *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. *Biochim. Biophys. Acta* *1063*, 137–146.
- Sawant, D.V., Yano, H., Chikina, M., Zhang, Q., Liao, M., Liu, C., Callahan, D.J., Sun, Z., Sun, T., Tabib, T., et al. (2019). Adaptive plasticity of IL-10+ and IL-35+ Treg cells cooperatively promotes tumor T cell exhaustion. *Nat. Immunol.* *20*, 724–735.
- 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. *EMBO J.* *17*, 1675–1687.
- Sceneay, J., Chow, M.T., Chen, A., Halse, H.M., Wong, C.S.F., Andrews, D.M., Sloan, E.K., Parker, B.S., Bowtell, D.D., Smyth, M.J., et al. (2012). Primary tumor hypoxia recruits CD11b+/Ly6Cmed/Ly6G+ im-

- immune suppressor cells and compromises NK cell cytotoxicity in the premetastatic niche. *Cancer Res.* *72*, 3906–3911.
- Schauer, I.G., Zhang, J., Xing, Z., Guo, X., Mercado-Uribe, I., Sood, A.K., Huang, P., and Liu, J. (2013). Interleukin-1 $\beta$  promotes ovarian tumorigenesis through a p53/NF- $\kappa$ B-mediated inflammatory response in stromal fibroblasts. *Neoplasia N. Y. N* *15*, 409–420.
- 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.
- Schlecker, E., Fiegler, N., Arnold, A., Altevogt, P., Rose-John, S., Moldenhauer, G., Sucker, A., Paschen, A., von Strandmann, E.P., Textor, S., et al. (2014). Metalloprotease-mediated tumor cell shedding of B7-H6, the ligand of the natural killer cell-activating receptor NKp30. *Cancer Res.* *74*, 3429–3440.
- Schlichtholz, B., Legros, Y., Gillet, D., Gaillard, C., Marty, M., Lane, D., Calvo, F., and Soussi, T. (1992). The immune response to p53 in breast cancer patients is directed against immunodominant epitopes unrelated to the mutational hot spot. *Cancer Res.* *52*, 6380–6384.
- Schmidl, C., Delacher, M., Huehn, J., and Feuerer, M. (2018). Epigenetic mechanisms regulating T-cell responses. *J. Allergy Clin. Immunol.* *142*, 728–743.
- Schulz-Heddergott, R., and Moll, U.M. (2018). Gain-of-Function (GOF) Mutant p53 as Actionable Therapeutic Target. *Cancers* *10*.
- Schuster, I.S., Wikstrom, M.E., Brizard, G., Coudert, J.D., Estcourt, M.J., Manzur, M., O'Reilly, L.A., Smyth, M.J., Trapani, J.A., Hill, G.R., et al. (2014). TRAIL+ NK Cells Control CD4+ T Cell Responses during Chronic Viral Infection to Limit Autoimmunity. *Immunity* *41*, 646–656.
- Schwartz, R.H. (2003). T cell anergy. *Annu. Rev. Immunol.* *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. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *167*, 2068–2073.
- Sebbagh, M., Hamelin, J., Bertoglio, J., Solary, E., and Bréard, J. (2005). Direct cleavage of ROCK II by granzyme B induces target cell membrane blebbing in a caspase-independent manner. *J. Exp. Med.* *201*, 465–471.
- 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. *Curr. Pharm. Des.* *14*, 2100–2110.
- Sedelies, K.A., Ciccone, A., Clarke, C.J.P., Oliaro, J., Sutton, V.R., Scott, F.L., Silke, J., Susanto, O., Green, D.R., Johnstone, R.W., et al. (2008). Blocking granule-mediated death by primary human NK cells requires both protection of mitochondria and inhibition of caspase activity. *Cell Death Differ.* *15*, 708–717.
- Sedlmayr, P., Schallhammer, L., Hammer, A., Wilders-Truschnig, M., Wintersteiger, R., and Dohr, G. (1996). Differential phenotypic properties of human peripheral blood CD56dim+ and CD56bright+ natural killer cell subpopulations. *Int. Arch. Allergy Immunol.* *110*, 308–313.
- Shamalov, K., Levy, S.N., Horovitz-Fried, M., and Cohen, C.J. (2017). The mutational status of p53 can influence its recognition by human T-cells. *Oncoimmunology* *6*, e1285990.
- Shaul, M.E., and Fridlender, Z.G. (2017). Neutrophils as active regulators of the immune system in the tumor microenvironment. *J. Leukoc. Biol.* *102*, 343–349.
- Shelling, A.N. (1997). Role of p53 in drug resistance in ovarian cancer. *Lancet Lond. Engl.* *349*, 744–745.



- Sheppard, K.-A., Fitz, L.J., Lee, J.M., Benander, C., George, J.A., Wooters, J., Qiu, Y., Jussif, J.M., Carter, L.L., Wood, C.R., et al. (2004). PD-1 inhibits T-cell receptor induced phosphorylation of the ZAP70/CD3zeta signalosome and downstream signaling to PKC $\theta$ . *FEBS Lett.* *574*, 37–41.
- Shi, H., Lambert, J.M.R., Hautefeuille, A., Bykov, V.J.N., Wiman, K.G., Hainaut, P., and Caron de Fromentel, C. (2008). In vitro and in vivo cytotoxic effects of PRIMA-1 on hepatocellular carcinoma cells expressing mutant p53ser249. *Carcinogenesis* *29*, 1428–1434.
- Shi, L., Keefe, D., Durand, E., Feng, H., Zhang, D., and Lieberman, J. (2005). Granzyme B binds to target cells mostly by charge and must be added at the same time as perforin to trigger apoptosis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *174*, 5456–5461.
- Shieh, S.Y., Ikeda, M., Taya, Y., and Prives, C. (1997). DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2. *Cell* *91*, 325–334.
- 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 Res.* *61*, 4942–4946.
- Shirley, S., and Micheau, O. (2013). Targeting c-FLIP in cancer. *Cancer Lett.* *332*, 141–150.
- Shortman, K., and Naik, S.H. (2007). Steady-state and inflammatory dendritic-cell development. *Nat. Rev. Immunol.* *7*, 19–30.
- Shvarts, A., Steegenga, W.T., Riteco, N., van Laar, T., Dekker, P., Bazuine, M., van Ham, R.C., van der Houven van Oordt, W., Hateboer, G., van der Eb, A.J., et al. (1996). MDMX: a novel p53-binding protein with some functional properties of MDM2. *EMBO J.* *15*, 5349–5357.
- Siemens, D.R., Hu, N., Sheikhi, A.K., Chung, E., Frederiksen, L.J., Pross, H., and Graham, C.H. (2008). Hypoxia increases tumor cell shedding of MHC class I chain-related molecule: role of nitric oxide. *Cancer Res.* *68*, 4746–4753.
- Silva, J.L., Lima, C.G.S., Rangel, L.P., Ferretti, G.D.S., Pauli, F.P., Ribeiro, R.C.B., da Silva, T. de B., da Silva, F.C., and Ferreira, V.F. (2020). Recent Synthetic Approaches towards Small Molecule Reactivators of p53. *Biomolecules* *10*.
- Simonsen, A., and Tooze, S.A. (2009). Coordination of membrane events during autophagy by multiple class III PI3-kinase complexes. *J. Cell Biol.* *186*, 773–782.
- Singh, S.S., Vats, S., Chia, A.Y.-Q., Tan, T.Z., Deng, S., Ong, M.S., Arfuso, F., Yap, C.T., Goh, B.C., Sethi, G., et al. (2018). Dual role of autophagy in hallmarks of cancer. *Oncogene* *37*, 1142–1158.
- Smith, M.L., and Seo, Y.R. (2002). p53 regulation of DNA excision repair pathways. *Mutagenesis* *17*, 149–156.
- 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. *J. Exp. Med.* *192*, 755–760.
- So, T., Soroosh, P., Eun, S.-Y., Altman, A., and Croft, M. (2011). Antigen-independent signalosome of CARMA1, PKC $\theta$ , and TNF receptor-associated factor 2 (TRAF2) determines NF- $\kappa$ B signaling in T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 2903–2908.
- Sobhani, M., Abdi, J., Manujendra, S.N., Chen, C., and Chang, H. (2015). PRIMA-1Met induces apoptosis in Waldenström’s Macroglobulinemia cells independent of p53. *Cancer Biol. Ther.* *16*, 799–806.
- Song, H., Hollstein, M., and Xu, Y. (2007). p53 gain-of-function cancer mutants induce genetic instability by inactivating ATM. *Nat. Cell Biol.* *9*, 573–580.

- Soragni, A., Janzen, D.M., Johnson, L.M., Lindgren, A.G., Thai-Quynh Nguyen, A., Tiourin, E., Soriaga, A.B., Lu, J., Jiang, L., Faull, K.F., et al. (2016). A Designed Inhibitor of p53 Aggregation Rescues p53 Tumor Suppression in Ovarian Carcinomas. *Cancer Cell* 29, 90–103.
- Sot, B., Freund, S.M.V., and Fersht, A.R. (2007). Comparative biophysical characterization of p53 with the pro-apoptotic BAK and the anti-apoptotic BCL-xL. *J. Biol. Chem.* 282, 29193–29200.
- Soussi, T., and Lozano, G. (2005). p53 mutation heterogeneity in cancer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 331, 834–842.
- Speidel, D. (2010). Transcription-independent p53 apoptosis: an alternative route to death. *Trends Cell Biol.* 20, 14–24.
- 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.
- Stambolsky, P., Tabach, Y., Fontemaggi, G., Weisz, L., Maor-Aloni, R., Siegfried, Z., Sigfried, Z., Shiff, I., Kogan, I., Shay, M., et al. (2010). Modulation of the vitamin D3 response by cancer-associated mutant p53. *Cancer Cell* 17, 273–285.
- 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 Res.* 61, 7030–7033.
- Stein, Y., Rotter, V., and Aloni-Grinstein, R. (2019). Gain-of-Function Mutant p53: All the Roads Lead to Tumorigenesis. *Int. J. Mol. Sci.* 20.
- Steinman, R.M., Hawiger, D., and Nussenzweig, M.C. (2003). Tolerogenic dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* 21, 685–711.
- Stepp, S.E., Dufourcq-Lagelouse, R., Le Deist, F., Bhawan, S., Certain, S., Mathew, P.A., Henter, J.I., Bennett, M., Fischer, A., de Saint Basile, G., et al. (1999). Perforin gene defects in familial hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Science* 286, 1957–1959.
- Stolz, A., Ernst, A., and Dikic, I. (2014). Cargo recognition and trafficking in selective autophagy. *Nat. Cell Biol.* 16, 495–501.
- Strasser, A., Cory, S., and Adams, J.M. (2011). Deciphering the rules of programmed cell death to improve therapy of cancer and other diseases. *EMBO J.* 30, 3667–3683.
- Street, S.E., Cretney, E., and Smyth, M.J. (2001). Perforin and interferon-gamma activities independently control tumor initiation, growth, and metastasis. *Blood* 97, 192–197.
- 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 Res.* 29, 4530–4540.
- Sui, L., Dong, Y., Ohno, M., Watanabe, Y., Sugimoto, K., and Tokuda, M. (2002). Survivin expression and its correlation with cell proliferation and prognosis in epithelial ovarian tumors. *Int. J. Oncol.* 21, 315–320.
- Sui, X., Chen, R., Wang, Z., Huang, Z., Kong, N., Zhang, M., Han, W., Lou, F., Yang, J., Zhang, Q., et al. (2013). Autophagy and chemotherapy resistance: a promising therapeutic target for cancer treatment. *Cell Death Dis.* 4, e838.
- Sun, L., Zhang, L., Yu, J., Zhang, Y., Pang, X., Ma, C., Shen, M., Ruan, S., Wasan, H.S., and Qiu, S. (2020). Clinical efficacy and safety of anti-PD-1/PD-L1 inhibitors for the treatment of advanced or metastatic cancer: a systematic review and meta-analysis. *Sci. Rep.* 10, 2083.

- Sun, Z., Chen, F., Meng, F., Wei, J., and Liu, B. (2017). MHC class II restricted neoantigen: A promising target in tumor immunotherapy. *Cancer Lett.* 392, 17–25.
- Sundar, R., Cho, B.-C., Brahmer, J.R., and Soo, R.A. (2015). Nivolumab in NSCLC: latest evidence and clinical potential. *Ther. Adv. Med. Oncol.* 7, 85–96.
- Sutton, V.R., Vaux, D.L., and Trapani, J.A. (1997). Bcl-2 prevents apoptosis induced by perforin and granzyme B, but not that mediated by whole cytotoxic lymphocytes. *J. Immunol. Baltim. Md* 158, 5783–5790.
- 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. *J. Exp. Med.* 192, 1403–1414.
- Sutton, V.R., Wowk, 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.
- 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., et al. (2016). Serglycin determines secretory granule repertoire and regulates natural killer cell and cytotoxic T lymphocyte cytotoxicity. *FEBS J.* 283, 947–961.
- Swisher, S.G., Roth, J.A., Nemunaitis, J., Lawrence, D.D., Kemp, B.L., Carrasco, C.H., Connors, D.G., El-Naggar, A.K., Fossella, F., Glisson, B.S., et al. (1999). Adenovirus-mediated p53 gene transfer in advanced non-small-cell lung cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 91, 763–771.
- Synnott, N.C., Murray, A., McGowan, P.M., Kiely, M., Kiely, P.A., O'Donovan, N., O'Connor, D.P., Gallagher, W.M., Crown, J., and Duffy, M.J. (2017). Mutant p53: a novel target for the treatment of patients with triple-negative breast cancer? *Int. J. Cancer* 140, 234–246.
- 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. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 12, 3265–3271.
- Takahashi, H., Sakakura, K., Kawabata-Iwakawa, R., Rokudai, S., Toyoda, M., Nishiyama, M., and Chikamatsu, K. (2015). Immunosuppressive activity of cancer-associated fibroblasts in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Immunol. Immunother. CII* 64, 1407–1417.
- 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.
- Tal, P., Eizenberger, S., Cohen, E., Goldfinger, N., Pietrokovski, S., Oren, M., and Rotter, V. (2016). Cancer therapeutic approach based on conformational stabilization of mutant p53 protein by small peptides. *Oncotarget* 7, 11817–11837.
- Tang, B.L. (2015). A unique SNARE machinery for exocytosis of cytotoxic granules and platelets granules. *Mol. Membr. Biol.* 32, 120–126.
- Tang, B.L. (2019). Syntaxin 16's Newly Deciphered Roles in Autophagy. *Cells* 8.
- Tang, J., Di, J., Cao, H., Bai, J., and Zheng, J. (2015). p53-mediated autophagic regulation: A prospective strategy for cancer therapy. *Cancer Lett.* 363, 101–107.
- Tang, X., Zhu, Y., Han, L., Kim, A.L., Kopelovich, L., Bickers, D.R., and Athar, M. (2007). CP-31398 restores mutant p53 tumor suppressor function and inhibits UVB-induced skin carcinogenesis in mice. *J. Clin. Invest.* 117, 3753–3764.

- Tasdemir, E., Chiara Maiuri, M., Morselli, E., Criollo, A., D'Amelio, M., Djavaheri-Mergny, M., Cecconi, F., Tavernarakis, N., and Kroemer, G. (2008a). A dual role of p53 in the control of autophagy. *Autophagy* 4, 810–814.
- 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. (2008b). Regulation of autophagy by cytoplasmic p53. *Nat. Cell Biol.* 10, 676–687.
- Tassone, P., Old, M., Teknos, T.N., and Pan, Q. (2013). p53-based therapeutics for head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* 49, 733–737.
- Tazawa, H., Kagawa, S., and Fujiwara, T. (2013). Advances in adenovirus-mediated p53 cancer gene therapy. *Expert Opin. Biol. Ther.* 13, 1569–1583.
- Teng, F.Y., Wang, Y., and Tang, B.L. (2001). The syntaxins. *Genome Biol.* 2, REVIEWS3012.
- Terry, S., Buart, S., and Chouaib, S. (2017). Hypoxic Stress-Induced Tumor and Immune Plasticity, Suppression, and Impact on Tumor Heterogeneity. *Front. Immunol.* 8, 1625.
- Terzian, T., Suh, Y.-A., Iwakuma, T., Post, S.M., Neumann, M., Lang, G.A., Van Pelt, C.S., and Lozano, G. (2008). The inherent instability of mutant p53 is alleviated by Mdm2 or p16INK4a loss. *Genes Dev.* 22, 1337–1344.
- Tessoulin, B., Descamps, G., Moreau, P., Maïga, S., Lodé, L., Godon, C., Marionneau-Lambot, S., Oullier, T., Le Gouill, S., Amiot, M., et al. (2014). PRIMA-1Met induces myeloma cell death independent of p53 by impairing the GSH/ROS balance. *Blood* 124, 1626–1636.
- 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 Res.* 71, 5998–6009.
- Thelen, M., Damme, M., Dammé, M., Schweizer, M., Hagel, C., Wong, A.M.S., Cooper, J.D., Braulke, T., and Galliciotti, G. (2012). Disruption of the autophagy-lysosome pathway is involved in neuropathology of the nclf mouse model of neuronal ceroid lipofuscinosis. *PLoS One* 7, e35493.
- Thibodeau, J., Bourgeois-Daigneault, M.-C., Huppé, G., Tremblay, J., Aumont, A., Houde, M., Bartee, E., Brunet, A., Gauvreau, M.-E., de Gassart, A., et al. (2008). Interleukin-10-induced MARCH1 mediates intracellular sequestration of MHC class II in monocytes. *Eur. J. Immunol.* 38, 1225–1230.
- Thielens, A., Vivier, E., and Romagné, F. (2012). NK cell MHC class I specific receptors (KIR): from biology to clinical intervention. *Curr. Opin. Immunol.* 24, 239–245.
- Thiem, A., Hesbacher, S., Kneitz, H., di Primio, T., Heppt, M.V., Hermanns, H.M., Goebeler, M., Meierjohann, S., Houben, R., and Schrama, D. (2019). IFN-gamma-induced PD-L1 expression in melanoma depends on p53 expression. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* CR 38.
- Thiery, J., and Lieberman, J. (2014). Perforin: a key pore-forming protein for immune control of viruses and cancer. *Subcell. Biochem.* 80, 197–220.
- 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. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 170, 5919–5926.
- 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. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 174, 871–878.

- 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., 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. *Nat. Immunol.* *12*, 770–777.
- Thiery, J., Safta, T.B., Ziani, L., and Chouaib, S. (2015). Mechanisms of Cytotoxic Lymphocyte-Mediated Apoptosis and Relationship with the Tumor Suppressor p53. *Crit. Rev. Immunol.* *35*, 433–449.
- Thomas, D.A., and Massagué, J. (2005). TGF-beta directly targets cytotoxic T cell functions during tumor evasion of immune surveillance. *Cancer Cell* *8*, 369–380.
- Thomas, M., Pim, D., and Banks, L. (1999). The role of the E6-p53 interaction in the molecular pathogenesis of HPV. *Oncogene* *18*, 7690–7700.
- Timosenko, E., Hadjinicolaou, A.V., and Cerundolo, V. (2017). Modulation of cancer-specific immune responses by amino acid degrading enzymes. *Immunotherapy* *9*, 83–97.
- Tittarelli, A., Janji, B., Van Moer, K., Noman, M.Z., and Chouaib, S. (2015). The Selective Degradation of Synaptic Connexin 43 Protein by Hypoxia-induced Autophagy Impairs Natural Killer Cell-mediated Tumor Cell Killing. *J. Biol. Chem.* *290*, 23670–23679.
- Tojyo, I., Shintani, Y., Nakanishi, T., Okamoto, K., Hiraishi, Y., Fujita, S., Enaka, M., Sato, F., and Muragaki, Y. (2019). PD-L1 expression correlated with p53 expression in oral squamous cell carcinoma. *Maxillofac. Plast. Reconstr. Surg.* *41*, 56.
- Toledo, F., and Wahl, G.M. (2006). Regulating the p53 pathway: in vitro hypotheses, in vivo veritas. *Nat. Rev. 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. *J. Biol. Chem.* *281*, 8600–8606.
- Tooze, S.A., and Yoshimori, T. (2010). The origin of the autophagosomal membrane. *Nat. Cell Biol.* *12*, 831–835.
- Tran, D.Q., Ramsey, H., and Shevach, E.M. (2007). Induction of FOXP3 expression in naive human CD4+FOXP3 T cells by T-cell receptor stimulation is transforming growth factor-beta dependent but does not confer a regulatory phenotype. *Blood* *110*, 2983–2990.
- Trapani, J.A. (2012). Granzymes, cytotoxic granules and cell death: the early work of Dr. Jurg Tschopp. *Cell Death Differ.* *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. *J. Cell. Mol. Med.* *18*, 2275–2286.
- Trombetta, E.S., and Mellman, I. (2005). Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo. *Annu. Rev. Immunol.* *23*, 975–1028.
- Trotta, R., Dal Col, J., Yu, J., Ciarlariello, D., Thomas, B., Zhang, X., Allard, J., Wei, M., Mao, H., Byrd, J.C., et al. (2008). TGF-beta utilizes SMAD3 to inhibit CD16-mediated IFN-gamma production and antibody-dependent cellular cytotoxicity in human NK cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *181*, 3784–3792.
- Tumeh, P.C., Harview, C.L., Yearley, J.H., Shintaku, I.P., Taylor, E.J.M., Robert, L., Chmielowski, B., Spasic, M., Henry, G., Ciobanu, V., et al. (2014). PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. *Nature* *515*, 568–571.

- Vassilev, L.T. (2007). MDM2 inhibitors for cancer therapy. *Trends Mol. Med.* *13*, 23–31.
- 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.
- Vaughan, C.A., Deb, S.P., Deb, S., and Windle, B. (2014). Preferred binding of gain-of-function mutant p53 to bidirectional promoters with coordinated binding of ETS1 and GABPA to multiple binding sites. *Oncotarget* *5*, 417–427.
- Vignali, D.A.A., Collison, L.W., and Workman, C.J. (2008). How regulatory T cells work. *Nat. Rev. Immunol.* *8*, 523–532.
- Vigneron, N., and Van den Eynde, B.J. (2012). Proteasome subtypes and the processing of tumor antigens: increasing antigenic diversity. *Curr. Opin. Immunol.* *24*, 84–91.
- Vivier, E., Morin, P., O'Brien, C., Druker, B., Schlossman, S.F., and Anderson, P. (1991). Tyrosine phosphorylation of the Fc gamma RIII(CD16): zeta complex in human natural killer cells. Induction by antibody-dependent cytotoxicity but not by natural killing. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *146*, 206–210.
- Vivier, E., Tomasello, E., Baratin, M., Walzer, T., and Ugolini, S. (2008). Functions of natural killer cells. *Nat. Immunol.* *9*, 503–510.
- Vivier, E., Raulet, D.H., Moretta, A., Caligiuri, M.A., Zitvogel, L., Lanier, L.L., Yokoyama, W.M., and Ugolini, S. (2011). Innate or Adaptive Immunity? The Example of Natural Killer Cells. *Science* *331*, 44–49.
- Vivier, E., Ugolini, S., Blaise, D., Chabannon, C., and Brossay, L. (2012). Targeting natural killer cells and natural killer T cells in cancer. *Nat. Rev. Immunol.* *12*, 239–252.
- Vogiatzi, F., Brandt, D.T., Schneikert, J., Fuchs, J., Grikscheit, K., Wanzel, M., Pavlakis, E., Charles, J.P., Timofeev, O., Nist, A., et al. (2016). Mutant p53 promotes tumor progression and metastasis by the endoplasmic reticulum UDPase ENTPD5. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *113*, E8433–E8442.
- 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. *J. Biol. Chem.* *280*, 8426–8434.
- Voskoboinik, I., Dunstone, M.A., Baran, K., Whisstock, J.C., and Trapani, J.A. (2010). Perforin: structure, function, and role in human immunopathology. *Immunol. Rev.* *235*, 35–54.
- Vousden, K.H. (2005). Apoptosis. p53 and PUMA: a deadly duo. *Science* *309*, 1685–1686.
- Vousden, K.H., and Lu, X. (2002). Live or let die: the cell's response to p53. *Nat. Rev. Cancer* *2*, 594–604.
- Vousden, K.H., and Prives, C. (2009). Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53. *Cell* *137*, 413–431.
- Wade, M., Li, Y.-C., and Wahl, G.M. (2013). MDM2, MDMX and p53 in oncogenesis and cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* *13*, 83–96.
- Waggoner, S.N., Cornberg, M., Selin, L.K., and Welsh, R.M. (2011). Natural killer cells act as rheostats modulating antiviral T cells. *Nature* *481*, 394–398.
- Walch, M., Dotiwala, F., Mulik, S., Thiery, J., Kirchhausen, T., Clayberger, C., Krensky, A.M., Martinvalet, D., and Lieberman, J. (2014). Cytotoxic cells kill intracellular bacteria through granzyme-mediated delivery of granzymes. *Cell* *157*, 1309–1323.

- Walerych, D., Lisek, K., Sommaggio, R., Piazza, S., Ciani, Y., Dalla, E., Rajkowska, K., Gaweda-Walerych, K., Ingallina, E., Tonelli, C., et al. (2016). Proteasome machinery is instrumental in a common gain-of-function program of the p53 missense mutants in cancer. *Nat. Cell Biol.* *18*, 897–909.
- Walker, K.K., and Levine, A.J. (1996). Identification of a novel p53 functional domain that is necessary for efficient growth suppression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *93*, 15335–15340.
- Walsh, C.M., Matloubian, M., Liu, C.C., Ueda, R., Kurahara, C.G., Christensen, J.L., Huang, M.T., Young, J.D., Ahmed, R., and Clark, W.R. (1994). Immune function in mice lacking the perforin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *91*, 10854–10858.
- Walton, J., Blagih, J., Ennis, D., Leung, E., Dowson, S., Farquharson, M., Tookman, L.A., Orange, C., Athineos, D., Mason, S., et al. (2016). CRISPR/Cas9-Mediated Trp53 and Brca2 Knockout to Generate Improved Murine Models of Ovarian High-Grade Serous Carcinoma. *Cancer Res.* *76*, 6118–6129.
- Walzer, T., Dalod, M., Robbins, S.H., Zitvogel, L., and Vivier, E. (2005). Natural-killer cells and dendritic cells: “l’union fait la force.” *Blood* *106*, 2252–2258.
- Wang, B., Niu, D., Lai, L., and Ren, E.C. (2013a). p53 increases MHC class I expression by upregulating the endoplasmic reticulum aminopeptidase ERAP1. *Nat. Commun.* *4*, 2359.
- Wang, G.-Q., Wieckowski, E., Goldstein, L.A., Gastman, B.R., Rabinovitz, A., Gambotto, A., Li, S., Fang, B., Yin, X.-M., and Rabinowich, H. (2001). Resistance to Granzyme B-mediated Cytochrome c Release in Bak-deficient Cells. *J. Exp. Med.* *194*, 1325–1338.
- Wang, J., Zhao, Q., Qi, Q., Gu, H., Rong, J., Mu, R., Zou, M., Tao, L., You, Q., and Guo, Q. (2011). Gambogic acid-induced degradation of mutant p53 is mediated by proteasome and related to CHIP. *J. Cell. Biochem.* *112*, 509–519.
- Wang, Q., Lin, W., Tang, X., Li, S., Guo, L., Lin, Y., and Kwok, H.F. (2017). The Roles of microRNAs in Regulating the Expression of PD-1/PD-L1 Immune Checkpoint. *Int. J. Mol. Sci.* *18*.
- 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. *Mol. Cell. Biol.* *23*, 2171–2181.
- Wang, W., Li, F., Mao, Y., Zhou, H., Sun, J., Li, R., Liu, C., Chen, W., Hua, D., and Zhang, X. (2013b). A miR-570 binding site polymorphism in the B7-H1 gene is associated with the risk of gastric adenocarcinoma. *Hum. Genet.* *132*, 641–648.
- Wang, X., Li, J., Dong, K., Lin, F., Long, M., Ouyang, Y., Wei, J., Chen, X., Weng, Y., He, T., et al. (2015). Tumor suppressor miR-34a targets PD-L1 and functions as a potential immunotherapeutic target in acute myeloid leukemia. *Cell. Signal.* *27*, 443–452.
- Wang, Y., Wang, H., Yao, H., Li, C., Fang, J.-Y., and Xu, J. (2018). Regulation of PD-L1: Emerging Routes for Targeting Tumor Immune Evasion. *Front. Pharmacol.* *9*, 536.
- Wang, Z.-T., Chen, Z.-J., Jiang, G.-M., Wu, Y.-M., Liu, T., Yi, Y.-M., Zeng, J., Du, J., and Wang, H.-S. (2016). Histone deacetylase inhibitors suppress mutant p53 transcription via HDAC8/YY1 signals in triple negative breast cancer cells. *Cell. Signal.* *28*, 506–515.
- Waterhouse, N.J., Sedelies, K.A., Browne, K.A., Wowk, M.E., Newbold, A., Sutton, V.R., Clarke, C.J.P., Oliaro, J., Lindemann, R.K., Bird, P.I., et al. (2005). A central role for Bid in granzyme B-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* *280*, 4476–4482.
- Waterhouse, N.J., Sedelies, K.A., and Trapani, J.A. (2006). Role of Bid-induced mitochondrial outer membrane permeabilization in granzyme B-induced apoptosis. *Immunol. Cell Biol.* *84*, 72–78.

- Watzl, C. (2014). How to trigger a killer: modulation of natural killer cell reactivity on many levels. *Adv. Immunol.* *124*, 137–170.
- Wei, F., Zhong, S., Ma, Z., Kong, H., Medvec, A., Ahmed, R., Freeman, G.J., Krogsgaard, M., and Riley, J.L. (2013). Strength of PD-1 signaling differentially affects T-cell effector functions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *110*, E2480-2489.
- 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. *Mol. Cell* *30*, 678–688.
- 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 Differ.* *15*, 718–729.
- Wellenstein, M.D., Coffelt, S.B., Duits, D.E.M., van Miltenburg, M.H., Slagter, M., de Rink, I., Henneman, L., Kas, S.M., Prekovic, S., Hau, C.-S., et al. (2019). Loss of p53 triggers WNT-dependent systemic inflammation to drive breast cancer metastasis. *Nature* *572*, 538–542.
- 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 Differ.* *21*, 196–205.
- Whitesell, L., Sutphin, P.D., Pulcini, E.J., Martinez, J.D., and Cook, P.H. (1998). The physical association of multiple molecular chaperone proteins with mutant p53 is altered by geldanamycin, an hsp90-binding agent. *Mol. Cell. Biol.* *18*, 1517–1524.
- Wijdeven, R.H., Pang, B., Assaraf, Y.G., and Neefjes, J. (2016). Old drugs, novel ways out: Drug resistance toward cytotoxic chemotherapeutics. *Drug Resist. Updat. Rev. Comment. Antimicrob. Anticancer Chemother.* *28*, 65–81.
- Willis, A., Jung, E.J., Wakefield, T., and Chen, X. (2004). Mutant p53 exerts a dominant negative effect by preventing wild-type p53 from binding to the promoter of its target genes. *Oncogene* *23*, 2330–2338.
- Wilson, N.S., Dixit, V., and Ashkenazi, A. (2009). Death receptor signal transducers: nodes of coordination in immune signaling networks. *Nat. Immunol.* *10*, 348–355.
- Wischhusen, J., Naumann, U., Ohgaki, H., Rastinejad, F., and Weller, M. (2003). CP-31398, a novel p53-stabilizing agent, induces p53-dependent and p53-independent glioma cell death. *Oncogene* *22*, 8233–8245.
- Wörmann, S.M., Song, L., Ai, J., Diakopoulos, K.N., Kurkowski, M.U., Görgülü, K., Ruess, D., Campbell, A., Doglioni, C., Jodrell, D., et al. (2016). Loss of P53 Function Activates JAK2-STAT3 Signaling to Promote Pancreatic Tumor Growth, Stroma Modification, and Gemcitabine Resistance in Mice and Is Associated With Patient Survival. *Gastroenterology* *151*, 180-193.e12.
- Xiang, X., Yu, P.-C., Long, D., Liao, X.-L., Zhang, S., You, X.-M., Zhong, J.-H., and Li, L.-Q. (2018). Prognostic value of PD-L1 expression in patients with primary solid tumors. *Oncotarget* *9*, 5058–5072.
- Xie, G., Li, W., Li, R., Wu, K., Zhao, E., Zhang, Y., Zhang, P., Shi, L., Wang, D., Yin, Y., et al. (2017). Helicobacter Pylori Promote B7-H1 Expression by Suppressing miR-152 and miR-200b in Gastric Cancer Cells. *PloS One* *12*, e0168822.
- Xie, Q.-K., Zhao, Y.-J., Pan, T., Lyu, N., Mu, L.-W., Li, S.-L., Shi, M.-D., Zhang, Z.-F., Zhou, P.-H., and Zhao, M. (2016). Programmed death ligand 1 as an indicator of pre-existing adaptive immune responses in human hepatocellular carcinoma. *Oncoimmunology* *5*, e1181252.



- Xu, H., Li, X., Liu, D., Li, J., Zhang, X., Chen, X., Hou, S., Peng, L., Xu, C., Liu, W., et al. (2013). Follicular T-helper cell recruitment governed by bystander B cells and ICOS-driven motility. *Nature* 496, 523–527.
- Xu, J., Timares, L., Heilpern, C., Weng, Z., Li, C., Xu, H., Pressey, J.G., Elmets, C.A., Kopelovich, L., and Athar, M. (2010). Targeting wild-type and mutant p53 with small molecule CP-31398 blocks the growth of rhabdomyosarcoma by inducing reactive oxygen species-dependent apoptosis. *Cancer Res.* 70, 6566–6576.
- Xu, S., Tao, Z., Hai, B., Liang, H., Shi, Y., Wang, T., Song, W., Chen, Y., OuYang, J., Chen, J., et al. (2016). miR-424(322) reverses chemoresistance via T-cell immune response activation by blocking the PD-L1 immune checkpoint. *Nat. Commun.* 7, 11406.
- Yang, J.K. (2015). Death effector domain for the assembly of death-inducing signaling complex. *Apoptosis Int. J. Program. Cell Death* 20, 235–239.
- Yang, L., and Zhang, Y. (2017). Tumor-associated macrophages: from basic research to clinical application. *J. Hematol. Oncol.* *J Hematol Oncol* 10.
- Yang, Z., and Klionsky, D.J. (2009). An overview of the molecular mechanism of autophagy. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 335, 1–32.
- Yang, A., Kaghad, M., Wang, Y., Gillett, E., Fleming, M.D., Dötsch, 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. *Mol. Cell* 2, 305–316.
- Yang, C., Maignel, D.A., and Carrier, F. (2002). Identification of nucleolin and nucleophosmin as genotoxic stress-responsive RNA-binding proteins. *Nucleic Acids Res.* 30, 2251–2260.
- Yang, K., Zhou, J., Chen, Y., Chen, Y., Chen, L., Zhang, P., Ma, L., Jiang, Z., Bian, J., and Yin, W. (2020). Angiotensin II contributes to intratumoral immunosuppression via induction of PD-L1 expression in non-small cell lung carcinoma. *Int. Immunopharmacol.* 84, 106507.
- Yang, Z., Wang, D., Wang, G., Zhang, Q., Liu, J., Peng, P., and Liu, X. (2010). Clinical study of recombinant adenovirus-p53 combined with fractionated stereotactic radiotherapy for hepatocellular carcinoma. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 136, 625–630.
- Yee-Lin, V., Pooi-Fong, W., and Soo-Beng, A.K. (2018). Nutlin-3, A p53-Mdm2 Antagonist for Nasopharyngeal Carcinoma Treatment. *Mini Rev. Med. Chem.* 18, 173–183.
- Yokosuka, T., and Saito, T. (2010). The immunological synapse, TCR microclusters, and T cell activation. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 340, 81–107.
- 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.
- Yoshikawa, N., Kajiyama, H., Nakamura, K., Utsumi, F., Niimi, K., Mitsui, H., Sekiya, R., Suzuki, S., Shibata, K., Callen, D., et al. (2016). PRIMA-1MET induces apoptosis through accumulation of intracellular reactive oxygen species irrespective of p53 status and chemo-sensitivity in epithelial ovarian cancer cells. *Oncol. Rep.* 35, 2543–2552.
- Youle, R.J., and Strasser, A. (2008). The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 47–59.
- Youn, J.-Y., Dyakov, B.J.A., Zhang, J., Knight, J.D.R., Vernon, R.M., Forman-Kay, J.D., and Gingras, A.-C. (2019). Properties of Stress Granule and P-Body Proteomes. *Mol. Cell* 76, 286–294.
- Youssef, M.M.S., Symonds, P., Ellis, I.O., and Murray, J.C. (2006). EMAP-II-dependent lymphocyte killing is associated with hypoxia in colorectal cancer. *Br. J. Cancer* 95, 735–743.

- Yu, X., Blanden, A.R., Narayanan, S., Jayakumar, L., Lubin, D., Augeri, D., Kimball, S.D., Loh, S.N., and Carpizo, D.R. (2014). Small molecule restoration of wildtype structure and function of mutant p53 using a novel zinc-metallochaperone based mechanism. *Oncotarget* 5, 8879–8892.
- Yuan, J., Yeasky, T.M., Havre, P.A., and Glazer, P.M. (1995). Induction of p53 in mouse cells decreases mutagenesis by UV radiation. *Carcinogenesis* 16, 2295–2300.
- Yun, C.W., and Lee, S.H. (2018). The Roles of Autophagy in Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* 19.
- Zaffagnini, G., and Martens, S. (2016). Mechanisms of Selective Autophagy. *J. Mol. Biol.* 428, 1714–1724.
- 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 Rep.* 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. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 17, 2830–2841.
- Zanjirband, M., Edmondson, R.J., and Lunec, J. (2016). Pre-clinical efficacy and synergistic potential of the MDM2-p53 antagonists, Nutlin-3 and RG7388, as single agents and in combined treatment with cisplatin in ovarian cancer. *Oncotarget* 7, 40115–40134.
- Zhang, D., Beresford, P.J., Greenberg, A.H., and Lieberman, J. (2001a). Granzymes A and B directly cleave lamins and disrupt the nuclear lamina during granule-mediated cytolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 5746–5751.
- Zhang, D., Pasternack, M.S., Beresford, P.J., Wagner, L., Greenberg, A.H., and Lieberman, J. (2001b). Induction of rapid histone degradation by the cytotoxic T lymphocyte protease Granzyme A. *J. Biol. Chem.* 276, 3683–3690.
- Zhang, J., Tsapralis, G., and Bowden, G.T. (2008). Nucleolin stabilizes Bcl-X L messenger RNA in response to UVA irradiation. *Cancer Res.* 68, 1046–1054.
- Zhang, J., Bu, X., Wang, H., Zhu, Y., Geng, Y., Nihira, N.T., Tan, Y., Ci, Y., Wu, F., Dai, X., et al. (2018). Cyclin D-CDK4 kinase destabilizes PD-L1 via cullin 3-SPOP to control cancer immune surveillance. *Nature* 553, 91–95.
- Zhang, X.-L., Xu, L.-L., and Wang, F. (2017). Hsa\_circ\_0020397 regulates colorectal cancer cell viability, apoptosis and invasion by promoting the expression of the miR-138 targets TERT and PD-L1. *Cell Biol. Int.* 41, 1056–1064.
- Zhao, Y.G., and Zhang, H. (2019). Autophagosome maturation: An epic journey from the ER to lysosomes. *J. Cell Biol.* 218, 757–770.
- 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. *J. Biol. Chem.* 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. *J. Biol. Chem.* 282, 12104–12111.
- Zhu, J., Huang, X., and Yang, Y. (2012). Myeloid-derived suppressor cells regulate natural killer cell response to adenovirus-mediated gene transfer. *J. Virol.* 86, 13689–13696.
- Zhu, J., Chen, L., Zou, L., Yang, P., Wu, R., Mao, Y., Zhou, H., Li, R., Wang, K., Wang, W., et al. (2014). MiR-20b, -21, and -130b inhibit PTEN expression resulting in B7-H1 over-expression in advanced colorectal cancer. *Hum. Immunol.* 75, 348–353.

Zhu, J., Sammons, M.A., Donahue, G., Dou, Z., Vedadi, M., Getlik, M., Barsyte-Lovejoy, D., Al-awar, R., Katona, B.W., Shilatifard, A., et al. (2015). Gain-of-function p53 mutants co-opt chromatin pathways to drive cancer growth. *Nature* 525, 206–211.

Zhu, K., Wang, J., Zhu, J., Jiang, J., Shou, J., and Chen, X. (1999). p53 induces TAP1 and enhances the transport of MHC class I peptides. *Oncogene* 18, 7740–7747.

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.

Ziani, L., Chouaib, S., and Thiery, J. (2018). Alteration of the Antitumor Immune Response by Cancer-Associated Fibroblasts. *Front. Immunol.* 9, 414.

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

Zitvogel, L., Apetoh, L., Ghiringhelli, F., and Kroemer, G. (2008). Immunological aspects of cancer chemotherapy. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 59–73.

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. *J. Biol. Chem.* 274, 11549–11556.