



HAL
open science

Rôle de la phosphatase Wip1 dans la nécroptose

Lisa Lagorgette

► **To cite this version:**

Lisa Lagorgette. Rôle de la phosphatase Wip1 dans la nécroptose. Autre. Université Bourgogne Franche-Comté, 2024. Français. NNT : 2024UBFCI008 . tel-04773992

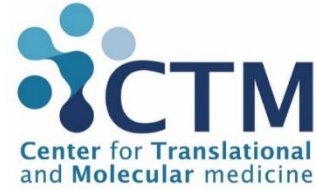
HAL Id: tel-04773992

<https://theses.hal.science/tel-04773992v1>

Submitted on 8 Nov 2024

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

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



**THESE DE DOCTORAT DE L'ETABLISSEMENT UNIVERSITÉ DE BOURGOGNE
PRÉPARÉE A L'INSERM UMR 1231 (CTM), UFR DES SCIENCES DE SANTÉ**

Ecole doctorale n°554

Environnements-Santé

Présentée pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE BOURGOGNE

Spécialité : Biochimie, Biologie Cellulaire et Moléculaire

Présentée et soutenue à Dijon le 12 septembre 2024

Par

Lisa LAGORGETTE

Rôle de la phosphatase Wip1 dans la nécroptose

Composition du Jury :

Pr Inna LAVRIK, Professeur Université de Magdeburg

Rapportrice

Dr Yegor VASSETZKY, DR1 Gustave Roussy

Rapporteur

Dr Murat SAPARBAEV, DR1 Gustave Roussy

Examineur

Dr Oleg DEMIDOV, CR1 Université de Bourgogne

Directeur de thèse

Dr Carmen GARRIDO, DR1 Université de Bourgogne

Présidente du jury

Remerciements

Tout d'abord, je souhaite remercier vivement les membres de mon jury de thèse, qui me font l'honneur de juger mon travail. Je remercie la **Pr Inna Lavrik** et le **Dr Yegor Vassetski** pour leur temps consacré à mon travail en leur qualité de rapportrice et rapporteur de thèse. Je tiens également à remercier le **Dr Murat Saparbaev** d'avoir accepté de faire parti de mon jury de thèse en qualité d'examinateur. Merci à vous qui vous êtes déplacés de loin pour certains et jusqu'en Bourgogne pour l'occasion.

Je saisis également cette opportunité pour remercier le ministère de l'Enseignement supérieur et de la Recherche pour m'avoir accordé une bourse MESRI ainsi que le Centre Georges François Leclerc pour avoir financé ma dernière année de thèse.

Je tiens à remercier le **Dr Carmen Garrido**, directrice de notre équipe, qui m'a permis de pouvoir prolonger cette fin de thèse sereinement et qui a toujours été à l'écoute auprès de tous. Merci également d'avoir accepté d'être examinatrice et présidente de mon jury.

Je tiens à remercier particulièrement le **Dr Oleg Demidov**, mon directeur de thèse, de m'avoir accueilli depuis mon stage de M1, puis de M2 pour ensuite poursuivre l'aventure en thèse. Un grand merci pour la confiance que vous m'avez accordé depuis le début dans les divers travaux de recherche que nous avons entrepris. Même si tous n'ont pas été fructueux, je suis assez fière du travail que nous avons pu accomplir depuis ces années. Je tiens également à vous remercier de m'avoir fait découvrir et apprendre diverses thématiques et techniques relatives à notre domaine qui m'ont permis d'enrichir, développer et améliorer ma curiosité et mon raisonnement scientifique. Je sors largement grandie de cette expérience et vous remercie pour tous ces échanges scientifiques ou non qui m'ont permis de m'épanouir durant toutes ces années !

Je tiens également à remercier **Jeanne**, membre emblématique de l'équipe OD, avec qui j'ai partagé une grande partie de ma thèse. Jeannette pour les intimes, un grand merci pour ta présence dès le premier stage et surtout pendant ma thèse où nous avons pu davantage apprendre à se connaître et travailler ensemble toujours dans la bonne humeur. Ta rigueur, ton professionnalisme, ta franchise et bienveillance auront été d'une grande aide dès le début jusqu'à la fin de ma thèse. Merci pour l'aide que tu m'as accordée à la paillasse et également un grand merci pour ton soutien, notamment au début puis tout le long des années. Partie depuis un an, nos discussions scientifiques et surtout toutes les autres m'auront manquées sans parler des restaurants du midi ! Reste comme tu es et je te souhaite un bel avenir à l'Ub ou même ailleurs avec Alex et toutes les personnes chères à tes yeux. Je tiens également à remercier **Anya** pour sa bonne humeur durant ce petit séjour français. J'espère que tu as su trouver un endroit où t'épanouir et je te souhaite le meilleur.

Voisine du bureau OD et membre actif des restaurants du midi, je tiens à te remercier **Julie** pour ta présence tout au long de ma thèse. Un grand merci notamment pour ce fameux lundi matin où tu as su être à l'écoute et de très bons conseils. Ta bonne humeur, ton rire communicatif et ta bienveillance auront marqué le labo et m'auront manqué pendant cette dernière année. En dehors de ta générosité, je ne peux qu'être admirative de ton parcours et de la carrière que tu entreprends qui reflètent tes nombreux efforts et ta rigueur scientifique ! Je te souhaite le meilleur et réussir tout ce que tu entreprends, à toi et à Burhan ! **Burhan**, un grand merci pour m'avoir transmis toutes tes connaissances dès mon stage de M1 et m'avoir permis d'accéder à la thèse. Ta bonne humeur et ta générosité m'auront accompagné pendant mes stages mais également après lors de tes nombreux passages au labo. Je te souhaite du courage et de la réussite pour les prochaines années, qui, sans aucun doute te permettront de devenir un médecin de qualité.

Je tiens également à te remercier **Lucile** pour ta bonne humeur et tes conseils de tous types. Echanger avec toi est toujours agréable et ta gentillesse, ta disponibilité et ton professionnalisme sont

indispensables à l'équipe. Je te souhaite le meilleur au sein de l'équipe et plein de bonheur avec ta petite famille.

Partageant le même labo et voisins de bureau, je souhaite remercier la team Jego. **Manon**, nous avons commencé notre thèse le même jour et tu l'as terminé quelques mois avant avec brio ! Merci pour ton aide, tes conseils et les déjeuners partagés. Même si nous ne savons pas où l'on finira, je te souhaite le meilleur et te t'épanouir à tous les niveaux peu importe où tu seras (la Suède peut-être...). Mister WB, un grand merci **Vincent** pour ton aide et les connaissances que tu as su me transmettre qui ont grandement participé à la réussite de cette thèse. Te voilà outre-Mer où je ne me fais aucun doute quant à ta réussite.

Presque la dernière arrivée de l'équipe CG, je souhaite dire un grand merci à **Flavie**. Souriante et solaire, ta bonne humeur et ta bienveillance auront amené un vent nouveau à nos bureaux et labos. Je tiens à te remercier pour toutes ces conversations, scientifiques ou non, qui auront égayés ces deux dernières années de thèse. Ces beaux moments rythmés par de nombreux cafés et repas partagés m'auront permis de rendre cette dernière année plus douce et paisible dans certains moments. Même si je n'en fais aucun doute, je te souhaite le meilleur pour la suite de ta thèse et tu peux être fière de ce que tu as accompli et de ce qui t'attend. Ta rigueur, curiosité, motivation et persévérance te permettront d'aller au bout de (tes) nombreux projets. Même si la vieille part du labo, je serai toujours dispo pour un verre accompagné de fromage et saucisson.

Je ne peux citer l'une sans l'autre, merci à **Aurélie** pour ton humour et ta bonne humeur (ou pas ahah) au L2 et dans le labo depuis ton arrivée. Je te souhaite également une belle fin de thèse, sereine et pleine de réussite (et ne l'oublie pas, pense à toi). Je tiens également à remercier l'ensemble de la team DD pour ces déjeuners partagés. Déjà partie, merci à toi **Clarisse** pour ton humour incisif et les conversations que l'on a pu partager. J'espère que tu t'épanouie où tu es et que tu écris de nombreux nouveaux protocoles. Bon courage à toi **Maude** pour la fin de thèse et la suite.

Personne indispensable au laboratoire et à la réussite de ce travail, je tiens énormément à te remercier **Abdel**. Un grand merci pour ton aide et ton implication dans mon projet, sans toi je n'aurais pas pu générer une grande partie de ce travail. Toujours de bonne humeur, (trop) volontaire et à l'écoute, je te souhaite de trouver un endroit à la hauteur de ton talent et de tes compétences où tu pourras devenir le chercheur que tu souhaites. Je te souhaite le meilleur pour l'avenir et de prendre du temps pour toi ! Je tiens également à remercier le Dr **Olivier Micheau** pour son implication dans mon projet et les conseils apportés.

Je tiens également à remercier **Elise** et **François** pour votre bonne humeur, votre implication et l'aide que vous apportez à chacun. François, même si tu es parti de l'autre côté, tu resteras toujours un CG de cœur et tes petits passages dans le box nous le rappellent. Ton humour et les conseils scientifiques que tu as su apporter dès mon stage m'auront accompagné tout au long de cette aventure. Nouvelle recrue CG, merci à toi Elise de m'avoir permis de réaliser ce petit séjour Suisse, fort sympathique. Consœur de burpees et squats, ça a été un réel plaisir de partager cette dernière année avec toi. Même si tu n'en es pas sûr, je suis certaine que tu sauras apporter beaucoup à cette équipe, et crois-moi tu as déjà commencé. Ne changez rien !

Je tiens également à remercier **Anaïs**, le binôme que j'ai pu rencontrer il y a quelques années maintenant. Ayant suivie le même parcours, nous nous sommes entraînées et soutenues sur de nombreux projets sans jamais être en compétition. Toujours positive, je ne peux qu'être admirative de ta motivation et ta force de travail qui te promettent une belle carrière. Encore un peu de courage, c'est bientôt ton tour !

Enfin, je tiens à remercier toutes les autres personnes de l'équipe CG que j'ai pu côtoyer. **Lenny**, je tiens à te remercier de la bonne humeur que tu as apportée au début de ta thèse et te souhaite pleins de réussite et bonheur, et à très vite pour ton retour dans l'hexagone. **Valentin**, c'est la dernière ligne droite, tout mon soutien pour ces derniers moments parfois difficiles et je te souhaite de pouvoir réaliser tous tes projets. **Adilah**, je te souhaite également le meilleur pour ton avenir, dans les plantes

ou dans la santé, tu sauras mettre à profit toutes tes connaissances j'en suis certaine. Arrivant également sur la fin, **Alexandsandra** et **Aude**, je vous souhaite le meilleur. Ayant grandement participé à la réussite de ce projet, je tiens à remercier **Yana** et **Julie**, les deux stagiaires que j'ai pu encadrer et former. J'espère avoir été à la hauteur et vous avoir appris l'essentiel et vous remercie grandement d'avoir contribué au commencement de ce projet pour Yana, et à la fin de ce projet pour Julie.

Je tiens également à remercier les membres de la **plateforme ImaFlow** et la **plateforme de Zootechnie**, merci pour nos échanges et l'aide que vous m'avez accordé lorsque j'ai pu vous solliciter. Enfin, un grand merci général à tous **les membres des équipes de 3ème étage** sans qui le quotidien n'aurait pas été aussi appréciable. Je ressors grandie humainement et scientifiquement des échanges divers et variés avec chacun. Merci pour cet environnement positif et propice à la bonne réalisation d'une thèse.

La grange, camarades du cocorico, membres actifs du comité des fêtes et d'autres surnoms oubliés, je tiens à dire un grand merci à tous mes amis. Vous citer un à un serait trop long mais je tiens à tous vous remercier chaleureusement pour votre présence et les bons moments partagés. Merci d'être là depuis toutes ces années et de m'avoir permis de respirer et de rigoler, tous ces vendredis soir et ces nombreux week-ends. Merci pour ces parenthèses hivernales à Tignes, ces escapades parisiennes et les virées estivales ! Un grand merci également au « raclis » pendant cette bulle du mois de mai qui m'a fait grand bien. Tous différents mais se ressemblant sur tellement de choses, je suis certaine que nous avons encore de nombreux beaux moments à partager. Et surtout, ne changez rien !

Partageant mon quotidien depuis plusieurs années maintenant, je tiens à remercier **ma belle-famille**, pour votre présence et votre soutien. Vous êtes synonymes de partage et générosité. Merci pour tous ces souvenirs et ces beaux moments partagés à la montagne et lors des nombreuses fêtes de famille, toujours réussies bien sûr !

Je tiens également à remercier toute **ma famille, mes grands-parents, mes oncles et tantes et mes cousins et cousines**. Merci pour votre soutien et ces beaux moments partagés lors de nos réunions de famille. Cette réussite est aussi la vôtre puisque vous m'avez permis de grandir dans un environnement sain et bienveillant, avec toujours une ouverture d'esprit qui a su attiser ma curiosité depuis petite.

Enfin, je n'en serai pas arrivée jusque-là sans l'aide et le soutien de mes parents. **Papa, Maman**, je ne peux que vous dire merci. Merci pour les valeurs et l'ouverture d'esprit que vous nous avez transmis, qui nous ont permis de devenir les femmes que l'on est aujourd'hui. Merci d'avoir cru en nous et de nous avoir toujours laissé le choix et permis de réaliser les études que l'on a souhaité, même si ce n'était pas le chemin que l'on nous avait tracé. Vous êtes toujours une oreille attentive en cas de doutes, de questionnements et savez trouver les mots justes. Comme vous le dites si bien, la vie est une succession de choix et vous m'avez permis de choisir les bons pour en arriver jusque-là. Tout simplement, merci pour votre amour et votre présence.

Je tiens également à remercier **ma sœur** et toute sa petite famille. Notre complicité ne fait que se renforcer avec le temps laissant place à de très beaux moments partagés et d'autres en devenir. Souvent première à connaître mes péripéties, tu es toujours de bons conseils et tu m'as permis de relativiser à certains moments et prendre les bonnes décisions. Je suis admirative de la femme forte et déterminée que tu es, sur qui on peut toujours compter. Je tiens également à remercier mon beaufrère, comme on sait si bien le dire. Merci pour ton humour subtil, ta bienveillance et ta zenitude qui permet de calmer parfois les Lagorgette. Et bien sûr merci à mes deux petites nièces qui ont agrandi la famille, qui me font rire et m'apportent beaucoup de joie et de tendresse.

Enfin, je tiens à remercier du fond du cœur **mon conjoint**. Depuis le début tu m'as toujours soutenu dans mes projets et m'a poussé à donner le meilleur de moi-même. Ta bienveillance, ta générosité, ton humour et ta patience ont permis de rendre cette aventure plus douce. Voilà la fin d'une aventure et le début de bien d'autres j'en suis certaine. Encore merci car je n'y serais jamais arrivée sans toi.

Résumé/Abstract

Titre : Rôle de la phosphatase Wip1 dans la nécroptose

Mots clés : *Wip1, Phosphatase, Nécroptose, Mort cellulaire, Cancer*

Indispensable à la signalisation cellulaire, la phosphorylation des protéines joue un rôle clef dans les voies de morts cellulaires et est largement décrite dans la littérature s'intéressant aux différentes kinases impliquées. A l'inverse, la déphosphorylation des protéines est moins étudiée mais les phosphatases jouent un rôle prédominant dans ces mécanismes de morts cellulaires. Nouvelle mort cellulaire programmée, la nécroptose se présente comme une mort cellulaire aux fortes propriétés immunogènes. L'induction de mort cellulaire immunogène peut être proposée comme stratégie thérapeutique afin d'améliorer les traitements anti-cancéreux existants et contourner les mécanismes de résistance. Surexprimée dans de nombreux cancers, la phosphatase PPM1D, également appelée Wip1, est décrite comme un régulateur majeur des voies de morts cellulaires comme l'apoptose, l'autophagie ou la sénescence. Ce travail s'intéresse alors au rôle de la phosphatase Wip1 dans la nécroptose. A l'aide de plusieurs modèles cellulaires de déficiences génétiques, nous proposons Wip1 comme un régulateur négatif de la nécroptose par son interaction avec la kinase RIPK3 dans le noyau. Enfin, l'inhibition de Wip1 est proposée comme une stratégie thérapeutique prometteuse afin d'augmenter l'induction de morts cellulaires immunogènes.

Title : Role of Wip1 phosphatase in necroptosis

Keywords : *Wip1, Phosphatases, Necroptosis, Cell death, Cancer*

Phosphorylation of critical proteins in cell death pathways is well described in the literature, but mostly from the point of kinases. Dephosphorylation is usually studied much less, but phosphatases could prevent the execution of suicidal cell death programs. Necroptosis appears as a new type of programmed cell death known for its immunogenic properties. Inducing immunogenic cell death could be proposed to improve cancer treatment and avoid multidrug resistance. Overexpressed in several cancers, the phosphatase PPM1D, also named Wip1, is described as central regulator of cell death pathways such as apoptosis, autophagy or senescence. This work investigates the role of the phosphatase Wip1 in the programmed necroptosis cell death. Using several genetically deficient cell line models, we propose Wip1 as a negative regulator of necroptosis through its interaction with the kinase RIPK3 into the nucleus. Finally, Wip1 inhibition is proposed as a promising therapeutic strategy in order to improve immunogenic cell death induction.

Table des matières

| | |
|--|----|
| Remerciements | 2 |
| Résumé/Abstract..... | 5 |
| Table des matières | 6 |
| Table des illustrations..... | 11 |
| Table des tableaux..... | 18 |
| Liste des abréviations | 19 |
| Introduction..... | 20 |
| I. Le cancer..... | 20 |
| 1. Origine et découverte..... | 20 |
| 2. Incidence et prévalence | 20 |
| 3. Facteurs de risque et dépistage | 22 |
| 4. Processus tumoral | 23 |
| 4.a Classification des tumeurs /Nomenclature | 23 |
| 4.b Notions de proto-oncogène et de gène suppresseur de tumeur..... | 24 |
| 4.c « Hallmarks of cancer » | 25 |
| 4.c.i Maintien des signaux prolifératifs..... | 25 |
| 4.c.ii Insensibilité aux signaux inhibiteurs de croissance..... | 25 |
| 4.c.iii Résistance aux morts cellulaires..... | 26 |
| 4.c.iv Potentiel de réplication illimité | 26 |
| 4.c.v Induction de l'angiogenèse | 27 |
| 4.c.vi Capacité d'invasion et de formation de métastases | 27 |
| 4.c.vii Instabilité génomique et mutations | 28 |
| 4.c.viii Inflammation favorisant la tumeur | 28 |
| 4.c.ix Dérégulation du métabolisme énergétique | 29 |
| 4.c.x Echappement au système immunitaire..... | 29 |
| 4.c.xi Plasticité phénotypique..... | 30 |
| 4.c.xii Reprogrammation épigénétique non mutationnelle | 30 |
| 4.c.xiii Polymorphisme du microbiome : | 31 |
| 4.c.xiv Senescence | 32 |
| 4.d Transformation cellulaire : initiation, promotion, progression..... | 33 |
| 4.e Concept de l'immunoediting : élimination, équilibre, échappement | 33 |
| II. Thérapies anticancéreuses | 35 |
| 1. Les diverses chimiothérapies | 36 |
| 1.a Les agents alkylants..... | 36 |
| 1.b Les antimétabolites | 36 |
| 1.c Les inhibiteurs du fuseau mitotique..... | 37 |
| 1.d Les inhibiteurs de topoisomérase I et II | 37 |

| | | |
|-------------|--|----|
| 1.e | Autres agents chimiothérapeutiques | 37 |
| 2. | Thérapies ciblées | 38 |
| 2.a | Anticorps monoclonaux..... | 38 |
| 2.b | Inhibiteurs à petites molécules | 39 |
| 3. | Immunothérapie..... | 40 |
| 3.a | L'immunothérapie passive | 40 |
| 3.a.i | Cytokines | 40 |
| 3.a.ii | Transfert adoptif de cellules/Thérapie cellulaire adoptive | 41 |
| II.3.a.ii.1 | Tumor Infiltrated Lymphocytes (TILs) | 41 |
| II.3.a.ii.2 | CAR-T..... | 41 |
| 3.b | Immunothérapie active | 42 |
| 3.b.i | Vaccins oncolytiques | 42 |
| 3.b.ii | Vaccins anti-tumoraux..... | 42 |
| 3.b.iii | Inhibiteurs des immune checkpoints | 43 |
| III. | Résistance aux traitements et morts cellulaires | 44 |
| 1. | Mécanismes de résistance | 44 |
| 1.a | Efflux du traitement | 44 |
| 1.b | Inactivation des agents anticancéreux | 45 |
| 1.c | Altérations épigénétiques | 45 |
| 1.d | Amélioration de la réparation de l'ADN | 45 |
| 1.e | TEM..... | 46 |
| 1.f | Cellules souches cancéreuses..... | 46 |
| 1.g | Hétérogénéité de la tumeur..... | 47 |
| 1.h | Résistances aux mort cellulaires..... | 47 |
| 2. | Morts cellulaires et résistances : les voies communément altérées | 48 |
| 2.a | Apoptose et résistance | 48 |
| 2.a.i | Voie intrinsèque | 49 |
| 2.a.ii | Voie extrinsèque..... | 49 |
| 2.a.iii | Voie commune..... | 50 |
| 2.b | Autophagie et résistance..... | 52 |
| 2.c | Autres morts cellulaires et résistance | 54 |
| IV. | La nécroptose : focus sur une mort cellulaire programmée immunogène..... | 58 |
| 1. | Découverte | 58 |
| 2. | Mécanisme | 59 |
| 2.a | Initiation : activation par la voie canonique | 60 |
| 2.a.i | Récepteur TNFR1..... | 61 |
| 2.a.ii | Récepteurs Fas, DR4/DR5 et DR6 | 62 |

| | | |
|---------|---|----|
| 2.a.iii | Récepteurs à l'interféron..... | 62 |
| 2.b | Initiation : activation par la voie non canonique..... | 63 |
| 2.b.i | Récepteurs TLR3/4 | 63 |
| 2.b.ii | ZBP1..... | 63 |
| 2.c | Formation du nécrosome : les protéines clefs | 63 |
| 2.c.i | RIPK1..... | 63 |
| 2.c.ii | RIPK3..... | 65 |
| 2.c.iii | MLKL..... | 66 |
| 2.d | Perméabilisation de la membrane plasmique et relargage de DAMPs..... | 68 |
| 3. | Contexte physiopathologique de la nécroptose | 69 |
| 3.a | Développement et embryogenèse..... | 69 |
| 3.b | Maladies cardiaques..... | 69 |
| 3.c | Maladies neurodégénératives..... | 70 |
| 3.d | Inflammation | 71 |
| 3.e | Cancer..... | 71 |
| 3.e.i | Rôle antitumoral..... | 71 |
| 3.e.ii | Rôle pro-tumoral | 75 |
| 4. | Induction de la nécroptose comme stratégie thérapeutique | 77 |
| 4.a | DAMPs et vaccination..... | 77 |
| 4.b | Utilisation de chimiothérapies comme inducteurs de nécroptose | 78 |
| 4.c | Utilisation de composés naturels pour induire la nécroptose | 79 |
| 4.d | Utilisation de smac mimetics comme inducteurs de nécroptose | 79 |
| 5. | Modèle d'étude de la nécroptose | 80 |
| 5.a | Cellules utilisées | 80 |
| 5.b | Inducteurs de la nécroptose..... | 80 |
| 5.c | Inhibiteurs de la nécroptose..... | 81 |
| 5.d | Techniques de détection | 84 |
| V. | La phosphatase Wip1, régulateur important des voies de morts cellulaires..... | 86 |
| 1. | Les phosphatases, protéines essentielles à l'homéostasie cellulaire..... | 86 |
| 2. | Familles des PP2C | 87 |
| 3. | Focus sur la phosphatase Wip1, une cible thérapeutique prometteuse | 89 |
| 3.a | Structure et activité phosphatase | 89 |
| 3.b | Wip1, régulateur de divers morts cellulaires et senescence..... | 89 |
| 3.b.i | Wip1, régulateur de l'apoptose..... | 90 |
| 3.b.ii | Wip1, régulateur de l'autophagie | 91 |
| 3.b.iii | Wip1, régulateur de la NETose..... | 92 |
| 3.b.iv | Wip1, régulateur de la sénescence | 93 |

| | | |
|---|---|-----|
| V.3.b.iv.1 | Axe p53-p21 | 93 |
| V.3.b.iv.2 | Axe p38-p16 | 95 |
| 3.c | Autres fonctions de Wip1..... | 97 |
| 3.c.i | Wip1, un médiateur clé de l'hématopoïèse et du système immunitaire..... | 97 |
| V.3.c.i.1 | Hématopoïèse..... | 97 |
| V.3.c.i.2 | Lymphocytes T | 97 |
| V.3.c.i.3 | Lymphocytes B | 98 |
| V.3.c.i.4 | Cellules myéloïdes | 98 |
| V.3.c.i.5 | Réponse inflammatoire | 100 |
| 3.c.ii | Wip1, un médiateur dans le neurodéveloppement..... | 101 |
| 3.d | Wip1, une protéine surexprimée dans de nombreux cancers et potentielle cible thérapeutique..... | 102 |
| Problématique – Objectifs de thèse..... | | 104 |
| Matériels et méthodes..... | | 105 |
| I. | Modèles d'études..... | 105 |
| 1. | Cellules utilisées | 105 |
| 2. | Génération de lignées cellulaires CRISPR-Cas9 | 105 |
| 2.a | Stratégie de clonage..... | 105 |
| 2.a.i | Hybridation des oligonucléotides..... | 105 |
| 2.a.ii | Ligation et transformation..... | 106 |
| 2.a.iii | Vérification du clonage..... | 106 |
| 2.b | Transfection et sélection des cellules CRISPR-Cas9 positives | 106 |
| 3. | Génération de modèles de surexpression par infection virale | 107 |
| 3.a | Production de particules virales | 107 |
| 3.b | Infection des cellules d'intérêt | 107 |
| 4. | Transfection transitoire..... | 108 |
| 5. | Isolation de cellules murines..... | 109 |
| 6. | Modèle vivo..... | 109 |
| II. | Traitements | 109 |
| III. | Etudes protéiques | 110 |
| 1. | Western-blot | 110 |
| 1.a | Préparation des échantillons..... | 110 |
| 1.b | Migration et transfert..... | 110 |
| 1.c | Blocage, incubations et anticorps primaires | 111 |
| 1.d | Anticorps secondaires et révélations | 112 |
| 2. | Co-immunoprécipitation | 112 |
| 3. | Isolation du cytoplasme et du noyau | 113 |
| 4. | Western-blot sur surnageant | 113 |

| | | |
|------|--|-----|
| 5. | Immunofluorescence..... | 113 |
| 6. | Expériences de ligature de proximité duolink (PLA) | 114 |
| IV. | Test de mortalité | 115 |
| 1. | Incucyte – 7AAD | 115 |
| 2. | Cell Titer Glo (CTG) | 115 |
| | Résultats..... | 116 |
| I. | Développement de lignées KO et de modèles de surexpression..... | 116 |
| 1. | Modèles de déficiences CRISPR-Cas9..... | 116 |
| 1.a | Stratégies de clonages..... | 116 |
| 1.b | Génération de lignées Wip1 KO et PPM1B KO..... | 117 |
| 1.c | Génération des lignées DKO Wip1 et PPM1B dans les cellules MC38..... | 118 |
| 1.d | Génération de lignées MC38 RIPK3 KO | 119 |
| 2. | Modèles de surexpression protéique..... | 119 |
| 2.a | Modèles de surexpression de la protéine RIPK3 humaine..... | 119 |
| 2.b | Modèle de surexpression de la protéine Wip1 | 120 |
| II. | Induction <i>in vitro</i> de la nécroptose | 121 |
| 1. | L'inhibition de Wip1 par le GSK2830371 potentialise les morts cellulaires dépendantes du TNF 121 | |
| 2. | L'inhibition de Wip1 par le GSK2830371 potentialise l'induction de la nécroptose..... | 124 |
| 3. | La kinase RIPK3 est nécessaire à l'activation de la nécroptose..... | 127 |
| III. | L'absence de phosphatases PP2C potentialise l'induction de la nécroptose..... | 132 |
| IV. | Nécroptose nucléaire et interaction entre Wip1 et RIPK3..... | 138 |
| 1. | Localisation nucléaire de la phosphatase Wip1 | 138 |
| 2. | Localisation nucléaire de la kinase RIPK3..... | 140 |
| 3. | Wip1 semble interagir avec RIPK3 au niveau du noyau | 143 |
| | Discussion..... | 146 |
| | Conclusion générale | 153 |
| | Références bibliographiques..... | 154 |
| | Liste des publications et présentations..... | 182 |
| | Annexe 1 – Revue 1 ^{er} auteur | 183 |
| | Annexe 2 – Participation publications..... | 204 |
| | Annexe 3..... | 230 |
| | Annexe 4..... | 231 |

Table des illustrations

Figure 1 : Schéma représentant l'incidence et la mortalité des 10 cancers les plus fréquents dans le monde, en 2020. Pour chaque sexe ((A) : homme, (B) : femme) la surface du diagramme circulaire reflète la proportion du nombre total de cas ou de décès. D'après Bray et al⁶..... 21

Figure 2 : Les caractéristiques du cancer. D'après Hanahan et Weinberg²⁵. 32

Figure 3 : Concept de l'immunoediting des tumeurs. L'immunoediting se compose de trois phases successives : l'élimination, l'équilibre et l'échappement. Pendant la phase d'élimination, l'immunité innée et adaptative coopèrent pour éliminer les tumeurs qui se développent, même si celles-ci sont cliniquement invisibles. Si les cellules tumorales ne sont pas détruites, elles peuvent entrer dans la phase d'équilibre où l'immunité adaptative joue un rôle déterminant. Les lymphocytes T CD4+/8+, l'IL-12 et l'IFN γ sont nécessaires pour maintenir la dormance des cellules cancéreuses. Cependant, l'immunogénicité des tumeurs durant cette phase est modifiée. En conséquence de la pression de sélection immunitaire constante exercée sur les cellules tumorales maintenues en dormance, des « variants » de cellules tumorales peuvent apparaître. Ces clones tumoraux ont plusieurs mécanismes d'actions : (i) ne plus être reconnus par l'immunité adaptative (e.g. perte d'antigène (Ag), de CMH), (ii) devenir insensibles à la réponse immunitaire, ou (iii) induire un état immunosuppresseur dans le microenvironnement tumoral. Ces cellules cancéreuses entrent ensuite dans la phase d'échappement où leur croissance n'est plus réprimée par l'immunité. Ces cellules tumorales apparaissent et provoquent une maladie cliniquement apparente. D'après Schreiber *et al*, 2011⁵⁴. 34

Figure 4 : Les différents mécanismes de résistances mis en place par les cellules cancéreuses 44

Figure 5 : Les diverses morts cellulaires programmées et leurs caractéristiques moléculaires participant au processus tumoral. L'apoptose et l'autophagie représentent les deux morts cellulaires programmées majoritairement décrites dans la littérature. D'autres voies découvertes plus tardivement comme la nécroptose, la pyroptose, la ferroptose, la parthanatose, l'entose, la nétose et la mort dépendante de lysosome font parties des morts cellulaires programmées. L'induction de ces morts cellulaires résultent de l'induction et la répression de plusieurs acteurs moléculaires spécifiques à chaque voie. Comme les cellules tumorales échappent aux processus de morts cellulaires programmées pour croître, l'induction de ces morts par traitement est une solution thérapeutique. D'après Han *et al*¹³⁴. 48

Figure 6 : Mécanismes moléculaires responsable de l'induction de l'apoptose. L'apoptose est une mort cellulaire programmée qui peut être activée par la voie intrinsèque (a) ou extrinsèque (b). L'induction de l'apoptose par la voie intrinsèque est activée par de nombreux stress cellulaires (dommages à l'ADN, privation en nutriments etc...). Cette activation permet l'induction des protéines pro-apoptotiques à domaine BH3 (BIM, NOXA, PUMA et BAD). L'induction de ces protéines permet la répression des protéines anti-apoptotiques de la famille des Bcl-2 (Bcl-2, BCL-X, MCL-1, BCL-2A1) permettant le relargage des effecteurs apoptotiques Bak et Bax formant un complexe responsable de la perméabilisation de la mitochondrie MOMP (Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization). Ainsi, les pores dans la membrane mitochondriale permettent le relargage du cytochrome c et de SMAC. Le cytochrome c s'associe ensuite à APAF1 pour former l'apoptosome. La formation de l'apoptose permet le clivage et activation de la caspase 9 qui va pouvoir à son tour cliver et activer les caspases effectrices 3 et 7. Parallèlement, SMAC inhibe les XIAPs qui ont pour fonction de réprimer l'apoptose. L'apoptose extrinsèque est déclenchée par la fixation de ligand aux récepteurs de morts présents à la surface des cellules. La fixation du ligand au récepteur permet l'assemblage d'un complexe protéique appelé DISC (Death-inducing signaling pathway) induisant le recrutement de la caspase 8, puis de son clivage nécessaire à son activation. La caspase 8 peut induire directement le clivage et activation des caspases 3 et 7 ou peut agir indirectement par activation protéolytique de BID qui induit à son tour l'apoptose comme dans la voie intrinsèque. L'induction de l'apoptose par la voie intrinsèque ou extrinsèque mène à l'activation des caspases effectrices 3 et 7 qui ont plusieurs

substrats. Parmi eux, les caspases sont nécessaires à l'activation de ROCK-1 qui va permettre la contraction de l'actine et la formation de corps apoptotiques. Au niveau nucléaire, les caspases permettent l'activation de la DNase CAD qui va induire la fragmentation de l'ADN. Enfin, les caspases effectrices inactives également par voie protéolytique les flippases lipidiques comme ATP11 et XKR8 perçu comme un signal « eat me » pour les cellules phagocytaires favorisant l'élimination de la cellule apoptotique. D'après Strasser *et al*¹³⁹..... 51

Figure 7 : Mécanismes moléculaires responsables de l'induction de l'autophagie. Cinq étapes sont nécessaires au déroulement de l'autophagie : l'induction, la nucléation, l'élongation, l'amarrage et la fusion puis la dégradation et recyclage. L'initiation de l'autophagie est permise par la formation d'un complexe protéique Ulk1/2, FIP200, ATG13, ATG17 et ATG101. Cette induction est permise par l'activation de l'AMPK et des MAPK selon la balance énergétique et est réprimée par l'expression de mTOR. L'autophagie se poursuit par l'étape de nucléation contrôlée par le complexe Beclin1 (Beclin1, ATG4L, VPS34, UVRAG, Bif-1) qui est régulé négativement par les protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2. Beclin1 et ATG14L facilitent ensemble alors la formation de la membrane autophagosomale qui est liée à ATG5 et ATG12. Sous l'action de la ligase E1 ATG7 et la ligase E2 ATG10, le complexe multiprotéique et ligase E3 ATG12-ATG5-ATG16 est formée. Parallèlement, ATG4 induit le clivage de pro-LC3 permettant d'obtenir LC3-I qui grâce au ligase E2 AG3 et E1 ATG7 permet d'obtenir LC3-II par conjugaison avec la phosphatidyléthanolamine (PE). Lors de l'élongation, le complexe ATG5/ATG12/ATG16 permet le recrutement de LC3-II liée à la membrane pour former le phagophore puis l'autophagosome. Lors de la phase d'amarrage et de fusion, l'autolysosome est généré par la fusion de l'autophagosome et du lysosome. Ainsi, le contenu membranaire et cytoplasmique est soit dégradé ou recyclé. L'autophagie peut atténuer les dommages causés par les médicaments thérapeutiques contre les tumeurs et produit ensuite une résistance aux médicaments multiples (MDR). D'après Chang et Zou¹⁴⁴..... 53

Figure 8 : Représentation schématique de la morphologie des cellules lors de diverses morts cellulaires programmées, d'après Chen *et al*¹⁵³..... 58

Figure 9 : Chronologie de la découverte de la nécroptose, d'après Liu *et al*¹⁷²..... 59

Figure 10 : Schéma simplifié des différents récepteurs pouvant déclencher la nécroptose. Les récepteurs au TNF, Fas et DR6 permettent d'activer la nécroptose par la voie canonique. Leur activation permet le recrutement de la kinase RIPK1 qui va permettre l'activation par phosphorylation de la RIPK3 qui à son tour phosphoryle et active la pseudokinase MLKL. La voie non canonique de la nécroptose met en jeu TLR4, TLR3 et ZBP1. La voie canonique permet également le recrutement de la kinase RIPK3 mais sans l'aide de RIPK1. L'engagement de TLR4 membranaire ou de TLR3 endosomal permet le recrutement de l'adaptateur TRIF nécessaire pour l'activation de RIPK3 puis de MLKL. Une infection virale ou la présence d'ADN mitochondriale permet également le recrutement de RIPK3 puis de MLKL. Dans la voie canonique et non canonique, la phosphorylation de la pseudokinase MLKL induit son oligomérisation et former un pore au niveau de la membrane plasmique pour engendrer la mort cellulaire. D'après Yan *et al*¹⁷⁴..... 60

Figure 11 : Mécanisme de la voie de signalisation de la nécroptose activée par la voie canonique. Différents ligands peuvent activer plusieurs récepteurs transmembranaires initiant la nécroptose. L'activation du récepteur TNFR1 engage la formation du complexe I composé de cIAP1/2, CYLD, RIPK1 et TRAF2. Les cIAPs induisent la polyubiquitination de RIPK1 permettant le recrutement de NEMO et TAB2 activant la voie NFκB et la voie des MAPK (ERK, JNK, p38) responsables de la survie cellulaire. Par ailleurs, la protéine CYLD induit la déubiquitination de RIPK1 permettant la formation du complexe IIa. Le complexe IIa peut également être formé à la suite d'activation de d'autres récepteurs membranaires tels que Fas ou encore DR4/5. Dans le complexe IIa, la caspase-8 activée clive et inhibe les activités de RIPK1 et RIPK3 menant ainsi à l'apoptose. L'absence ou l'inhibition génétique ou chimique de la caspase-8 ou de FADD permet de former le complexe IIb responsable de la nécroptose. Dans ce complexe, RIPK1 active RIPK3 par phosphorylation ce qui permet la phosphorylation et activation de la pseudokinase MLKL. La phosphorylation de MLKL permet son oligomérisation et regroupement de

plusieurs protéines afin de former un canal au niveau de la membrane plasmique. Ce canal forme un pore membranaire et induit la mort cellulaire. Schéma adapté de Chen *et al*¹⁷⁶..... 61

Figure 12 : Structures des kinases de la famille RIPK. Les protéines de la famille RIPK partagent un domaine homologue sérine-thréonine kinase (KD) avec un site catalytique. La phosphorylation de la Ser227 de RIPK3 est essentielle pour l'activation de la nécroptose. De plus, RIPK1 est autophosphorylée en Ser14, Ser15, Ser161 et Ser166 pendant la nécroptose. L'asp324 de RIPK1 et l'Asp328 de RIPK3 sont des sites de clivage par ma caspase-8 activée. RIPK1 possède un domaine DD en C-ter qui assure la médiation de la signalisation des récepteurs de mort. RIPK2 possède un domaine CARD en C-ter assurant la médiation de la signalisation des caspases. RIPK1 et RIPK3 possèdent un domaine RHIM nécessaire à leur interaction et activation dans la nécroptose. RIPK4 et RIPK5 ont des répétitions d'ankyrine en Ct-er. RIPK6 et RIPK7 possèdent des régions riches en leucine (LRR), des répétitions d'ankyrine, des domaine Roc et COR (Roc/COR) et des répétitions WD40 (WD). D'après He et Wang¹⁹⁶. 65

Figure 13 : Schéma représentant le changement conformationnel de la pseudokinase MLKL lors de la nécroptose. La pseudokinase MLKL est composée de trois domaines : son domaine pseudokinase PsKD en position C-terminale, suivi d'un linker/brac et d'une terminaison N-terminale 4HB effectrice de la nécroptose. L'induction de la nécroptose permet le recrutement et la phosphorylation de RIPK3 (soit par RIPK1, ZBP1 ou TRIF) qui à son tour phosphoryle MLKL. La phosphorylation de MLKL induit à son tour un changement conformationnel de la protéine réorientant le domaine 4HB et le linker. Ce changement conformationnel est nécessaire à l'oligomérisation de la protéine en tétramère pour former un pore à la membrane plasmique. Ce pore induit la perméabilisation de la membrane caractérisée par le relargage de DAMPs. Adapté de Krautwald *et al*²¹³. 67

Figure 14 : Relargage de DAMPs lors de mort cellulaire immunogène. D'après Ahmed et Tait²²⁷. ... 68

Figure 15 : Niveau d'expression basale de la kinase RIPK3 dans 60 lignées cancéreuses. Western-blot de lysats totales sur 60 lignées cancéreuses, d'après Koo *et al*²⁵¹. 72

Figure 16 : Représentation schématique des réponses immunitaires pro ou anti-tumorales induites par la nécroptose. Lorsque les cellules tumorales meurent par nécroptose, elles libèrent un ensemble de DAMPs, chimiokines et cytokines, antigènes (Ag) tumoraux créant un microenvironnement immunitaire inflammatoire qui peut avoir des effets anti-tumoraux ou pro-tumoraux. (1a) Les molécules immunogènes libérées par les cellules mourant par nécroptose permettent le recrutement de macrophages et DC naïves qui vont migrer au niveau des ganglions lymphatiques. (1b) Au sein du ganglion lymphatique, les cellules présentatrices d'antigènes activées amorcent les cellules T CD8+/CD4+ par des antigènes cancéreux. Après cette interaction, les cellules T naïves se différencient en cellules T cytotoxiques effectrices. Ces cellules T rejoignent alors la circulation. (1c) Les cellules T effectrices infiltrent la tumeur pour éliminer les cellules cancéreuses. (2a) Cependant, la mort cellulaire par nécroptose des cellules cancéreuses peut avoir des effets pro-tumoraux en attirant notamment les MDSCs et les TAM pouvant entraîner une immunosuppression de la tumeur. (2b) Parallèlement, les cytokines libérées par les cellules cancéreuses nécroptotiques peuvent favoriser l'angiogenèse, la prolifération des cellules cancéreuses, le développement de métastases et la libération de ROS et RNI facilitant l'instabilité génomique. (2c) Tous ces facteurs participent ensemble à la progression tumorale. Schéma d'après Garg *et al*²⁵³. 76

Figure 17 : Induction de la nécroptose dans diverses lignées cancéreuses. Test de viabilité mesurant le niveau d'ATP réalisé 48h après traitement au DMSO (contrôle) ou au T+S+Z (TNF α + smac mimetic + z-VAD-FMK). D'après Wang *et al*³⁰⁷. 81

Figure 18 : Inhibiteurs et inducteurs dans la signalisation de la nécroptose. La voie la plus décrite de la nécroptose est celle médiée par la fixation du TNF sur TNFR1. La fixation de ce ligand induit l'activation du complexe I composé de TRADD, RIPK1, TRAF2, cIAP1/2 et LUBAC. Dans ce complexe, les cIAPs ou LUBAC conduisent à l'ubiquitination de RIPK1 menant à l'activation de la voie NF κ B. En présence de smac mimetics inhibant les cIAPs ou encore de CHX, RIPK1 n'est plus ubiquitinylé et devient actif menant à la formation du complexe IIa ou IIb responsables de l'apoptose, dépendante ou non de RIPK1. Lorsqu'un inhibiteur de caspase est ajouté, la caspase 8 est dégradée et permet la

formation du complexe IIc où RIPK1 phosphorylé permet le recrutement et la phosphorylation de RIPK3. RIPK3 activé permet ensuite le recrutement et la phosphorylation de la pseudokinase MLKL permettant son oligomérisation responsable de formation de pores à la membrane conduisant à la nécroptose. Plusieurs inhibiteurs de nécroptose peuvent être utilisés. L'inhibition de RIPK1 se réalise le plus souvent par l'ajout de Nec1s mais peut aussi être réalisée par PN10, le Compound 1 ou Cpd27. Pour inhiber RIPK3, plusieurs inhibiteurs peuvent être utilisés comme le GSK'840, le GSK'843 et le GSK'872. Pour inhiber MLKL, le NSA est majoritairement utilisé mais peut également être inhibé par le Compound 1. Schéma d'après Stockwell et al³¹⁰. 83

Figure 19 : Rôles des phosphatases de la famille des PP2Cs dans les différentes voies de morts et la sénescence. L'abréviation ND indique « no data » pour les cibles de certaines PP2Cs. 90

Figure 20 : La phosphatase Wip1, régulateur de l'apoptose et l'autophagie. Wip1 est un régulateur négatif de l'apoptose d'une façon p53 dépendante par son interaction directe avec ATM, ATR, Chk1, Chk2 et p53. Dans les cellules p53-négatives, la surexpression de Wip1 régule positivement l'apoptose par son inhibition de NfαB et l'activation de RUNX2. Wip1 régule positivement l'autophagie par ses fonctions inhibitrices sur ATM et mTOR qui sont des régulateurs négatifs de l'autophagie. Par ailleurs, Wip1 déphosphoryle Ulk1, ce qui entraîne son activation et la formation d'autophagophores responsables des mécanismes d'autophagie. 92

Figure 21 : Rôle de Wip1 dans la sénescence, représentation schématique des voies de signalisation majeures. Dans l'axe p53-p21, Wip1 régule la sénescence principalement par son interaction négative directe avec ATM, p53 et Chk2 entraînant une réduction de p21 qui diminue l'induction de la sénescence. Dans l'axe p38-p16, Wip1 agit comme un régulateur négatif par son interaction avec p38MAPK conduisant à une réduction de p16 qui entraîne une diminution de la sénescence. 96

Figure 22 : Gel d'agarose des gRNA digérés par NcoI afin de valider les constructions plasmidiques de CRISPR-Cas9. Plusieurs gRNA ont été testés pour les gènes donnés et les flèches orange indiquent les constructions non conformes. 116

Figure 23 : Western-blots de la sélection monoclonale des modèles CRISPR-Cas9 pour les protéines PPM1B et Wip1 dans les lignées HT-29, MC38 et L929. (A) Caractérisation des clones PPM1B KO dans la lignée HT-29 ; (B) Caractérisation des clones Wip1 KO dans la lignée HT-29 ; (C) Caractérisation des clones PPM1B KO dans la lignée MC38 ; (D) Caractérisation des clones Wip1 KO dans la lignée MC38 ; (E) Caractérisation des clones PPM1B KO dans la lignée L929 ; (F) Caractérisation des clones Wip1 KO dans la lignée L929. Les * rouges représentent les clones sélectionnés pour le reste des expériences. 118

Figure 24 : Western-blots de la sélection monoclonale des modèles CRISPR-Cas9 DKO pour les protéines PPM1B et Wip1 dans les cellules MC38. (A) Caractérisation des clones DKO PPM1B/Wip1 obtenus à partir des clones PPM1B KO ; (B) Caractérisation des clones DKO PPM1B/Wip1 obtenus à partir des clones Wip1 KO. 119

Figure 25 : Western-blots de la sélection monoclonale des modèles RIPK3 KO dans les cellules MC38. 119

Figure 26 : Western-blots des lignées HCT116, MDA-MB-231 et SW620 déficientes pour la Caspase 8, FADD et RIPK1 surexprimant ou non la kinase RIPK3. (A) Caractérisation des cellules HCT116 WT, Caspase 8 -/-, FADD -/- et RIPK1 -/- déficientes ou surexprimant RIPK3 ; (B) Caractérisation des cellules MDA-MB-231 WT, Caspase 8 -/-, FADD -/- et RIPK1 -/- déficientes ou surexprimant RIPK3 ; (C) Caractérisation des cellules SW620 WT, Caspase 8 -/-, FADD -/- et RIPK1 -/- déficientes ou surexprimant RIPK3. 120

Figure 27 : Western-blots de la sélection monoclonale des cellules MC38 surexprimant Wip1. 120

Figure 28 : L'inhibition de Wip1 par le GSK2830371 potentialise les différentes morts cellulaires dépendantes du TNF. La mort cellulaire est quantifiée à l'aide d'un marquage 7-AAD suivi par Incucyte dans les cellules HT-29 (A), MC38 (B) et L929 (C). GSK=GSK2830371 20μM, TNF20 = TNF 20ng/ml, TNF50 = 50ng/ml, TNF100 = TNF 100ng/ml, TB = TNF à 20ng/ml + Birinapant 100nM, TBZ = TNF 20ng/ml + Birinapant 100nM + z-VAD-FMK 20μM. Les histogrammes représentent la mort cellulaire à t=12h

(n=3). Les données sont représentées sous forme de moyenne \pm SD, test T de Student (*p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001, ****p < 0,0001). 122

Figure 29 : L'inhibition de Wip1 par le GSK2830371 potentialise la nécroptose dans les cellules HT-29. (A) Suivie de la mort cellulaire par marquage 7-AAD par Incucyte (n=6) ; (B) Quantification de la mort cellulaire 8h après traitements TBZ (n=6) ; (C) Western-blot des cellules HT-29 8h après traitements TB, TBZ +/- GSK2830371. Les données sont représentées sous forme de moyenne \pm SD, test Mann-Whitney (*p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001, ****p < 0,0001). 124

Figure 30 : L'inhibition de Wip1 par le GSK2830371 potentialise la nécroptose dans les cellules MC38. (A) Suivie de la mort cellulaire par marquage 7-AAD par Incucyte (n=8) ; (B) Quantification de la mort cellulaire 4h après traitements TBZ (n=8) ; (C) Western-blot des cellules MC38 4h après traitements TB, TBZ +/- GSK2830371. Les données sont représentées sous forme de moyenne \pm SD, test Mann-Whitney (*p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001, ****p < 0,0001). 125

Figure 31 : L'inhibition de Wip1 par le GSK2830371 potentialise la nécroptose dans les cellules L929. (A) Suivie de la mort cellulaire par marquage 7-AAD par Incucyte (n=5) ; (B) Quantification de la mort cellulaire 2h après traitements TBZ (n=5) ; (C) Western-blot des cellules L929 2h après traitements TB, TBZ +/- GSK2830371. Les données sont représentées sous forme de moyenne \pm SD, test Mann-Whitney (*p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001, ****p < 0,0001). 126

Figure 32 : La kinase RIPK3 est nécessaire à l'activation de la nécroptose par le traitement TBZ. (A) Suivie de la mort cellulaire par marquage 7-AAD par Incucyte dans les cellules MC38 WT (n=6) ; (B) Suivie de la mort cellulaire par marquage 7-AAD par Incucyte dans les cellules MC38 RIPK3 KO (n=6) ; (C) Images prises par l'Incucyte 4h traitement marquées au 7-AAD. Les données sont représentées sous forme de moyenne \pm SD. 127

Figure 33 : L'utilisation d'inhibiteurs de nécroptose Nec1s, GSK'843 et NSA inhibe la mort induite par la combinaison TBZ. (A) Quantification de la viabilité cellulaire dans les cellules HT-29 8h après traitements (n=3), (Test Cell Title Glow, Promega) ; (B) Quantification de la viabilité cellulaire dans les cellules MC38 4h après traitements (n=4), (Test Cell Title Glow, Promega). Les données sont représentées sous forme de moyenne \pm SD, test Two-way ANOVA (*p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001, ****p < 0,0001). 128

Figure 34 : L'ajout de la kinase RIPK3 sensibilise les cellules à la nécroptose par le traitement TBZ de façon RIPK1-dépendante. (A) Quantification de la mort cellulaire par Incucyte par marquage 7-ADD 12h après traitements dans les cellules HCT116 (n=3) ; (B) Quantification de la mort cellulaire par Incucyte par marquage 7-ADD 12h après traitements dans les cellules MDA-MB-231 (n=3) ; (C) Quantification de la mort cellulaire par Incucyte par marquage 7-ADD 12h après traitements dans les cellules SW620 (n=3). Les données sont représentées sous forme de moyenne \pm SD, test Two-way ANOVA (*p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001, ****p < 0,0001). 130

Figure 35 : L'expression de la phosphatase Wip1 module la mort induite par nécroptose à la suite du traitement TBZ dans les cellules MC38. (A) Western-blot des cellules MC38 WT, déficientes pour Wip1 (Wip1 KO) et surexprimant Wip1 (mWip1) après extraction du cytoplasme et du noyau ; (B) Suivie de la mort cellulaire par marquage 7-AAD par Incucyte (n=7). Les données sont représentées sous forme de moyenne \pm SD, test Two-way ANOVA (*p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001, ****p < 0,0001). 132

Figure 36 : La délétion de la phosphatase Wip1 semble induire l'expression de la phosphatase PPM1B et inversement. (A) Western-blot des cellules HT29 WT, Wip1 KO et PPM1B KO après extraction du cytoplasme et du noyau 6h après traitement au GSK2830371 20 μ M ; (B) Western-blot des cellules MC38 WT, Wip1 KO et PPM1B KO après extraction du cytoplasme et du noyau 6h après traitement au GSK2830371 20 μ M ; (C) Western-blot des cellules L929 WT, Wip1 KO et PPM1B KO après extraction du cytoplasme et du noyau 6h après traitement au GSK2830371 20 μ M. 134

Figure 37 : L'absence de phosphatases PP2Cs potentialise l'induction de la nécroptose par le traitement TBZ. (A) Western-blot des différentes lignées MC38 déficientes pour les phosphatases Wip1 et/ou PPM1B ; (B) Suivie de la mort cellulaire induite par le traitement TBZ par marquage 7-AAD par Incucyte dans les cellules MC38 (n=8) ; (C) Western-blot des modèles MC38 déficients pour les

| | |
|--|-----|
| PP2Cs 4h après traitement TBZ. Les données sont représentées sous forme de moyenne \pm SD, test Two-way ANOVA (*p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001, ****p < 0,0001)..... | 135 |
| Figure 38 : L'inhibition de Wip1 par le GSK2830371 potentialise la mort cellulaire induite par la combinaison TBZ même en absence de Wip1. (A) Suivre de la mort cellulaire par marquage 7-AAD par Incucyte dans les cellules MC38 WT ; (B) Suivre de la mort cellulaire par marquage 7-AAD par Incucyte dans les cellules MC38 PPM1B KO ; (C) Suivre de la mort cellulaire par marquage 7-AAD par Incucyte dans les cellules Wip1 KO ; (D) Suivre de la mort cellulaire par marquage 7-AAD par Incucyte dans les cellules MC38 DKO Wip1/PPM1B. Les histogrammes représentent la mort cellulaire à t=8h (n=8). Les données sont représentées sous forme de moyenne \pm SD, test Mann-Whitney (*p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001, ****p < 0,0001)..... | 136 |
| Figure 39 : L'absence de phosphatases PP2Cs augmente la phosphorylation des protéines nécroptotiques. Western-blot des modèles MC38 déficients pour les PP2Cs 4h après traitement TBZ \pm GSK2830371. | 137 |
| Figure 40 : La phosphatase Wip1 est strictement nucléaire et son expression est diminuée en présence de GSK2830371. (A) Immunofluorescence des cellules MCF-7 traitées ou non à la CisPlatine (x40) ; (B) Western-blot des cellules HT29 WT traitées ou non au GSK2830371 pendant 6h après extraction du cytoplasme ; (C) Western-blot des cellules MC38 WT traitées ou non au GSK2830371 pendant 6h après extraction du cytoplasme. | 138 |
| Figure 41 : La kinase RIPK3 possède une localisation nucléaire renforcée après traitement à la Leptomycine B. Immunofluorescence réalisée sur les cellules MDA-MB-231 WT et RIPK3+ traitées ou non à la Leptomycine B à 1 μ M pendant 1h (x40). | 140 |
| Figure 42 : L'absence de PP2Cs induit l'accumulation de protéines nécroptotiques dans le noyau. (A) Western-blot des cellules MC38 WT après traitement au TBZ \pm GSK2830371 pendant 4h après extraction du cytoplasme et du noyau ; (B) Western-blot des cellules MC38 Wip1 KO après traitement au TBZ \pm GSK2830371 pendant 4h après extraction du cytoplasme et du noyau ; (C) Western-blot des cellules MC38 PPM1B KO après traitement au TBZ \pm GSK2830371 pendant 4h après extraction du cytoplasme et du noyau ; (D) Western-blot des cellules MC38 DKO après traitement au TBZ \pm GSK2830371 pendant 4h après extraction du cytoplasme et du noyau..... | 142 |
| Figure 43 : La phosphatase Wip1 semble interagir avec la kinase RIPK3 et non avec la pseudokinase MLKL dans les cellules MC38. Les cellules sont traitées ou non pendant 4h avec TBZ. (A) Co-immunoprécipitation de RIPK3 dans les cellules MC38 ; (B) Co-immunoprécipitation de MLKL dans les cellules MC38. | 143 |
| Figure 44 : La phosphatase Wip1 interagit avec la kinase RIPK3 dans diverses lignées cellulaires. Les cellules sont traitées ou non pendant 4h avec TBZ. (A) Co-immunoprécipitation de RIPK3 dans les cellules HT-29 ; (B) Co-immunoprécipitation de RIPK3 dans les cellules MC38 ; (C) Co-immunoprécipitation de RIPK3 dans les cellules L929..... | 143 |
| Figure 45 : La phosphatase Wip1 interagit avec RIPK3 dans le noyau dans les cellules HT-29. Les cellules sont traitées ou non pendant 4h avec TBZ. (A) Proximity Ligation Assay entre les protéines Wip1 et RIPK3 (x40) ; (B) Quantification du nombre de ligation par noyau (n=3). Les données sont représentées sous forme de moyenne \pm SD, test One-way ANOVA avec comparaison multiple Kruskal-Wallis (*p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001, ****p < 0,0001). | 144 |
| Figure 46 : Wip1 et RIPK3 interagissent dans le noyau lorsque ces protéines sont exprimées après transfection dans les cellules Hek293. Les cellules sont traitées ou non pendant 4h avec TBZ. (A) Co-immunoprécipitation de RIPK3 dans les cellules Hek293 après transfection de Wip1 et RIPK3 (traitement TBZ pendant 4h) ; (B) Proximity Ligation Assay entre les protéines Wip1 et RIPK3 dans les cellules Hek293 Hek293 après transfection de Wip1 et RIPK3 (traitement TBZ pendant 4h) (x20)... | 145 |
| Figure 47 : L'absence des phosphatases PPM1B et Wip1 potentialise l'induction de la nécroptose par le traitement TBZ dans les L929. (A) Suivre de la mort cellulaire par le traitement TBZ marquage 7-AAD par Incucyte (n=3) ; (B) Western-blot des différentes lignées L929 déficientes pour les phosphatases Wip1 ou PPM1B ; (B). Les données sont représentées sous forme de moyenne \pm SD, test Two-way ANOVA (*p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001, ****p < 0,0001). | 147 |

| | |
|---|-----|
| Figure 48 : Les phosphatases PP2Cs semblent interagir différemment avec la kinase RIPK3 selon le type cellulaire. | 148 |
| Figure 49 : L'absence de Wip1 dans les cellules de souris Wip1 -/- potentialise l'induction à la nécroptose. Western-blot de cellules extraites de la moelle osseuse de souris WT et Wip1 -/- traitées par la combinaison TB, TB ± GSK2830371..... | 149 |
| Figure 50 : L'induction de la nécroptose permet le relargage de DAMPs et est modulée selon l'expression de Wip1. (A) Western-blot des cellules et surnageants des cellules HT-29 traitées par les combinaisons TB et TBZ ± GSK2830371 pendant 8h ; (B) Western-blot des cellules et surnageants des cellules MC38 WT traitées par les combinaisons TB et TBZ ± GSK2830371 pendant 4h ; (C) Western-blot des cellules et surnageants des cellules MC38 Wip1 KO traitées par les combinaisons TB et TBZ ± GSK2830371 pendant 4h ; (D) Western-blot des cellules et surnageants des cellules MC38 PPM1B KO traitées par les combinaisons TB et TBZ ± GSK2830371 pendant 4h..... | 151 |
| Figure 51 : L'absence de la kinase RIPK3 induit une accélération de la croissance tumorale. Les cellules MC38 ont été injectées en sous-cutanée dans des souris C57Bl/6 et les tumeurs ont été mesurées tous les deux jours..... | 152 |
| Figure 52 : Les phosphatases PPM1B et Wip1 sont capables de réguler la nécroptose au niveau du cytoplasme et du noyau. Dans le cytoplasme, la nécroptose est régulée négativement par la phosphatase PPM1B interagissant avec RIPK3. Lors de la nécroptose nucléaire, la phosphatase Wip1 régule négativement la nécroptose par son interaction avec la kinase RIPK3. | 153 |

Table des tableaux

| | |
|--|-----|
| Tableau 1 : Niveaux d'expression de protéines nécroptotiques dans différents cancers et leur pronostic associé. Réalisé à partir des travaux de Lalaoui et Brumatti ²⁶⁰ , Liu <i>et al</i> ¹⁸¹ et Garg <i>et al</i> ²⁵³ | 73 |
| Tableau 2 : Rôle des membres de la famille PP2C dans la mort cellulaire programmée et la sénescence | 88 |
| Tableau 3 : Lignées cellulaires utilisées dans les diverses expériences. | 105 |
| Tableau 4 : Séquences des oligonucléotides pour le développement de lignées CRISPR-Cas9. | 106 |
| Tableau 5 : Les différents traitements utilisés <i>in vitro</i> dans l'étude de la nécroptose. | 110 |
| Tableau 6 : Les différents anticorps primaires utilisés dans les études de Western-blot. | 111 |
| Tableau 7 : Anticorps utilisés pour les marquages d'immunofluorescence. | 114 |
| Tableau 8 : Anticorps utilisés pour les expériences de ligature de proximité duolink. | 114 |

Liste des abréviations

| | |
|--|---|
| 5-FU : 5-fluorouracile | LT-CSH : Cellules Souches Hématopoïétiques à long terme |
| Ac : Anticorps | MDR : MultiDrug Resistance |
| AD : maladie Alzheimer | MEF : Mouse Embryonic Fibroblast |
| ADCC : Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxicity | MET : Microscopie Electronique |
| ADCP : Antibody-Dependent Cellular Phagocytosis | MMR : Mismatch Repair |
| ADN : Acide Désoxyribonucléique | MOMP : Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization |
| Ag : Antigène | NCI : National Cancer Institute |
| APP : Amyloid Precursor Protein | Nec-1 : Necrostatine-1 |
| ARN : Acide ribonucléique | NER : Nucleotide Excision Repair |
| Aβ : Amyloïde β | NES : Nuclear Export Sequences |
| CAR : Chimeric Antigen Receptor | NGS : Next Generation Sequencing |
| CDC : Complement-Dependent Cytotoxicity | NK : Natural Killer |
| CDKI : Cyclin Dependant Kinase Inhibitor | NLS : Nuclear Localization Sequences |
| CHX : Cycloheximide | NSA : Necrosulfonamide |
| CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité | OMS : Organisation Mondiale de la Santé |
| CRT : Calreticuline | PE : Phosphatidylethanolamine |
| CSC : Cellules Souches Cancéreuses | PI3K : Phosphatidylinositol-3-Kinase |
| CSH : Cellules Souches Hématopoïétiques | PLA : Proximity Ligation Assay |
| CTG : Cell Titer Glo | PPM : Phosphatases Metale-Dependent |
| CYP450 : Cytochrome P450 | PPP : Phosphoprotéines Phosphatases |
| DAMPs : Damage-associated molecular patterns | PPR : Pattern Recognition Receptor |
| DDR : DNA Damage Response | PSA : Pénicilline Streptomycine Amphotéricine |
| DISC : Death-Inducing Signaling Pathway | pTAU : protéine hyperphosphorylée Tau |
| DR : Death Receptor | PTP : Proteines Tyrosines Phosphatases |
| dsDNA : AND double brin | PYGL : Glycogene Phosphorylase |
| EBV : Epstein Barr Virus | ROS : Reactive Oxygen Species |
| EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor | SASP : Senescence-associated Secretory Phenotype |
| FH : Fumarate Hydratase | Seli : Sélinexor |
| GLUD1 : Glutamate Dehydrogenase 1 | ST-CSH : Cellules Souches Hématopoïétiques à court terme |
| GPX4 : Glutathion Peroxydase 4 | SVF : Sérum de Veau Foetal |
| gRNA : ARN guides | TB : TNFα + Birinapant |
| GSDM : Gasdermine | TBZ : TNF, Birinapant, z-VAD-FMK |
| GSH : Glutathion | TCR : T-Cell Receptor |
| GST : Glutathion S-transférase | TEM : Transition Epithélio-Mésenchymateuse |
| IAP : Inhibitor of Apoptosis Proteins | TILs : Tumor Infiltrated Lymphocytes |
| IARC : Centre International de la recherche sur le cancer | TIS : Therapy-induced senescence |
| IFN : Interferon | TLR : Toll Like Receptor |
| IFNR : Interferon Receptor | TNF : Tumor Necrosis Factor |
| IL : Interleukine | TNM : Tumor Node Metastasis |
| KO : Knock-Out | TSZ : TNF, Smac-mimetics, z-VAD-FMK |
| LAM : Leucémie Myéloïde Aigüe | UICC : Union International Contre le Cancer |
| LDH : Lactate Dehydrogenase | Wip1 : Wild type p53 induced protein phosphatase 1 |
| LIP : Labile Iron Poul | |
| LMB : Leptomycine B | |

Introduction

I. Le cancer

1. Origine et découverte

Le cancer est de nos jours un problème majeur de santé publique. Il s'agit en effet de la principale cause de décès au sein des pays développés et la seconde dans les pays en voie de développement, avec une incidence en constante augmentation¹.

Le cancer est une maladie ancestrale puisque des découvertes paléontologiques témoignent de tumeurs chez les animaux avant l'apparition de l'Homme. La première description scientifique du cancer a été décrite par Hippocrate, médecin de l'Antiquité, en le nommant carcinome. Le terme carcinome prend sa racine du terme grecque *Καρκίνοϋ* en comparant cette maladie à une crabe qui adhère à son environnement avec ses pattes. Plus tard, les médecins Celsus et Galien traduisent alors ce terme par les termes latins cancer et oncos (pour gonflement), respectivement². La compréhension du cancer tend à s'améliorer lors de la Renaissance lorsque les premières autopsies ont été réalisées. Au 16^e siècle, le médecin Paracelsus étudie les tumeurs des travailleurs de mines et suggère alors que leur exposition au soufre et à l'arsenic peut causer le développement de cancer. Cette observation a anticipé l'avenir de la recherche sur la cancérogénèse chimique, puisqu'il s'agit de la première association entre les facteurs environnementaux et le développement de cancer³. Au fil des siècles, de nouvelles observations mettent en évidence le caractère héréditaire du cancer et que celui-ci est dû à une transformation cellulaire. Au 18^e siècle, plusieurs médecins soutiennent la théorie de Paracelsus concernant l'exposition chimique et le développement tumorale notamment avec l'exposition au tabac, aux fumées toxiques ou encore certains composés comme l'aniline. Enfin, les avancées technologiques majeures en biologie comme l'utilisation du microscope ont permis de comprendre histologiquement cette maladie. En effet, son utilisation a permis de démontrer que le cancer est le résultat d'une transformation s'opérant dans la cellule mais également qu'elle peut avoir une modification de la chromatine. Au 20^e siècle, les scientifiques comprennent davantage les mécanismes de cancérogénèse et démontrent qu'il s'agit d'un processus multi-étape et multifactoriel^{4,5}.

2. Incidence et prévalence

Pour estimer l'incidence mondiale du cancer, de nombreuses revues scientifiques s'appuient sur les rapports des agences nationales d'informations comme l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), le Centre International de recherche sur le cancer (IARC), le GLOBOCAN ou encore l'Agence Américaine du Cancer (American Cancer Society). Grâce à ces recueils de données, il a été recensé en 2020 19,3

millions de nouveaux cas et 10 millions de morts liés au cancer à travers le monde. Il est estimé qu'une personne sur cinq développe un cancer avant 75 ans et qu'une personne sur dix meurt de cette maladie. Le cancer du sein est le cancer le plus diagnostiqué en 2020 avec 2,26 millions de nouveaux cas suivi par le cancer du cancer du poumons, 2,21 millions de nouveau cas. Sexes confondus, le cancer du poumon est le plus meurtrier, suivi du foie puis de l'estomac. ^{6,7} L'incidence et la mortalité des dix cancers les plus répandus par sexe sont illustrés par la Figure 1.

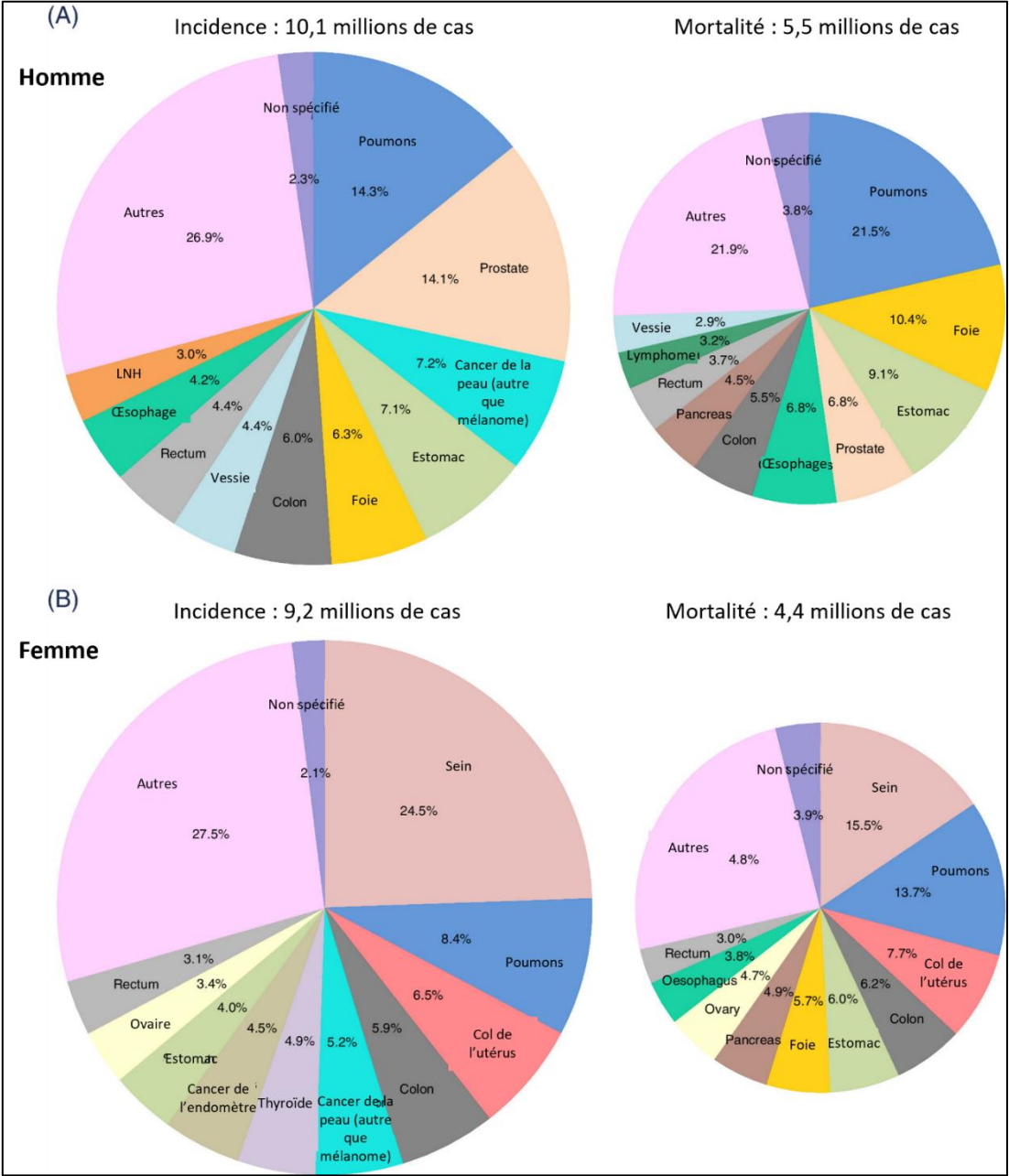


Figure 1 : Schéma représentant l'incidence et la mortalité des 10 cancers les plus fréquents dans le monde, en 2020. Pour chaque sexe ((A) : homme, (B) : femme) la surface du diagramme circulaire reflète la proportion du nombre total de cas ou de décès. D'après Bray et al⁶.

Avec la crise du COVID-19 au début de l'année de 2020, la recherche médicale et les soins médicaux mondiaux ont été chamboulés priorisant alors la prise en charge de patient et les thématiques de recherche. Cet évènement ne permet alors pas d'avoir de données précises sur l'incidence du cancer pour les années 2022. Une prédiction de 34 millions de nouveaux cas est estimée pour 2070, le double du nombre estimé pour 2018. L'augmentation la plus importante est projetée dans les pays où l'indice de développement humain est élevé. Dans cinquante ans, les nombres du cancer tendent également à augmenter notamment par les changements démographiques comme le vieillissement des populations dû à une espérance de vie de plus en plus élevée, mais aussi par les changements climatiques et l'exposition à l'industrialisation de certaines régions du monde encore non concernées auparavant⁸.

3. Facteurs de risque et dépistage

Le cancer est une maladie multifactorielle causée par la combinaison de facteurs génétiques et environnementaux⁹. Dans cette partie, les facteurs environnementaux seront abordés. Les facteurs de risques environnementaux érigés par l'OMS se résument à l'exposition au tabac, la consommation d'alcool, une faible activité physique et une mauvaise alimentation. Cependant, le cancer est une maladie complexe et les facteurs de risques ne sont pas égaux en fonction du lieu d'habitation et des différences interindividuelles. Moins évident, l'expositions à certaines infections biologiques peuvent permettre de déclencher un processus de cancérogenèse. En 2008, 16% des cas de cancers avaient été associés à des agents infectieux à travers le monde, mais reste plus élevés dans les pays en voie de développement. Parmi ces agents infectieux, nous pouvons citer les virus associés aux hépatites B et C ou encore les papillomavirus¹⁰. Les carcinogènes environnementaux représentent la dernière classe de facteurs de risque. Parmi ces carcinogènes les plus connus on compte l'arsenic, la pollution de l'air, le radon ou encore l'amiante, sans oublier l'exposition à certains métaux. L'exposition à ces substances est difficile à évaluer notamment dans certains pays où la croissance économique entraîne l'urbanisation et l'industrialisation causant une exposition croissante aux risques sanitaires liés à l'environnement moderne¹¹. Enfin, l'agent carcinogène dont tout le monde est exposé causant le développement de cancer de la peau reste l'exposition aux rayonnement du soleil¹⁰.

Grâce aux interventions préventives, 40 à 50% des cancers pourraient être évités au niveau mondial. L'intégration de ces mesures dans les plans nationaux de lutte contre le cancer doit devenir une priorité puisque des actions préventives rapides promettent de produire des gains à long terme par rapport aux dépenses initiales, réduisant ainsi considérablement le fardeau du cancer pour les générations futures⁸. La prévention du cancer peut alors être classifiée en trois catégories : primaire, secondaire et tertiaire. La prévention primaire consiste à modifier et améliorer le mode de vie qui représente un

facteur de risque (sédentarité, tabagisme etc.) et à mettre en place des thérapies protectrices comme la vaccination qui a pu démontrer son efficacité à long terme. La prévention secondaire a une action dans le contrôle de la carcinogenèse grâce à diverses méthodes. Elles prennent en compte alors la détection précoce, le traitement ou l'ablation de lésions précancéreuses. Pour finir, la prévention tertiaire est mise en place de traitements après le diagnostic du cancer pour améliorer la qualité de vie et la survie du patient ¹².

4. Processus tumoral

4.a Classification des tumeurs /Nomenclature

Du fait de leurs hétérogénéités, il est nécessaire pour les professionnels de santé de classer les tumeurs afin d'attribuer aux patients la meilleure prise en charge. Communément, les tumeurs sont classées de quatre façons ¹³ :

- Par localisation selon le tissu et/ou organe atteints :

Selon cette classification, deux grands groupes se distinguent : les cancers hématologiques et les néoplasmes solides. Les néoplasmes solides sont également subdivisés en plusieurs groupes regroupant les carcinomes et les sarcomes. Le terme carcinome est appliqué aux cancers qui prennent leur origine d'une transformation de cellules épithéliales tandis que les sarcomes résultent d'une transformation de cellules des muscles, tissus adipeux, os ou vaisseaux sanguins.

- Par type spécifique
- Par leur grade selon la classification de l'OMS

Cette classification combine à la fois des caractéristiques cytologiques (comme le degré de différenciation cellulaire et la dysplasie) et des observations morphologiques et structurales (comme le nombre de mitose et de nécrose). Le grade s'exprime de 1 à 3 où le grade 1 est le plus faible et le grade 3 le plus élevé ¹³.

- Par leur étendu selon le système de Métastases Ganglionnaires (système TNM) ¹⁴.

Le TNM (« Tumor Node Metastasis ») est un système de classification des tumeurs cancéreuses solides de l'Union Internationale Contre le Cancer (UICC) créé en 1958. Il est largement utilisé en oncologie et permet aux cliniciens d'avoir un langage universel pour décrire le cancer. Le TNM permet d'évaluer la taille ou l'étendue de la tumeur primaire (T), le degré de propagation aux ganglions lymphatiques (N) et la présence de métastase (M). Ces trois catégories comportent plusieurs classes numérotées pour caractériser le plus précisément le cancer du patient. La taille de la tumeur T est alors notée de T0 indiquant aucune trace de tumeur puis de T1 à T4 pour identifier la taille et l'extension de la tumeur. L'atteinte des ganglions lymphatiques (N) suit la même codification, avec N0 indiquant qu'il n'y a pas

de propagation régionale des ganglions, puis de N1 à N3 indiquant le degré de propagation des ganglions. De même, la présence de métastases est codifiée par M0 lorsqu'elles sont absentes et M1 s'il y a des preuves de métastases. Celle-ci peut être subdivisée en fonction de la tumeur pour apporter le plus d'informations détaillée ¹⁵.

4.b Notions de proto-oncogène et de gène suppresseur de tumeur

Conceptuellement, le cancer résulte d'une accumulation de mutations permettant alors à une cellule saine de se transformer en cellule tumorale avec pour caractéristique une prolifération anarchique. Ces mutations vont avoir lieu dans des proto-oncogènes et gènes suppresseurs de tumeur ¹⁶. Dans nos cellules, les proto-oncogènes jouent un rôle clef dans la régulation des processus biologiques puisqu'ils peuvent agir en tant que facteur de transcription mais également coder de nombreuses protéines impliquées dans la transduction de signaux cellulaires comme les kinases ou les facteurs de croissance. La mutation d'un proto-oncogène va le transformer en oncogène lui conférant un gain de fonction favorisant la multiplication cellulaire et jouant un rôle essentiel dans la pathogenèse du cancer. Parmi les mécanismes d'activation des proto-oncogènes, on peut retrouver des translocations chromosomiques, des mutations ponctuelles et des amplifications génétiques. Aujourd'hui on dénombre entre 50 et 60 oncogènes¹⁷. Parmi eux, on peut citer l'oncogène MYC (translocation chromosomique)¹⁸ impliqué dans le lymphome de Burkitt humain, l'oncogène RAS (mutation ponctuelle) retrouvé dans de nombreux cancer comme le côlon¹⁹ ou encore l'oncogène c-MYC (amplification génétique) dans le neuroblastome²⁰.

D'autre part, le développement du cancer va également être contrôlé par l'expression de gènes suppresseurs de tumeurs impliqués dans la croissance et la différenciation cellulaire. Comme leur nom l'indique, les gènes suppresseurs de tumeurs forment un vaste ensemble de gènes qui protègent l'organisme contre le développement de néoplasme¹⁶. Ainsi, l'absence ou l'inactivation de gènes par des mutations entraîne le développement tumoral. Parmi ces gènes suppresseurs de tumeur, on peut alors citer p53, communément appelés « gardien du génome » ou encore la protéine du rétinoblastome Rb ^{21,22}.

Néanmoins, des mutations dans des oncogènes ou gènes suppresseurs de tumeur ne sont pas les seuls événements dans le développement du cancer. En effet, les auteurs Douglas Hanahan et Robert A. Weinberg ont pu définir les « Hallmarks of cancer » au travers de leur travaux décrivant les caractéristiques communes aux cellules cancéreuses ²³⁻²⁵(**Figure 2**).

4.c « Hallmarks of cancer »

Le phénomène de tumorigénèse est un processus multi-étape qui conduit progressivement à la transformation de cellules normales en cellules cancéreuses. Malgré sa complexité, le phénomène de tumorigénèse peut être réduit à un petit nombre de principes sous-jacents. Au début des années 2000, Douglas Hanahan et Robert A. Weinberg ont défini six caractéristiques communes aux cellules cancéreuses²³. Ces caractéristiques regroupent : l'autosuffisance en signaux de croissance, l'insensibilité aux signaux inhibiteurs de croissance, la résistance à l'apoptose, un potentiel de réplication illimité, l'induction de l'angiogenèse et la capacité à former des métastases (**Figure 2**). Voici une description succincte de ces mécanismes.

4.c.i *Maintien des signaux prolifératifs*

La prolifération anarchique des cellules cancéreuses reste la première caractéristique que l'on peut citer pour définir une cellule tumorale. Dans ces cellules, la production et la libération de signaux de croissance sont dérégulés entraînant une hyperactivation de leur prolifération. Plusieurs mécanismes sont mis en place. Elles peuvent par exemple produire elles-mêmes des ligands de facteurs de croissance entraînant une auto-prolifération ou encore envoyer des signaux pour stimuler les cellules non tumorales du stroma qui à leur tour produisent des signaux de croissance utilisés par les cellules tumorales. Les récepteurs à la surface des cellules cancéreuses peuvent aussi être en grand nombre pour capter le maximum de signaux nécessaires à l'hyperprolifération. Intracellulairement, des acteurs moléculaires peuvent être surexprimés et activés constitutivement les voies de prolifération sans besoin de signaux extracellulaires. L'activation constitutive de ces voies de signalisation est la résultante de mutations somatiques intervenant dans les gènes contrôlant la prolifération, le cycle cellulaire, ou la production de facteurs de croissance. Dans un état physiologique, des mécanismes de rétrocontrôles négatifs interviennent dans le maintien de l'homéostasie et contrôlent la prolifération cellulaire. Les cellules tumorales arrivent alors à lever ces voies de rétrocontrôle négatif pour contrôler leur prolifération^{23,26}.

4.c.ii *Insensibilité aux signaux inhibiteurs de croissance*

Afin de maintenir une prolifération constitutive, les cellules tumorales ont acquis la capacité à échapper aux signaux régulant négativement la prolifération cellulaire. Ces signaux inhibant la croissance et la prolifération sont contrôlés par l'expression de gènes suppresseurs de tumeurs. Les freins majeurs à la croissance cellulaire sont des régulateurs directs de la division cellulaire comme Rb, p53 et les protéines inhibitrices de kinases « cycline-dépendantes » (CDKI)²⁷⁻²⁹. Appelée gardien du génome, la protéine p53 garantit l'homéostasie tissulaire et la prolifération physiologique en détectant par exemple les dommages à l'ADN ou certains stress pouvant altérer la duplication sans

erreur du génome, la ségrégation chromosomique ou la division cellulaire. Ces stress cellulaires vont activer p53 engendrant la mise en place d'une machinerie complexe d'inhibiteurs du cycle cellulaire et dans le cas d'anomalies irréversibles engendrant la mort cellulaire programmée (apoptose)³⁰. Comme dit précédemment, ces gènes se retrouvent mutés dans le cancer entraînant alors une absence de signaux inhibant la croissance menant aux néoplasmes. En effet, on considère que le gène p53 est muté dans 50% des cancers et qu'un grand nombre de tumeurs avec une protéines p53 de type sauvage portent des altérations qui compromettant sa signalisation ³¹.

4.c.iii Résistance aux morts cellulaires

Physiologiquement, les cellules dysfonctionnelles possédant des mutations sont éliminées par l'organisme selon différents choix de mort cellulaires mais les cellules cancéreuses acquièrent une résistance à celles-ci. Le concept selon lequel la mort cellulaire programmée par apoptose constitue une barrière naturelle au développement du cancer a largement été démontrée au cours de ces dernières décennies ³². En effet, dans les cellules tumorales, les gènes pro-apoptotiques contrôlant l'induction d'apoptose comme *Bax* peuvent être diminués tandis que ceux empêchant l'apoptose, les gènes anti-apoptotiques comme *Bcl-2* peuvent être surexprimés ³³. Comme dit précédemment, la protéine p53 régule également l'induction d'apoptose lors de stress. En cas de perte de fonctionnalité de p53, les cellules ne vont plus mourir par apoptose entraînant leur prolifération en accumulant des dommages à l'ADN, pouvant aboutir au développement d'une tumeur ³⁴.

L'apoptose n'est pas la seule mort cellulaire auxquelles les cellules cancéreuses acquièrent une résistance. En effet, l'autophagie, la pyroptose, la ferroptose ou encore la nécroptose peuvent être dérégulées afin d'entraîner le développement tumorale ³⁵. Ces résistances aux différentes morts cellulaires seront explorées plus en détail dans la suite de ce document.

4.c.iv Potentiel de réplication illimité

L'immortalisation des cellules cancéreuses leur confère un pouvoir réplicatif illimité et un échappement aux signaux de morts cellulaires. L'un des marqueurs prédominants dans le pouvoir réplicatif des cellules cancéreuses est notamment dû à l'activation exacerbée de télomérases³⁶. Les télomères sont des complexe ADN-protéines (nucléoprotéines) répétables présents aux extrémités des chromosomes qui enregistrent chaque cycle de division cellulaire. Les télomères ont une fonction de protection car ils s'érodent au cours de chaque division, perdent leur fonction protectrice et mènent la cellule à un état de crise ³⁷. Quand un certain seuil d'érosion est atteint, la protéine p53 est recrutée et provoque l'arrêt du cycle cellulaire ou l'apoptose des cellules. Contourner cette réponse inhibitrice induite par p53 permet aux cellules tumorales dont les télomères s'érodent d'ignorer les points de contrôle des « télomères courts » et continuer à proliférer mais de façon transitoire ³⁸. Inévitablement,

l'érosion des télomères entraîne la perte des nucléoprotéines protégeant les extrémités des chromosomes et provoque des catastrophes mitotiques menant à la mort cellulaire. Les cellules tumorales contournent cette barrière en activant un système d'entretien et d'extension des télomères, normalement utilisé dans les fonctions répliquatives embryonnaires et des cellules souches³⁹. Ce système implique l'expression exacerbée de la télomérase, enzyme responsable de l'extension des télomères et permet aux cellules cancéreuses de se multiplier à l'infini⁴⁰. Diagnostiquer l'expression de ces télomérases et les cibler constituent un des axes de la prise du cancer⁴¹.

4.c.v Induction de l'angiogenèse

Une tumeur peut être considérée comme un organe ou un tissu et a donc besoin de nutriments et oxygène pour survivre, croître et éliminer les déchets métaboliques. Ainsi, la tumeur comporte un réseau de vaisseaux sanguins et sa capacité à former de nouveaux vaisseaux est appelée l'angiogenèse⁴². L'angiogenèse est dirigée par l'expression de multiple facteurs comme le facteur de croissance endothéliale vasculaire A, VEGF-A et est réprimé par la thrombospondine-1 TSP-1⁴³⁻⁴⁵. L'importance de l'angiogenèse dans le développement tumoral est connu depuis plusieurs années et a permis la mise en place de nouvelles stratégies thérapeutiques comme le développement d'inhibiteurs spécifiques de la voie VEGF/VEGFR utilisés aujourd'hui en clinique^{46,47}.

4.c.vi Capacité d'invasion et de formation de métastases

Pendant longtemps, il était connu que la présence de métastases reflétait la gravité de la maladie, mais le mécanisme par lequel les cellules pouvaient se dissocier de la matrice extracellulaire et envahir les tissus voisins était inconnu. Par la suite, il a été découvert que l'un des principaux modes d'action s'opère par la perte de la E-cadhérine, molécule d'adhésion entre cellules. Ainsi, il est souvent observé dans les cancers des mutations et inactivations de la E-cadhérine permettant ainsi aux cellules de se dissocier⁴⁸. Le processus d'invasion et de métastase peut être décrit en plusieurs étapes clefs : 1) invasion locale, 2) intravasation des cellules tumorales dans les vaisseaux sanguins et lymphatiques, 3) le transport des cellules tumorales par ces vaisseaux, 4) extravasation des cellules des vaisseaux aux tissus sains, 5) colonisation faisant référence à la croissance de ces métastases^{49,50}. L'un des marqueurs majeurs de la capacité d'invasion et la formation de métastases est la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM). Les cellules soumises à la TEM vont alors exhiber de nombreux changements morphologiques comme la diminution de marqueurs de cellules épithéliales et une augmentation de marqueurs mésenchymateux qui sont régulés par de nombreux facteurs de transcription comme SNAIL, TWIST et ZEB⁴⁹.

Ces six caractéristiques décrites en 2001 ont été complétées en 2011 en définissant quatre nouvelles caractéristiques à savoir la dérégulation du métabolisme énergétique cellulaire, l'instabilité

génomique, l'échappement au système immunitaire et la promotion d'un environnement pro inflammatoire ²⁴. Voici une description succincte de ces mécanismes.

4.c.vii Instabilité génomique et mutations

L'instabilité génomique et les mutations au sein des gènes favorisant l'acquisition de propriétés cancéreuses sont la principale modalité nécessaire à la transformation tumorale. Physiologiquement, l'organisme est capable de reconnaître et corriger les altérations de l'ADN afin de maintenir le contenu en ADN et empêcher l'apparition de clones cellulaires à l'ADN muté notamment avec les gènes suppresseurs de tumeurs comme p53. Dans les cellules cancéreuses, les systèmes de détection et réparation à l'ADN sont modifiés de façon à ce que les mutations s'accumulent. Ces systèmes sont souvent régulés par des gènes suppresseurs de tumeur comme p53 qui vont alors être inactivés par mutation ou encore par répression épigénétique ³⁴. Grâce aux développements de technologies de séquençage à haut débit (NGS), l'importance de ces nombreuses mutations dans le processus de tumorigenèse est reconnue. Par exemple, le consortium PanCancer mis en place par le National Cancer Institute (NCI) a publié une analyse de 33 types de cancers chez plus de 10 000 patients, classant les cancers selon leur constitution cellulaire et génétique ⁵¹. Cette étude a permis d'identifier des relations moléculaires dans la diversité des cancers afin d'adapter les traitements thérapeutiques selon les mutations retrouvées. Ce consortium a alors pu identifier environ 300 gènes responsables de la croissance tumorale.

4.c.viii Inflammation favorisant la tumeur

Hormis les cellules tumorales, la tumeur contient d'autres types cellulaires dont les cellules du système immunitaire qui peuvent jouer un rôle anti ou pro-tumorale. Au début du 20e siècle, il était incompris comment l'inflammation associée à la tumeur avait un effet positif sur le développement tumoral et favorisait son expansion. Après plusieurs années de recherche, les études ont pu montrer un rôle pléiotrope de l'inflammation puisqu'elle contribue et participe dans de nombreuses autres « hallmarks » des cellules tumorales^{24,52}. L'inflammation peut permettre le relargage de molécules bioactives dans l'environnement comme des facteurs de croissance qui vont maintenir les voies impliquées dans la prolifération, des facteurs de survie qui limitent la mort cellulaire, des enzymes qui vont promouvoir l'angiogenèse, l'invasion, la formation de métastases etc... ⁵² L'inflammation peut également participer à l'évolution génétique des cellules tumorales avec le relargage d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) qui sont activement mutagènes ⁵³. L'inflammation peut également grandement participer à une caractéristique majeure des cellules tumorales, à savoir l'échappement du système immunitaire qui sera décrit par la suite ⁵⁴.

4.c.ix Dérégulation du métabolisme énergétique

La multiplication incontrôlée des cellules cancéreuses n'est pas seulement la résultante d'une dérégulation des mécanismes de prolifération mais résulte également d'une adaptation du métabolisme énergétique dont le métabolisme glucidique ⁵⁵. Physiologiquement en conditions aérobies, pour produire de l'énergie, les cellules réalisent la glycolyse en convertissant le glucose en pyruvate dans le cytosol puis en dioxyde de carbone dans les mitochondries. Lors de la glycolyse aérobie, on observe une faible production de lactate. En absence d'oxygène, soit en condition anaérobie, la glycolyse est toujours privilégiée mais son rendement énergétique est moins rentable qu'en condition aérobie et entraîne une forte production de lactate induisant une acidification de l'environnement extracellulaire qui peut à forte dose être délétère. Dans la tumeur, on observe une concentration anormalement élevée de lactate dû à l'effet Warburg. En effet, même en présence d'une grande quantité d'oxygène, les cellules cancéreuses se caractérisent par des niveaux élevés d'absorption du glucose et une conversion accrue du glucose en lactate via la glycolyse dite aérobie. Cette forte capacité à capter le glucose est aujourd'hui utilisée dans le diagnostic clinique avec le PET scan (tomographie par émission de position) afin de localiser les tumeurs. L'analogue radiomarqué du glucose, le FDG est utilisé comme traceur. En effet, il se fixe aux récepteurs du glucose des cellules cancéreuses et permet ainsi par imagerie de localiser ces cellules tumorales⁵⁶. Dans les tumeurs, l'hypoxie s'observe fréquemment et est généralement associée à une augmentation des transporteurs au glucose et des enzymes de la voie glycolytique dans les cellules cancéreuses. L'augmentation de ces marqueurs est alors régulée par des mutations dans des proto-oncogènes et gènes suppresseurs de tumeurs ⁵⁷. Dans les cellules cancéreuses, d'autres métabolismes énergétiques sont dérégulés comme le métabolisme lipidique ⁵⁸ ou encore le métabolisme des acides aminés ⁵⁹.

4.c.x Echappement au système immunitaire

Le rôle du système immunitaire dans la formation tumorale jusqu'en 2011 était encore une question non résolue, à savoir s'il était impliqué dans l'éradication de la tumeur ou bien dans sa progression. La théorie de l'immunosurveillance propose que le système immunitaire est capable de reconnaître et éliminer la majorité des cellules cancéreuses et tumeurs naissantes ⁵⁴. A partir de cette théorie, les tumeurs que l'on observe ont échappé à ce système de détection empêchant alors leur élimination par le système immunitaire ^{60,61}. Cette partie sera détaillée ultérieurement.

Enfin, en 2022, les hallmarks sont de nouveaux compléter par quatre nouveaux marqueurs communs aux cellules cancéreuses. Ainsi, s'ajoute la plasticité phénotypique, la reprogrammation épigénétique non mutationnelle, le polymorphisme du microbiote et la sénescence des cellules. Voici une description succincte de ces mécanismes ²⁵.

4.c.xi Plasticité phénotypique

Mis à part les cellules progénitrices dotées d'une plasticité, les cellules participant au développement et organisation du tissu sont définies par une différenciation terminale leur conférant leur propriété fonctionnelle. En effet, les cellules à leur état final de différenciation ne sont pas capables de proliférer, à l'inverse des cellules composant une tumeur. Ainsi, inverser cet état de différenciation cellulaire terminale et posséder des capacités de plasticité cellulaire semblent être un mécanisme mis en place par les cellules cancéreuses⁶². Plusieurs plasticités dans le cancer sont observées à savoir une capacité de dédifférenciation, un blocage de différenciation ou encore une transdifférenciation.

Les mécanismes de dédifférenciation s'observent notamment dans la carcinogenèse colorectale où les cellules épithéliales du colon vont se dédifférencier et exprimer des marqueurs normalement retrouvés dans les progéniteurs. De plus, des études ont pu montrer que la capacité de dédifférenciation des cellules cancéreuses peut être associée à un mauvais pronostic dans certains cancers^{63,64}.

Par ailleurs, la capacité des cellules tumorales à bloquer leur différenciation va également être une signature de celles-ci. Généralement, le blocage de différenciation des cellules va les mener à rester bloquer au stade de progéniteurs non différenciés aux fortes capacités répliquatives. On peut observer cela par exemple dans la leucémie aiguë pro myélocytaire où à la suite d'une translocation chromosomique, les progéniteurs myéloïdes ont perdu la capacité à se différencier en granulocyte menant à l'accumulation de progéniteurs non différenciés. Le blocage de différenciation est également observé dans d'autres cancers comme dans le mélanome, celui du pancréas ou encore celui du foie^{25,65}.

Retrouvés dans les cas de métaplasies tissulaires, des états cellulaires de transdifférenciation sont observés dans le cancer. Cela s'observe notamment dans le développement de l'adénocarcinome canalaire pancréatique où les cellules acineuses pancréatiques peuvent se transdifférencier en un phénotype de cellules canalaire lors de l'initiation du développement de la tumeur. La transdifférenciation s'observe également dans les résistances aux traitements anti-cancéreux^{62,66}.

4.c.xii Reprogrammation épigénétique non mutationnelle

Comme citées précédemment, l'instabilité et les mutations du génome constituent le concept principal responsable du développement tumoral. Il est maintenant bien connu que les mécanismes épigénétiques jouent un rôle clef durant le développement embryonnaire ou encore dans la différenciation et l'organogenèse⁶⁷. Ces modifications épigénétiques implique des changements structurelles au sein des acides nucléiques et des histones conférant une structure de chromatine différente et comprend trois mécanismes moléculaires majeurs : la méthylation de l'ADN, la

modifications des histones et les modèles de modélisation des nucléosomes ⁶⁸. Avec les avancées technologiques, il est maintenant reconnu que des modifications épigénétiques comme l'accès à la chromatine, la modification des histones, la modification de la méthylation de l'ADN, les modifications post-transcriptionnelles et d'autres sont impliqués dans la formation de néoplasme. Ainsi, l'histone H1.0 est retrouvée diminuée dans de nombreuses cellules tumorales de divers types de cancers et cette modification est associée à un mauvais pronostic chez les patients ⁶⁹. Des modifications épigénétiques non mutationnelles sont également observées dans les cellules du microenvironnement tumoral comme les cellules immunitaires, les péricytes, cellules endothéliales etc... Dans ces cellules, ces modifications vont alors leur permettre de participer au processus de tumorigenèse ⁷⁰. Enfin, les modifications épigénétiques peuvent également être utilisées comme biomarqueurs. Premier cancer masculin, le cancer de la prostate présente chez 95% des patients une expression accrue de PCA3 que l'on retrouve dans le sang et est utilisé à des fins de diagnostic ⁶⁸.

4.c.xiii Polymorphisme du microbiome :

Aujourd'hui, de multiples études ont mis en exergue le fait que la variabilité polymorphe des microbiomes entre les individus d'une population peut avoir un impact profond sur les phénotypes du cancer ⁷¹. Connu depuis longtemps pour avoir son importance au niveau de l'homéostasie intestinale, le microbiome joue un rôle dans de nombreuses pathologies. Au niveau du cancer, certaines expériences de transplantation de fèces d'individus atteints de cancer colorectal à un individu sain prédisposent au développement de ce cancer. De là découle deux concepts sous-jacents : un effet protecteur du microbiome et un effet pro-tumoral de certaines souches de bactéries ⁷². En effet, le relargage de toxines et d'autres molécules des bactéries sont capables d'altérer l'ADN des cellules de l'épithélium intestinal et ainsi induire de nombreuses mutations ⁷³. De plus, les bactéries ont la capacité de se fixer à la surface de cellules épithéliales et produire des ligands mimant des signaux de prolifération, caractéristiques des cellules cancéreuses. Les bactéries sont également capables de synthétiser certains métabolites impliqués dans la cancérogenèse. Par ailleurs, les bactéries arrivent également à moduler l'effet du système immunitaire ⁷⁴.

Au niveau de la tumeur, des études ont pu démontrer la présence de bactéries. Ainsi, une étude portant sur l'analyse de 1526 tumeurs de sept types différents a montré que chaque type était caractérisé par un microbiome distinctif largement localisé à l'intérieur des cellules cancéreuses et des cellules immunitaires et qu'au sein de chaque type de tumeur, des variations du microbiome ont été observées ⁷⁵. Un défi important pour l'avenir sera d'étendre ces implications à d'autres types de tumeurs et de déchiffrer les contributions potentiellement séparables de la constitution et de la variation du microbiome tumoral à celles du microbiome intestinal (et du tissu local d'origine),

potentiellement en identifiant des espèces microbiennes fonctionnellement influentes à un endroit ou à un autre ²⁵.

4.c.xiv Senescence

Par définition, la sénescence est le processus du vieillissement cellulaire se traduisant par un arrêt irréversible de la prolifération. Il s'agit probablement d'une évolution d'un mécanisme de protection pour maintenir l'homéostasie tissulaire de façon complémentaire aux diverses formes de morts cellulaires et protéger l'organisme des cellules dysfonctionnelles. La sénescence se caractérise donc par un arrêt du cycle cellulaire qui induit des changements morphologiques et métaboliques des cellules et active un phénotype sécrétoire associé à la sénescence impliquant le relargage de nombreuses protéines bioactives, cytokines ou chimiokines. Divers stimuli induisent la sénescence comme le stress lié aux dommages à l'ADN ⁷⁶. Pendant longtemps considérée comme une protection, l'induction de la sénescence des cellules était considérée comme anti-tumorale empêchant ainsi la prolifération anarchique des cellules tumorales ⁷⁷. Cependant, des études ont pu montrer que les molécules sécrétées par les cellules sénescents (SASP pour senescence-associated secretory phenotype) peuvent avoir un effet pro-tumorale notamment en promouvant l'angiogenèse, l'échappement à l'apoptose et la prolifération des cellules du microenvironnement tumorale ⁷⁸.

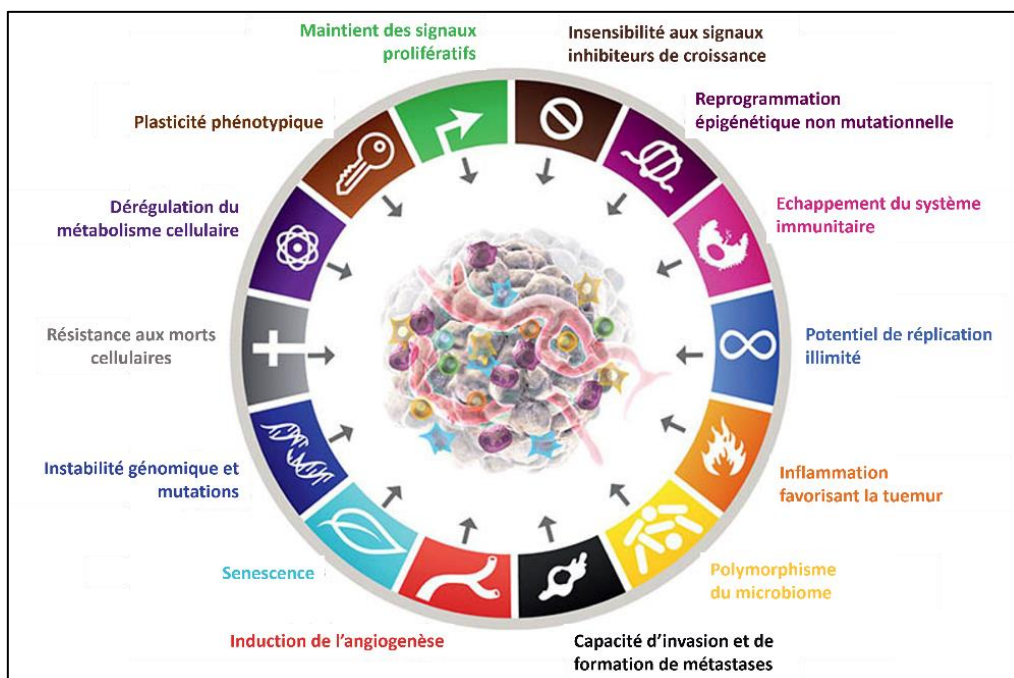


Figure 2 : Les caractéristiques du cancer. D'après Hanahan et Weinberg²⁵.

4.d Transformation cellulaire : initiation, promotion, progression

Le cancer est donc la résultante de nombreuses altérations cellulaires et son processus peut se résumer à trois processus fondamentaux : initiation, promotion, progression ⁷⁹.

- *Initiation*

L'initiation correspond à la première étape de la carcinogenèse. L'initiation induit une altération, une modification de gènes qui peuvent apparaître spontanément ou après l'exposition d'agents carcinogènes appelés « agents initiateurs ». Ces dommages à l'ADN sont irréversibles et seront transmis aux cellules filles lors des phénomènes de réplication ⁸⁰.

- *Promotion*

L'étape de promotion va correspondre à la sélection clonale des cellules mutées qui ont subi l'étape d'initiation. Dans cette étape, les agents dit « promoteurs » ne sont pas mutagènes (à l'inverse de ceux dit « initiateurs ») et ne sont pas forcément carcinogènes lorsqu'ils ne sont pas associés à un autre agent. Ces agents sont caractérisés par leur capacité à réduire le temps entre l'exposition aux agents initiateurs et le développement de la tumeur ou augmenter le nombre de tumeurs déjà formées dans un tissu. Il existe deux catégories de promoteurs : ceux spécifiques qui interagissent directement aux récepteurs membranaires ou dans une cible cellulaire, et ceux non spécifiques qui altèrent l'expression de gènes sans agir sur un récepteur connu ⁸¹.

- *Progression*

La phase de progression représente l'étape finale de la transformation néoplasique où les cellules tumorales acquièrent un phénotype malin. Dans cette étape, les cellules acquièrent de nombreuses signatures des cellules cancéreuses comme une forte instabilité génomique, le potentiel de réplication illimité ou encore l'angiogenèse et le phénomène d'invasion. En effet, lors de la progression, les cellules tumorales présentent un phénotype agressif où elles vont alors induire le développement et la croissance de la tumeur puis également envahir des tissus environnants ^{79,82,83}.

4.e Concept de l'immunoediting : élimination, équilibre, échappement

La participation du système immunitaire dans la cancérogenèse est reconnue depuis le 20e siècle notamment avec le prix Nobel de physiologie ou médecine décerné au médecin Paul Ehrlich qui émit l'hypothèse que le système immunitaire est capable de réprimer le développement tumoral ⁸⁴.

En 1970, le concept de l'immunosurveillance suggère que l'action du système immunitaire peut prévenir le développement du cancer en contrôlant, détectant et éliminant les cellules tumorales ⁸⁵.

Plus récemment, des travaux ont montré que le système immunitaire ne protège pas seulement l'hôte

contre la formation de tumeur mais contribue aussi à l'immunogénicité tumorale. Ces résultats sont à la base du concept de l'immunoediting proposé par Schreiber en 2011⁵⁴ illustré en **Figure 3**.

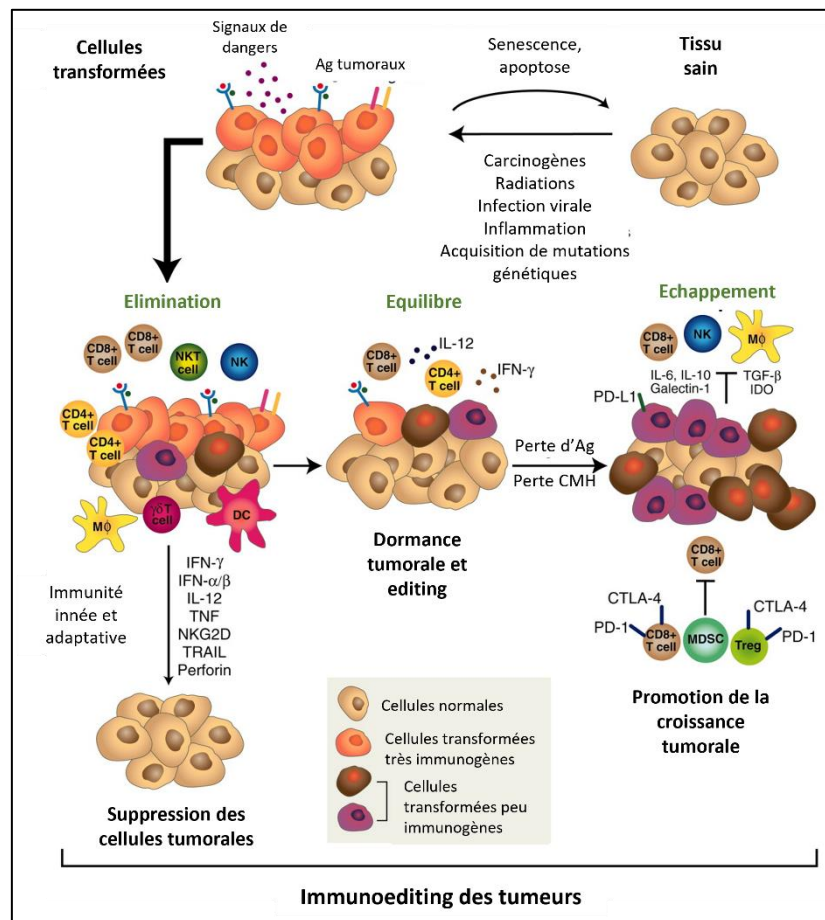


Figure 3 : Concept de l'immunoediting des tumeurs. L'immunoediting se compose de trois phases successives : l'élimination, l'équilibre et l'échappement. Pendant la phase d'élimination, l'immunité innée et adaptative coopèrent pour éliminer les tumeurs qui se développent, même si celles-ci sont cliniquement invisibles. Si les cellules tumorales ne sont pas détruites, elles peuvent entrer dans la phase d'équilibre où l'immunité adaptative joue un rôle déterminant. Les lymphocytes T CD4+/8+, l'IL-12 et l'IFN γ sont nécessaires pour maintenir la dormance des cellules cancéreuses. Cependant, l'immunogénicité des tumeurs durant cette phase est modifiée. En conséquence de la pression de sélection immunitaire constante exercée sur les cellules tumorales maintenues en dormance, des « variants » de cellules tumorales peuvent apparaître. Ces clones tumoraux ont plusieurs mécanismes d'actions : (i) ne plus être reconnus par l'immunité adaptative (e.g. perte d'antigène (Ag), de CMH), (ii) devenir insensibles à la réponse immunitaire, ou (iii) induire un état immunosuppresseur dans le microenvironnement tumoral. Ces cellules cancéreuses entrent ensuite dans la phase d'échappement où leur croissance n'est plus réprimée par l'immunité. Ces cellules tumorales apparaissent et provoquent une maladie cliniquement apparente. D'après Schreiber *et al*, 2011⁵⁴.

L'immunoediting est un processus complexe qui se compose de trois phases : une phase d'élimination, une phase d'équilibre et une phase d'échappement. La phase d'élimination est la phase où l'immunosurveillance se met en place. Les acteurs de la réponse immunitaire innée et adaptative coopèrent pour détecter et éliminer la présence de cellules tumorales. Si la destruction des cellules tumorales est totale, la phase d'élimination représente un point final de l'immunoediting. Durant la

phase d'équilibre, les cellules malignes qui ont échappé à la phase d'élimination et qui ont un phénotype non immunogène sont sélectionnées pour la croissance. Il s'agit du plus long des trois processus d'immunoediting du cancer et peut survenir sur une période de plusieurs années. Lors de la phase d'échappement, les cellules tumorales ne sont plus réprimées et continuent de croître de manière incontrôlée. Plusieurs mécanismes conduisent à l'échappement tumorale et à la résistance des cellules cancéreuses au système immunitaire. On peut notamment citer la réduction ou perte d'expression des molécules du CMH classique de classe I par les cellules cancéreuses qui sont essentielles au bon fonctionnement des lymphocytes T, mais aussi le développement d'un microenvironnement pro-tumoral qui exerce un effet suppresseur sur le système immunitaire et agit comme une barrière protectrice pour les cellules cancéreuses ⁸⁶.

II. Thérapies anticancéreuses

Appelée la maladie du siècle, le cancer touche un grand nombre de personnes à travers le monde et son traitement représente alors un axe important de la recherche médicale mondiale. Par sa complexité, les thérapies anticancéreuses sont multiples et ont évolué au cours du temps afin de choisir aujourd'hui le meilleur traitement pour chaque patient ⁸⁷.

Pendant plusieurs décennies, les traitements conventionnels anticancéreux ont été la chirurgie, la radiothérapie et la chimiothérapie. A un stade précoce, la chirurgie, consistant à l'exérèse de la tumeur, est le premier recours efficace pour éradiquer celle-ci. Dans de nombreux cas, la chirurgie est couplée à la radiothérapie et/ou la chimiothérapie afin de limiter l'expansion de la tumeur primaire et éliminer ou prévenir les potentielles cellules cancéreuses restantes dans l'organisme ⁸⁸. Par ailleurs, l'utilisation de ces agents cytotoxiques exerce de nombreux effets secondaires avec notamment une toxicité sur les cellules saines et le développement de mécanismes de résistance aux chimiothérapies par les cellules cancéreuses ⁸⁷. Grâce aux avancées technologiques et l'enrichissement des connaissances, de nouvelles thérapies dites ciblées sont apparues. Contrairement aux chimiothérapies cytotoxiques, ces thérapies visent à comprendre les mécanismes moléculaires responsables de la transformation néoplasique et identifier de nouvelles cibles pour les bloquer. L'utilisation d'inhibiteurs sélectifs des tyrosines kinases ou l'administration d'anticorps monoclonaux sont des exemples courants de thérapies ciblées utilisées en clinique. La thérapie ciblée agit uniquement sur les cellules malignes en agissant sur les changements qui les aident à croître, se diviser et se répandre ⁸⁷. En parallèle, de nouvelles approches comme l'immunothérapie vont être recommandées afin d'éliminer toutes les cellules tumorales par activation du système immunitaire.

1. Les diverses chimiothérapies

Le terme « chimiothérapie » a été inventé par Paul Ehrlich, chimiste qui étudiait l'utilisation de médicaments contre les maladies infectieuses⁸⁹. La chimiothérapie a pour but d'inhiber la prolifération des cellules tumorales et empêcher leur propagation et formation de métastases. Pour cela, plusieurs classes de chimiothérapies existent et sont classées selon leur mode d'action. Le plus souvent, les agents chimiothérapeutiques agissent au niveau de la réplication et fonction des cellules tumorales en agissant notamment sur la synthèse de l'ADN, de l'ARN et des protéines. Le but ultime des agents chimiothérapeutiques est alors d'induire la mort des cellules cancéreuses soit par effet direct ou bien par le déclenchement de l'apoptose. Avec les chimiothérapies traditionnelles, seulement une partie des cellules cancéreuses peuvent être touchées nécessitant alors une répétition du traitement pour obtenir une réponse optimale. Il est alors courant de combiner plusieurs chimiothérapies pour obtenir la meilleure réponse thérapeutique chez les patients. La chimiothérapie peut être utilisée en contexte néoadjuvant, adjuvant, combinée et métastatique. Le traitement néoadjuvant est utilisé avant un traitement primaire comme une chirurgie alors que le traitement adjuvant est administré en plus de la thérapie initiale afin d'éliminer les cellules tumorales restantes⁹⁰.

Comme dit précédemment, les agents chimiothérapeutiques peuvent être classés selon différentes façons. Ici, nous classerons les agents chimiothérapeutiques selon cinq catégories : les agents alkylants, les antimétabolites, les inhibiteurs du fuseau mitotique, les inhibiteurs de topoisomérases et les autres⁹¹.

1.a Les agents alkylants

Les agents alkylants sont utilisés comme agent anticancéreux car ils ont la capacité d'interférer avec la formation et la liaison du double brin d'ADN. Chimiquement, ces agents transfèrent un groupe alkyle ($C_n H_{2n+1}$) au niveau d'une base guanine de l'ADN empêchant alors la réplication et la transcription. Les agents alkylants regroupent alors plusieurs molécules : les moutardes azotées (bendamustine, cyclophosphamide, ifosfamide), les nitrosourés (carmustine, lomustine), les analogues de platine (carboplatine, cisplatine, oxaliplatine), les triazènes (dacarbazine, procarbazine, témozolomide), le sulfonate d'alkyle (busulfan) et les éthylèneimine (Thiotépa)⁹².

1.b Les antimétabolites

Les antimétabolites sont des agents cancéreux qui bloquent également la transcription des cellules. Comme leur nom l'indique, les antimétabolites miment la structure des métabolites physiologiques et vont être utilisés dans les voies de signalisation et ainsi bloquer la multiplication des cellules cancéreuses. Les principaux antimétabolites regroupent les analogues de folates (Aminoptérine et

Méthotrexate), les analogues de purines (Mercaptopurine) ou encore les analogues de pyrimidine (Fluorouracil (5-FU), Gemcitabine, Capecitabine)⁸⁷.

Prenons comme exemple le 5-FU. Le 5-FU fait partie des antimétabolites de la classe des fluoropyrimidines, développé il y a plus de 60 ans et c'est sa capacité à être métabolisé par les cellules qui le rend cytotoxique. Cet analogue fluoré de l'uracile, possède deux modes d'actions. Le premier conduit à la formation ribo- et désoxyribo-nucléosides, puis de nucléotides triphosphates pouvant s'incorporer dans l'ADN et l'ARN produisant alors des erreurs de lecture bloquant la synthèse de protéines. Le second et mécanisme majeur conduit à l'inhibition de la thymidylate synthétase, enzyme permettant la synthèse *de novo* de la thymidine, par le 5-fluorodéoxyuridine monophosphate (FdUMP). Cela entraîne alors un déséquilibre dans le pool des nucléotides et à terme l'inhibition de la synthèse d'ADN et l'induction d'apoptose⁹³.

1.c Les inhibiteurs du fuseau mitotique

Les Vinca alcaloïdes comme la Vinblastine et les taxanes comme le docétaxel et le paclitaxel vont entraîner l'arrêt de la division des cellules. En effet, ces molécules agissent au niveau des microtubules du fuseau mitotique empêchant la séparation des chromosomes lors de la mitose menant alors à la mort cellulaire⁹¹.

1.d Les inhibiteurs de topoisomérase I et II

Comme expliquer précédemment, les topoisomérases jouent un rôle clef lors de la division cellulaire. Les inhibiteurs de topoisomérase inhibent alors l'activité de ces enzymes empêchant la réplication et induisant de nombreux dommages à l'ADN, menant à terme à la mort cellulaire. Parmi les inhibiteurs de topoisomérase I on retrouve l'irinotécan et le topotécan et on peut citer pour les inhibiteurs de topoisomérase II l'étoposide et le teniposide⁹¹.

1.e Autres agents chimiothérapeutiques

Dans cette sous-catégorie, des agents chimiothérapeutiques aux mécanismes d'actions différents sont alors regroupés. Parmi eux, on retrouve les antibiotiques antitumoraux comme les anthracyclines avec la doxorubicine. La doxorubicine agit également au niveau de la topoisomérase II empêchant également la réplication cellulaire. La doxorubicine peut également induire la production de ROS, des dommages dans l'ADN mitochondriaux et induire l'apoptose des cellules⁹⁴. La bléomycine est également un autre antibiotique utilisé comme anti-cancéreux. La bléomycine est un chélateur des ions fer qui serait alors responsable du relargage de radicaux libres superoxydes et hydroxydes venant s'insérer dans l'ADN provoquant une scission⁹². Ensuite, les inhibiteurs de protéasome sont utilisés comme traitement comme le Bortezomib ou le Carfilzomib qui comme leur nom l'indique inhibe le

protéasome empêchant la dégradation de certains facteurs pro-apoptotiques favorisant alors l'apoptose des cellules cancéreuses. D'autres inhibiteurs sont utilisés comme les inhibiteurs de tyrosines kinases tel que l'imatinib et l'erlotinib qui vont alors inhiber l'activité enzymatique de nombreuses kinases impliquées dans les voies de signalisation dérégulées dans les cellules cancéreuses^{87,91}.

2. Thérapies ciblées

De nombreuses études statistiques montrent que la mortalité des patients atteints de cancer est due à une résistance aux traitements. La résistance aux chimiothérapies résulte de différents mécanismes mis en place par les cellules cancéreuses comme un efflux accru des traitements, des mutations génétiques et épigénétiques, des facteurs de croissance ou encore un métabolisme élevé des xénobiotiques. Afin de palier à ce phénomène de résistance aux chimiothérapies, le développement de thérapies ciblées propose une réelle alternative thérapeutique. Grâce au NGS, les mutations des cellules cancéreuses pour chaque patient peuvent être caractérisées et ciblées à l'aide de traitements adéquats. Ainsi, à l'inverse d'une chimiothérapie, une thérapie ciblée agira aux niveaux de cellules cancéreuses et ne sera pas toxique pour les cellules environnantes. Ces traitements sont permis notamment grâce aux anticorps monoclonaux ou des médicaments dits « à petites molécules »^{91,95}.

2.a Anticorps monoclonaux

Parmi les immunoglobulines, les IgG sont généralement les plus utilisées pour les anticorps monoclonaux car elles peuvent interagir directement avec les récepteurs Fc retrouvés à la surface des cellules immunitaires comme les cellules Natural Killer (NK), les neutrophiles, les monocytes, les cellules dendritiques et les éosinophiles afin de moduler leur fonction. Pour éliminer les cellules cancéreuses, les thérapies utilisant des anticorps possèdent diverses modes d'actions. En effet, le mécanisme direct par lequel les anticorps monoclonaux peuvent éliminer les cellules tumorales consiste à interagir et bloquer un récepteur aux facteurs de croissance situé à la surface de la cellule cancéreuse. Par exemple, le récepteur EGFR (« Epidermal Growth Factor Receptor) est retrouvé surexprimé à la surface de nombreuses cellules cancéreuses et représente une cible pour certains anticorps monoclonaux comme le Cetuximab. Autre récepteur exprimé à la surface des cellules, le récepteur HER2 est ciblé par l'anticorps monoclonal Trastuzumab.

Les anticorps monoclonaux peuvent également agir de façon indirecte par leurs interactions avec les cellules immunitaires de l'hôte. En effet, plusieurs voies peuvent être activées comme la réponse ADCC (« Antibody-Dependent Cell-mediated »), la réponse CDC (« Complement-dependant cytotoxicity »), la réponse ADCP (« Antibody-Dependant Cellular Phagocytosis ») qui vont permettre l'élimination des cellules cancéreuses par les cellules du système immunitaire. Beaucoup d'anticorps monoclonaux

utilisent leur capacité à activer le système du complément comme le Rituximab. Enfin, les anticorps monoclonaux peuvent être des outils pour transporter des molécules létales comme des radioisotopes, médicaments ou toxines pour éliminer directement les cellules cancéreuses et ont montré leur forte efficacité ^{96,97}.

2.b Inhibiteurs à petites molécules

Comme dit précédemment, les aberrations génétiques sont une signature des cellules cancéreuses et les caractériser pour les cibler est le principe de thérapie ciblée. Ainsi, les gènes et protéines surexprimés et impliqués dans la tumorigenèse peuvent être reconnus par des inhibiteurs à petites molécules. Ces inhibiteurs vont alors plusieurs cibles : les tyrosines kinases, les effecteurs en aval de la signalisation, les gènes suppresseurs de tumeur et les modificateurs de la chromatine ^{98,99}.

Deux groupes de kinases se distinguent : les tyrosines kinases qui sont pour la plupart couplées à des récepteurs de facteurs de croissance et les sérine/thréonine kinases qui englobent un grand nombre de kinases intracellulaires. Les inhibiteurs de tyrosine kinases possèdent différents modes d'action : ils peuvent rentrer en compétition avec l'ATP au niveau du site de fixation dans la poche de l'enzyme, inhiber allostériquement l'enzyme ou bien se fixer à d'autre site qui vont empêcher son bon fonctionnement. Ces inhibiteurs vont alors cibler des kinases associées à des récepteurs surexprimés dans de nombreux cancer comme les récepteurs EGFR ou VEGFR. Dans l'ensemble, le ciblage des mutations dans les tyrosines kinases a été une stratégie thérapeutique efficace notamment avec les inhibiteurs de BCR-ABL qui ont révolutionné le traitement de la leucémie myéloïde chronique. D'autres inhibiteurs qui ciblent les mutations JAK2 et FLT3 dans les hémopathies malignes et les mutations ALK, MET, NTRK, RET et ROS1 dans les tumeurs solides représentent également des traitements efficaces. De plus, de nombreux effecteurs responsables de la tumorigenèse comme RAS, RAF, MEK et bien d'autres peuvent être la cible de traitement. Etant fortement mutés et rendus inactifs dans le cancer, les gènes suppresseurs de tumeur sont difficiles à cibler notamment car la restauration fonctionnelle d'un produit protéique mutant est généralement plus difficile que son inhibition. Muté dans de nombreux cancers, le gène TP53 représente une cible prometteuse. La majorité de ces anomalies sont des mutations dites faux-sens qui entraînent une modification de conformation de la protéine p53 entraînant son déploiement. Ainsi, de nombreuses études tentent d'identifier des petites molécules qui seraient capables de stabiliser la conformation native de p53 et restaurer sa fonction. Les modifications épigénétiques sont également responsables de l'oncogenèse donc les cibler représente une stratégie thérapeutique. Ainsi, des médicaments utilisés en clinique sont des inhibiteurs d'ADN méthyltransférases ou encore d'histone désacétylases ¹⁰⁰.

3. Immunothérapie

Comme énoncé auparavant, l'échappement immunitaire des cellules tumorales participe grandement à la transformation néoplasique et fait partie des « hallmarks »²⁴. Bien que le rôle antitumoral du système immunitaire soit connu depuis plusieurs décennies, ce n'est que depuis peu que les immunothérapies sont utilisées en clinique. Les traitements immunothérapeutiques peuvent agir par réactivation d'une réponse immunitaire préexistante ou induire une nouvelle réponse du système immunitaire. Les traitements immunothérapeutiques sont classés en deux catégories : l'immunothérapie active et l'immunothérapie passive. L'immunothérapie passive est utilisée pour des patients ayant une réponse immunitaire antitumorale faible ou absente. L'administration de cytokines recombinantes, une transplantation de cellules immunitaires activées *in vitro* et plus récemment l'administration de cellules CAR-T (cellules T porteuses d'un récepteur chimérique) sont des exemples courants d'immunothérapies passives retrouvées en clinique. L'immunothérapie active quant à elle va être administrée à des patients ayant un système immunitaire fonctionnel afin de stimuler ses fonctions antitumorales *in vivo*. La vaccination des patients avec des peptides antitumoraux et ainsi déclencher une réponse immunitaire spécifique est une possibilité de traitement ayant fait ses preuves¹⁰¹. La classification décrite ici est inspirée du papier Papaioannou *et al*¹⁰¹ et reste une parmi tant d'autres.

3.a L'immunothérapie passive

Selon les classifications, les anticorps monoclonaux peuvent également être considérés comme un traitement immunothérapeutique puisqu'ils vont être reconnus par les cellules du système et engendrer les divers systèmes de reconnaissance (énoncés paragraphe II.2.a) pour éliminer les cellules tumorales.

3.a.i Cytokines

Essentielles aux dialogues entre cellules, les cytokines sont de petites protéines naturellement produites et sécrétées par les cellules immunitaires afin de moduler les diverses voies de signalisation. Dans le microenvironnement tumoral, les cytokines qui vont être responsables de l'activité anti-tumorale du système immunitaire sont l'interleukine 2 (IL-2), l'interféron α (IFN- α) et l'interleukine 12 (IL-12). L'IL-2 possède un rôle pléiotrope dans le système immunitaire mais l'une de ses principales fonctions est d'induire la prolifération des lymphocytes T indispensable à la réponse anti-tumorale. L'IFN- α quant à lui va notamment être utilisé pour son effet immunosuppresseur sur les lymphocytes T régulateur qui vont inhiber la réponse anti-tumorale. Enfin, l'un des rôles majeurs de l'IL-12 est d'agir au niveau des lymphocytes CD4+ et promouvoir leur activité anti-tumorale. En clinique, le traitement

par cytokine ne se réalise pas seul mais est souvent combiné à d'autres traitements comme la chimiothérapie ¹⁰¹.

3.a.ii Transfert adoptif de cellules/Thérapie cellulaire adoptive

L'immunothérapie par transfert adoptif de cellules consiste à l'injection de cellules immunitaires isolées préalablement du patient. Pour cela, différents types de cellules immunitaires peuvent être choisis et voici deux exemples les plus connus utilisant les lymphocytes T :

II.3.a.ii.1 Tumor Infiltrated Lymphocytes (TILs)

Les lymphocytes infiltrants la tumeur, plus connus sous l'abréviation anglophone TILs pour Tumor Infiltrated Lymphocytes peuvent être utilisés comme méthode de transfert adoptif à des fins thérapeutiques. Cette thérapie personnalisée consiste à injecter aux patients des lymphocytes T de façon autologue sans modifier leur récepteur T. Pour cela, après excision d'une partie de la tumeur, les TILs sont isolés *ex vivo* puis mis en culture afin d'entraîner leur expansion. Les clones vont ensuite être challengés et sélectionnés avant d'être réinjectés au patient. Ce traitement autologue ne va alors pas entraîner de réponse du non-soi puisqu'il s'agit de cellules d'un même individu. Les cellules injectées sont alors capables de reconnaître les cellules tumorales pour les éliminer puisqu'une première reconnaissance antigénique a déjà eu lieu précédemment dans la tumeur ^{102,103}.

II.3.a.ii.2 CAR-T

La thérapie par cellules CAR-T (Chimeric Antigen Receptor T-cell) a révolutionné les traitements immunothérapeutiques depuis quelques années. La thérapie cellulaire par cellules CAR-T consiste à utiliser des cellules T collectés chez le patient puis les modifiés génétiquement avant de lui être réinjectés. La modification génétique du lymphocyte T consiste à modifier son TCR pour le remplacer par un CAR afin de le diriger spécifiquement contre un antigène tumoral pour qu'il puisse reconnaître et éliminer les cellules portant cet antigène. Un anticorps monoclonal ou plus généralement un fragment de sa chaîne variable dirigé contre un antigène spécifique est greffé à la surface du lymphocyte. Ainsi, les cellules du patient sont prélevées, puis modifiées génétiquement avant d'être réinjectées au patient après avoir reçu une chimiothérapie entraînant une déplétion des cellules immunitaires pour ne pas entraîner une réponse de rejet. Depuis 2017, les premières immunothérapies par cellules CAR-T ont été approuvées et de nombreux essais cliniques ont vu le jour dans plusieurs hémopathies malignes. Les tumeurs solides restent encore difficiles à traiter par cellules CAR-T puisque ces tumeurs exposent généralement plusieurs antigènes à leur surface mais de nombreuses recherches sont prometteuses notamment pour traiter le mélanome ^{104,105}.

Par ailleurs, d'autres CAR, moins connus et encore en développement peuvent être utilisés comme les cellules CAR NK utilisant comme cellules les Natural Killer, les CARMA utilisant comme cellules les

macrophages. Le principe est le même que pour les cellules CAR-T mais le type cellulaire est différent¹⁰⁶.

3.b Immunothérapie active

Comme dit précédemment, l'immunothérapie active consiste à réactiver le système immunitaire du patient qui est encore fonctionnel. L'immunothérapie active est moins utilisée en clinique mais beaucoup de recherche sont réalisées pour pouvoir développer des traitements efficaces et durables¹⁰⁷.

3.b.i Vaccins oncolytiques

Les vaccins oncolytiques utilisent des virus afin d'éliminer les cellules cancéreuses. En effet, des virus sont génétiquement modifiés afin d'abolir leur virulence mais ont toujours la capacité de pénétrer et induire la lyse d'une cellule. Le premier virus oncolytique a été utilisé dans le mélanome et de nombreuses études montrent des résultats prometteurs pour d'autres cancer. L'un des obstacles premiers des virus oncolytiques restent l'immunité innée et adaptative du patient qui peut alors éliminer ces agents et ainsi diminuer l'efficacité du traitement^{108,109}.

3.b.ii Vaccins anti-tumoraux

Le vaccin qui est l'une des plus grandes avancées médicales consiste à injecter une substance pathogène chez un individu qui va ensuite développer une immunité afin de combattre la maladie associée à ce pathogène. De nos jours, des vaccins contre le cancer existent comme celui contre l'hépatite B ou encore le papillomavirus mais sont des vaccins préventifs et non curatifs. Ainsi, développer un vaccin qui permettrait de soigner le cancer serait une réelle arme médicale. De nombreuses recherches sont réalisées engendrant plusieurs essais cliniques mais encore aucun traitement vaccinal contre le cancer est aujourd'hui utilisé comme traitement anti-cancéreux. On peut distinguer alors deux types de vaccins contre le cancer : le vaccin autologue et le vaccin allogénique. Le vaccin autologue est un vaccin personnalisé puisque des cellules cancéreuses sont prélevées du patients, processées et multipliées en laboratoire avant d'être réinjectées dans la circulation. Ainsi, le principe de la vaccination s'opère puisque les cellules cancéreuses circulantes vont être reconnues par les cellules immunitaires pour être éliminées. Le principe de mémoire sera mis en place pour que le système immunitaire reconnaisse plus tard des nouvelles cellules tumorales pour les éliminer à nouveau¹¹⁰. Le vaccin allogénique est un vaccin qui ne va pas utiliser des cellules du soi mais des cellules cultivées en laboratoire. Le principe général de ce vaccin est de stimuler et déclencher la réponse anti-tumorale du système immunitaire au lieu de cibler une cellule cancéreuse particulière¹¹¹.

Enfin, de nombreuses études sont menées afin de développer des vaccins basés sur la reconnaissance d'ADN et protéines tumorales ainsi que sur les néoantigènes des cellules tumorales ¹⁰⁹.

3.b.iii Inhibiteurs des immune checkpoints

Les points de contrôles immunitaires, largement nommés « immune checkpoint » font partie du fonctionnement physiologique du système immunitaire puisqu'il s'agit d'une balance entre des signaux stimulateurs et inhibiteurs pour prévenir et empêcher une forte réponse immunitaire délétère pour les cellules saines. Les « immune checkpoint » sont illustrés par l'expression de protéines à la surface des lymphocytes T qui vont reconnaître une protéine partenaire à la surface d'une autre cellule et ainsi envoyer un signal aux cellules T pour les inactiver. Dans le cancer, les cellules tumorales participent à l'échappement immunitaire en exprimant ces protéines pour ne plus être reconnues par l'immunité antitumorale et favoriser la croissance et l'expansion du néoplasme. Les inhibiteurs de points de contrôles immunitaires appelées « immune checkpoint inhibitors » ou ICIs sont utilisées pour lever les signaux exprimés par les cellules tumorales et ainsi permettre à l'immunité de reconnaître et éliminer ces cellules. Les « immune checkpoints » les plus largement étudiés sont ceux mettant en jeu CTLA-4, PD-1, PD-L1, LAG-3 et TIM-3 et seront alors ciblés par des ICIs. Les ICIs ont alors largement révolutionnés l'immunothérapie et peuvent être utilisés en monothérapie ou bien combinés à de la radio ou chimiothérapies mais sont utilisés pour des tumeurs qui ont une forte infiltration immunitaire ¹¹²⁻¹¹⁴.

Malgré la diversité des traitements anti-cancéreux proposés, de nombreux phénomènes de résistances aux traitements existent et représente un échec thérapeutique.

III. Résistance aux traitements et morts cellulaires

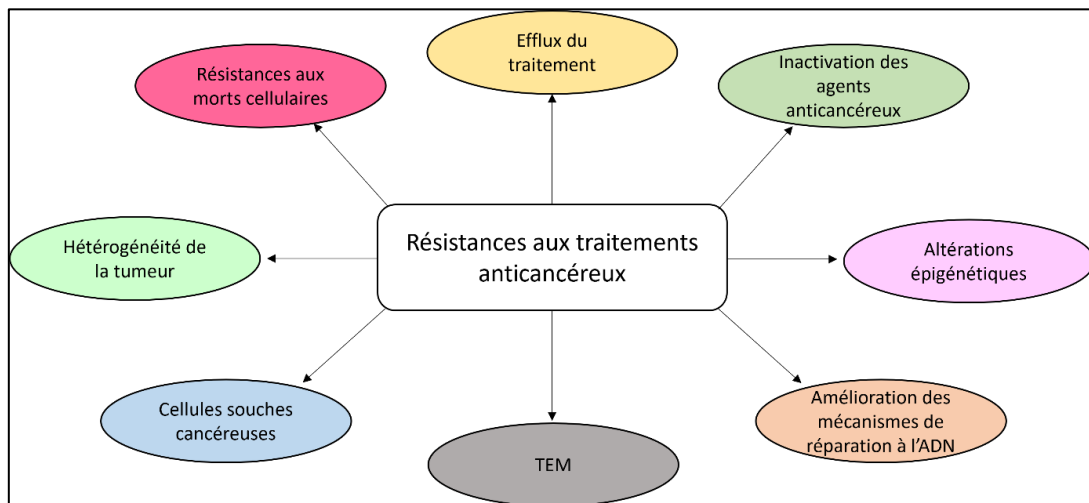


Figure 4 : Les différents mécanismes de résistances mis en place par les cellules cancéreuses

Malgré la diversité des traitements anti-cancéreux, l'utilisation de chimiothérapie est la première arme thérapeutique utilisée contre le cancer. Cependant, l'utilisation des chimiothérapies entraîne de nombreux phénomènes de résistance chez les patients. En effet, la multirésistance aux chimiothérapies (MDR pour MultiDrug Resistance) est responsable de 90% de décès de patient ayant reçu des chimiothérapies traditionnelles ou des nouvelles thérapies ciblées ⁹¹. Les résistances aux traitements peuvent être classées de deux façons : la résistance intrinsèque et la résistance acquise. La résistance intrinsèque ou primaire est médiée par des facteurs endogènes présents avant quelque conque traitement dans les cellules ou tissus tumoraux. Inversement, la résistance acquise se développe après avoir reçu un premier traitement contre le cancer ¹¹⁵. Enfin, les mécanismes de résistances sont multiples (**Figure 4**) et peuvent être subdivisés selon leur mode d'action et voici quelques exemples décrits ci-dessous.

1. Mécanismes de résistance

1.a Efflux du traitement

En augmentant l'efflux de médicament du compartiment intracellulaire, les cellules tumorales sont capables de résister aux traitements anti-cancéreux. Ce mécanisme très courant dans la résistance aux antibiotiques est l'un des principaux mécanismes mis en place par les cellules tumorales dans le cancer. L'augmentation d'efflux du médicament est alors médiée par des pompes d'efflux comme notamment les transporteurs ABC (ATP-binding cassette) ¹¹⁶. Les transporteurs ABC sont des protéines transmembranaires dont la fonction est de permettre à divers substrats de franchir différentes membranes de la cellule grâce à la fixation et l'hydrolyse de l'ATP. Dans les résistances aux cancers,

les transporteurs ABC les plus impliqués sont ABCB1 (également connu sous le nom de MDR1), ABCG2 (BRCP) et ABCC1 (MRP1). Le niveau d'expression de certains transporteurs ABC dans le tumeur est alors être utilisé afin de prédire l'efficacité d'un traitement et les cibler devient alors une stratégie thérapeutique ¹¹⁷.

1.b Inactivation des agents anticancéreux

Pour certains agents anticancéreux, l'activation de médicament *in vivo* implique des mécanismes où les molécules interagissent avec de nombreux acteurs moléculaires. Ces interactions peuvent alors modifier, dégrader partiellement ou complexer le médicament avec d'autres molécules ou protéines pour aboutir à son activation et efficacité clinique ¹¹⁸. Ainsi, les cellules cancéreuses peuvent réduire l'activité de ces médicaments comme moyen de résistance. Ce mécanisme est observé dans le traitement de la leucémie myéloïde aigüe (LAM) traitée avec la cytarabine. Pour obtenir l'effet anticancéreux souhaité, la cytarabine doit subir de multiples phosphorylations pour être active. Cependant, de nombreux phénomènes de mutations dans cette voie de phosphorylations surviennent et rendent alors la molécule inactive ¹¹⁹. D'autres enzymes sont également impliquées dans l'inactivation des agents anticancéreux comme les Glutathion S-transférase (GST) ou encore les cytochromes P450 (CYP450). Les GST qui ont pour rôle de détoxifier l'organisme dans l'élimination des xénobiotiques, participent aux phénomènes de résistance par détoxification direct des molécules anticancéreuses ou en inhibant la voie kinase MAPK ¹²⁰. Les CYP450 sont également impliquées dans le métabolisme et l'élimination des xénobiotiques au niveau du foie et jouent un rôle dans les phénomènes de résistances aux traitements anticancéreux. On observe alors des polymorphismes chez les patients induisant des mutations ou altérations du fonctionnement des CYP450 qui peuvent altérer l'effet des agents anticancéreux et mener aux résistances ¹¹⁸.

1.c Altérations épigénétiques

Comme cité précédemment, les modifications épigénétiques constituent l'une des signatures des cellules cancéreuses. De plus, des altérations épigénétiques ont lieu au niveau de certains gènes entraînant une résistance face aux traitements anticancéreux. Parmi ces altérations, on peut citer la déméthylation du promoteur MDR1 (transporteur ABC participant aux efflux) menant alors *in fine* à une diminution des agents anti-cancéreux dans la cellule ¹²¹.

1.d Amélioration de la réparation de l'ADN

En réponse aux chimiothérapies qui induisent directement ou indirectement des dommages à l'ADN, les mécanismes de réponses aux dommages à l'ADN DDR (pour DNA Damage Response) jouent un rôle clef dans les mécanismes de résistances aux traitements anti-cancéreux. En effet, les cellules

cancéreuses vont alors augmenter leur système de réparation à l'ADN pour pouvoir inhiber les effets causés par les agents chimiothérapeutiques. On observe des surexpressions de certains composants du système de réparation par excision des nucléotides (NER pour nucleotide excision repair) et de réparation des mésappariements (MMR pour mismatch repair) dans les résistances au 5-FU. L'enzyme de réparation à l'ADN MGMT (O6-methylguanine DNA methyltransferase) est également retrouvée surexprimée dans de nombreux cancers et permet une résistance des cellules cancéreuses notamment face aux agents alkylants ^{118,122}.

1.e TEM

Hormis son rôle dans la progression tumorale et le développement de métastases, la TEM joue également un rôle important dans les résistances aux traitements anticancéreux. La TEM qui est un processus par lequel les cellules épithéliales perdent la polarité apicale-basale et l'adhésion cellule-cellules pour se transformer en cellules mésenchymateuses est illustrée par des effecteurs moléculaires. En effet, on observe une diminution des gènes de cellules endothéliales comme les gènes codant pour la E-cadhérine, ZO-1 ou les occludines. Inversement, une augmentation de l'expression de gènes de cellules mésenchymateuses s'opère avec une forte expression des gènes codants pour la N-cadhérine, la vimentine ou encore la fibronectine. Plusieurs voies de signalisation impliquant le TGF β , Wnt, Notch et Hedgehog sont connues pour être impliquées dans la TEM ¹²³. Ainsi, les mécanismes de la TEM interviennent dans les mécanismes de résistance des tumeurs lors de l'utilisation de chimiothérapies comme le paclitaxel et le docétaxel. En effet, dans plusieurs types de cancer différents, le traitement avec ces deux chimiothérapies induit une augmentation des acteurs en amont de la TEM comme ZEB1/2 et le TGF β responsables de résistance. A l'inverse, la sensibilité des cellules cancéreuses au paclitaxel et docétaxel peut être restaurée après l'inhibition de la TEM selon différentes approches ¹²⁴. D'autres agents anticancéreux comme le géfitinib utilisé dans le cancer du poumon se révèlent inefficaces à cause de la TEM. En effet, le géfitinib induit l'activation de la voie NOTCH-1 impliqué dans le processus de TEM¹²⁵. De plus, la surexpression de certains gènes impliqués dans la TEM rend certaines thérapies inefficaces. Dans le cancer du sein, la surexpression de Wnt3 induit des résistances au Trastuzumab¹²⁶ et l'activation de la voie Hedgehog dans le cancer du poumon induit une résistance à l'inhibiteur de tyrosine kinase EGFR-TKI¹²⁷.

1.f Cellules souches cancéreuses

Depuis plusieurs années, de nombreuses recherches ont pu mettre en évidence la présence de cellules souches cancéreuses (CSC) au sein des tumeurs. Similaires aux cellules souches, les CSC sont des sous-ensembles de cellules tumorales dotées de propriétés d'auto-renouvellement et de différenciations multidirectionnelles. Leur présence est considérée comme moteurs dans le développement tumoral

et est corrélée au développement de tumeurs agressives, hétérogènes et résistantes aux thérapies¹²⁸. Les mécanismes par lesquels les CSCs participent à la résistance aux traitements sont multiples et comprennent : la participation au processus de TEM, l'augmentation des protéines de détoxification, la dormance de ces cellules, la résistance aux dommages à l'ADN et d'autres¹²⁹. Les CSCs étant dans un état quiescent en phase G0, elles sont insensibles aux chimiothérapies conventionnelles. En effet, les chimiothérapies causent des dommages à l'ADN irréversibles notamment en agissant sur la synthèse de l'ADN de cellules en divisions. Comme les cellules sont en phase G0, elles ne sont pas dans une démarche de division cellulaire les rendant alors résistantes à ces traitements et participant à leur maintien au sein de la tumeur. Par conséquent, l'utilisation de chimiothérapies va pouvoir éliminer les cellules tumorales « classiques » mais vont également exercer une pression de sélection et maintenir la présence de CSCs qui peuvent à tout moment recoloniser et induire la formation de nouvelles tumeurs¹³⁰. Cibler les CSCs représentent alors une stratégie thérapeutique prometteuse pour empêcher toutes récurrences¹³¹.

1.g Hétérogénéité de la tumeur

L'hétérogénéité tumorale fait référence aux divers changements moléculaires et génétiques intervenant dans l'évolution de la tumeur entraînant des différences dans le taux de croissance, la capacité d'invasion et la sensibilité aux médicaments des différentes cellules tumorales au sein de la tumeur¹³². En effet, une tumeur est définie comme un microenvironnement tumoral composé de multiples types cellulaires. Ainsi, lors de la progression et du développement tumoral, l'évolution clonale et l'hétérogénéité tumorale mène à une succession de modifications biologiques et de l'environnement de l'hôte. Ainsi, l'évolution perpétuelle de la tumeur et son hétérogénéité sont directement impliqués dans les résistances aux traitements anticancéreux présentant une multitude de cibles¹³³. De plus, les composants du microenvironnement tumoral comme les cellules stromales, les cellules immunitaires, la matrice extracellulaire et divers facteurs solubles comme les cytokines et facteurs de croissance communiquent et interagissent entre eux ce qui favorise également la résistance face aux traitements¹¹⁹.

1.h Résistances aux morts cellulaires

Comme cité précédemment, l'échappement aux morts cellulaires constitue l'une des signatures des cellules cancéreuses et représente également l'un des mécanismes majeurs mis en place dans la résistance aux traitements anticancéreux. En effet, de nombreux traitements anticancéreux dont de nombreuses chimiothérapies bloquent la division cellulaire, induisent des dommages à l'ADN menant alors à terme à l'induction des systèmes de mort cellulaire pour éliminer les cellules tumorales. Ainsi, les cellules tumorales mettent en place de nombreuses adaptations afin d'échapper à ces morts pour

continuer à se développer et promouvoir l'expansion tumorale. Voici quelques exemples de mécanisme mis en place selon les différentes voies de mort cellulaires.

2. Morts cellulaires et résistances : les voies communément altérées

Les morts cellulaires programmées désignent les formes de morts cellulaires régulées par de multiples acteurs moléculaires et qui s'opposent aux morts cellulaires accidentelles comme la nécrose. Depuis plusieurs décennies, il est connu que ces mécanismes de morts cellulaires programmées participent grandement aux processus tumoraux notamment dans les phénomènes de résistances aux traitements anti-cancéreux. Ainsi, les cibler pour améliorer l'efficacité des traitements représente un axe important de la recherche mondiale. Les morts cellulaires programmées majeures les plus étudiées dans la tumorigenèse sont l'apoptose et l'autophagie mais depuis plusieurs années des nouvelles voies comme la nécroptose et bien d'autres sont décrites comme importantes dans le processus tumorale (Figure 5).

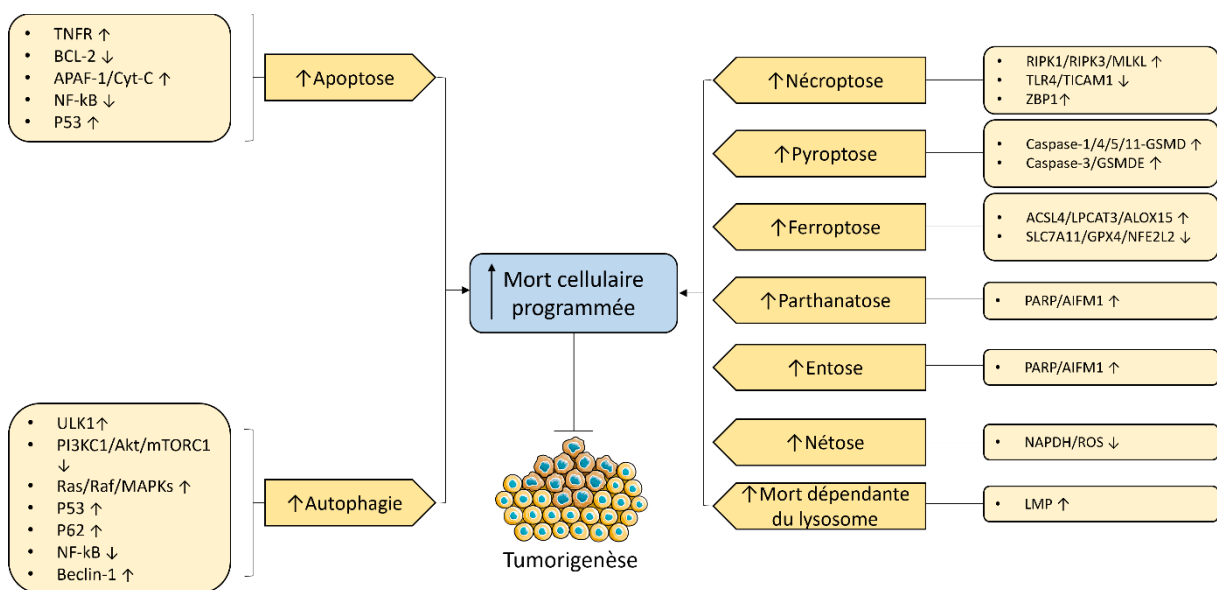


Figure 5 : Les diverses morts cellulaires programmées et leurs caractéristiques moléculaires participant au processus tumoral. L'apoptose et l'autophagie représentent les deux morts cellulaires programmées majoritairement décrites dans la littérature. D'autres voies découvertes plus tardivement comme la nécroptose, la pyroptose, la ferroptose, la parthanatose, l'entose, la nétose et la mort dépendante de lysosome font parties des morts cellulaires programmées. L'induction de ces morts cellulaires résultent de l'induction et la répression de plusieurs acteurs moléculaires spécifiques à chaque voie. Comme les cellules tumorales échappent aux processus de morts cellulaires programmées pour croître, l'induction de ces morts par traitement est une solution thérapeutique. D'après Han *et al*¹³⁴.

2.a Apoptose et résistance

Une grande partie des traitements anti-cancéreux vont activer l'apoptose et échouent lorsque les cellules cancéreuses acquièrent une résistance à celle-ci. Découverte en 1972, l'apoptose est une mort

cellulaire programmée induite par des signaux extra et intracellulaires qui peuvent s'opérer par la voie extrinsèque ou par la voie intrinsèque. La voie extrinsèque est médiée par les récepteurs de mort à la surface des cellules, tandis que la voie intrinsèque est initiée par les mitochondries. Les caspases constituent l'une des signatures majeures de l'apoptose puisqu'il s'agit de protéines régulatrices indispensables à cette voie¹³⁵.

2.a.i Voie intrinsèque

La voie intrinsèque de la nécroptose est déclenchée à la suite de stress cellulaire tels que des radiations, des agents cytotoxiques, des toxines ou encore une hypoxie et se caractérise par la perméabilisation de la mitochondrie, le relargage de cytochrome c, la formation de l'apoptosome et l'activation de la caspase 9. L'apoptose intrinsèque régulée par les protéines de la famille Bcl-2, sont subdivisés en deux groupes : les protéines pro-apoptotiques (Bax, Bak, Bad, Bcl-Xs, Bid, Bik, Bim et Hrk) et les protéines anti-apoptotiques (Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-W, Bfl-1, Mcl-1). L'équilibre entre l'expression des protéines pro et anti-apoptotiques est régulé par diverses voies de signalisation et le devenir de la cellule est déterminé en fonction des signaux de survie ou de mort. D'autres facteurs pro-apoptotiques comme AIF, Smac, Diablo peuvent également induire le relargage du cytochrome c de la mitochondrie. Enfin, plusieurs cytochromes c vont se lier à APAF1 pour former l'apoptosome qui est un complexe supramoléculaire capable de cliver la caspase 9¹³⁵⁻¹³⁷.

2.a.ii Voie extrinsèque

La voie extrinsèque de l'apoptose correspond à l'apoptose médiée par l'activation de récepteurs membranaires. Ces récepteurs de mort se trouvant à la surface des cellules regroupent les récepteurs Fas (Apo-1, CD95 et DR2) et ceux de la superfamille des récepteurs au facteur de nécrose tumorale TNF (Tumor Necrosis Factor) avec les récepteurs TNFR1 (TNF-R1/DR1), TRAILR1 (également nommé DR4) et les TRAILR2 (également nommé DR5). Ces récepteurs possèdent des domaines intracellulaires qui permettent le recrutement d'adaptateurs protéiques comme TRADD ou FADD. Ces récepteurs vont alors être activés par divers ligands comme les TNF, FasL ou encore TRAIL. La fixation de ces ligands aux récepteurs de mort vont alors permettre l'assemblage de différents complexes responsables de l'apoptose. Lors de l'activation du TNFR1, l'apoptose est déclenchée par la formation du complexe IIa responsable de l'apoptose et sera décrit ultérieurement. Par ailleurs, l'activation des autres récepteurs de morts comme les récepteurs Fas mène à la formation d'un complexe protéique appelé DISC (Death-inducing signaling pathway) qui va mener ensuite au recrutement de la caspase 8, puis à son clivage menant à son activation^{136,137}. La forme non active de la caspase 8 nommée procaspase 8 est constituée d'un prodomaine N-terminale incluant les domaines effecteurs de mort (DED) DED1 et DED2 puis d'un site catalytique en terminaison C-terminale. Ces domaines DED vont permettre

interagir avec les domaines de mort DED également présents sur FADD par exemple et ainsi participer à l'assemblage du complexe DISC menant à l'activation de la caspase 8. Possédant deux isoformes, soit la procaspase 8a et procaspase 8b, l'assemblage des procaspases 8 au sein du DISC permet la formation de filaments DED servant de plateforme à la dimérisation et l'activation des procaspases 8. La dimérisation des procaspases 8 permet un changement conformationnel menant à leur clivage aboutissant à la forme active clivée de la caspase 8, acteur majeur de l'activation de l'apoptose par la voie extrinsèque¹³⁸⁻¹⁴⁰.

2.a.iii Voie commune

Que l'apoptose soit activée par la voie intrinsèque ou extrinsèque, les caspases initiatrices 8 et 9 vont induire le recrutement et l'activation des caspases 3, 6 et 7 dites « effectrices ». La caspase 8 et 9 peuvent cliver la caspase 3 tandis que la caspase 7 est clivée seulement par la caspase 9. La caspase 3 peut également activer la caspase 6. Ces caspases effectrices vont agir au niveau de nombreux substrats qui vont être à l'origine de la fragmentation de l'ADN, de la dégradation du cytosquelette et de la dégradation nucléaire. Parmi ces substrats, on peut citer la PARP qui participe aux mécanismes de réparation de l'ADN. La dégradation de la PARP est cruciale et conduit à de nombreux changements biochimiques et morphologiques tels que le rétrécissement cellulaire, la condensation cytoplasmiques et la formation de corps apoptotiques. Les corps apoptotiques seront ensuite éliminés par des cellules phagocytaires^{33,141}.

La **Figure 6** illustre les divers modes d'activation et les mécanismes moléculaires nécessaires à l'apoptose.

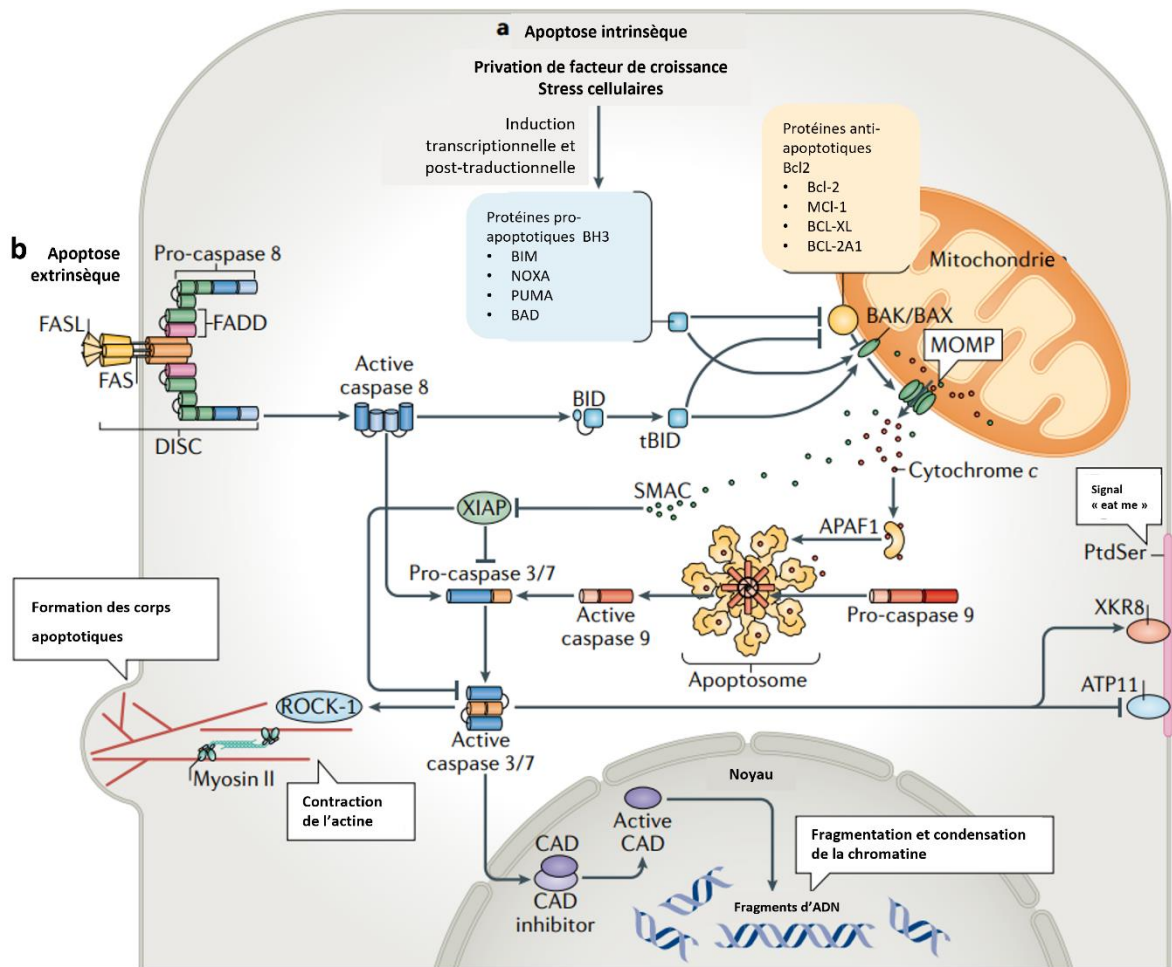


Figure 6 : Mécanismes moléculaires responsable de l'induction de l'apoptose. L'apoptose est une mort cellulaire programmée qui peut être activée par la voie intrinsèque (a) ou extrinsèque (b). L'induction de l'apoptose par la voie intrinsèque est activée par de nombreux stress cellulaires (dommages à l'ADN, privation en nutriments etc...). Cette activation permet l'induction des protéines pro-apoptotiques à domaine BH3 (BIM, NOXA, PUMA et BAD). L'induction de ces protéines permet la répression des protéines anti-apoptotiques de la famille des Bcl-2 (Bcl-2, BCL-X, MCL-1, BCL-2A1) permettant le relargage des effecteurs apoptotiques Bak et Bax formant un complexe responsable de la perméabilisation de la mitochondrie MOMP (Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization). Ainsi, les pores dans la membrane mitochondriale permettent le relargage du cytochrome c et de SMAC. Le cytochrome c s'associe ensuite à APAF1 pour former l'apoptosome. La formation de l'apoptosome permet le clivage et activation de la caspase 9 qui va pouvoir à son tour cliver et activer les caspases effectrices 3 et 7. Parallèlement, SMAC inhibe les XIAPs qui ont pour fonction de réprimer l'apoptose. L'apoptose extrinsèque est déclenchée par la fixation de ligand aux récepteurs de morts présents à la surface des cellules. La fixation du ligand au récepteur permet l'assemblage d'un complexe protéique appelé DISC (Death-inducing signaling pathway) induisant le recrutement de la caspase 8, puis de son clivage nécessaire à son activation. La caspase 8 peut induire directement le clivage et activation des caspases 3 et 7 ou peut agir indirectement par activation protéolytique de BID qui induit à son tour l'apoptose comme dans la voie intrinsèque. L'induction de l'apoptose par la voie intrinsèque ou extrinsèque mène à l'activation des caspases effectrices 3 et 7 qui ont plusieurs substrats. Parmi eux, les caspases sont nécessaires à l'activation de ROCK-1 qui va permettre la contraction de l'actine et la formation de corps apoptotiques. Au niveau nucléaire, les caspases permettent l'activation de la DNase CAD qui va induire la fragmentation de l'ADN. Enfin, les caspases effectrices inactivent également par voie protéolytique les flippases lipidiques comme ATP11 et XKR8 perçu comme un signal « eat me » pour les cellules phagocytaires favorisant l'élimination de la cellule apoptotique. D'après Strasser *et al*¹⁴².

L'inhibition de l'apoptose représente alors un mécanisme majeur dans les résistances aux traitements anti-cancéreux et plusieurs stratégies sont mises en place par les cellules tumorales. Comme cité précédemment, des mutations inactivatrices ou des délétions dans les gènes pro-apoptotiques (*Bax*, *Bak*) peuvent avoir lieu alors que des surexpressions dans les gènes pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 sont mis en place¹⁴³. D'autres mécanismes peuvent être adoptés comme la dérégulation de la voie PI3K/AKT qui régule de nombreuses voies telles que la survie et l'expression des membres de la famille Bcl-2³³. Les IAPs (Inhibitors of Apoptosis Proteins) qui comme leurs noms l'indique bloque l'activité des caspases sont également retrouvés surexprimés dans de nombreux cancers et induisent une résistance aux traitements¹⁴⁴.

2.b Autophagie et résistance

L'autophagie peut être décrite comme une mort cellulaire avec un processus d'autodigestion afin de maintenir la biosynthèse cellulaire et la demande d'énergie pendant la privation de nutriments ou de stress métaboliques. Dans les cellules de mammifères, les trois voies d'autophagie les mieux caractérisées sont l'autophagie médiée par les chaperons, la microautophagie et la macroautophagie¹⁴⁵. Nous nous intéresserons ici à la macroautophagie, appelée autophagie par défaut, qui est liée à l'apparition et à la résistance aux traitements anticancéreux¹⁴⁶. L'autophagie implique la formation d'une vésicule à double membrane qui encapsule le cytoplasme, les protéines malformées, les organites, et qui finit par fusionner avec les lysosomes pour leur dégradation. L'autophagie peut être divisée en quatre étapes : l'induction, la nucléation des vésicules, l'élongation des vésicules, la fusion et la dégradation¹⁴⁷.

La formation de cette vésicule à double membrane appelée autophagosome, est un processus complexe qui implique des protéines liées à l'autophagie nommées ATG. La première étape de l'autophagie correspondant à l'induction qui est contrôlée par l'expression de la kinase Ulk1/2 qui va former un complexe multiprotéique avec ATG12, ATG17, ATG101 et FIP200. Cette induction est engendrée par des stimuli de stress médiés par l'expression de AMPK et des MAPK et est réprimée par mTOR. Lors de la nucléation, la protéine Ulk1 phosphoryle et active le complexe phosphatidylinositol 3-kinase de classe III (PI3KC3). Ce complexe composé de Beclin1, Vps34, Vps15 et Atg14L est régulé négativement par les protéines anti-apoptotiques Bcl/Bcl-XL. Beclin1 et ATG14L facilitent ensemble alors la formation de la membrane autophagosomale qui est liée à ATG5 et ATG12. Lors de l'élongation, le complexe ATG5/ATG12/ATG16(L) permet le recrutement et la conversion de la chaîne légère LC3-I en une forme LC3-II liée à la membrane. Ce passage de LC3-I en LC3-II est un marqueur fort de l'autophagie. LC3-II se lie avec la protéine adaptatrice SQSTM1 pour dégrader les agrégats de protéines ubiquitinées dans l'autophagolysosome. L'autophagolysosome est formé lors de la phase

d'arrimage et de fusion résultant de la fusion entre l'autophagosome et le lysosome. Pour finir, l'ultime étape consiste à la dégradation et le recyclage des protéines séquestrées dans l'autophagosome grâce à la formation de l'autolysosome^{145,147,148}.

L'autophagie est processus cellulaire essentiel à la survie et au maintien de la cellule puisqu'elle leur permet de se protéger en éliminant les protéines mal repliées et/ou les organites endommagés qui jouent un rôle dans le développement, la mort cellulaire, la suppression de tumeurs ou encore l'adaptation à une privation de nutriments. L'autophagie est alors déclenchée par de multiples stimuli externes et est régulée par deux voies principales : négativement par la voie PI3K-AKT-mTOR et positivement par la voie impliquant la protéine kinase activée par l'AMP (AMPK). mTOR, régulateur négatif de l'autophagie, peut être activé par des facteurs de croissance et inhibé par l'AMPK et p53. mTOR régule négativement l'autophagie par son action de phosphorylation au niveau du complexe Ulk1/2, nécessaire à l'initiation de la voie. Par ailleurs, l'autophagie est activée par l'AMPK qui a la capacité d'inactiver mTORC1 à travers la phosphorylation de TSC1/2. D'autres gènes tel que p53, p21, AKT et d'autres peuvent également activer ou inhiber cette voie ¹⁴⁹. L'induction et le déroulement de l'autophagie sont résumés par la **Figure 7**.

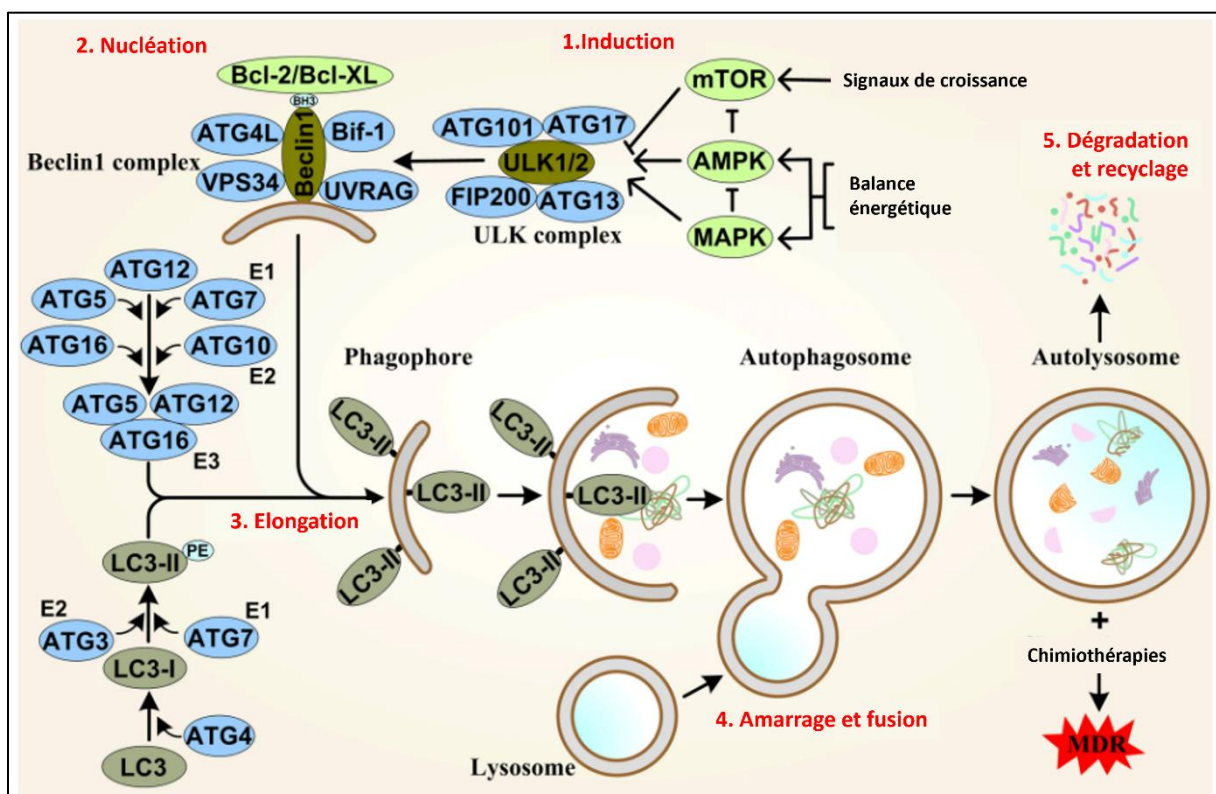


Figure 7 : Mécanismes moléculaires responsables de l'induction de l'autophagie. Cinq étapes sont nécessaires au déroulement de l'autophagie : l'induction, la nucléation, l'élongation, l'amarrage et la fusion puis la dégradation et recyclage. L'initiation de l'autophagie est permise par la formation d'un complexe protéique Ulk1/2, FIP200, ATG13, ATG17 et ATG101. Cette induction est permise par l'activation de l'AMPK et des MAPK selon la balance énergétique et est réprimée par l'expression de mTOR. L'autophagie se poursuit par l'étape de nucléation contrôlée par le complexe Beclin1 (Beclin1,

ATG4L, VPS34, UVRAG, Bif-1) qui est régulé négativement par les protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2. Beclin1 et ATG14L facilitent ensemble alors la formation de la membrane autophagosomale qui est liée à ATG5 et ATG12. Sous l'action de la ligase E1 ATG7 et la ligase E2 ATG10, le complexe multiprotéique et ligase E3 ATG12-ATG5-ATG16 est formée. Parallèlement, ATG4 induit le clivage de pro-LC3 permettant d'obtenir LC3-I qui grâce au ligase E2 AG3 et E1 ATG7 permet d'obtenir LC3-II par conjugaison avec la phosphatidyléthanolamine (PE). Lors de l'élongation, le complexe ATG5/ATG12/ATG16 permet le recrutement de LC3-II liée à la membrane pour former le phagophore puis l'autophagosome. Lors de la phase d'amarrage et de fusion, l'autolysosome est généré par la fusion de l'autophagosome et du lysosome. Ainsi, le contenu membranaire et cytoplasmique est soit dégradé ou recyclé. L'autophagie peut atténuer les dommages causés par les médicaments thérapeutiques contre les tumeurs et produit ensuite une résistance aux médicaments multiples (MDR). D'après Chang et Zou¹⁴⁷.

Dans les cellules cancéreuses, l'autophagie a un rôle complexe puisqu'elle peut à la fois être pro ou anti-tumorale. Par exemple, l'autophagie basale peut alors être considérée comme anti-tumorale puisqu'elle permet la dégradation de composants ou de protéines endommagées impliquées dans le développement de cancer ¹⁵⁰. Des mutations dans les protéines régulant positivement cette mort cellulaire comme des mutations dans Beclin-1 ou dans ses partenaires vont alors permettre le développement néoplasique ¹⁵¹. Comme la fonction de l'autophagie dans le cancer semble être double, cela suggère également un rôle paradoxal dans les réponses aux traitements anti-cancéreux. L'utilisation de thérapies anticancéreuses telles que la radiothérapie, les thérapies ciblées ou les chimiothérapies vont alors activer les voies de morts cellulaires y compris l'autophagie et des phénomènes de résistances se mettent en place. En effet, une augmentation de l'autophagie induit des phénomènes de résistance aux traitements et est associée à un mauvais pronostic. Cela s'observe dans le traitement au 5-FU où son efficacité est réduite car une autophagie protectrice est mise en place. Cette autophagie protectrice entraîne alors l'induction de Beclin-1, suivie de la conversion de LC3-I en LC3-II et l'augmentation de Bcl-2. Des résistances à l'autophagie se produisent également avec l'utilisation du cisplatine impliquant plusieurs mécanismes de protection. Avec le cisplatine, on observe également une surexpression de Beclin1, une surexpression de la conversion de LC3 et une augmentation d'ATG7 ^{150,152}. A l'inverse, plusieurs études ont pu montrer que l'efficacité de certains agents anti-cancéreux est due à l'induction de l'autophagie lorsque les voies apoptotiques sont entravées. Enfin, il est montré qu'inhiber l'autophagie en même temps qu'utiliser des agents anti-cancéreux permet une meilleure réponse aux traitements ¹⁵³. L'un des inhibiteurs les plus connus est la rapamycine qui a pu montrer de nombreux résultats positifs ¹⁵⁴.

2.c Autres morts cellulaires et résistance

Même si l'induction de l'apoptose par les traitements anti-cancéreux représente l'effet escompté, l'échappement et la résistance des cellules tumorales face à cette mort a nécessité de s'intéresser aux autres morts cellulaires possibles. Depuis plusieurs années, de nombreuses études s'intéressent à d'autres processus de mortalité des cellules cancéreuses tels que la pyroptose ou encore la ferroptose qui se sont révélées cruciales pour l'efficacité de la thérapie anti-cancéreuses.

Nommée en 2012, la ferroptose est une nouvelle mort cellulaire programmée dépendante du fer qui se caractérise par une peroxydation des lipides et une surcharge en fer. De plus en plus d'études montrent que la ferroptose peut réguler le développement des tumeurs, les métastases et les réponses thérapeutiques. Morphologiquement, la membrane cellulaire n'est pas endommagée lors de la ferroptose mais sa densité est augmentée et rompue conduisant à la formation de vésicules. Une atrophie de la mitochondrie s'observe, accompagnée d'une réduction ou disparition de la crête mitochondriale. A l'inverse d'autres morts cellulaires, il n'y a pas de changement de la taille du noyau mais seulement une condensation de la chromatine. Le mécanisme de la ferroptose repose principalement sur des processus intracellulaires : la production et l'élimination des peroxydes lipidiques. Ainsi, le fer et les acides polyinsaturés sont utilisés comme substrat pour la peroxydation des lipides, caractéristique de cette mort. Lorsque les cellules ne peuvent plus éliminer l'excès de ROS, la ferroptose est alors induite.

Moléculairement, la ferroptose est la conséquence d'un déséquilibre de trois métabolismes : le métabolisme des acides aminés (également appelé la voie canonique régulée par le glutathion peroxydase 4 (GPX4)), le métabolisme du fer et le métabolisme des lipides. La ferroptose induite par un métabolisme anormal des acides aminés est lié au tripeptide composé de Glutamate, Cystéine et Glycine appelé Glutathion (GSH). Grâce à des antiports présents à la membrane plasmique, la catalyse du glutamate permet la génération de cystéine indispensable à la production Glutathion (GSH) nécessaire à l'activité de GPX4. Lorsque du GSH est présent, GPX4 catalyse la réduction des peroxydes lipidique et inhibe ainsi la ferroptose. Inhiber le système d'antiports membranaires réduisant la formation du substrat de GPX4 (le GSH) ou inhiber directement GPX4 permet ainsi d'induire la ferroptose. Comme son nom l'indique, la ferroptose est caractérisée par une augmentation de réserve de Fe^{2+} , appelée LIP (de l'anglais Labile Iron Pool). L'augmentation de cette réserve LIP intracellulaire permet la génération de radicaux libres par la réaction de Fenton et participe à la peroxydation des phospholipides menant à la ferroptose. De plus, la génération de ROS initiant la peroxydation des lipides nécessite du fer. Se caractérisant par une augmentation de peroxyde lipidique, le métabolisme lipidique joue donc un rôle clef dans la ferroptose. Ainsi, des phospholipides provenant de la membrane peuvent être peroxydés provoquant la perméabilisation des membranes menant à la mort cellulaire. Ce processus fait intervenir plusieurs enzymes comme la LPCAT3^{155,156}.

Comme beaucoup de mort cellulaire, la ferroptose semble jouer un rôle dichotomique dans la tumorigenèse¹⁵⁶. En effet, elle peut être pro-tumorale puisqu'il a été montré que les cellules cancéreuses nécessitent plus de fer que les cellules non tumorales pour leur développement et que cette mort affecte la sensibilité des cellules faces aux traitements. Dans une certaine mesure, la surcharge en fer dans les cellules cancéreuses permet la production de ROS qui peut participer à la

prolifération. Ainsi, certaines études montrent qu'une forte expression de la protéine inhibitrice GPX4 est associée à une meilleure survie de patients atteints de cancer pancréatiques et de patients atteints de lymphomes B^{157,158}. Comme l'augmentation de protéines inhibant la ferroptose semble protecteur, cela montre que les cellules tumorales échappent à cette mort pour proliférer. Néanmoins, l'inhibition de ces protéines régulatrices et l'activation de la ferroptose permet de palier à certains phénomènes de résistances et améliorer les traitements anti-cancéreux. Dans le cancer du sein, l'inhibition de GPX4 permet de restaurer la sensibilité des cellules cancéreuses à la gefitinib¹⁵⁹. Activateur de la ferroptose, l'érastine permet de restaurer les propriétés anti-tumorales de la cytarabine et de la doxorubicine dans la LAM. Ainsi de nombreuses études montrent que l'induction de la ferroptose ouvre des possibilités pour combattre les résistances aux chimiothérapies^{160,161}.

Autre mort récemment découverte, la pyroptose semble également jouer un rôle dans les phénomènes de résistances aux traitements. La pyroptose est une mort cellulaire programmée dépendante des gasdermines (GSDM). La superfamille des GSDMs contient plusieurs membres : les gasdermines A/B/C/D (GSDMA/B/C/D), les gasdermines E (GSDME) et DFNB59 chez l'Homme (Gsdma1-3, Gsdmc1-4, Gsdmd, Dfna5, and Dfnb59 chez la souris). Comme les caspases, les gasdermines sont clivées pour être activées. Lorsqu'elles sont clivées, elles vont donner naissance à deux fragments : les GSDM-N qui contiennent le domaine N-terminal de la protéine généralement effecteur de la pyroptose et les GSDM-C qui contiennent le domaine C-terminal intervenant généralement dans des phénomènes de régulation. Les GSDM-N sont les effecteurs de la pyroptose car on observe une oligomérisation de plusieurs GSDM-N qui forment des pores à la membrane plasmique conduisant à la mort cellulaire¹⁶². L'activation de la pyroptose est dépendante de plusieurs voies : la voie canonique, la voie non canonique, la voie dépendante des caspases 3/8 et celle médiée par les granzymes.

La voie canonique est médiée par la formation d'inflammasome à la suite de l'activation de récepteurs membranaires appartenant à la famille des PRR (Pattern Recognition Receptor) en réponse à divers stimuli. La formation et l'activation des divers inflammasomes comme NLRP3 mène à l'activation de la caspase 1 qui clive GSDMD (53 kDa) pour produire GSDMD-N (31 kDa) et de GSDMD-C (22 kDa). Plusieurs GSDMD-N viennent ensuite former des pores à la membrane plasmique menant à la mort cellulaire et au relargage de divers IL-1. A l'inverse de la voie canonique, la voie non canonique ne fait pas intervenir de récepteurs externes et d'inflammasomes mais est déclenchée par divers signaux intracellulaires comme le LPS qui vient activer directement les caspases 4/5/11¹⁶³. Ces caspases induisent le clivage de GSDMD comme dans la voie canonique menant à la mort cellulaire. La voie dépendante des caspases 3/8 intervenant dans l'apoptose a été observée avec l'usage de

chimiothérapies. En effet, des études ont montré que l'activation des récepteurs au TNF ou l'utilisation de chimiothérapies induisant l'activation des caspases 3 et 8 permettaient le clivage de GSDME en GSDME-N menant à la pyroptose¹⁶⁴. Enfin, la pyroptose peut être induite grâce aux granzymes A et B. Les granzymes qui sont relargués par les CTL et cellules NK sont des protéases qui peuvent cliver la GSDMB en GSDMB-N et induire la mort cellulaire par pyroptose^{165,166}. Morphologiquement, la pyroptose peut ressembler à l'apoptose puisqu'on observe une fragmentation de l'ADN, une condensation de la chromatine et parfois une activation de la caspase 3. Cependant, à l'inverse de l'apoptose, la pyroptose est une mort cellulaire hautement inflammatoire par le relargage des différents IL-1s et de DAMPs.

De par l'inflammation produite et comme les autres morts cellulaires, la pyroptose joue un rôle paradoxal dans la tumorigenèse car elle peut la promouvoir ou bien la réprimer. En effet, l'expression des GSDMs dans des différents cancers n'a pas les mêmes conséquences. Par exemple, dans le cancer du poumon GSDMD participe au développement tumoral où celles-ci et la GSDME réprime la tumorigenèse dans le cancer du sein. De même, au sein d'un même sous-type de cancer l'expression de divers GSDMs n'a pas le même effet. Dans le cancer colorectal, des études ont montré GSDMC et GSDME favorise la carcinogénèse alors que GSDMD inhibe la progression tumorale¹⁶³. Ces niveaux d'expressions et conséquences sur le développement tumoral montrent que la pyroptose est une mort cellulaire complexe mais qu'elle peut également être ciblée pour traiter le cancer. Cependant, de nombreuses tumeurs présentent un niveau de GSDMs faibles dû à une méthylation élevée dans leur promoteur rendant leur activation compliquée¹⁶⁷. Ainsi, la combinaison de chimiothérapie et d'agents hypométhylants permet d'induire la pyroptose et ainsi lever certaines résistances aux traitements^{162,163}. Décrit précédemment comme participant à la carcinogénèse, l'inflammation générée par la pyroptose peut participer au développement tumoral mais elle peut également participer au recrutement des cellules immunitaires anti-tumorales. En effet, la pyroptose étant hautement inflammatoire et permettant le relargage de protéines de la famille IL-1 et de DAMPs, elle peut également être induite pour améliorer les réponses immunitaires anti-tumorales¹⁶⁸.

Ainsi, la balance entre ces morts cellulaires est essentielle au maintien de l'organisme. Néanmoins, de nombreux déséquilibres dans celles-ci s'observent dans le développement tumoral et le maintien du cancer menant à des phénomènes de résistances. L'induction de nouvelles morts cellulaires représentent alors une stratégie thérapeutique pour lutter contre ces résistances. Cependant, comme l'indique la **Figure 8**, les morts cellulaires sont toutes différentes mécaniquement et morphologiquement conduisant à diverses réponses physiologiques. Hautement immunogène par le relargage de DAMPs, la nécroptose représente une mort cellulaire intéressante dans le traitement contre le cancer.

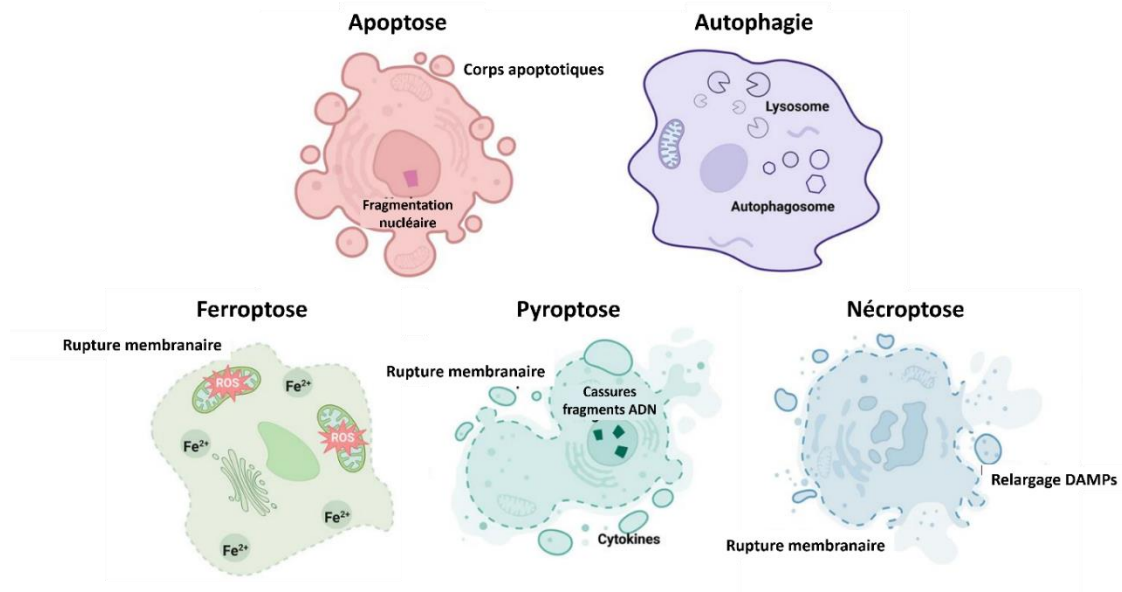


Figure 8 : Représentation schématique de la morphologie des cellules lors de diverses morts cellulaires programmées, d'après Chen *et al*¹⁵⁶.

IV. La nécroptose : focus sur une mort cellulaire programmée immunogène

1. Découverte

Associée depuis longtemps à la nécrose qui est une mort accidentelle, la nécroptose est une mort cellulaire programmée découverte pour la première fois en 1988 par Laster *et al*, avec la découverte du TNF pouvant activer l'apoptose et une mort cellulaire nécrotique¹⁶⁹. La découverte de la nécroptose est ensuite marquée par 1998 où Vercaemmen *et al* découvrent deux voies différentes associées au récepteur Fas : une menant à l'apoptose et à une autre voie lorsque l'apoptose est bloquée par des inhibiteurs¹⁷⁰. Dans les années suivantes, la signalisation de cette nouvelle forme de mort est déchiffrée et le premier acteur moléculaire découvert est le récepteur interagissant avec la sérine/thréonine protéine kinase 1, nommée RIPK1¹⁷¹. Ce n'est qu'en 2005 que le terme nécroptose apparaît en décrivant cette mort comme une voie alternative commune de mort cellulaire non apoptotique, déclenchée par l'activation de récepteurs de morts DR¹⁷². Dans cette même étude, A. Degterev and J. Yuan décrivent pour la première fois une molécule inhibitrice de la nécroptose, la Nécrostatine 1 (Nec-1), qui a largement permis de comprendre les mécanismes moléculaires et fonctionnels de la nécroptose¹⁷². Ce n'est qu'en 2008 que ces mêmes auteurs découvrent que Nec-1 inhibe spécifiquement la kinase RIPK1¹⁷³. Puis, en 2009 et 2012, les protéines majeures de la nécroptose sont découvertes à savoir RIPK3¹⁷⁴ et MLKL¹⁷⁵ respectivement. Les dates clés de la découverte de la nécroptose sont résumées en figure 9¹⁷⁶. La chronologie de la découverte de la nécroptose est résumée par la **Figure 9**.

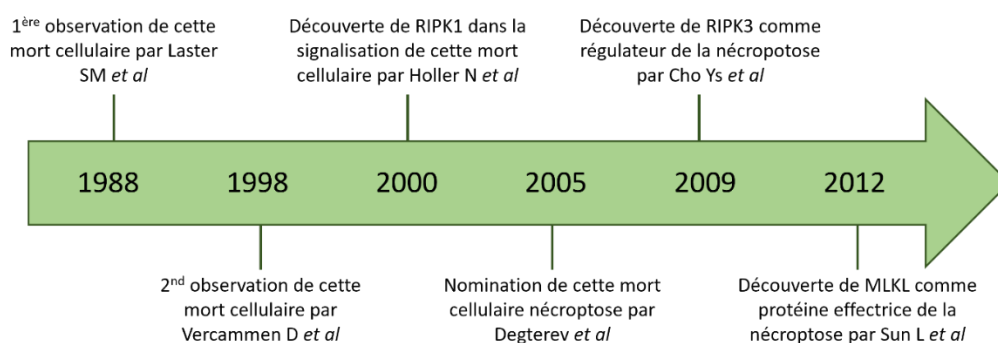


Figure 9 : Chronologie de la découverte de la nécroptose, d'après Liu et al¹⁷⁶.

2. Mécanisme

Longtemps associée à la nécrose, la nécroptose présente les mêmes caractéristiques morphologiques à savoir un arrondissement de la cellule, une augmentation du volume cellulaire, un gonflement des organites, une absence de fragmentation de l'ADN internucléosique et une rupture de la membrane plasmique. Cependant, à l'inverse de la nécrose, la nécroptose se définit comme une mort cellulaire programmée impliquant trois principales protéines à savoir RIPK1, RIPK3 et MLKL. L'induction de la nécroptose est engendrée par différents stimuli menant à la formation du nécrosome ¹⁷⁷. Ces différents stimuli activent différents récepteurs initiant la nécroptose soit par la voie canonique ou non canonique (**Figure 10**).

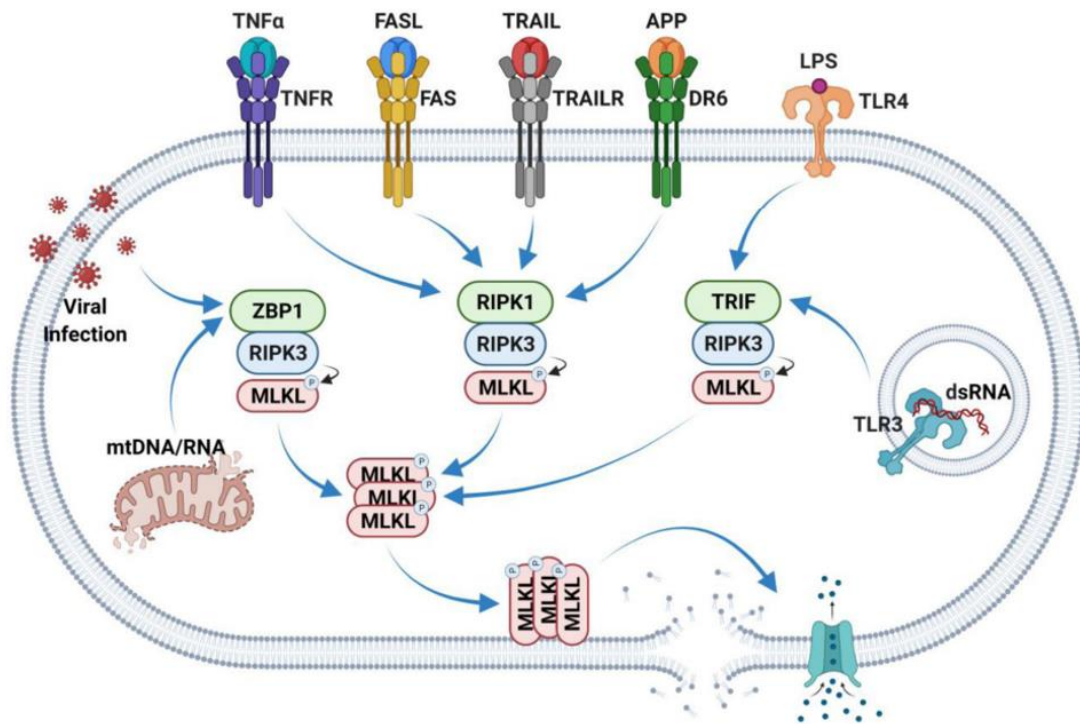


Figure 10 : Schéma simplifié des différents récepteurs pouvant déclencher la nécroptose. Les récepteurs au TNF, Fas et DR6 permettent d'activer la nécroptose par la voie canonique. Leur activation permet le recrutement de la kinase RIPK1 qui va permettre l'activation par phosphorylation de la RIPK3 qui à son tour phosphoryle et active la pseudokinase MLKL. La voie non canonique de la nécroptose met en jeu TLR4, TLR3 et ZBP1. La voie canonique permet également le recrutement de la kinase RIPK3 mais sans l'aide de RIPK1. L'engagement de TLR4 membranaire ou de TLR3 endosomal permet le recrutement de l'adaptateur TRIF nécessaire pour l'activation de RIPK3 puis de MLKL. Une infection virale ou la présence d'ADN mitochondriale permet également le recrutement de RIPK3 puis de MLKL. Dans la voie canonique et non canonique, la phosphorylation de la pseudokinase MLKL induit son oligomérisation et former un pore au niveau de la membrane plasmique pour engendrer la mort cellulaire. D'après Yan *et al*¹⁷⁸.

2.a Initiation : activation par la voie canonique

La voie canonique de la nécroptose implique de multiples communications protéiques menant au recrutement des trois protéines nécroptotiques RIPK1, RIPK3 et MLKL. La voie canonique est initiée par la fixation de différents ligands et cytokines majoritairement sur des récepteurs de mort DR (Death Receptor). Parmi ces récepteurs, on retrouve les récepteurs de la superfamille TNFR regroupant le TNFR1, Fas, DR4/5, DR6 et d'autre récepteurs transmembranaires tels que les Toll-Like Receptors (TLR) ou encore les récepteurs à l'interféron (IFNR)^{179,180}.

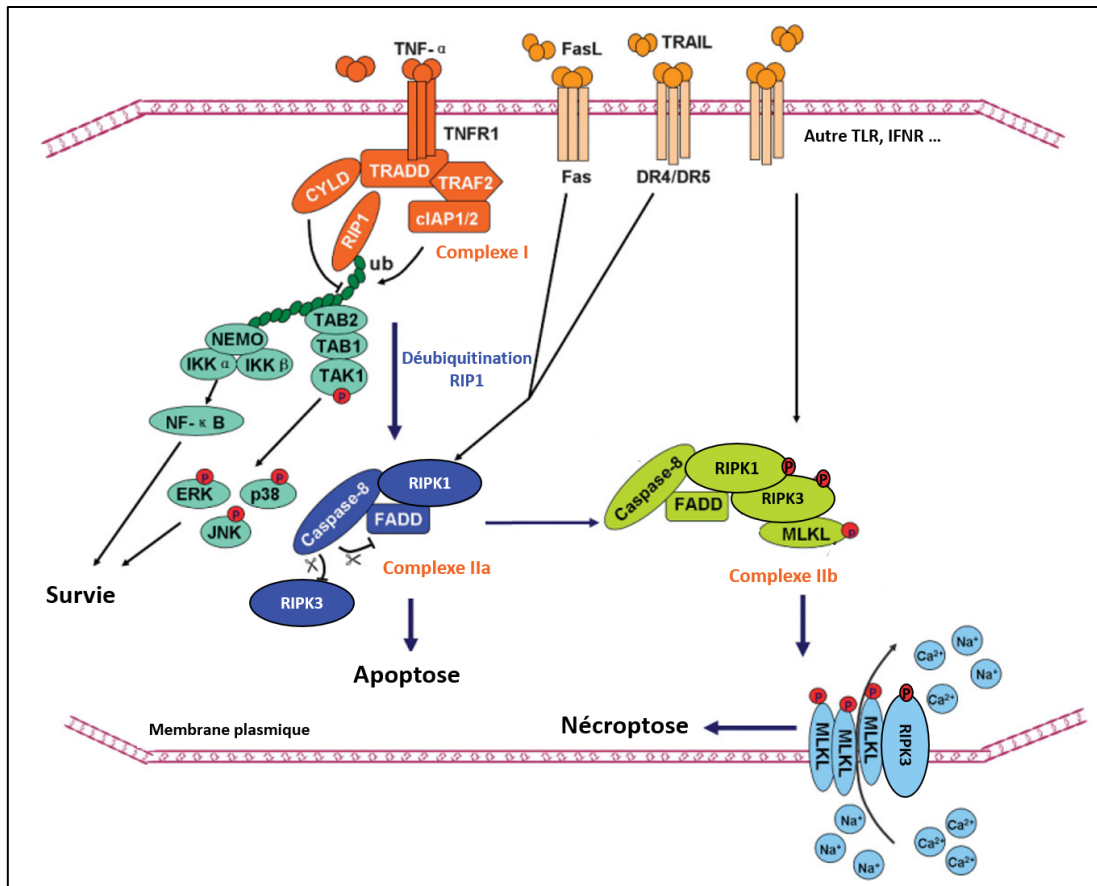


Figure 11 : Mécanisme de la voie de signalisation de la nécroptose activée par la voie canonique.

Différents ligands peuvent activer plusieurs récepteurs transmembranaires initiant la nécroptose. L'activation du récepteur TNFR1 engage la formation du complexe I composé de cIAP1/2, CYLD, RIPK1 et TRAF2. Les cIAPs induisent la polyubiquitination de RIPK1 permettant le recrutement de NEMO et TAB2 activant la voie NFκB et la voie des MAPK (ERK, JNK, p38) responsables de la survie cellulaire. Par ailleurs, la protéine CYLD induit la déubiquitination de RIPK1 permettant la formation du complexe IIa. Le complexe IIa peut également être formé à la suite d'activation de d'autres récepteurs membranaires tels que Fas ou encore DR4/5. Dans le complexe IIa, la caspase-8 activée clive et inhibe les activités de RIPK1 et RIPK3 menant ainsi à l'apoptose. L'absence ou l'inhibition génétique ou chimique de la caspase-8 ou de FADD permet de former le complexe IIb responsable de la nécroptose. Dans ce complexe, RIPK1 active RIPK3 par phosphorylation ce qui permet la phosphorylation et activation de la pseudokinase MLKL. La phosphorylation de MLKL permet son oligomérisation et regroupement de plusieurs protéines afin de former un canal au niveau de la membrane plasmique. Ce canal forme un pore membranaire et induit la mort cellulaire. Schéma adapté de Chen *et al*¹⁸⁰.

2.a.i Récepteur TNFR1

La nécroptose activée par le TNFα est l'activation la plus décrite et comprise dans la littérature. Ceci est notamment dû au fait que sa découverte résulte d'une conséquence de la voie de signalisation du TNFR1¹⁸¹. La nécroptose induite par le TNFα s'engage alors par la fixation de ce médiateur au récepteur TNFR1 menant à la formation d'un complexe membranaire, complexe I, composé de la kinase RIPK1, de la protéine du domaine de mort associé au TNFR1 TRADD, de TRAF2, CYLD et des inhibiteurs d'apoptose cIAP1 et cIAP2. Dans ce complexe, chaque protéine possède une fonction clef et définie. En effet, TRADD permet le recrutement de RIPK1 au TNFR1. A son tour, RIPK1 subit une

polyubiquitination liée à la Lysine 63 par les cIAPs qui est essentielle au recrutement du facteur nucléaire NEMO, une sous-unité du complexe I κ B kinase (IKK), qui à son tour active NF κ B et les protéines kinases MAPK. La déubiquitination de RIPK1 par CYLD ou l'inhibition des protéines cIAP permet alors la conversion du complexe I en complexe II¹⁸². On peut distinguer différents complexes II à savoir le complexe IIa et le complexe IIb. Après dissociation de TRADD au TNFR1, FADD est recruté et permet le recrutement et l'activation de la caspase 8, indépendamment de l'activité kinase de RIPK1 menant au complexe IIa responsable de l'apoptose. Lorsque la caspase 8 est absente ou inactivée notamment par c-FLIP, la kinase RIPK1 est active et recrute RIPK3 et permet la formation du complexe IIb¹⁷⁷. Ce complexe IIb mène à la formation du nécrosome se composant des kinases RIPK1 et RIPK3 et est activé par la phosphorylation croisée de RIPK1 et RIPK3. Enfin, la kinase RIPK3 recrute et phosphoryle la pseudokinase MLKL qui va alors être transloquée à la membrane et former des pores menant alors à la mort cellulaire^{183,184}. L'induction de la nécroptose par l'activation du TNFR1 est schématisée par la **Figure 11**.

2.a.ii Récepteurs Fas, DR4/DR5 et DR6

D'autres récepteurs de mort tels que le récepteur Fas, les récepteurs DR4/5 (TRAILR1 et TRAILR2 respectivement) et DR6 peuvent également entraîner l'induction de la nécroptose. La fixation des ligands CD95 (FasL) entraîne l'activation du récepteur Fas et TRAIL l'activation de DR4/DR5¹⁸⁵. Il a également été montré que le ligand APP (Amyloid Precursor protein) peut se lier à DR6 et engendrer la nécroptose¹⁸⁶. Contrairement à la signalisation du TNFR1 où se forme d'abord le complexe de survie puis les complexes induisant la mort cellulaire, la liaison de FasL à Fas ou de TRAIL à DR4/DR5 induit l'assemblage du complexe DISC associé à Fas, menant au recrutement et à l'activation de la caspase 8 conduisant à l'apoptose. En l'absence physiologique ou forcée des cIAPs et de la caspase 8, RIPK1 recrute alors RIPK3 formant alors le nécrosome menant à la phosphorylation de MLKL et donc à la nécroptose^{176,187}. L'induction de la nécroptose par l'activation des récepteurs Fas, DR4/DR5, DR6 est schématisée par la **Figure 11**.

2.a.iii Récepteurs à l'interféron

Le récepteur à l'interféron (IFNR) peut également être impliqué dans l'induction de la nécroptose. L'induction de cette mort cellulaire est activée par les interférons de type I (IFN α et IFN β) se fixant aux récepteurs IFNR1 et 2 et par l'interféron de type II (IFN γ) se fixant au récepteur IFN γ R. L'activation de ces récepteurs induit la formation du nécrosome avec le recrutement de RIPK1 et RIPK3 quand FADD ou la caspase 8 sont absents ou inactivés, conduisant alors à la nécroptose avec la phosphorylation de MLKL^{188,189}.

2.b Initiation : activation par la voie non canonique

L'induction de la voie non canonique de la nécroptose implique les récepteurs Toll-Like 3 et 4 (TLR3/4) ou la protéine ZBP1. A l'inverse de la voie canonique, la voie non canonique induit la nécroptose mais indépendamment du recrutement et de l'activité de la kinase RIPK1¹⁹⁰.

2.b.i Récepteurs TLR3/4

Les toll-receptors 3 et 4 (TLR3 et TLR4) peuvent également être mobilisés lors de l'initiation de la nécroptose. En réponse à une stimulation du TLR4 par le LPS ou du récepteur endosomal TLR3 par des signaux de danger comme l'ADN double brin provenant de virus (dsDNA), la nécroptose est activée indépendamment de RIPK1. L'engagement des TLR3 et 4 déclenche le recrutement de l'adaptateur TRIF qui va se complexer à RIPK3 et ensuite induire la phosphorylation de MLKL conduit à la mort cellulaire¹⁹¹⁻¹⁹³.

2.b.ii ZBP1

ZBP1 (également appelé DAI) est le régulateur principal de l'induction de la nécroptose lorsque celle-ci est causée par une infection virale. En effet, ZBP1 est considéré comme un senseur cytoplasmique pouvant détecter les acides nucléiques libres. Ainsi, l'ADN ou l'ARN virale peuvent être détectés comme l'ADN et ARN mitochondrial qui sont relargués dans certains contextes pathologiques. Comme RIPK1 induit le recrutement et la phosphorylation de RIPK3 dans la voie canonique, ici ZBP1 induit le recrutement et l'autophosphorylation de RIPK3 qui à son tour permet la phosphorylation de MLKL, dernier effecteur de la nécroptose^{194,195}.

2.c Formation du nécrosome : les protéines clefs

Le mécanisme de la nécroptose met en jeu principalement trois protéines à savoir les kinases RIPK1, RIPK3 et la pseudokinase MLKL décrits ci-dessous.

2.c.i RIPK1

RIPK1 est une kinase de 76 kDa découverte au début des années 2000¹⁷¹. Cette sérine/thréonine kinase est une protéine qui appartient avec la famille des kinases RIP composée de sept membres soit de RIPK1 à RIPK7 (**Figure 12**). RIPK6 et RIPK7 appelées respectivement LRRK et LRRK2 sont des cousins plus éloignés de RIPK1-RIPK5¹⁹⁶. Ces protéines appartiennent à la même famille du fait de leur homologie notamment partagée au niveau de leur site catalytique situé en N-ter. A l'inverse, chaque membre de la famille RIP se différencie par leur terminaison C-ter, différente entre chaque protéine (**Figure 12**). En effet, la protéine RIPK1 possède un domaine de mort DD, la protéine RIPK2 un site de recrutement des caspases CARD et les protéines RIPK4 et RIPK5 une répétition ankyrine différentes

entre elles. Première kinase de cette famille, RIPK1 possède un domaine de mort DD en C-ter et également un motif d'interaction homotypique RIP nommé RHIM nécessaire à son interaction avec RIPK3. La protéine RIPK1 subit de nombreuses modifications post-traductionnelles telles que la phosphorylation et l'ubiquitination nécessaire à sa fonction. L'ubiquitination de cette protéine inhibe son activité kinase. Indispensable à l'induction de la signalisation induite par le TNF α , RIPK1 se lie au domaine DD de TRADD et au récepteur de la superfamille TNFR pour former une structure trimérique. Par la suite, TRADD recrute des ubiquitines ligases E3 comme cIAP1/2 par l'intermédiaire de TRAF2 pour former le complexe I nécessaire à l'activation de la voie NF κ B ou encore la voie des MAPKinases. cIAP1/2 favorisent l'ubiquitination liée à K63 sur la Lys377 de RIPK1 et leurs propres sites de lysine, fournissant une plate-forme nécessaire à l'activation de NF κ B^{197,198}.

Lorsque les signaux intracellulaires favorisent l'induction de mort et non l'inflammation, RIPK1 peut être déubiquitinylé par les enzymes A20 ou CYLD menant ainsi au complexe II. La formation du complexe II s'observe également lorsque cIAP1/2 sont absents ou inhibés. La formation du complexe II et donc de DISC peut suivre deux voies différentes. Il peut alors conduire au complexe IIa formé de FADD, de la caspase 8 et de RIPK1 qui vont mener à l'apoptose. Lorsque la caspase 8 est inhibée ou absente, RIPK1 s'associe à RIPK3 conduisant à la formation du complexe IIb nécessaire à la nécroptose caractérisée par l'activation et la phosphorylation de MLKL. La phosphorylation de la kinase RIPK1 est un des marqueurs de l'activation de la nécroptose. Plusieurs études montrent de nombreux sites de phosphorylation de RIPK1 mais seulement la phosphorylation de la Ser161 ou Ser166 se retrouvent dans la nécroptose. Moléculairement parlant, l'induction de la nécroptose mène à l'autophosphorylation de RIPK1 en Ser161 ou Ser166 nécessaire à l'interaction et activation de la kinase RIPK3 par le domaine RHIM¹⁹⁹.

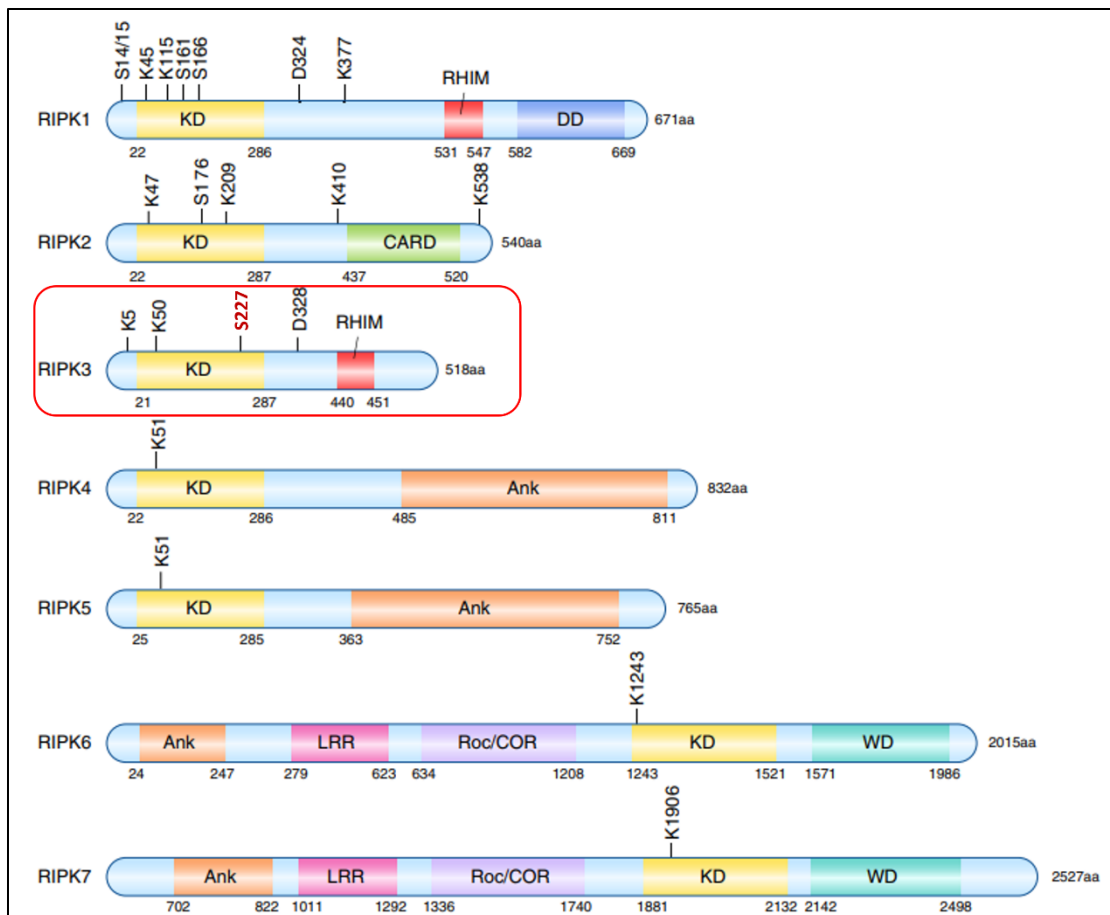


Figure 12 : Structures des kinases de la famille RIPK. Les protéines de la famille RIPK partagent un domaine homologue sérine-thréonine kinase (KD) avec un site catalytique. La phosphorylation de la Ser227 de RIPK3 est essentielle pour l'activation de la nécroptose. De plus, RIPK1 est autophosphorylée en Ser14, Ser15, Ser161 et Ser166 pendant la nécroptose. L'asp324 de RIPK1 et l'Asp328 de RIPK3 sont des sites de clivage par ma caspase-8 activée. RIPK1 possède un domaine DD en C-ter qui assure la médiation de la signalisation des récepteurs de mort. RIPK2 possède un domaine CARD en C-ter assurant la médiation de la signalisation des caspases. RIPK1 et RIPK3 possèdent un domaine RHIM nécessaire à leur interaction et activation dans la nécroptose. RIPK4 et RIPK5 ont des répétitions d'ankyrine en Ct-er. RIPK6 et RIPK7 possèdent des régions riches en leucine (LRR), des répétitions d'ankyrine, des domaine Roc et COR (Roc/COR) et des répétitions WD40 (WD). D'après He et Wang²⁰⁰.

2.c.ii RIPK3

La protéine RIPK3 est une kinase qui a été découverte en 1999 par deux groupes de chercheurs dans des travaux notamment sur l'apoptose^{201,202}. Le gène *Ripk3* codant pour cette protéine se trouve sur le chromosome 14 chez l'Homme et la souris. Chez l'Homme, RIPK3 est codé par 518 acides aminés pour une protéine de 57kDa tandis que chez la souris cette protéine est codée par 486 acides aminés pour 53 kDa²⁰³. Appartenant à la famille des kinases RIP, la protéine RIPK3 possède en motif C-terminal un motif d'interaction homotypique RIP nommé RHIM, également présent dans le domaine intermédiaire de RIPK1 assurant leur interaction nécessaire pour la voie canonique de la nécroptose²⁰⁴. Ce domaine RHIM permet également à la kinase RIPK3 d'interagir avec TRIF ou encore ZBPI afin d'activer la voie non canonique de la nécroptose²⁰⁵.

La protéine RIPK3 possède plusieurs sites de phosphorylation mais peu d'entre eux sont connus pour des fonctions biologiques. Dans la nécroptose, la phosphorylation en Sérine 227 pour RIPK3 humain et la phosphorylation de la Thréonine 231/Sérine 232 chez la souris sont indispensables pour le recrutement et l'activation de la pseudokinase MLKL^{203,206}. Hormis son rôle dans la nécroptose, la protéine RIPK3 intervient dans plusieurs processus de morts cellulaires et également dans l'inflammation et le métabolisme mitochondrial^{204,207}. Comme dit précédemment, la kinase RIPK3 est une protéine clef dans l'induction de la nécroptose notamment par la voie canonique mais également non canonique. Dans les deux voies, l'activation de RIPK3 mène à sa phosphorylation qui va à son tour phosphoryler MLKL induisant son oligomérisation et translocation à la membrane plasmique pour former des pores.

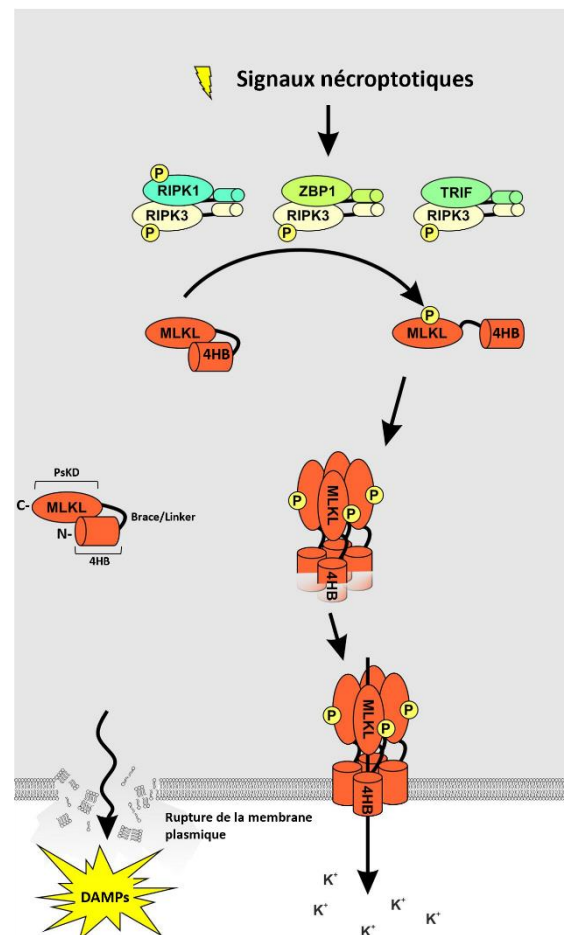
Le rôle de RIPK3 a également été montré dans la régulation de l'autophagie. En effet, en réponse à un stress génotoxique, RIPK3 phosphoryle la protéine autophagique Ulk1 en Sérine 746 indispensable lors de l'autophagie alternative^{207,208}. Hormis son rôle dans la nécroptose induisant le relargage de DAMPs, RIPK3 est impliqué dans l'inflammation notamment car il s'agit d'un activateur de la voie NF- κ B et des MAPK dans de nombreux types cellulaires menant à la transcription de gènes de cytokines et chemokines pro-inflammatoire ainsi que de NLRP3. Le mode d'activation de la voie NF- κ B par RIPK3 n'étant pas défini, deux mécanismes sont proposés afin de l'expliquer. Dans les cellules exprimant la caspase 8 et indépendamment de son activité kinase, RIPK3 favorise l'activation de l'inflammasome par l'axe caspase 8-RIPK1-NLRP3²⁰⁹. Le second mécanisme proposé intervient dans les cellules quand la caspase 8 est inactive où RIPK3 favorise l'activation de l'inflammasome par MLKL. En effet, MLKL peut directement induire l'activation de NLRP3 après l'efflux de potassium dû à la rupture de la membrane plasmique²¹⁰. Enfin, RIPK3 joue un rôle dans le métabolisme mitochondrial notamment lors de la glycolyse. En effet, plusieurs études ont montré des interactions entre RIPK3 et des enzymes métaboliques tels que la glutamate déshydrogénase 1 (GLUD1), la fumarate hydratase (FH) ou encore la glycogène phosphorylase (PYGL)²¹¹. De plus, RIPK3 et MLKL sembleraient également activer le complexe de la pyruvate déshydrogénase pour augmenter la respiration aérobie.^{211,212}

2.c.iii MLKL

L'effecteur terminal de la nécroptose est la pseudokinase MLKL, découverte en 2012¹⁷⁵. Les pseudokinases représentent 10% des kinomes de mammifères et désignent des protéines kinases au site catalytique inactif leur empêchant alors leur action de phosphorylation²¹³. Les pseudokinases sont des régulateurs de la signalisation cellulaire en agissant principalement en tant que modulateurs des protéines kinases dites authentiques²¹⁴. Hormis son domaine pseudokinase en C-ter nommé PsKD, la protéine MLKL est composée d'une terminaison N-terminale à quatre hélices nommée 4HB et d'une région à deux hélices appelée également « linker » ou « brace ». La structure 4HB est connue pour sa

fonction de perméabilisation responsable de la mort cellulaire tandis que le domaine pseudokinase et le linker jouent un rôle dans le réarrangement structural dû à la phosphorylation de MLKL. En effet, lorsque MLKL est recrutée dans le nécrosome et activée par la phosphorylation de RIPK3, MLKL subit un changement conformationnel réorientant le domaine 4HB et le linker. Ce changement permet l'oligomérisation de la protéine, suivie de la perméabilisation cellulaire^{215,216} et est schématisé par la **Figure 13**.

Figure 13 : Schéma représentant le changement conformationnel de la pseudokinase MLKL lors de la nécroptose. La pseudokinase MLKL est composée de trois domaines : son domaine pseudokinase PsKD en position C-terminale, suivi d'un linker/brac et d'une terminaison N-terminale 4HB effectrice de la nécroptose. L'induction de la nécroptose permet le recrutement et la phosphorylation de RIPK3 (soit par RIPK1, ZBP1 ou TRIF) qui à son tour phosphoryle MLKL. La phosphorylation de MLKL induit à son tour un changement conformationnel de la protéine réorientant le domaine 4HB et le linker. Ce changement conformationnel est nécessaire à l'oligomérisation de la protéine en tétramère pour former un pore à la membrane plasmique. Ce pore induit la perméabilisation de la membrane caractérisée par le relargage de DAMPs. Adapté de Krautwald *et al*²¹⁷.



Indispensable à la nécroptose, la phosphorylation de MLKL par RIPK3 sur son domaine pseudokinase est réalisée en T357/S358 pour MLKL humain et en S345 pour MLKL murin²¹⁶. Malgré la similarité au niveau structural et fonctionnel, certaines études

montrent des différences entre la protéine MLKL humaine et murine notamment sur l'assemblage de celles-ci. En effet, certaines études montrent que la protéine MLKL humaine va s'assembler en tétramère tandis que la protéine MLKL murine s'assemble en trimère pour ensuite former des pores au niveau de la membrane plasmique^{218,219}.

Mis à part l'action de RIPK3 sur MLKL convertissant les protéines MLKL dormantes dans la cellule en protéines actives, d'autres modifications post-traductionnelles ont été montrées comme nécessaires à l'oligomérisation et la translocation de MLKL à la membrane plasmique. Par exemple, certains métabolites inositols phosphates comme le 6-inositol phosphate IP6 permettent l'oligomérisation de pMLKL et sa translocation à la membrane plasmique²²⁰. De plus, il a été montré que les kinases TAM

(regroupant les kinases Tyro3, Axl et Mer) après la phosphorylation par RIPK3, phosphorylent à leur tour MLKL pour induire son oligomérisation ²²¹. Enfin, MLKL est client des protéines chaperonnes HSP70 et HSP90 permettant leur translocation à la membrane plasmique entraînant la perméabilisation et la mort de la cellule ^{222,223}.

Hormis son rôle comme exécuteur final de la nécroptose, la protéine MLKL participe à plusieurs mécanismes ²¹⁵. En effet, certaines études ont pu montrer que MLKL participe à la génération de formation de vésicules extracellulaires, indépendamment de l'activité de RIPK1 et RIPK3 ²²⁴. MLKL joue également un rôle dans le modelage de la membrane plasmique puisqu'il peut induire l'exposition de la phosphatidylsérine à la membrane ²²⁵. Il semblerait également que MLKL joue un rôle au niveau du système nerveux en favorisant le processus de démyélinisation permettant la régénération nerveuse ²²⁶. Enfin, MLKL semblerait également jouer un rôle nucléaire lors de la nécroptose mais cet aspect sera abordé ultérieurement.

2.d Perméabilisation de la membrane plasmique et relargage de DAMPs

Lors de la nécroptose, la phosphorylation de MLKL décrit précédemment entraîne son oligomérisation et sa translocation à la membrane plasmique. A la membrane cellulaire, les oligomères de pMLKL induisent sa rupture en formant un groupe de pores avec les protéines de jonctions serrées ou en régulant le flux de canaux ioniques ²²⁷⁻²²⁹. A l'inverse de certaines morts cellulaires comme l'apoptose, la nécroptose comme la nécrose est une mort cellulaire rapide caractérisée par la perméabilisation de la membrane plasmique ainsi que la libération du contenu cellulaire et de DAMPs (**Figure 14**). Cette libération de contenu intracellulaire définit alors la nécroptose comme une mort cellulaire hautement immunogène. En effet, on observe dans les cellules nécroptotiques le relargage de molécules pro-inflammatoires tels que HMGB1, la Calreticuline (CRT), des fragments d'ADN ou encore de l'ATP ^{230,231}.

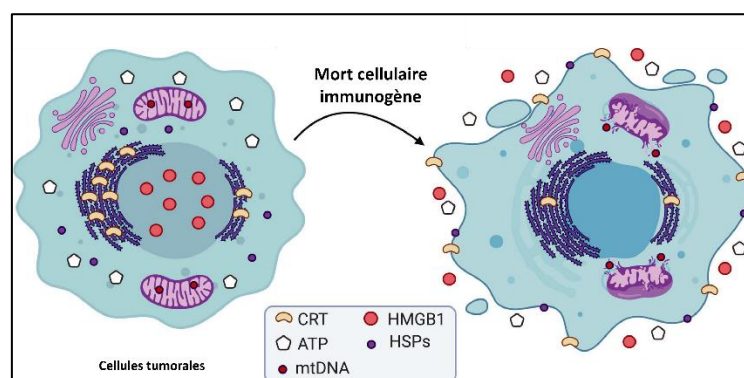


Figure 14 : Relargage de DAMPs lors de mort cellulaire immunogène. D'après Ahmed et Tait²³¹.

3. Contexte physiopathologique de la nécroptose

La nécroptose est une mort cellulaire programmée qui intervient le plus souvent dans un contexte pathologique. Quelques exemples sont décrits ci-dessous.

3.a Développement et embryogenèse

Depuis longtemps, l'une des approches pour comprendre le rôle de gènes et protéines dans le développement est de générer des animaux knock-out (KO) pour ceux-ci et étudier leur croissance du stade embryonnaire jusqu'au stade adulte. Grâce à ces modèles, de nombreux gènes impliqués dans les voies de morts cellulaires ont été identifiés comme les gènes *caspase 8* et *fadd*. Ainsi, l'absence des gènes *caspase 8* et *fadd* mène à une léthalité embryonnaire signifiant que la présence de ces gènes et donc des phénomènes d'apoptose est indispensable au bon développement de l'embryon ²³². Pour comprendre l'implication des gènes nécroptotiques, de la même façon des animaux transgéniques *ripk1* *-/-*, *ripk3* *-/-* et *mlkl* *-/-* ont été générés. Ainsi, les souris *ripk1* *-/-* ne survivent pas plus de trois jours indiquant le rôle essentielle de ce gène dans le développement ²³³. Néanmoins, la protéine Ripk1 étant impliquée dans l'ensemble des voies de morts TNF α dépendantes cela ne permet d'affirmer que la nécroptose est impliquée dans le développement. A l'inverse, des souris *ripk3* *-/-* ou *mlkl* *-/-* sont viables et présentent un développement normal supposant alors que la nécroptose n'est pas essentielle aux mécanismes de développement ^{234,235}. Cependant, la léthalité des souris *caspase 8* *-/-* ou *fadd* *-/-* peut être permutée par l'ablation de *ripk3*. En effet, l'absence de *ripk3* dans les souris *fadd* *-/-* leur permet de survivent mais on observe une mort post-natale dans les animaux *fadd* *-/-* *ripk3* ^{Δ/Δ} dû à une trop forte inflammation notamment au niveau des intestins. Ces résultats suggèrent alors que l'ablation de *ripk3* permet la survie des souris déficientes pour *fadd* selon deux processus : l'inhibition de la nécroptose au cours du développement embryonnaire et la restriction de l'inflammation massive au cours du développement post-natal ²³².

Ainsi, la nécroptose semble assurer la médiation de fonctions physiologiques majeures mais est également impliquée dans l'étiologie de nombreuses pathologies humaines.

3.b Maladies cardiaques

Plusieurs études ont établi un lien entre les maladies cardiovasculaires et la nécroptose ^{236,237}. Par exemple, comparément aux souris sauvages, les souris *ripk3* *-/-* sont moins sensibles à l'insuffisance cardiaque dû à une réponse nécroptotique réduite du myocarde. Ceci s'explique par le fait que la protéine kinase II dépendante de la calmoduline CaMKII, que l'on retrouve en grand nombre notamment dans le myocarde a été montrée comme substrat de la protéine nécroptotique RIPK3. En effet, à un niveau basal, CaMKII est inactive et est activée lors d'une contraction cardiaque par

exemple. Cette protéine peut être activée par des agents cardiotoxiques comme la doxorubicine menant alors à l'insuffisance cardiaque. Ainsi, après exposition à la doxorubicine, les souris *ripk3* *-/-* sont moins sensibles à l'insuffisance cardiaque dû à une réponse nécroptotique réduite du myocarde puisque RIPK3 ne peut plus activer CaMKII²³⁸. De plus, ces mêmes souris déficientes pour *ripk3* développent des lésions d'athéroscléroses moins importantes que les souris sauvages. Chez l'Homme, on observe un niveau élevé des ARN messagers de RIPK3 et MLKL dans les plaques d'athéromes et le niveau de phosphorylation de MLKL peut également être considéré comme un biomarqueur avancé de la nécroptose dans l'athérosclérose²³⁶. La nécroptose est également impliquée dans d'autres maladies cardiovasculaires comme l'accident vasculaire cérébral, l'infarctus du myocarde et bien d'autres et l'inhiber représente une stratégie thérapeutique pour renforcer les traitements déjà existant et limiter à long terme les effets néfastes de ces troubles cardiaques.

3.c Maladies neurodégénératives

Plusieurs travaux ont pu montrer un rôle important de la nécroptose dans les maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson ou encore la sclérose en plaque^{176,239}. Le rôle de la nécroptose dans ces maladies cérébrales a notamment été mis en évidence avec l'utilisation d'inhibiteur de nécroptose comme la Nec-1, inhibiteur de la kinase RIPK1. En effet, Degtrev *et al* ont été les premiers à observer des phénomènes nécroptotiques *in vivo* au niveau du cerveau notamment dans l'ischémie cérébrale et qu'elle était diminuée suite à l'administration de Nec-1¹⁷². Caractérisée par une dégénérescence progressive des neurones dopaminergiques, la maladie de Parkinson est l'une des plus maladies neurodégénératives des plus répandues représentant un axe important de la recherche mondiale. Des études réalisées sur des tissus post-mortem de patients atteints de la maladie de Parkinson ont montré une activation de la nécroptose et une expression élevée des protéines RIPK1, RIPK3 et MLKL dans la substance noire de patients atteints²⁴⁰. Également, l'inhibition pharmacologique de RIPK1 et l'inhibition génétique de RIPK3 et MLKL diminue la dégénérescence des neurones dopaminergiques dans des modèles animaux de la maladie de Parkinson²⁴¹.

Autre maladie neurodégénérative majeure, la maladie d'Alzheimer (AD) manifestée en partie par une perte progressive de la mémoire et des troubles cognitifs et son développement peuvent être associés aux mécanismes sous-jacents de la nécroptose^{176,242}. Cette neurodégénérescence est caractérisée par l'accumulation anormale de la protéine hyperphosphorylée Tau (pTau) et d'agrégats intracellulaires et extracellulaires d'amyloïde- β (A β). Plusieurs études conduites sur des coupes post-mortem de cerveau de patients atteints d'AD ont montré qu'une accumulation d'A β est associée à une accumulation de protéines nécroptotiques telles que pMLKL²⁴³ et que les protéines RIPK1, RIPK3 et MLKL sont

également augmentés par rapport à un tissu sain²⁴⁴. Comme dans la maladie de Parkinson, l'utilisation d'inhibiteurs de RIPK1 (Nec-1), de RIPK3 (GSK'843) et de MLKL (NSA : nécrosulfonamide) réduisent la nécroptose au niveau du cerveau et permettent une amélioration des troubles cognitifs dans les modèles d'AD²⁴².

3.d Inflammation

Comme décrit précédemment, la nécroptose est une mort cellulaire hautement inflammatoire par le relargage de DAMPs. Également, comme cité précédemment et souligné par Kearney et Martin, la nécroptose spontanée conduit à une inflammation excessive léthale dans les animaux *caspase 8* *-/-* ou *fadd* *-/-* et peut être restaurée par la délétion supplémentaire de *ripk3* ou *mlkl* traduisant donc du rôle majeure de la nécroptose dans l'inflammation²⁴⁵. De plus, la nécroptose joue un rôle dans l'inflammation puisque la protéine RIPK3 active la formation de l'inflammasome responsable de la production de l'interleukine 1- β (IL-1 β)^{246,247} (paragraphe 2.C.ii). L'inflammation induite par la nécroptose peut également être observée lors d'une infection virale activant ZBP1 responsable de la voie non canonique de la nécroptose²⁴⁸. Depuis plusieurs années, il est connu que la COVID-19 causée par une infection au SARS-CoV-2 est marquée par une forte phase inflammatoire due à la tempête cytokinique où on observe une activation accrue de la nécroptose, pyroptose et ferroptose²⁴⁹. En effet, des niveaux sériques élevés de RIPK3 ont été retrouvés dans les sérums de patients atteints de la COVID-19²⁵⁰ et des infections au SARS-Cov2 sur des cellules pulmonaires ont montré une augmentation de pMLKL²⁵¹. Ainsi, pour diminuer cette inflammation lors de l'infection certains inhibiteurs de nécroptose sont étudiés comme potentiels traitement et certains sont testés en essais cliniques^{252,253}.

3.e Cancer

Dans le cancer, le rôle de la nécroptose est paradoxale puisque que cette mort cellulaire peut être considérée comme anti-tumorale par sa fonction de dégradation et ses propriétés immunogènes, mais également comme pro-tumorale par la forte inflammation induite, caractéristique du cancer^{184,185,254}. La nécroptose touche également les cellules tumorales au sein de la tumeur mais également toutes les autres cellules du microenvironnement tumoral traduisant également de la complexité du rôle de cette mort cellulaire dans la transformation néoplasique. Cette ambivalence ouvre le champ à de nombreuses études et les rôles pro et antitumoraux de la nécroptose seront résumés dans les parties ci-dessous.

3.e.i Rôle antitumoral

Comme décrit précédemment, l'échappement des cellules cancéreuses aux phénomènes de morts cellulaires comme la nécroptose fait partie des mécanismes mis en place par les cellules tumorales

pour se multiplier. Ainsi, la diminution de l'expression de protéines clefs impliquées dans la signalisation de la nécroptose a été constatée dans différents types de cellules cancéreuses suggérant que ces cellules échappent à la nécroptose pour survivre. En effet, deux articles publiés par les mêmes auteurs montrent qu'une grande partie des lignées cancéreuses présentent une expression négatives pour la protéine RIPK3^{255,256}. Comme le montrent la **Figure 15** ci-dessous, sur plus de 60 lignées cancéreuses deux tiers de ces cellules sont déficientes pour la protéine RIPK3.

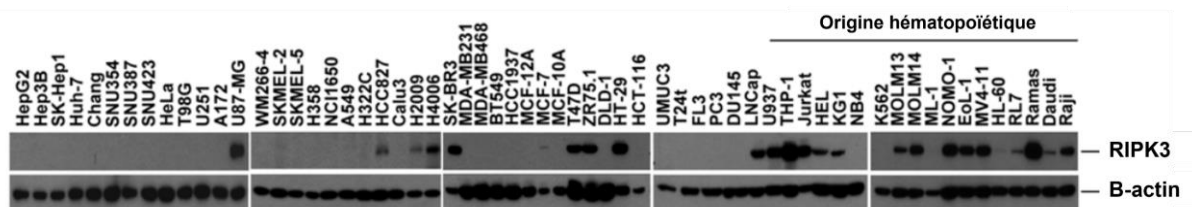


Figure 15 : Niveau d'expression basale de la kinase RIPK3 dans 60 lignées cancéreuses. Western-blot de lysats totales sur 60 lignées cancéreuses, d'après Koo *et al*²⁵⁵.

Une diminution de l'expression de RIPK3 est également retrouvée dans plusieurs tumeurs humaines de différentes origines comme dans le cancer mammaire, colorectale ou encore dans des leucémies ou mélanome^{178,185}. Cette diminution de l'expression de RIPK3 est la résultante de modifications épigénétiques mises en place par les cellules cancéreuses²⁵⁷. L'une de ces modifications les plus constatées est la méthylation génomique de RIPK3 à proximité de son site de départ transcriptionnel, empêchant la production de RIPK3²⁵⁵. Également, on peut observer à la suite d'une infection au Epstein Barr Virus (EBV) une suppression de RIPK3 due à une hyperméthylation de son promoteur^{258,259}. Une autre étude a également démontré que la méthylation de RIPK3 est maintenue par l'expression UHRF1 et peut être restaurée par le facteur de transcription Sp1²⁶⁰. Par ailleurs, il est également décrit que l'expression de certains oncogènes tels que BRAF et AXL peuvent influencer l'expression de RIPK3. L'inhibition de ces deux gènes permet de restaurer l'expression de RIPK3 dans les cellules ne l'exprimant pas et ainsi restaurer leur sensibilité à l'induction de la nécroptose²⁶¹. Tout comme RIPK3, des niveaux d'expressions différentes de la protéine MLKL sont retrouvés dans différents cancers²⁶² mais leurs origines restent plus mystérieuses. En effet, trois mutations de MLKL ont été étudiées dans les cancers humains. Pour deux d'entre elles, les mutations surviennent dans des régions très conservées situées dans le domaine PsKD pour MLKL humain dans des cancers gastriques²⁶³. La troisième mutation a été observée dans la boucle d'activation de PsKD dans le cancer pulmonaire humain²⁶².

L'expression de ces protéines nécroptotiques peut alors servir comme biomarqueurs pour ainsi prédire le pronostic (**Tableau 1**).

Tableau 1 : Niveaux d'expression de protéines nécroptotiques dans différents cancers et leur pronostic associé. Réalisé à partir des travaux de Lalaoui et Brumatti²⁶⁴, Liu *et al*¹⁸⁵ et Garg *et al*²⁵⁷.

| Protéines | Niveau d'expression | Type de cancer | Pronostic | Références |
|-----------|---------------------|--|-------------------|-----------------------------------|
| RIPK3 | ↓ | Cancer colorectal | Mauvais pronostic | 255, 265, 266, 267, 266, 268, 267 |
| | ↓ | Leucémie myéloïde aiguë | Mauvais pronostic | 269, 270 |
| | ↓ | Mélanome | Mauvais pronostic | 271 |
| | ↑ | Cancer du pancréas | Mauvais pronostic | 272, 273 |
| | ↑ | Cancer du poumon | Bon pronostic | 274 |
| | ↑ | Cancer colorectal | Bon pronostic | 275 |
| | ↓ | Cancer du sein | Mauvais pronostic | 276, 255, |
| MLKL | ↓ | Cancer gastrique | Mauvais pronostic | 272 |
| | ↓ | Cancer des ovaires | Mauvais pronostic | 277 |
| | ↓ | Carcinome épidermoïde | Mauvais pronostic | 278 |
| | ↓ | Cancer du pancréas | Mauvais pronostic | 279 |
| | ↓ | Cancer colorectal | Mauvais pronostic | 265 |
| | ↓ | HR-HPV cervical cancer | Mauvais pronostic | 280 |
| | ↑ | Cancer du sein | Mauvais pronostic | 281 |
| RIPK1 | ↓ | Cancer de la tête et du cou | Mauvais pronostic | 281 |
| | ↓ | Cancer du foie | Mauvais pronostic | 282 |
| | ↑ | Cancer du sein | Mauvais pronostic | 283 |
| | ↑ | Glioblastome | Mauvais pronostic | 284 |
| | ↓ | Carcinome spinocellulaire de la tête et du cou | Mauvais pronostic | 285 |

L'absence de ces protéines nécroptotiques retrouvée dans divers cancers et associée à un mauvais pronostic traduit des propriétés antitumorales de la nécroptose.

Au niveau de la recherche fondamentale et translationnelle, plusieurs études montrent qu'une surexpression de ces protéines permet une régression tumorale et par conséquent une meilleure réponse immunitaire anti-tumorale. En effet, lorsque la protéine RIPK3 est surexprimée dans un modèle de cellules de cancer de la prostate²⁸⁶ ou dans des cellules de carcinomes de l'œsophage²⁸⁷, on observe une diminution de l'agressivité de ces cellules comme une diminution de leur capacité de

migration et d'invasion. De plus, comparé aux cellules non modifiées, la surexpression de RIPK3 dans ces cellules permet une réduction de la croissance tumorale lorsqu'elles sont injectées en sous-cutanée dans le modèle de souris nude. De même, dans un modèle de cancer de la vessie, l'absence de RIPK3 et MLKL par l'injection de cellules shRIPK3 et shMLKL augmente la croissance tumorale comparé aux cellules non modifiées. Dans ce même modèle, la surexpression de MLKL permet une régression tumorale²⁸⁸. Cependant, ces études utilisent le modèle de souris nude pouvant alors émettre une limite quant à la transposition du rôle anti-tumorale de la nécroptose. En effet, la nécroptose étant connue comme très inflammatoire et sachant que l'inflammation participe à la tumorigenèse notamment par le recrutement de cellules immunitaires pro-tumorales, il est nécessaire d'étudier le rôle de ces protéines dans un modèle immunocompétents.

Ainsi, la surexpression de RIPK3 dans le modèle de carcinome pulmonaire murin LLC1 injectées dans souris C57Bl/6 montre une diminution de la croissance tumorale caractérisée par une diminution de neutrophiles et monocytes dans la tumeur²⁶⁰. Des approches moins conventionnelles comme l'utilisation de virus relarguant MLKL ou encore l'injection de l'ARN messager MLKL (mMLKL) ont pu montrer une activité anti-tumorale de la nécroptose. Comme cité précédemment, la vaccination utilisant des virus oncolytiques peut être une alternative thérapeutique pour réactiver la réponse immunitaire et ainsi permettre la régression tumorale. Dans une étude, un virus oncolytique est modifié de façon à relarguer la protéine nécroptotique MLKL puis est injecté dans des tumeurs de mélanome B16-F10 dans des souris immunocompétentes. Les résultats de ce travail montrent que l'injection de ce virus permet une forte régression tumorale car la présence de MLKL permet le relargage de DAMPs comme HMGB1 permettant le recrutement de cellules T aux propriétés cytotoxiques²⁸⁹. L'injection du transcrit mMLKL dans les tumeurs de modèles syngéniques B16-F10 de mélanome et de cancer colorectal CT26 permet également une régression des tumeurs par le recrutement des cellules immunitaires anti-tumorales. Ces résultats prouvent que les signaux nécroptotiques tels que la présence de MLKL permet le recrutement de cellules immunitaires anti-tumorales car les cellules B16-F10 et CT26 sont déficientes pour la protéine RIPK3. L'injection de mMLKL en intratumoral permet la réduction de la tumeur en sous-cutanée et protège également contre l'apparition de nodules pulmonaires dans le modèle de métastases lorsque les cellules sont injectées par voie intraveineuse. En thérapies, les inhibiteurs de checkpoints immunitaires comme les anti-CTLA4 ou anti-PD1 ne fonctionnent pas pour tous les patients notamment pour ceux qui présentent une faible infiltration immunitaire. Ainsi, l'ajout de mMLKL dans la tumeur induit la production de néo-antigènes au sein du site tumoral permettant le recrutement de cellules immunitaires anti-tumorales. Ainsi, lorsque mMLKL est injecté en amont d'un anti-PD1, on observe une absence du développement tumoral. Enfin, les auteurs de cette étude ont également utilisé le

transcrit humain MLKL (hMLKL) dans un modèle de souris humanisées et son injection permet un retard de la croissance tumorale²⁹⁰.

Cependant, même si un grand nombre de publications montrent les propriétés anti-tumorales de la nécroptose, celle-ci peut être également participer et promouvoir la tumorigenèse.

3.e.ii Rôle pro-tumoral

Hormis son rôle anti-tumoral, la nécroptose est également définie comme pro-tumorale par sa capacité à induire une forte inflammation et à promouvoir la formation de métastases^{178,185}. Comme indiqué dans le **Tableau 1**, l'expression des gènes des protéines nécroptotiques RIPK1, RIPK3 et MLKL peut être utilisée comme marqueurs de pronostic. Même si l'absence de ces gènes est majoritairement reportée comme mauvais pronostic, leur surexpression dans certains cancers est également associée à un mauvais pronostic notamment dans le cancer du sein et du pancréas. En effet, une étude comparant plusieurs lignées de cancer du sein montre que l'inactivation des gènes *ripk1*, *ripk3* et *mlkl* réduit leur tumorigénicité et permet de les sensibiliser à la radiothérapie. Dans cette même étude, un traitement à la NSA dans des souris porteuses de tumeurs permet une régression tumorale²⁹¹. D'autres observations en faveur des propriétés pro-tumorales est l'expression de RIPK3 qui est retrouvée dans les tumeurs mammaires récurrentes ou récidivantes alors que RIPK3 est absents dans les tumeurs primaires²⁹². Un travail réalisé sur la nécroptose et le cancer du pancréas montrent que les protéines RIPK1 et RIPK3 sont fortement exprimées dans la tumeur et associées à une inflammation accrue. En effet, l'expression de RIPK3 est corrélée à la sécrétion de la chimiokine pro-inflammatoire CXCL1 qui permet la progression tumorale avec le recrutement de cellules immunosuppressives comme les TAM et les MDSCs²⁷³. Également dans le cancer du pancréas, la nécroptose participe à la tumorigenèse car elle permet la migration des cellules cancéreuses à travers l'axe CXCL5-CXCR2. Des expériences de migration montrent que des cellules cancéreuses pancréatiques exposées à un milieu conditionné provenant d'un milieu de culture où des cellules sont traitées avec des inducteurs de nécroptose migrent plus rapidement à la suite d'une blessure où dans des expériences de « transwell-Matrigel invasion assay ». Ce milieu présente un niveau élevé de CXCL5 qui a pour récepteur CXCR2, lui-même surexprimé dans les cellules pancréatiques. L'induction de la nécroptose dans ces cellules permet le relargage de CXCL5 qui promeut l'invasion et la migration de ces cellules à travers CXCR2 car l'ajout d'inhibiteur ou de siRNA contre CXCR2 bloquent leur migration²⁹³. Pour former des métastases, l'étape d'extravasation est une étape clef qui permet aux cellules cancéreuses d'envahir des tissus sains. Strilic *et al* ont alors démontré que les cellules cancéreuses sont capables d'induire la mort des cellules endothéliales par nécroptose afin de promouvoir leur extravasation par l'activation de DR6 dans le modèle de mélanome murin B16-F10. En effet, la coculture entre des cellules tumorales B16-F10 et des cellules endothéliales provoque la mort par nécroptose des cellules endothéliales. Cette mort est

induite par le relargage du ligand APP libéré par les cellules tumorales pouvant se fixer au DR6 des cellules endothéliales induisant la nécroptose. La destruction de ces cellules permet alors une ouverture pour les cellules cancéreuses qui permet leur extravasation favorisant l'apparition de métastases au niveau du poumon dans le modèle métastatique B16-F10¹⁸⁶. Une autre étude utilisant le modèle de métastases B16-F10 montre que la perte de RIPK3 dans le microenvironnement tumoral réduit la formation de nodules pulmonaires et présente une diminution de marqueur d'extravasation et d'angiogenèse²⁹⁴.

De nombreux travaux montrent donc le rôle dichotomique de la mort nécroptotique et de l'immunité et l'analogie entre le Yin et le Yang représentant les fonctions pro et anti-tumorales de l'immunité induite par la nécroptose par la **Figure 16** réalisée Garg *et al* illustre parfaitement cette ambivalence.

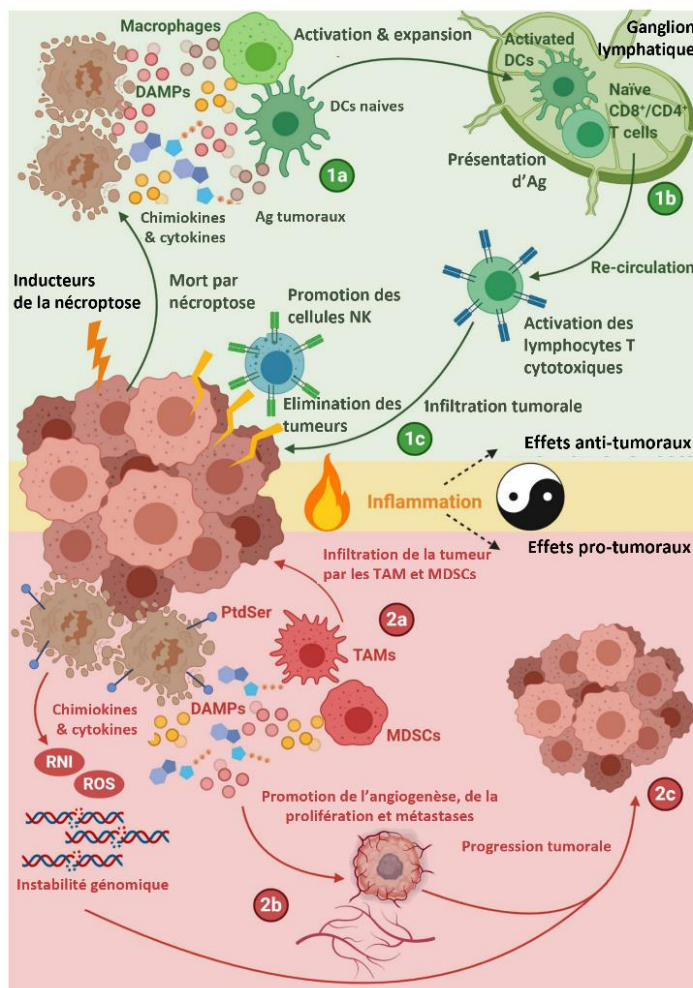


Figure 16 : Représentation schématique des réponses immunitaires pro ou anti-tumorales induites par la nécroptose.

Lorsque les cellules tumorales meurent par nécroptose, elles libèrent un ensemble de DAMPs, chimiokines et cytokines, antigènes (Ag) tumoraux créant un microenvironnement immunitaire inflammatoire qui peut avoir des effets anti-tumoraux ou pro-tumoraux. (1a) Les molécules immunogènes libérées par les cellules mourant par nécroptose permettent le recrutement de macrophages et DC naives qui vont migrer au niveau des ganglions lymphatiques. (1b) Au sein du ganglion lymphatique, les cellules présentatrices d'antigènes activées amorcent les cellules T CD8⁺/CD4⁺ par des antigènes cancéreux. Après cette interaction, les cellules T naives se différencient en cellules T cytotoxiques effectrices. Ces cellules T rejoignent alors la circulation. (1c) Les cellules T effectrices infiltrent la tumeur pour éliminer les cellules cancéreuses. (2a) Cependant, la mort cellulaire par nécroptose des cellules cancéreuses peut avoir des effets pro-tumoraux en attirant notamment les MDSCs et les TAM pouvant entraîner une immunosuppression de la tumeur. (2b)

Parallèlement, les cytokines libérées par les cellules cancéreuses nécroptotiques peuvent favoriser l'angiogenèse, la prolifération des cellules cancéreuses, le développement de métastases et la libération de ROS et RNI facilitant l'instabilité génomique. (2c) Tous ces facteurs participent ensemble à la progression tumorale. Schéma d'après Garg *et al*²⁵⁷.

4. Induction de la nécroptose comme stratégie thérapeutique

Depuis plusieurs années, l'induction de la nécroptose comme stratégie thérapeutique est source de nombreuses recherches et représente une stratégie attractive permettant de contourner des phénomènes de résistance et activer les réponses anti-tumorales^{185,254,264,295}.

Expliqué précédemment, l'immunoediting des tumeurs comprend la phase d'immunosurveillance qui est indispensable à l'élimination des cellules cancéreuses par le système immunitaire. Cette étape de détection est basée sur la reconnaissance de nouveaux antigènes reconnus par les cellules de l'immunité innée et adaptative comme les cellules dendritiques, les macrophages ou encore les NK qui vont permettre la mise en mémoire de ces antigènes et activer les cellules destructrices de l'immunité permettant l'élimination des cellules cancéreuses. Cependant, de nombreuses cellules tumorales mettent en place des mécanismes d'échappements tumorales pour contourner ces mécanismes pour croître et participer au développement tumoral. Également, face aux thérapies utilisées pour éliminer la tumeur, les cellules cancéreuses instaurent des mécanismes de résistances empêchant leur élimination.

4.a DAMPs et vaccination

Pour contrer ces mécanismes d'échappement et de résistance aux traitements, l'une des stratégies thérapeutiques est l'induction de morts immunogènes. L'induction de mort immunogène repose sur le principe que l'induction de certaines morts cellulaires permet le relargage de DAMPs, qui sont reconnus comme signaux de dangers par les cellules immunitaires. Ces DAMPs regroupant l'ATP, l'HMGB1, la CRT, HSP90 et HSP70 peuvent être reconnus par les cellules de l'immunité innée comme les DCs ou les macrophages agissant comme cellules présentatrices d'antigènes et ainsi activer les cellules effectrices de l'immunité anti-tumorales comme les lymphocytes T cytotoxiques. Cependant, les morts cellulaires ont des niveaux différents d'immunogénités et la nécroptose représente l'une des plus immunogènes puisqu'elle est caractérisée par une forte inflammation et le relargage de DAMPs^{231,296}

Plusieurs travaux ont permis de mettre en évidence le pouvoir immunogène de la nécroptose notamment par l'injection de cellules nécroptotiques. Dans une étude menée en 2019, Snyder *et al* ont démontré que l'injection de cellules nécroptotiques dans le microenvironnement tumoral permet une régression de la tumeur. Pour cela, les auteurs ont injecté directement dans la tumeur des cellules cancéreuses ou fibroblastes exprimant ectopiquement RIPK3 (cellules de mélanome B16-F10 et fibroblastes 3T3 respectivement) traités de façon à être injectés lorsqu'ils sont en nécroptose. Des injections répétées de ces cellules en train de mourir par nécroptose dans une tumeur existante permettent ainsi une forte réduction de la croissance tumorale. Cette régression tumorale est permise

par la présence de néoantigènes apportés par les cellules nécroptotiques injectées, permettant ainsi le recrutement de cellules présentatrices d'antigènes et lymphocytes T CD8+ nécessaires à l'élimination des cellules cancéreuses²⁹⁷. Dans une stratégie similaire, une équipe de recherche a également mis en place des expériences de vaccination avec des cellules nécroptotiques CT26 dans un modèle de souris balb/c. Les cellules CT26 étant déficientes pour la protéine RIPK3, elles ont été modifiées génétiquement afin d'exprimer RIPK3 de façon inductible par ajout de doxycycline par un système Tet-On. *In vitro*, la coculture de ces cellules nécroptotiques avec cellules dendritiques issues de la moelle permet la maturation et activation de ces cellules présentatrices d'antigènes. *In vivo*, l'immunisation des souris avec les cellules CT26 nécroptotiques en amont prévient le développement tumoral lorsque ces cellules sont injectées plus tard en sous-cutanée. Cette diminution s'explique par le fait que l'immunisation avec ces cellules permet d'exposer de nouveaux antigènes induisant le recrutement et l'activation de lymphocytes T cytotoxiques fonctionnels pour éliminer directement ou ultérieurement les cellules cancéreuses portant ces mêmes antigènes. Également, l'injection de ces cellules permet le relargage de DAMPs et chimiokines nécessaires au recrutement des cellules immunitaires aux fonctions anti-tumorales²⁹⁸ (**Figure 16**).

4.b Utilisation de chimiothérapies comme inducteurs de nécroptose

De nombreux travaux ont pu démontrer que la nécroptose peut être induite par plusieurs composés tels que la chimiothérapie, la radiothérapie, des composés naturels, des virus ou autres molécules^{185,257}. Sur des cellules de cancer de la thyroïde et de cancer de la corticosurrénale, la radiothérapie permet la mort de ces cellules par apoptose et également par activation de la nécroptose. Lorsque ces cellules sont soumises en même temps aux radiations et à Nec-1 qui inhibe la nécroptose, il y a une survie des cellules démontrant le rôle de la mort induite par nécroptose suite à un traitement par radiothérapie²⁹⁹. Des chimiothérapies conventionnelles comme le CisPlatine peut également activer la nécroptose. Dans une lignée de cancer de l'œsophage résistante à l'apoptose, l'ajout de CisPlatine permet d'activer RIPK3 et ainsi éliminer les cellules par activation de la nécroptose²⁸⁷. Agissant sur l'ADN, les agents chimiothérapeutiques créant des dommages à l'ADN comme le CisPlatine ou l'étoposide permettent également d'activer la nécroptose grâce au récepteur nucléaire RAR γ qui à son tour permet le recrutement de RIPK1 puis de RIPK3 et MLKL³⁰⁰. Comme cité précédemment, un grand nombre de cellules cancéreuses possèdent des modifications épigénétiques comme la méthylation de RIPK3 empêchant l'induction de la nécroptose. L'utilisation d'agents hypométhylants comme la décitabine permet de restaurer l'expression de RIPK3 dans les lignées HeLa, MDA-MB231 et DLD1 où RIPK3 est absent à l'état basal. Lorsque ces cellules sont prétraitées à la décitabine afin d'exprimer RIPK3, elles deviennent sensibles aux chimiothérapies. En effet,

comparément aux cellules non exposées à un pré-traitement à la décitabine, la doxorubicine ou l'étoposide induit la mort cellulaire par nécroptose. *In vivo*, la combinaison de la décitabine et de la doxorubicine permet de ralentir la croissance tumorale comparément aux animaux non traités ou traités seulement avec la décitabine ou avec la doxorubicine²⁵⁵. Dans un modèle de cancer pulmonaire, l'expression ectopique de RIPK3 permet une réduction de la croissance tumorale et est potentialisée par un traitement chimiothérapeutique comme avec le CisPlatine³⁰¹. Ainsi, les agents chimiothérapeutiques sont capables d'induire seules ou en combinaison la nécroptose par un mécanisme RIPK3 dépendant.

4.c Utilisation de composés naturels pour induire la nécroptose

Des composés naturels peuvent également être utilisés pour induire la nécroptose. L'un des plus connus est la shikonine, substance naphthoquinonique extraite d'une plante d'extrême-orient¹⁸⁵. L'utilisation de la shikonine permet d'induire la mort cellulaire par l'activation de la nécroptose et diminuer la progression tumorale dans plusieurs modèles de cancer (ostéosarcome³⁰², cancer du poumon³⁰³, gliome³⁰⁴). De plus, des études ont montré que ce composé naturel permet de lever des résistances aux traitements médiées par les transporteurs de médicaments ou les protéines anti-apoptotiques Bcl-2 dans des lignées humaines de leucémie³⁰⁵. Autre composé naturel membre des alcaloïdes, la résibufogénine a montré des activités anti-tumorales dans le cancer colorectal en induisant l'expression de RIPK3 et ainsi déclenchant la nécroptose³⁰⁶.

4.d Utilisation de smac mimetics comme inducteurs de nécroptose

Autres molécules capables d'induire la nécroptose, les « smacs mimetics » sont des petites molécules mimant Smac, un activateur de caspases et qui induit l'apoptose par l'inhibition des cIAPs. Plusieurs études ont démontré une action anti-tumorale de ces « smac mimetics » par nécroptose dans des cellules résistantes à l'apoptose. En effet, dans des modèles de cellules leucémiques déficientes pour *fadd* et la *caspase 8*, le BV6 qui est un smac mimetic permet d'induire la mort cellulaire par nécroptose et ainsi contrer la résistance à l'apoptose acquise par ces cellules³⁰⁷. De même, une étude similaire sur des cellules de carcinomes pancréatiques montrent les mêmes résultats : l'ajout de BV6 en combinaison avec un inhibiteur de caspases permet l'induction de la nécroptose³⁰⁸. Enfin, l'utilisation de smac mimetic en combinaison avec des agents déméthylants tels que la décitabine permet de déclencher la mort cellulaire de cellules de LAM par nécroptose et contourner leur résistance à la mort cellulaire par apoptose³⁰⁹. Plusieurs smac-mimetics sont actuellement en phase d'essais cliniques comme le LCL161³¹⁰.

5. Modèle d'étude de la nécroptose

5.a Cellules utilisées

Comme indiqué précédemment, un certain nombre de cellules possèdent des mutations ou modifications épigénétiques empêchant l'expression de protéines nécroptotiques comme RIPK3 limitant alors certains modèles d'études cellulaires. Néanmoins, certaines cellules sont décrites comme modèle pour étudier spécifiquement la nécroptose. Pour les cellules d'origine humaines, les cellules de cancer colorectales HT-29 représentent les cellules les plus largement utilisées pour étudier cette voie de mort cellulaire^{311,312}. Pour les cellules murines, ce sont les fibroblastes murins L929 qui sont décrits comme modèle d'étude^{312,313}. D'autres cellules sont également utilisées et une expression forcée par modification génétique de RIPK3 ou l'utilisation d'agent déméthylants comme cités auparavant permettent d'induire la nécroptose dans presque toutes les lignées cancéreuses.

5.b Inducteurs de la nécroptose

L'induction de la nécroptose peut se faire de plusieurs façons. En effet, comme dit précédemment la nécroptose peut être activée par l'utilisation de chimiothérapie ou de smac-mimetics dans des cellules résistantes à la nécroptose. Plusieurs molécules permettent l'activation et le déclenchement de cette voie dépendamment de certains types cellulaires¹⁸⁰. Dans la littérature, l'induction de la nécroptose *in vitro* est majoritairement décrite par l'addition de TNF se fixant au récepteur TNFR1 (l'ajout de TRAIL, FasL peut également être ajouté comme inducteurs) et permet la formation du complexe I. Cependant, l'exposition au TNF induit majoritairement la voie de survie cellulaire induite par la signalisation de NFκB ou alors l'induction de l'apoptose. Pour induire la nécroptose, des conditions supplémentaires sont nécessaires notamment pour empêcher l'ubiquitination de RIPK1 dans la voie de NFκB et l'activation de caspases dans l'apoptose. Pour guider la cellule à échapper à la voie de survie et empêcher l'ubiquitination de RIPK1, des smac-mimetics ou le cycloheximide (CHX) sont utilisés pour permettre l'assemblage du complexe IIb et non du complexe IIa. A cette étape, sans autre stimuli la cellule se dirige alors vers l'apoptose. Pour empêchant cela, il est nécessaire n'inhiber les caspases avec l'ajout de z-VAD-FMK qui est un inhibiteur de toutes les caspases. L'ajout de z-VAD-FMK permet ainsi la formation de complexe IIc et mène à l'activation de la nécroptose³¹⁴. *In vitro*, la combinaison de plusieurs traitements permet donc l'induction de la nécroptose comme la combinaison de TNF, smac-mimetic et z-VAD-FMK souvent abrégée TSZ ou encore la combinaison de TNF, CHX et z-VAD-FMK abrégée par TCZ^{311,315} retrouvées dans de nombreuses publications. Ainsi, ces combinaisons permettent d'induire la nécroptose dans plusieurs lignées sensibles comme l'indique la **Figure 17**.

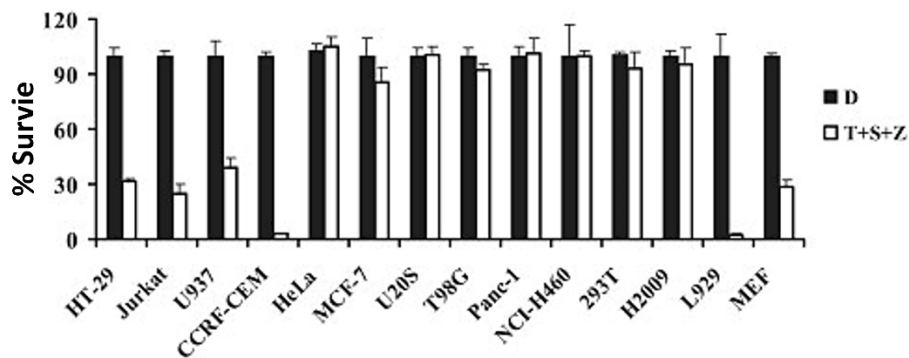


Figure 17 : Induction de la nécroptose dans diverses lignées cancéreuses. Test de viabilité mesurant le niveau d'ATP réalisé 48h après traitement au DMSO (contrôle) ou au T+S+Z (TNF α + smac mimetic + z-VAD-FMK). D'après Wang et al³¹¹.

Par ailleurs, pour les cellules L929 le traitement seul au TNF peut suffire à déclencher la nécroptose³¹⁶ tandis que l'ajout de smac-mimetic ou CHX avec du z-VAD-FMK est nécessaire pour les HT-29 par exemple.

La nécroptose peut également être activée par la voie non canonique par activation de TLR3 ou TLR4. Pour induire la nécroptose par activation du récepteur endocyté TLR3 le PolyI:C est très largement utilisé en combinaison avec des inhibiteurs de caspases comme le z-VAD-FMK^{317,318}. Le LPS couplé également à des inhibiteurs de caspases peut être utilisés pour induire la nécroptose par l'activation du TLR4³¹⁷.

5.c Inhibiteurs de la nécroptose

Afin d'étudier s'il s'agit bien de la nécroptose responsable de la mort cellulaire, des inhibiteurs de nécroptose peuvent être utilisés. Pour inhiber la nécroptose, les inhibiteurs s'appuient sur l'inhibition soit de RIPK1, RIPK3 ou MLKL.

Pour inhiber RIPK1, plusieurs inhibiteurs existent. Les plus connus et utilisés sont les Nécrostatines (Nec-1) qui permettent l'inhibition de la kinase RIPK1 de façon ATP-dépendante. De cette façon l'inhibition de RIPK1 par Nec-1 empêche l'activité enzymatique de cette protéine nécessaire à l'induction de la nécroptose²⁵². Cependant, l'inhibiteur Nec-1 inhibe également l'enzyme IDO responsable d'une forte réponse inflammatoire³¹⁹. Pour contrer cette non-spécificité, plus de 200 analogues ont été développés menant au composé Nec-1s montrant plus de spécificité et stabilité et moins de toxicité *in vivo* indépendamment de l'inhibition de IDO. A l'inverse, l'analogue Nec1i semble beaucoup moins spécifique et peut être utilisé comme contrôle négatif lorsque que Nec1s est utilisé³²⁰. D'autres inhibiteurs développés par la société GSK ont également été développés. On peut citer GSK'963, GSK2982772, GSK'841 qui montrent également une grande spécificité³²¹. D'autres molécules existent encore pour inhiber RIPK1.

Pour inhiber RIPK3, plusieurs molécules existent et sont développées majoritairement par la société GSK. Ainsi, les composés GSK'840, GSK'843 et GSK'872 ont montré le plus de spécificité sur 300 composés testés³¹⁴. Le composé GSK'840 serait plus efficace que les deux autres composés car sa capacité de binding et d'inhibition était plus élevée lors de tests biochimiques. Cependant, GSK'840 semble être inefficace sur les cellules murines³²⁰. Ces composés peuvent inhiber RIPK3 car ils se fixent sur domaine kinase et ainsi inhibe son activité enzymatique. D'autres composés comme le Dabrafenib utilisé comme traitement du mélanome Braf^{V600E} possèdent des capacités à inhiber RIPK3³⁵. Des composés aminobenzothiazole comme TAK-632 ou des composés BMS ont montré des capacités à inhiber RIPK3 mais ne seront pas développés ici³²⁰.

Pour inhiber MLKL, la molécule majoritairement utilisée est la molécule NSA pour nécrosulfonamide. En effet, cette molécule cible directement le résidu Cys86 du domaine N-terminale empêchant le déclenchement de la nécroptose dans les cellules humaines. Cependant, le composé NSA n'inhibe pas la nécroptose dans les cellules de souris car en position 86 se trouve un résidu tryptophane et non cystéine, limitant son utilisation dans les modèle murin³²².

Les modes d'actions des molécules activatrices et inhibitrices de la nécroptose sont résumés par la **Figure 18**.

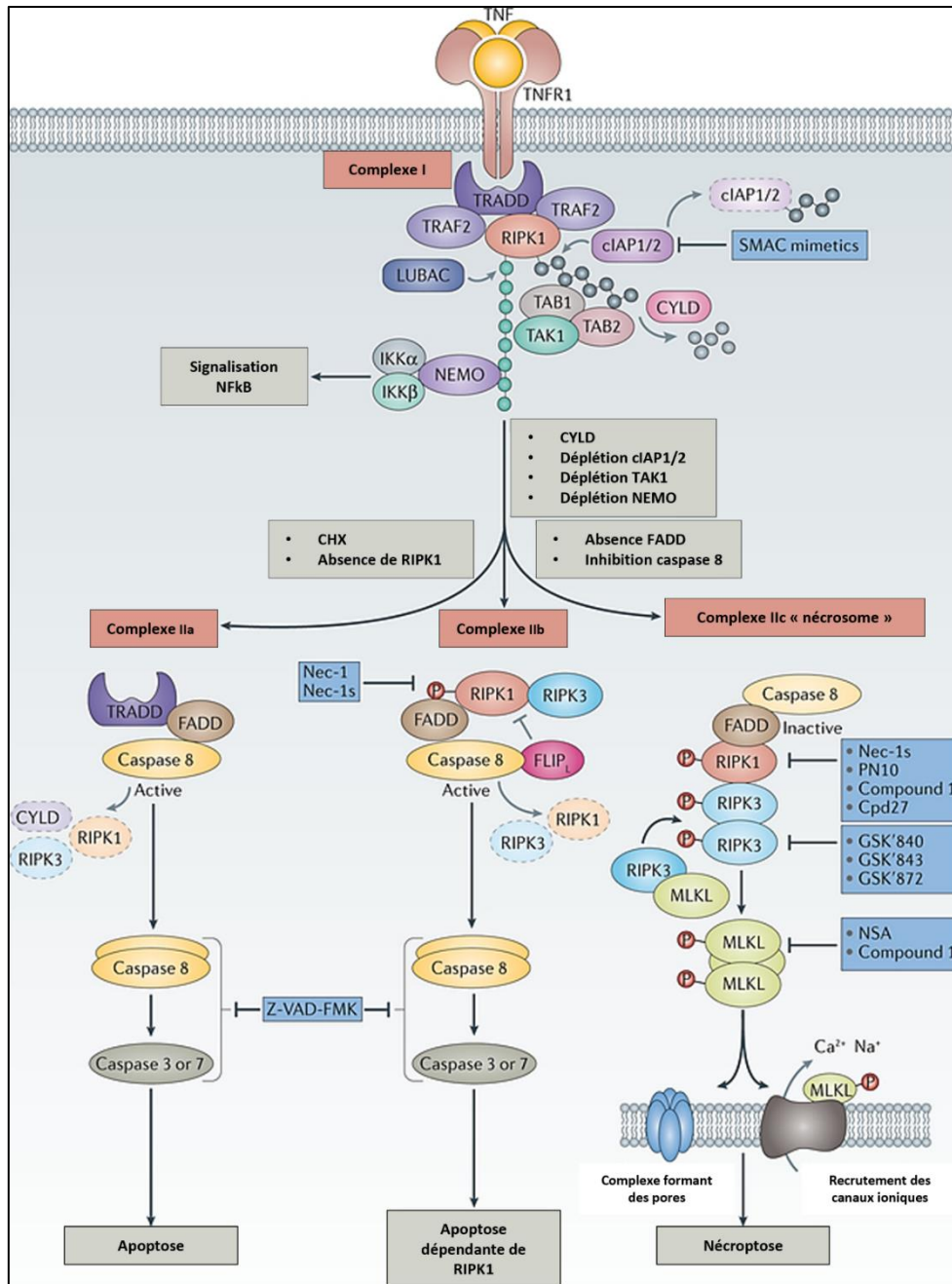


Figure 18 : Inhibiteurs et inducteurs dans la signalisation de la nécroptose. La voie la plus décrite de la nécroptose est celle médiée par la fixation du TNF sur TNFR1. La fixation de ce ligand induit l'activation du complexe I composé de TRADD, RIPK1, TRAF2, cIAP1/2 et LUBAC. Dans ce complexe, les cIAPs ou LUBAC conduisent à l'ubiquitinylation de RIPK1 menant à l'activation de la voie NFκB. En présence de smac mimetics inhibant les cIAPs ou encore de CHX, RIPK1 n'est plus ubiquitinylé et devient actif menant à la formation du complexe IIa ou IIb responsables de l'apoptose, dépendante ou non de RIPK1. Lorsqu'un inhibiteur de caspase est ajouté, la caspase 8 est dégradée et permet la formation du complexe IIc où RIPK1 phosphorylé permet le recrutement et la phosphorylation de RIPK3. RIPK3 activé permet ensuite le recrutement et la phosphorylation de la pseudokinase MLKL permettant son oligomérisation responsable de formation de pores à la membrane conduisant à la nécroptose. Plusieurs inhibiteurs de nécroptose peuvent être utilisés. L'inhibition de RIPK1 se réalise le plus souvent par l'ajout de Nec1s mais peut aussi être réalisée par PN10, le Compound 1 ou Cpd27. Pour inhiber RIPK3, plusieurs inhibiteurs peuvent être utilisés comme le GSK'840, le GSK'843 et le GSK'872. Pour inhiber MLKL, le NSA est majoritairement utilisé mais peut également être inhibé par le Compound 1. Schéma d'après Stockwell et al³¹⁴.

5.d Techniques de détection

Pour observer la nécroptose, diverses techniques peuvent être utilisées. Tout d'abord, la nécroptose étant une mort cellulaire la technique la plus simple à mettre en place reste un test de viabilité cellulaire qui permet de quantifier la mort induite. De nombreux tests existants comme ceux utilisant des marqueurs qui se lient à l'ADN (iodure de propidium, dapi, 7AAD etc...) permettent de suivre la mort engendrée. Ces marquages peuvent également être couplés à un marquage Annexine-V qui va permettre de différencier l'apoptose. D'autres tests *in vitro* existent comme les marqueurs d'activité enzymatique avec le dosage de la Lactate Déshydrogénase (LDH), le suivi de relargage d'ATP et bien d'autres. Néanmoins, ces tests permettent de quantifier la mort cellulaire totale et non pas spécifiquement la nécroptose. Pour cela, les inhibiteurs de nécroptose cités plus haut peuvent être utilisés (si l'effet observé est annulé en présence de l'inhibiteur alors la nécroptose est potentiellement induite) et des contrôles positifs connus de chaque mort cellulaire peuvent être utilisés (traitement à la staurosporine pour l'apoptose, rapamycine pour l'autophagie etc...). Pour déterminer si la nécroptose est mise en jeu, des observations microscopiques peuvent être utilisées pour observer la morphologie des cellules. En effet, le microscope électronique en transmission (MET) permet de distinguer les différentes morts cellulaires. Notamment, l'apoptose se caractérise par un rétrécissement cellulaire, une condensation nucléaire et une fragmentation des organites alors que la nécroptose se traduit par un gonflement de la cellule et une rupture de la membrane. La cytométrie en flux qui permet d'étudier la morphologie des cellules peut être utilisée et peut être couplée avec des anticorps spécifiques dirigés contre des protéines nécroptotiques comme RIPK3 et dirigées contre des protéines apoptotiques comme les caspases. Par ailleurs, comme la nécroptose fait intervenir plusieurs protéines à l'état phosphorylé, l'étude protéique par Western-blot reste l'une des techniques les plus utilisées dans les publications s'intéressant à la nécroptose. Ainsi, la phosphorylation des protéines RIPK1, RIPK3 et MLKL et plus particulièrement les deux dernières caractéristiques de la nécroptose pourront être étudiées. Par Western-blot, les interactions entre protéines nécroptotiques participant au nécrosome ou entre une protéine nécroptotique et une protéine donnée pourront également être investiguées par expériences de co-immunoprécipitation. Pour étudier la proximité entre deux protéines et leur localisation au sein de la cellule, des tests de « Proximity Ligation Assay » (PLA) peuvent être utilisés. Cette technique utilisant des anticorps couplés à des oligonucléotides permet d'observer une proximité témoignant d'une potentielle interaction observée en présence d'un signal fluorescent.

L'étude de la nécroptose *in vivo* s'avère plus difficile. En effet, la première contrainte provient du temps entre le prélèvement des tissus d'intérêt chez un patient ou d'un animal et le temps où il sera traité. En effet, les phénomènes de morts cellulaires peuvent être activés rapidement après prélèvement et

induire un biais dans l'étude. De plus, les tissus représentent un ensemble de cellules et il peut être difficile d'attribuer la nécroptose observée à un type cellulaire spécifique. Des marqueurs utilisés *in vitro* comme la détection de la LDH ne peuvent pas être utilisés comme marqueurs de la nécroptose *in vivo* car cette enzyme est également activée dans l'anémie ou encore l'inflammation. Cependant, des techniques immunohistochimiques peuvent être réalisées avec la détection des protéines nécroptotiques totales ou phosphorylées sur des coupes de tissus récoltés. La quantification de ces marquages entre un groupe traité et un groupe contrôle peut témoigner d'une activation de la nécroptose. Dans le modèle murin, des modèles de déficiences génétiques peuvent également être utilisés afin d'étudier le rôle des protéines nécroptotiques. En revanche, des traitements similaires aux traitements *in vitro* sont moins envisageables pour un traitement *in vivo*. Par exemple, un traitement avec du Z-VAD-FMK semble difficile puisqu'il ciblera toutes les caspases de l'organisme et l'apoptose est connue pour être nécessaire dans certaines fonctions physiologiques. Enfin, les inhibiteurs de nécroptose peuvent être utilisés sur le modèle murin par exemple hormis la NSA qui n'a aucun effet sur l'inhibition de MLKL d'origine murine.

Ainsi, la nécroptose est une mort cellulaire programmée facilement inductible et détectable *in vitro* mais qui présente des limites d'études *in vivo*^{315,321,323}.

V. La phosphatase Wip1, régulateur important des voies de morts cellulaires

1. Les phosphatases, protéines essentielles à l'homéostasie cellulaire

Les modifications post-traductionnelles sont des mécanismes clefs de la signalisation cellulaire qui assurent une diversité fonctionnelle des protéines et qui modifient leurs fonctions et stabilité. Parmi ces modifications, la phosphorylation des protéines représente l'une des modifications les plus largement observées et importantes. La phosphorylation des protéines est permise par les protéines kinases qui vont greffer un groupement phosphate sur des résidus Serine (86%), des résidus Thréonine (12%) ou bien Tyrosine (2%). La phosphorylation des protéines est une modification post-traductionnelles réversibles grâce à l'action des phosphatases.

Cette réversibilité de l'état phosphorylé des protéines est essentielle au bon fonctionnement des cellules puisque 30% des protéines chez l'Homme sont phosphorylées. Cependant, on observe une forte différence dans la proportion entre les kinases et les phosphatases puisque le génome humain contient plus de 500 gènes codant pour des protéines kinases contre environ 200 gènes codant pour des protéines phosphatases. Au niveau protéique, la différence semble inverse puisque les phosphatases semblent compenser leur nombre réduit de gènes par une abondance élevée de protéines, dans divers organismes eucaryotes. Pendant longtemps, cibler les kinases comme stratégie thérapeutique a été favorisé puisqu'on compte environ 17% de médicaments ciblant des kinases contre 6,5% ciblant des phosphatases. Néanmoins, les phosphatases représentent des régulateurs majeurs malgré leur plus faible représentation puisqu'elles doivent répondre de la même façon aux besoins cellulaires que les kinases et représentent donc un axe de recherche important^{324,325}. Il existe majoritairement trois grandes familles de phosphatases classées selon la similarité de séquence de leur domaine catalytique : les phosphoprotéines phosphatases (PPP), les protéines tyrosines phosphatases (PTP) et les protéines phosphatases métal-dépendantes (PPM). Les phosphatases appartenant à la famille des PPP et PPM sont responsables de la déphosphorylation des résidus pSer, pThr et pTyr³²⁶.

2. Familles des PP2C

Également connues sous le nom de phosphatases PP2C, les protéines appartenant à la famille des PPM sont des protéines monomériques dépendante de Mn^{2+} et Mg^{2+} nécessaire à leur activité catalytique. Ces phosphatases sont des protéines très conservées dans leur séquences et structures, avec des gènes homologues ayant été identifiées chez les procaryotes, les animaux et les plantes. Les phosphatases de la famille des PP2C possèdent un domaine catalytique qui représente la structure centrale de la protéine et possèdent également des domaines régulateurs N-terminaux et C-terminaux uniques. Des insertions en boucle peuvent se produire dans le domaine catalytique et dans les sites postérieurs de la protéine représentant les régions qui peuvent interagir avec d'autres protéines et reconnaître les substrats. Chez les mammifères, on compte 20 isoformes avec 18 phosphatases fonctionnelles et 2 pseudophosphatases : PPM1A, PPM1B, PPM1N, PPM1D, PPM1E, PPM1F, PPM1G, PPM1H, PPM1J, PPM1M, PPM1K, PPM1L, ILKAP, TAB1, PPTC7, PHLPP1, PHLPP2, PDP1, PDP2, PP2D1. Certaines PP2Cs sont plus étudiées que d'autres comme la phosphatase PPM1A qui est la plus largement représentée dans la littérature et intervient dans l'angiogenèse, l'inflammation, les réponses immunitaires et d'autres mécanismes. La phosphatase PPM1B est également largement étudiée et son rôle a notamment été démontré dans le développement mais aussi les phénomènes de mort comme la nécroptose, la sénescence et également la réponse antivirale³²⁷⁻³²⁹. Ici, nous nous intéressons à la phosphatase PPM1D, également connue sous le nom de Wip1 qui intervient dans de nombreux processus physiologiques et pathologiques. Le **Tableau 2** résumant les principales cibles et voies de morts dans lesquels les PP2Cs sont impliquées.

Tableau 2 : Rôle des membres de la famille PP2C dans la mort cellulaire programmée et la sénescence

| Protéines de la famille des PP2Cs | Types de morts cellulaires ou sénescence | Substrats | Références |
|------------------------------------|--|---|------------|
| PPM1A (PP2C α) | Apoptosis | n.d. | 330 |
| | | BAD (Bcl-2/Bcl-XL-antagonist, causing cell death) | 331 |
| | | p53 | 332 |
| | | Smad2, Smad3 | 333 |
| | | LEF-1 (Wnt pathway) | 334 |
| | Autophagy | p62-SQSTM1 | 335 |
| Senescence | CDK2, CDK6 | 336 | |
| PPM1B (PP2C β) | Apoptosis | n.d. | 330 |
| | | BAD (Bcl-2/Bcl-XL-antagonist, causing cell death) | 331 |
| | | IKK β | 337 |
| | Autophagy | ULK1 | 207 |
| Senescence | CDK2, CDK6 | 336 | |
| PPM1D/Wip1 (PP2C δ) | Apoptosis | p53 | 338–340 |
| | | ATM | 341 |
| | | ATR | 341 |
| | | CHK1 | 342 |
| | | CHK2 | 343 |
| | | RUNX2 | 340 |
| | | Nf κ B | 340 |
| | | p38MAPK pathway | 344,345 |
| | TGF β | 346 | |
| | Autophagy | ATM | 341 |
| | | ULK1 | |
| | | mTOR | 347 |
| | NETosis | STING pathway | |
| | | p38MAPK-STAT1 pathway | 348 |
| | | Coronin-1a | 349 |
| | | n.d. | 350 |
| | | n.d. | 351 |
| H2AX | | 352,353 | |
| Senescence | P53 - p21 pathway | 354,355 | |
| | P53-mTORC1 pathway | 356 | |
| | P38 - p16 pathway | 357–359 | |
| | STING pathway | 360 | |
| PPM1G (PP2C γ) | Apoptosis | | |
| | Senescence | p21WAF1/CIP1/Akt pathway | 361,362 |
| PPM1L (PP2C ϵ) | Apoptosis | ASK1 | 363 |
| PPM1K (PP2C μ) | Apoptosis | n. d. | 364 |
| | Ferroptosis | BCKDHA | |
| | Senescence | MEIS1/p21 | 365 |
| PPM1F (CaMKP/POPX2) | Apoptosis | F1A α | 366 |
| PHLPP/ SCOP | Apoptosis | Akt | 367 |

3. Focus sur la phosphatase Wip1, une cible thérapeutique prometteuse

3.a Structure et activité phosphatase

Appartenant à la famille des PP2Cs, la protéine Wip1 est une sérine-thréonine phosphatase codée par le gène PPM1D qui a été identifiée pour la première fois en 1997³⁶⁸.

Le gène PPM1D se trouve sur le chromosome 17 chez l'Homme et sur le chromosome 11 pour la souris permettant d'obtenir respectivement une protéine de 605 et de 598 acides aminés. Une homologie de 83% est observée entre ces deux espèces. Produit de ce gène, la protéine Wip1 est une sérine-thréonine phosphatase monomérique pouvant être subdivisée en deux domaines majeurs. Un premier domaine N-terminal à activité phosphatase (composé des acides aminés 1 à 375) très fortement conservé au sein des mammifères, et un second domaine C-terminal (composé des acides aminés 376 à 605) moins conservé, sans activité catalytique, qui joue un rôle dans la localisation nucléaire de Wip1^{369,370}.

L'appellation Wip1 signifiant "Wild-type p53 induced protein phosphatase 1" a été attribuée à cette protéine notamment par sa fonction de régulation négative de la voie p53. En effet, la phosphatase Wip1 déphosphoryle p53 et de nombreux cofacteurs et effecteurs associés à cette voie tels que ATM/ATR et seront décrits ultérieurement. Depuis plusieurs années, plusieurs substrats de cette phosphatase ont été découverts et les premiers décrits sont p53, p38, Chk1/2, ATM et Mdm2³⁶⁹. Des études *in vitro* ont pu établir que les substrats de la phosphatase Wip1 présentent des séquences communes. Ainsi, la phosphatase Wip1 est capable de reconnaître spécifiquement deux motifs de substrats distincts à savoir pSQ/pTQ (présents dans ATM, p53, Mdm2, γ H2AX, Chk1, Chk2) et pTxyY (présents dans la forme active de p38 MAPK)³⁷¹. Une étude de phosphoprotéomique réalisée en 2022 a pu identifier un grand nombre de substrats potentiels de Wip1 à la suite d'une exposition d'un traitement à l'étoposide induisant des dommages à l'ADN. Ces substrats possèdent tous des motifs pSQ/pTQ et révèlent un enrichissement des résidus d'acide glutamique entourant le résidu sérine phosphorylé³⁷². Ainsi, la phosphatase possède différentes protéines cibles et est donc impliquée dans plusieurs mécanismes cellulaires et sont détaillés ci-dessous.

3.b Wip1, régulateur de divers morts cellulaires et senescence

Comme décrit précédemment, la phosphatase Wip1 a été découverte en 1997 avec les études portant sur p53 en décrivant ainsi cette phosphatase comme cible de p53. La phosphorylation de p53 a vite été décrit comme mécanisme majeure de la régulation de cette protéine³⁷³. Par ailleurs, l'augmentation de l'expression de Wip1 à la suite de dommages à l'ADN forme une boucle de rétrocontrôle négatif en déphosphorylant p53 et en permettant à MDM2 d'ubiquitinyler p53 menant à

sa dégradation³⁷⁴. Cité précédemment, la phosphatase Wip1 déphosphoryle un grand nombre de protéines comme ATM³⁴¹, H2AX³⁷⁵, Chk1³⁷⁶, Chk2³⁴³, mTOR³⁵⁶, p38 MAPK^{348,357}, ULK1^{377,378}, NF-κB^{379,380}, Coronin-1a³⁴⁹. En raison de la diversité de ces cibles, la phosphatase Wip1 est impliquée dans de multiples processus cellulaires tels que la réponse aux dommages à l'ADN (DDR), la prolifération cellulaire et diverses morts cellulaires comme l'indique la **Figure 19**. De plus, nous pouvons observer que la phosphatase Wip1/PPM1B reste la PP2Cs la plus décrite et connue de la littérature.

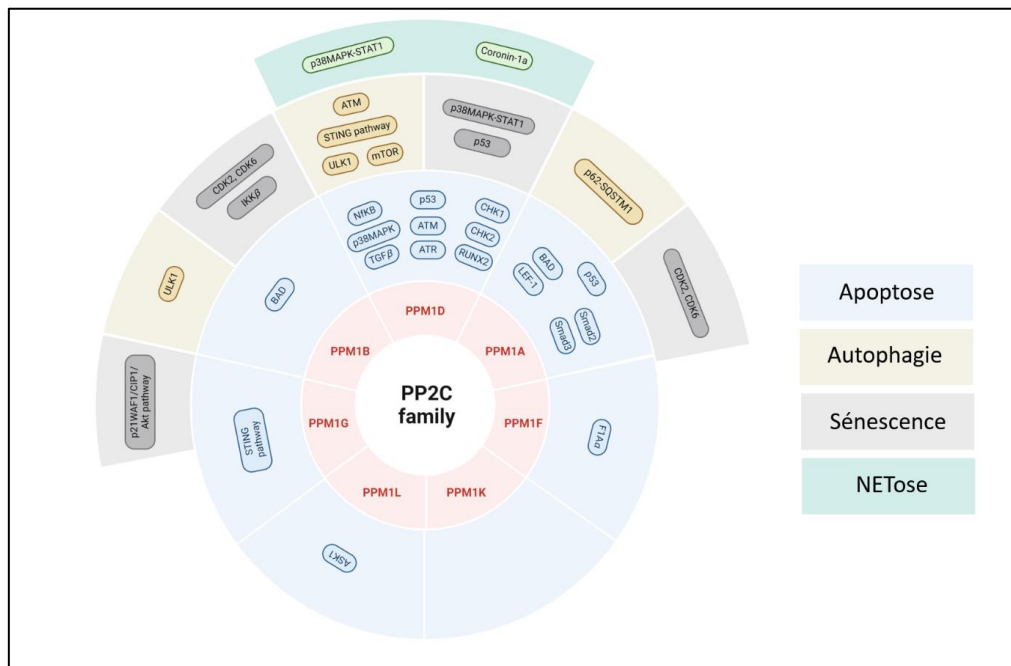


Figure 19 : Rôles des phosphatases de la famille des PP2Cs dans les différentes voies de morts et la sénescence. L'abréviation ND indique « no data » pour les cibles de certaines PP2Cs.

3.b.i Wip1, régulateur de l'apoptose

Régulateur clef de l'apoptose, p53 est un régulateur transcriptionnel de nombreux gènes pro-apoptotiques comme Bax³⁸¹, Puma³⁸² ou encore Noxa³⁸³. Par son action de déphosphorylation directe avec p53 ou avec des protéines en amont comme ATM, CHK2 et bien d'autres, la surexpression de Wip1 protège les cellules de l'apoptose³⁸⁴. Inversement, la délétion de Wip1 change significativement le seuil d'activité de p53 vers l'apoptose. Plusieurs études ont pu montrer un lien fort entre l'induction de l'apoptose et Wip1 de façon p53-dépendante. Dans les cellules souches intestinales de souris déficientes pour Wip1, l'augmentation de l'apoptose dépendante de p53 en cas de dommages à l'ADN ou de stress oncogène permet de réduire le nombre de polypes intestinaux et prolonger la vie des souris présentant une mutation APC (Min)³³⁸. Lorsque que p53 est supprimé dans les tissus des souris APC (Min) Wip1^{-/-}, on inverse le phénotype en atteignant un nombre de tumeurs similaires au phénotype sauvage. Quand les gènes *Cdkn2a*, *Chk2* ou encore *Gadd45a* sont délétées, on observe également un phénotype proche du phénotype sauvage³⁸⁵. En revanche, lorsque p53 est absent des

cellules, la délétion de Wip1 n'affecte pas l'induction de l'apoptose³³⁹. Inversement, dans les cellules d'ostéosarcome SAOS2 déficientes pour p53 la surexpression de Wip1 active l'expression de Bax et ainsi l'apoptose en supprimant la phosphorylation inhibitrice du facteur de transcription RUNX2 régulant Bax. Dans ces cellules p53 négatives, la surexpression de Wip1 active également l'apoptose en réduisant les niveaux anti-apoptotiques de Bcl-XL par la suppression de la voie NFκB³³⁹. L'implication de Wip1 dans l'apoptose est résumée par la **Figure 20**.

Récemment, de nombreuses études ont pu décrire que l'inhibition de Wip1 représente une potentielle stratégie thérapeutique afin de potentialiser l'apoptose induite par chimiothérapies ou la thérapie ciblée dans les tumeurs solides^{338,341} et hématologiques³⁸⁶⁻³⁸⁸. Il est important de noter que l'inhibition de Wip1 seule n'impacte pas la croissance des cellules cancéreuses alors que son inhibition combinée à des agents chimiothérapeutiques ou des radiations renforce significativement leurs effets^{386,388,389}.

3.b.ii Wip1, régulateur de l'autophagie

Décrit précédemment, l'autophagie est un processus cellulaire permettant le recyclage et la dégradation de nombreux composés cellulaires. L'autophagie est orchestrée par la formation de l'autophagosome lui-même régulé par l'expression du complexe ULK1³⁹⁰. A son tour, le complexe ULK1 est régulé négativement par plusieurs facteurs comme mTOR³⁹¹.

Le rôle de la phosphatase Wip1 dans l'autophagie a principalement été décrit à travers son implication dans la signalisation ATM-mTOR dans des études étudiant le métabolisme des acides gras, l'efflux du cholestérol des macrophages et l'athérosclérose^{347,392}. En effet, ces mécanismes sont contrôlés par la cascade ATM-mTOR³⁹³ qui peut à son tour être modulée par Wip1 à travers la phosphorylation directe de ATM³⁴¹. Enfin, l'utilisation de modèle *in vivo* a permis de démontrer que la délétion de Wip1 réduit l'activation de mTOR entraînant une diminution de l'accumulation de gouttelettes lipidiques dans les macrophages. Réciproquement, cela empêche la formation de cellules spumeuses et par conséquent réduit la formation de plaque d'athérosclérose³⁴⁷.

Le rôle de la phosphatase Wip1 dans l'autophagie ne se limite pas à son implication dans l'axe ATM-mTOR mais intervient également dans la régulation de ULK1. En effet, la phosphatase Wip1 a été reportée comme étant impliquée dans l'autophagie basale et induite par un stress génotoxique à travers la déphosphorylation de ULK1^{377,378}. Comme décrit ci-dessus, le complexe ULK1 joue un rôle crucial dans l'induction de l'autophagie notamment lors de privation d'acides aminés. En présence d'acides aminés, ULK1 est phosphorylé et rendu inactif par mTORC1 et l'AMPK sur différents résidus sérine/thréonine^{394,395}. A l'inverse, en cas de privation d'acides aminés, ULK1 est déphosphorylé et conduit à l'induction de l'autophagie³⁹⁰. Deux études ont alors décrit que la phosphatase Wip1 est capable de déphosphoryler ULK1 au niveau de la Ser637 et ainsi induire l'autophagie à un niveau basale

mais aussi à la suite d'un stress génotoxique^{377,378}. Dans les cellules MCF-7 possédant un niveau basal élevé pour la protéine Wip1, Ak *et al* ont montré que cette phosphatase est capable de déphosphoryler ULK1 en Ser637 associé à une accumulation de LC3-II ou encore la dégradation de p62. L'implication de Wip1 dans l'autophagie par la régulation de ATM, mTOR et ULK1 sont décrits par la **Figure 20**.

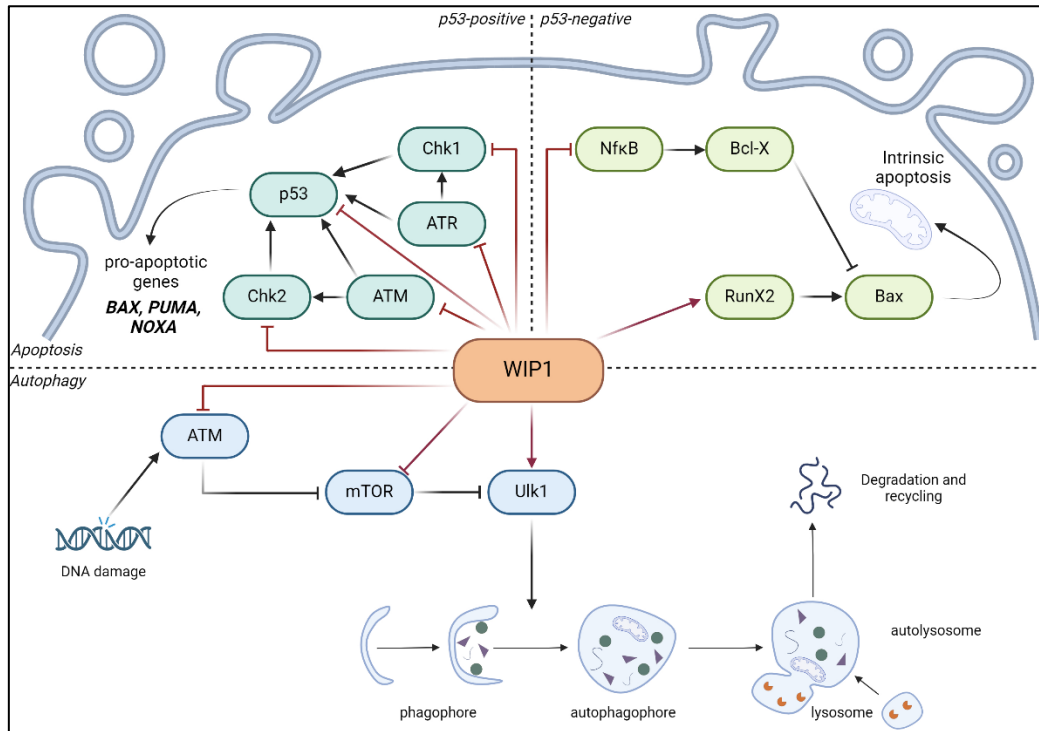


Figure 20 : La phosphatase Wip1, régulateur de l'apoptose et l'autophagie. Wip1 est un régulateur négatif de l'apoptose d'une façon p53 dépendante par son interaction directe avec ATM, ATR, Chk1, Chk2 et p53. Dans les cellules p53-négatives, la surexpression de Wip1 régule positivement l'apoptose par son inhibition de NfκB et l'activation de RUNX2. Wip1 régule positivement l'autophagie par ses fonctions inhibitrices sur ATM et mTOR qui sont des régulateurs négatifs de l'autophagie. Par ailleurs, Wip1 déphosphoryle ULK1, ce qui entraîne son activation et la formation d'autophagophores responsables des mécanismes d'autophagie.

Pour finir, Wip1 est également impliqué dans l'autophagie à travers la signalisation STING³⁹⁶. Il est maintenant bien connu que STING est responsable de l'autophagie³⁹⁷ et que la cascade STING/TBK1/IRF3 est associée au développement de pancréatite aiguë³⁹⁶. Dans le travail de Song *et al*, les auteurs ont montré que les cellules AR42J Wip1 KO présentent une diminution de la signalisation STING-TBK1, de l'autophagie et de la sévérité de la pancréatite aiguë³⁹⁶. Ces résultats suggèrent alors que la phosphatase Wip1 est impliquée dans l'autophagie et le développement de la pancréatite à travers l'axe STING-TBK1.

3.b.iii Wip1, régulateur de la NETose

Les pièges extracellulaires de neutrophiles appelés NETs pour « Neutrophil Extracellular Traps » sont des structures composées d'ADN, d'histones et de protéines provenant des granules et cytoplasmes des neutrophiles³⁹⁸. Ces structures spécifiques des neutrophiles ont pour principales fonctions

l'élimination de pathogènes et la formation de ces NETs est décrit comme une forme de mort cellulaire spécifique et caractéristique des neutrophiles activés appelée NETose³⁹⁹.

En 2013, la phosphatase Wip1 est décrite comme participant au développement et la maturation des neutrophiles comme régulateur négatif de la voie p38 MAPK et la voie STAT1³⁴⁸. Dans ce travail, la protéine Wip1 est décrite comme participant à la défense antibactérienne, à la migration et au processus inflammatoire des neutrophiles. Ces effets ont également été confirmés en 2017 dans une étude utilisant des souris Wip1 -/- soumises à une septicémie³⁵⁰. Plus récemment, une étude a pu montrer que Wip1 est capable d'inhiber la formation de NET lors d'infection à travers la voie calcique³⁴⁹. Ceci est notamment dû au fait que Wip1 est capable de déphosphoryler directement la Coronin-1a. Ainsi, comme Wip1 représente un régulateur négatif de la NETose, cibler cette protéine représente une cible intéressante pour les thérapies antibactérienne.

3.b.iv Wip1, régulateur de la sénescence

Régulateur clef de la réponse DDR, la phosphatase Wip1 se présente comme un inhibiteur de multiples protéines intervenant dans cette voie. Parmi ces protéines, la voie p53-p21 joue un rôle crucial dans l'induction de la sénescence⁷⁶ et la voie p38-p16 a également été décrite comme participant à l'état de sénescence des cellules^{357,359,400,401}. Par définition, la sénescence se caractérise par un arrêt du cycle cellulaire permanent associé à une augmentation de l'expression de p16 et p21 étant des inhibiteurs de kinases cyclines-dépendantes. Comme décrit précédemment dans ce travail, les cellules en sénescences restent métaboliquement actives et sécrètent un grand nombre de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires appelées SASP⁴⁰² qui peuvent exercer des effets négatifs sur l'oncogenèse et le vieillissement cellulaire⁴⁰³. Ainsi, l'élimination des cellules en sénescence représente un axe important de la recherche mondiale et la phosphatase Wip1 se présente comme une cible et un régulateur important de cette voie. Dans la sénescence et le vieillissement cellulaire, Wip1 agit au niveau de l'axe p53-p21 et au niveau de l'axe p38-p16.

V.3.b.iv.1 Axe p53-p21

Les travaux qui ont permis de déchiffrer l'implication de Wip1 dans la sénescence à travers l'axe de p53-p21 ont principalement été permis avec l'utilisation de fibroblastes d'embryon de souris (appelés MEF pour Mouse Embryonic Fibroblasts) isolés à partir de souris Wip1 -/-. En effet, il a été montré que les MEFs Wip1 -/- subissent une sénescence prématurée³⁵³. Le niveau de sénescence des cellules au sein d'une tumeur joue un rôle important dans son développement et est généralement médié par l'axe p53-p21. Hormis son implication dans l'apoptose, le rétablissement de la cascade p53 peut activer la sénescence. Dans des modèles de sarcomes de tissus mous, de carcinome hépatocellulaire ou

d'adénocarcinome du poumon, l'activation de la voie p53 induit la sénescence suivie de l'élimination de la tumeur par activation immunitaire⁴⁰⁴⁻⁴⁰⁶.

Régulateur de nombreuses voies de signalisation cellulaires dont les processus de morts, plusieurs inhibiteurs de Wip1 ont été développés comme stratégies thérapeutiques contre le cancer⁴⁰⁷. Comme Wip1 est un régulateur négatif de la cascade p53 son inhibition peut permettre la restauration de l'activité de p53 et ainsi moduler l'induction de la sénescence. Ainsi, l'utilisation d'inhibiteur a pu montrer que l'inhibition pharmacologique de Wip1 augmente les niveaux d'expression de p21 qui est impliqué dans la sénescence^{354,408,409}. Ainsi, inhiber Wip1 par l'utilisation d'inhibiteur afin d'augmenter la sénescence représente une potentielle stratégie thérapeutique pour de nombreux cancers. Cette stratégie est notamment intéressante dans le contexte de maladies onco-hématologiques où Wip1 peut être surexprimée après la sélection de l'hématopoïèse clonale⁴¹⁰. Malgré les nombreux progrès réalisés dans les traitements des maladies onco-hématologiques, le taux de rechute chez les patients reste élevé. Ceci est notamment dû au fait que malgré l'utilisation de traitements éliminant les cellules tumorales, certaines restent à l'état de dormance au sein de niche dans la moelle osseuse. Ces cellules persistantes sont capables plus tard de réintégrer le cycle cellulaire grâce à l'accumulation de nombreuses mutations et instabilité génomique qu'elles possèdent^{388,411,412}. La ré-intégration des cellules tumorales dans le cycle cellulaire à la suite d'un phénotype de sénescence qui devrait être un état irréversible, est une caractéristique des cellules tumorales de diverses origines⁴¹³. Ainsi, il a été montré que l'expression de Wip1 est diminuée lors de l'acquisition de ce phénotype sénescence. Cette réduction est donc nécessaire pour l'établissement de l'arrêt du cycle cellulaire. Au contraire, la réintroduction de l'expression de Wip1 entraîne la reprise du cycle cellulaire⁴¹⁴. Ces résultats ont été obtenus à l'aide d'un modèle de sénescence induite par la thérapie nommée TIS (Therapy-Induced Senescence), caractéristique des cellules tumorales. On observe la TIS lors de traitement traditionnels contre le cancer comme avec la radiothérapie, la chimiothérapie ou encore l'immunothérapies⁴¹³. Enfin, il a été démontré qu'une réduction de l'expression de Wip1 et une augmentation de p53 sont essentielles à l'induction de la TIS dans les cellules cancéreuses à la suite de traitement chimiothérapeutiques⁴¹⁴.

L'une des conséquences de l'accumulation de cellules en sénescence au sein d'une tumeur est la sécrétion et l'accumulation de SASP^{415,416}. Les cellules réalisant une sénescence prématurée avec un niveau élevé d'expression de Wip1 développent et sécrètent également de nombreux SASP⁴¹⁷. De plus, des études indiquent que p53 est l'un des principaux régulateurs de SASP et les cellules dépourvues de p53 sécrètent des niveaux plus élevés de plusieurs composants de SASP⁴¹⁸. Ainsi, comme Wip1 est un régulateur négatif de p53, l'expression forcée de Wip1 entraîne une augmentation de l'expression de cytokines et chimiokines participant à la sénescence, mais la fonction exacte de

Wip1 et les mécanismes mis en jeu doivent être davantage explorés⁴¹⁴. Une étude de 2011 montre des résultats appuyant cette hypothèse puisqu'il a été montré que l'activité de Wip1 diminue avec l'âge, probablement dû à un déclin de la fonction de p53 conduisant à une augmentation de l'activité des voies p38-MAPK et NFκB responsables d'une sénescence prématurée et inflammation chronique dans certains tissus³⁸⁰. Néanmoins, la relation entre Wip1 et les SASP n'est pas clairement établie.

V.3.b.iv.2 Axe p38-p16

Un grand nombre d'études ont pu montrer que l'inhibition de p38 à la suite de diverses conditions de stress prévient la sénescence ou l'arrêt de croissance cellulaire en bloquant l'expression de p16^{357,359,400,401}. L'un des premiers travaux à ce sujet fût en 2004 où Bulavin *et al* ont pu montrer que les MEFs Wip1 -/- étaient résistants à la transformation néoplasique en présence de différentes paires d'oncogènes complémentaires comme Ras, myc ou Erbb2. Ces auteurs ont alors conclu que l'inactivation ou la déplétion de Wip1 et l'activation de la MAPK p38 suppriment la tumorigenèse en modulant p16 (également appelé Cdkn2a)³⁵⁷. Les mêmes résultats ont été obtenus dans des modèles de lignées humaines. Dans les tissus de cancer du sein humain, les niveaux d'expression de Wip1 sont inversement corrélés à l'activité de p38 et des niveaux faibles de p16³⁵⁹. Également dans des cellules du cancer du sein, le niveau d'expression de Wip1 augmente l'activité de p38 MAPK et le niveau protéique de HBP1 étant responsable de l'induction de la sénescence. Dans ce travail, les résultats s'intéressent à HBP1 et non pas à p16 dans la sénescence. Zhang *et al* proposent alors que HBP1 ne régule pas la sénescence réplivative comme cela avait pu être démontré dans des fibroblastes humains⁴¹⁹. Enfin, un autre travail portant sur le rôle de Wip1 dans l'échappement à la sénescence dans des cellules souches mésenchymateuses humaines s'intéresse à ce mécanisme⁴²⁰. Ainsi, lorsque Wip1 est introduit dans les cellules souches mésenchymateuses cela induit la diminution de l'activation de p38 augmentant ainsi l'expression de p16 et donc l'activation de la sénescence. Dans ces mêmes cellules, l'expression de p21Cip1 qui est un effecteur de la voie p53 dans la sénescence n'est pas induit dans ce mécanisme confirmant que la voie est médiée par l'axe p38-p16.

Ainsi, l'utilisation de modèles de souris modifiées pour p38α et/ou WIP1 a permis de mieux comprendre les mécanismes de régulation de la prolifération et du vieillissement cellulaires dépendant de p16³⁵⁸. En effet, il a été observé que durant le vieillissement cellulaire Wip1 est diminué tandis que p38MAPK est augmenté. Dans les cellules β du pancréas, il a été montré que p16 (Cdkn2a) est réprimé transcriptionnellement par BMI1. Cependant, dans ces cellules en sénescence les kinases p38 MK2/MK3 phosphorylent BMI1 induisant ainsi la transcription de p16 et p19³⁵⁸. L'expression de ces inhibiteurs du cycle cellulaire conduit à une réduction de la prolifération et à la régénération de certains types de cellules auto-renouvelables. De plus, cette même étude montre une expression élevée des signalisations dépendantes de p38-MAPK dans les souris Wip1 -/- jeunes ou âgées. A

l'inverse, les souris surexprimant Wip1 montrent une réduction de la phosphorylation de p38-MAPK et ainsi un déclin des ARN messagers de p16 (Cdkn2a) et ARF, résultant d'une prolifération des îlots pancréatiques³⁵⁸. Ainsi, Wip1 se présente comme un important régulateur de p38-MAPK dans le processus de vieillissement.

Les principales cibles de Wip1 dans la sénescence sont résumées par la **Figure 21**.

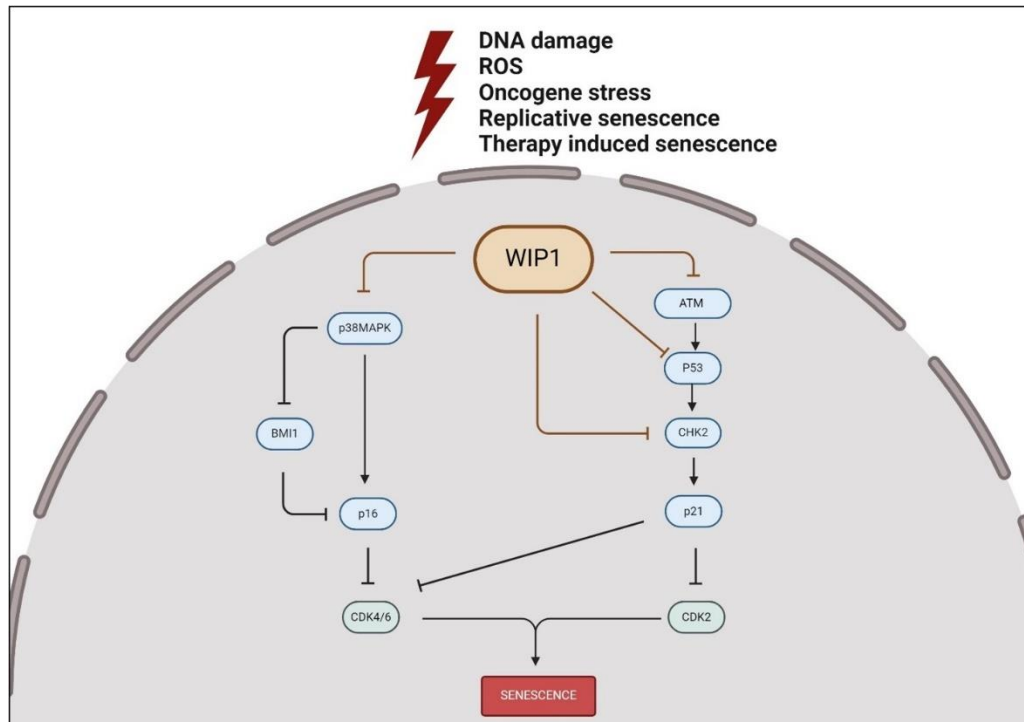


Figure 21 : Rôle de Wip1 dans la sénescence, représentation schématique des voies de signalisation majeures. Dans l'axe p53-p21, Wip1 régule la sénescence principalement par son interaction négative directe avec ATM, p53 et Chk2 entraînant une réduction de p21 qui diminue l'induction de la sénescence. Dans l'axe p38-p16, Wip1 agit comme un régulateur négatif par son interaction avec p38MAPK conduisant à une réduction de p16 qui entraîne une diminution de la sénescence.

Par ailleurs, de nombreuses études s'intéressent au rôle de Wip1 dans le vieillissement des cellules immunitaires. En effet, Chen *et al* ont démontré que l'expression de Wip1 dans les cellules souches hématopoïétiques (CSH) diminue drastiquement avec l'âge et que les souris Wip1 *-/-* présentent une accélération du vieillissement des CSHs associée à une augmentation de p53 et mTORC1. L'altération de la cascade de signalisation Wip1-p53 chez les souris déficientes pour Wip1 mène à un dysfonctionnement dans la différenciation des CSHs conduisant à une augmentation des cellules myéloïdes dans le sang périphérique. De plus, la dérégulation de la cascade Wip1-mTORC1 dans les CSHs de souris est également associée à l'expansion de ces cellules. Par conséquent, la phosphatase joue un rôle dans le vieillissement des CSHs via les voies en aval à savoir celles contrôlées par p53 et mTORC1³⁵⁶.

3.c Autres fonctions de Wip1

Hormis son rôle dans diverses morts cellulaires, la phosphatase Wip1 participe à de nombreuses fonctions et sont décrites ci-dessous. Le rôle prépondérant de celle-ci dans le vieillissement des CSHs³⁵⁶ et dans l'hématopoïèse clonale⁴²¹⁻⁴²³ décrits précédemment suggèrent une fonction importante de cette protéine dans l'hématopoïèse et la génération des leucocytes.

3.c.i *Wip1, un médiateur clé de l'hématopoïèse et du système immunitaire*

V.3.c.i.1 *Hématopoïèse*

Plusieurs études ont déjà établi un lien entre la phosphatase Wip1 et l'homéostasie des CSHs intestinales et mésenchymateuses^{338,420}. Les CSHs sont des cellules aux capacités d'auto-renouvellement qui permettent d'obtenir tous les types cellulaires sanguins et se distinguent entre les CSHs à long terme (LT-CSH) et les CSH à court terme (ST-CSH). Chen *et al* ont alors démontré que la protéine Wip1 était exprimée à des niveaux plus élevés au sein des LT-CSHs que des ST-CSHs et contrôlerait le processus de différenciation et d'homéostasie des CSHs³⁵⁶. Le rôle de la protéine Wip1 dans l'hématopoïèse a également été démontré grâce à des expériences de transplantations de moelle osseuse. Lorsque des animaux irradiés reçoivent la moelle osseuse de souris Wip1^{-/-} alors ces cellules de moelle osseuse présentent une perte remarquable de leurs capacités régénératives. De plus, des études *in vitro* vont dans le même sens et ce mécanisme semble être p53 dépendant notamment dans la différenciation des CSHs. Ainsi, cette étude démontre que Wip1 module la différenciation et l'activité des CSHs aux stades précoces des cellules présentant une pluripotence élevée³⁵⁶.

Pour résumer, dans des conditions physiologiques l'activité de Wip1 est de maintenir la quiescence des CSHs et faciliter leur différenciation. Lorsque Wip1 est absent, cela conduit à un vieillissement prématuré des CSHs qui est associé à des taux d'auto-renouvellement plus élevés et à une différenciation plus faible. Cela résulte ensuite d'une perte de capacité de régénération des cellules de la moelle osseuse déficientes pour Wip1.

V.3.c.i.2 *Lymphocytes T*

Ainsi, la phosphatase Wip1 intervient dans de nombreuses fonctions cellulaires et participe grandement à l'arrêt du cycle cellulaire ou encore l'apoptose. Dans le développement des cellules immunitaires, la différenciation des lymphocytes T se caractérise par une augmentation des dommages à l'ADN due à la réorganisation du TCR⁴²⁴. Régulateur des réponses aux dommages à l'ADN, une étude utilisant des modèles de souris déficientes pour Wip1 a pu montrer une absence de prolifération des lymphocytes T dans ces animaux. Dans cette même étude, ces animaux présentent également une forte sensibilité aux infections virales et une histologie anormale des organes lymphoïdes⁴²⁵. En réponse à ces observations, un travail de Schito *et al* a pu démontrer le rôle de Wip1

dans la maturation des cellules T dans le thymus⁴²⁶. De plus, les mécanismes de sélection des lymphocytes matures en lymphocytes T ou B dans le thymus sont régulés par de nombreux processus post-traductionnels. L'un des mécanismes connus est l'inhibition de p38MAPK pour le bon développement des lymphocytes T⁴²⁷. Bien que Wip1 est pour cible p38, l'étude de Schito *et al* montrent que l'inhibition de p38MAPK ne permet pas de restaurer le phénotype sauvage chez la souris Wip1^{-/-}. Bien au contraire, la suppression de p53 dans ce modèle permet de rétablir le phénotype sauvage et la différenciation fonctionnelle des lymphocytes T. Dans les souris doublement déficientes pour Wip1 et p53, la taille du thymus des souris est de taille normale. Ainsi, la phosphatase Wip1 dirige la mort et l'arrêt du cycle cellulaire des lymphocytes T en développement de manière p53 dépendante. Enfin, Sun *et al* apporte établissent également que Wip1 permet de réguler la maturation, la régénération et l'homéostasie des cellules épithéliales thymiques⁴²⁸.

V.3.c.i.3 Lymphocytes B

Tout comme les lymphocytes T, la recombinaison V(D)J impliquée dans la formation des récepteurs des lymphocytes B et la maturation de ces cellules est orchestrée par des mécanismes qui génèrent d'importants dommages à l'ADN et ainsi une activation de p53 à certains stades⁴²⁹. Ainsi, l'étude de Wip1 dans ces mécanismes fait sens. C'est dans ce contexte que Yi *et al* ont observé que les souris déficientes pour Wip1 possédaient un nombre très faible de lymphocytes B dans la moelle osseuse mais aussi au niveau de la rate et du sang périphérique⁴³⁰. L'absence de la phosphatase Wip1 se manifeste également par des troubles majeurs dans les phases de développement précoces des lymphocytes B avec une mortalité élevée et un blocage au stade pré-B du développement. Lorsque que p53 est absent en plus de Wip1, tout comme pour les lymphocytes T on observe une restauration du déficit en lymphocytes B. Ainsi, la phosphatase Wip1 permet de réguler la maturation et la prolifération de lymphocytes B dans la moelle osseuse par des mécanismes p53-dépendants.

V.3.c.i.4 Cellules myéloïdes

A l'inverse des lymphocytes, l'absence de Wip1 a un effet positif sur la différenciation et le développement des granulocytes puisque les souris déficientes pour cette phosphatase présentent une neutrophilie sévère⁴³¹. Un niveau faible de Wip1 s'observe au sein des progéniteurs et au fur et à mesure de la maturation vers un phénotype différenciée, son expression augmente. En conditions physiologiques, l'augmentation de l'expression de Wip1 lors de la maturation et la production de neutrophiles empêche la différenciation des progéniteurs myéloïdes communs en granulocytes matures pro-inflammatoires au détriment des autres cellules myéloïdes. En effet, une étude a pu montrer l'action de Wip1 sur la signalisation p38MAPK-STAT1⁴³¹. Cependant, à l'inverse de la différenciation des lymphocytes B et T la suppression de p53 ne permet pas de rétablir un phénotype sauvage et empêcher la neutrophilie dans les souris déficientes pour Wip1. Autres cellules myéloïdes,

peu d'études se sont intéressées au rôle de Wip1 dans les macrophages. Dans ces cellules la fonction de Wip1 a principalement été décrite dans des modèles murins d'athérosclérose. Ainsi, la suppression de Wip1 empêche la formation de plaques d'athérosclérose en supprimant le changement des macrophages en cellules spumeuses⁴³². Dans cette même étude, il est à noter que les macrophages déficients pour Wip1 présentent une inhibition de la voie mTOR. Cependant, le mécanisme décrit n'implique pas les cibles connues de Wip1 comme p53 ou encore p38MAPK et n'est déclenchée que par l'hyperactivation de la kinase ATM dans les souris Wip1 -/-.

Focus sur nos derniers travaux de recherches

C'est dans ce contexte que s'inscrivent les travaux de recherche de notre équipe publiés en 2021⁴³³. Dans notre travail, nous avons démontré que l'absence de Wip1 dans les CSHs ou encore dans les neutrophiles permet une réduction tumorale. A l'inverse de la majorité des études citées précédemment, des modèles de délétions conditionnelles ont été utilisés permettant d'étudier comment l'absence dans un type cellulaire spécifique et non pas à l'échelle de l'organisme impacte la tumorigenèse. Pour étudier l'effet de l'absence de Wip1 dans les CSHs, des modèles Fes-Cre ont été générés afin d'obtenir des animaux déplétés pour Wip1 uniquement dans les cellules exprimant la promoteur Fes, qui est exprimé dans les CSHs. Comme dans les modèles de déficience totale, ces animaux présentent des signes de lymphopénie et de neutrophilie progressant avec l'âge. Pour étudier l'effet sur la croissance tumorale, des modèles de croissance tumorale syngénique utilisant les cellules de mélanome B16-F10 ou de cancer pulmonaire LLC1 ont été utilisées. Après injection de ces cellules en sous-cutannée, les souris Fes-Cre présentent une croissance tumorale largement diminuée par rapport aux souris sauvages. Pour confirmer ces résultats, des transferts adoptifs de moelle osseuse sur souris irradiées ont été mis en place. Ainsi, les souris recevant des moelles de souris Wip1 -/- présente les mêmes effets sur la croissance tumorale. Enfin, des modèles de surexpression de Wip1 dans les CSHs ont été utilisés et on observe le phénotype inverse de croissance tumorale soit une croissance tumorale accrue par rapport aux souris sauvages. Ces résultats corrélerent avec les mauvais pronostics associés à une surexpression de Wip1 dans les cellules du sang observés chez les patients. Puisque que les tumeurs de souris Fes-Cre présentent un infiltrat immunitaire augmenté, un immunophénotypage a été réalisé pour déterminer quels sous types de cellules immunitaires différenciées étaient responsables du phénotype immunosuppresseur. L'immunophénotypage de l'infiltrat a mis en avant que cette augmentation était due aux neutrophiles déficients pour Wip1. Pour corroborer avec ces observations, des expériences de croissance tumorale combinées à des anticorps déplétant ont été effectuées. Ainsi, les souris recevant des anticorps dirigés contre les neutrophiles présentent une augmentation de la tumeur signifiant que l'épuisement des neutrophiles Wip1 KO entraîne une perte complète de l'effet tumorale.

Comme les neutrophiles déplétés pour Wip1 semble être responsables de la réponse anti-tumorale, des modèles murins LysM-Cre ont été développés. Le promoteur LysM est présent dans les cellules myéloïdes et en particulier dans les neutrophiles. Lorsque des modèles de croissance tumorale ont été réalisés, les animaux LysM-Cre présentent une croissance tumorale diminuée confirmant les précédents résultats. Pour comprendre les mécanismes mis en jeu, des études cytokiniques ont été effectuées. Les tumeurs de souris LysM-Cre présentent alors un profil de sécrétion cytokinique pro-inflammatoire qui permet d'expliquer le phénotype anti-tumoral observé. Des investigations supplémentaires ont permis de mettre en évidence que Wip1 module les capacités anti-tumorales des neutrophiles directement en stimulant leurs capacités cytotoxiques et indirectement en favorisant la survie et l'activation des lymphocytes T.

Afin de transposer ces résultats à l'Homme, des expériences *in vitro* ont été réalisées en utilisant des neutrophiles isolés de sang humain traités avec un inhibiteur pharmacologique de Wip1, le GSK2830371. Des expériences de western blot, qPCR et co-culture ont été réalisées sur des échantillons de patients ainsi que sur des cellules issues de sang de donneur sain et suivent la même tendance que ceux observés chez la souris. Les résultats de ces travaux ont donné lieu à une publication dans le journal Nature Communications (présent à la fin du document).

V.3.c.i.5 Réponse inflammatoire

Les modèles génétiques de déficiences pour la phosphatase ont également permis de mettre en évidence que cette protéine régule les réponses inflammatoires. En plus d'une hyperplasie des organes lymphoïdes et d'une désorganisation structurelle des organes Choi *et al* ont remarqué une inflammation chronique des tissus normaux chez les souris déficientes pour Wip1⁴²⁵. Connaissant le rôle de Wip1 dans la différenciation et le développement des cellules hématopoïétiques ainsi que dans les cellules immunitaires, le phénotype pro-inflammatoire observé dans ces animaux pourrait s'expliquer par une hyperactivation des cellules de l'immunité innée. De plus, comme le montre Sun *et al* l'absence de Wip1 conduit à une activation prolongée de p38MAPK et NFκB responsables de phénomènes inflammatoires⁴²⁸. Dans un contexte de maladie inflammatoire de l'intestin, les neutrophiles déficients pour Wip1 présentent une production accrue de cytokines pro-inflammatoires⁴³⁴. Comme dans le modèle LysM-Cre cité précédemment⁴³³.

Dans un contexte de réponse inflammatoire cutanée induite par l'exposition au TPA (12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate), la déficience de Wip1 chez la souris entraîne une réponse inflammatoire plus importante au niveau de la peau que dans les souris sauvages⁴³⁵. Cette inflammation augmentée au niveau de la peau s'accompagne d'une production plus élevée de TNFα et d'autres cytokines pro-inflammatoires.

Pour finir, dans un contexte d'études de lésions cérébrales, l'absence de Wip1 augmente la libération de cytokines pro-inflammatoires au niveau du cerveau et le nombre de microglies activées dans le cerveau. L'absence de cette phosphatase altère également les capacités motrices et cognitives des animaux⁴³⁶. Dans un travail sur la neuro-inflammation, Wip1 semble jouer un rôle dans l'activation des macrophages à la suite de lésions cérébrales dans des modèles *in vitro* et *in vivo*. En effet, les souris déficientes pour Wip1 possèdent des lésions cérébrales plus accentuées que les souris WT associée à une expression accrue de cytokines inflammatoires^{436,437}.

3.c.ii *Wip1, un médiateur dans le neurodéveloppement*

Régulateur de multiples fonctions physiologiques et pathologiques, la phosphatase Wip1 intervient également au niveau cérébral majoritairement au niveau de la neurogenèse. Wip1 a alors été décrit comme neuroprotecteur dans divers modèles d'études.

Tout d'abord, une première étude de 2009 a montré le rôle de la phosphatase Wip1 dans la neurogenèse notamment au niveau de la zone sous-ventriculaire du cerveau de souris. En effet, Wip1 permet de maintenir la formation *de novo* de neurones de façon p53-dépendante. Ainsi, la déficience de Wip1 diminue la formation de nouveaux neurones au niveau du bulbe olfactif⁴³⁸. Une autre étude de 2014, a également mis en évidence le rôle de Wip1 dans les cellules souches neuronales dans la même zone du cerveau notamment dans le contexte du vieillissement. En effet, avec l'âge il est connu que la formation de neurones diminue et est corrélée à une diminution de ces cellules souches. Ces cellules présentent alors un niveau d'expression élevée pour Wip1 et son expression diminue chez les souris âgées notamment par une augmentation de l'expression de DKK3. DKK3 est connu pour être un régulateur négatif de WNT impliqué dans la formation de neurones. Ainsi, cette étude montre que les animaux qui possèdent une forte expression de Wip1 présente une capacité de régénération de cellules neuronales accrue qui permet de restaurer l'olfaction. Les auteurs ont mis en évidence que ce mécanisme est dépendant de DKK3 puisque que lorsque la phosphatase Wip1 est surexprimée, elle permet une diminution de DKK3 induisant ainsi une expression élevée de WNT augmentant la neurogenèse⁴³⁹.

Dans des travaux s'intéressant à la récupération fonctionnelle à la suite d'une ischémie cérébrale, la phosphatase Wip1 participe également aux phénomènes de neurogenèse mis en jeu notamment par la régulation de la signalisation WNT/ β -Caténine. Avec leurs modèles d'études, les auteurs ont alors pu remarquer que Wip1 était très exprimée dans les zones du cerveau les plus impactées par l'ischémie. L'utilisation de modèles déficients pour la protéine Wip1 a également permis de mettre en évidence que ces animaux présentaient une récupération plus faible associée à une diminution de neurogenèse comparément aux animaux sauvages. De plus, cette diminution de neurogenèse se

caractérise par une diminution de la voie WNT/ β -Caténine. Ainsi, des modèles de restauration d'expression de la phosphatase Wip1 ont permis de réactiver cette voie de signalisation et ainsi augmenter la neurogenèse à la suite d'une ischémie cérébrale⁴⁴⁰. D'autres travaux ont décrit le rôle de Wip1 comme étant neuroprotecteur comme l'étude de Zhu *et al* décrite précédemment où les animaux déficients pour Wip1 présentaient des lésions cérébrales plus accentuées à la suite d'une neuro-inflammation⁴³⁶.

3.d Wip1, une protéine surexprimée dans de nombreux cancers et potentielle cible thérapeutique

La phosphatase Wip1 participe à de nombreuses fonctions physiologiques et pathologiques et participe également aux phénomènes de tumorigenèse^{441,442}. Cette protéine qui est exprimée à de faible niveau dans la plupart des tissus sains se retrouve surexprimée dans de multiples cancers comme le cancer du sein^{359,443-445}, de l'œsophage⁴⁴⁶, du colon^{447,448}, de la thyroïde⁴⁴⁹, du poumon^{450,451}, de l'ovaire⁴⁵² ou encore du neuroblastome^{453,454} et bien d'autres. De plus, Wip1 est également mutée dans les cellules immunitaires de patients atteints de cancer associées à un mauvais pronostic^{455,456}

Présent sur le chromosome 17q23 chez l'Homme, le gène PPM1D codant pour la protéine Wip1 est composé de six exons⁴⁵⁷. Dans le cancer, plusieurs aberrations génomiques au niveau de PPM1D existent permettant de désigner le gène PPM1D comme un proto-oncogène^{458,459}. Ces aberrations se traduisent par une amplification de gène ou des mutations du gène PPM1D. En effet, une amplification du chromosome 17 se retrouve dans de nombreux cancers et conduit alors à une augmentation du nombre de copies du gène PPM1D^{443,445,453,460,461}. Grâce au NGS, les premières mutations de PPM1D ont été reportées en 2013⁴⁴⁸. La majorité des mutations se retrouvent dans l'exon 6 du gène PPM1D et sont des mutations non-sens ou des mutations par décalage du cadre de lecture. Ces mutations aboutissent le plus souvent à une version tronquée de la protéine Wip1. Par ailleurs, des études ont pu montrer que ces mutations se situent en aval du domaine catalytique ayant un faible impact sur l'activité phosphatase de cette enzyme. A l'inverse, ces mutations entraînent la perte d'un motif de dégradation en position C-ter conduisant à la stabilisation et l'accumulation de Wip1 mutée^{387,423,462}. L'accumulation de cette protéine tronquée dans les cellules peut alors être très élevée comparément à la version sauvage de la protéine et ainsi mimer les aberrations par amplification chromosomique.

Ainsi, comme la phosphatase Wip1 est retrouvée surexprimée dans de nombreux cancers l'inhiber représente alors une potentielle stratégie thérapeutique. Pour inhiber cette enzyme, plusieurs stratégies ont pu être mises en place. Tout d'abord, des inhibiteurs peptidiques ont été mis au point

dans le but d'inhiber l'activité enzymatique de Wip1. *In vitro*, ces inhibiteurs peptidiques permettent de supprimer sélectivement l'activité phosphatase de Wip1 mais leur utilisation *in vitro* et *in vivo* reste limitée par leur faible capacité de translocation dans leur cellules ou encore leur stabilité *in vivo*³²⁷. Ainsi, la recherche sur ces inhibiteurs peptidiques n'a pas donné lieu à des recherches plus approfondies. Par conséquent, plusieurs laboratoires ont ensuite criblé et développé plusieurs molécules inhibitrices dirigées contre Wip1. Parmi elles, on retrouve le M321237, le CCT007093 et le SPI-001⁴⁶³⁻⁴⁶⁵. Cependant, la majorité de ces composés ne répondent pas à tous les critères d'un inhibiteur efficace. Le dernier inhibiteur mis au point et présentant le plus d'affinité pour Wip1 est le GSK2830371 développé par Gilmartin *et al.* Le GSK2830371 a alors la capacité de se lier à la boucle β de PPM1D située proche du site catalytique de cette protéine. Cette séquence est spécifique de PPM1D et n'est pas partagée avec les autres membres de la famille des PP2Cs assurant alors une bonne sélectivité du GSK2830371⁴⁶⁶. Une étude récente utilisant diverses expériences de biophysiques, de biochimies ou encore d'analyse structurale a permis de décrire le GSK2830371 comme inhibiteur non-compétitif. Ce travail montre alors que la protéine Wip1 existe sous deux conformations protéiques et que le GSK2830371 bloque la protéine Wip1 dans une seule conformation inactive induisant une inhibition allostérique de l'enzyme⁴⁶⁷. Dans des études fonctionnelles, le traitement de cellules cancéreuses au GSK2830371 augmente la phosphorylation des substrats de PPM1D comme la phosphorylation de p53 induisant ainsi l'apoptose dans les cellules avec p53 WT⁴⁶⁸. Dans des lignées de cancer du sein, de neuroblastome ou encore d'hémopathies, le GSK2830371 inhibe la prolifération des cellules cancéreuses présentant une amplification de PPM1D^{407,469,470}. De plus, l'inhibition de PPM1D par le GSK2830381 augmente l'expression de gènes cibles de p53 car Cdkn1a, Puma ou encore Bax entraînant un arrêt du cycle cellulaire mais n'est pas suffisant pour induire la mort cellulaire⁴⁶⁹. Ainsi, la majorité des travaux utilisant l'inhibiteur allostérique GSK2830371 montre que celui-ci seul n'induit pas la mort des cellules cancéreuses mais le combiner avec des agents chimiothérapeutiques potentialise leur efficacité^{388,407,469-471}.

Problématique – Objectifs de thèse

Décrit depuis plusieurs années, il est connu que le TNF joue un rôle pléiotrope dans le cancer. Exprimé par de nombreux types cellulaires, l'activation du récepteur TNFR1 peut engendrer plusieurs processus : la survie des cellules par l'activation de la voie NFκB, l'apoptose dépendante ou non de RIPK1 et d'autres morts cellulaires comme la nécroptose. De nombreuses études ont pu montrer son rôle anti-tumoral dans l'induction de la mort immunogène des tumeurs. En effet, la présence du TNF permet d'attirer les cellules immunitaires au sein de la tumeur et permettre leur activation.

Dans nos travaux réalisés en 2021⁴³³, nous avons pu montrer que les souris déficientes pour Wip1 présentent une réduction de croissance tumorale médiée par une augmentation de l'immunité anti-tumorale. Cette diminution de la croissance tumorale était alors associée à une augmentation de la sécrétion de TNFα, médiant l'attraction et l'activation des cellules immunitaires aux propriétés anti-tumorales. Ainsi, il semble exister un lien entre la présence de Wip1 et la production de TNF au sein de la tumeur. Par ailleurs, des expériences préliminaires réalisées dans notre équipe ont pu montrer que l'absence du récepteur TNFR1 dans les souris Wip1^{-/-} annule l'effet anti-tumoral associé à l'absence de Wip1. En effet, les souris Wip1^{-/-} TNFR1^{-/-} présentent une croissance tumorale supérieure aux souris Wip1^{-/-}. Enfin, comme décrit précédemment la phosphatase Wip1 joue un rôle central dans la régulation des morts cellulaires dépendantes TNF.

En prenant en compte toutes ces observations, nous nous sommes alors intéressés à la potentielle implication de la phosphatase Wip1 dans la nécroptose, mort cellulaire programmée hautement immunogène.

Matériels et méthodes

I. Modèles d'études

1. Cellules utilisées

Plusieurs lignées cancéreuses d'origine humaine et murine ont été utilisées pour réaliser ce travail et sont décrits dans le tableau ci-dessous. Toutes les cellules ont été cultivées en DMEM (Dutsher) supplémenté avec du sérum de veau fœtal (SVF) à 10%. De plus, un mélange de Pénicilline-Streptomycine et d'Amphotéricine B (PSA, Pan Biotech) a été ajouté dans toutes les lignées cellulaires ci-dessous à une concentration finale de 1%. Toutes ces cellules sont cultivées à 37°C avec 5% de CO₂ et sont indiquées en Tableau 3.

Tableau 3 : Lignées cellulaires utilisées dans les diverses expériences.

| Lignées cellulaires | Origine | Types cellulaires/Morphologies |
|---------------------|----------------------------------|--------------------------------|
| HCT116 | Carcinome colorectal humain | Cellules épithéliales |
| Hek-293 | Tissu rénal d'embryon humain | Cellules épithéliales |
| HT-29 | Adénocarcinome colorectal humain | Cellules épithéliales |
| MCF-7 | Adénocarcinome mammaire humain | Cellules épithéliales |
| MDA-231 MB | Adénocarcinome mammaire humain | Cellules épithéliales |
| SW620 | Adénocarcinome colorectal humain | Cellules épithéliales |
| L929 | Tissus adipeux murin | Fibroblastes |
| MC38 | Adénocarcinome mammaire murin | Cellules épithéliales |

2. Génération de lignées cellulaires CRISPR-Cas9

Des cellules Wip1 KO, PPM1B KO et Wip1/PPM1B DKO, RIPK3 KO ont été réalisées en utilisant la technologie CRISPR-Cas9. En collaboration avec le Dr Olivier Micheau et le Dr Abdelmnim Radoua, les cellules KO ont été obtenues grâce à leur plasmide ptARgenOM ayant fait récemment l'objet d'une récente publication⁴⁷². Plusieurs guides d'ADN ont été mis au point et testés.

2.a Stratégie de clonage

2.a.i Hybridation des oligonucléotides

Pour l'hybridation des oligonucléotides, un mix de 10µl contenant 100µM de chaque oligonucléotide (oligo 1 et oligo 2), 0,5µl de l'enzyme T4 Polynucleotide kinase (Promega, M4103), 1µl de tampon de ligase T4 DNA 10X (Promega, M1804) complété avec 6,5µl d'eau ultrapure a été réalisé. Les tubes sont ensuite placés dans un thermocycleur suivant la réaction suivante : 1h à 37°C, 5 minutes à 95°C puis une diminution de 5°C par minute jusqu'à atteindre la température de 25°C. A la fin du cycle, les

oligonucléotides sont dilués au 1/200^e dans de l'eau ultrapure. Les gènes cibles et leur oligonucléotides associés sont décrits dans le Tableau 4.

Tableau 4 : Séquences des oligonucléotides pour le développement de lignées CRISPR-Cas9.

| Gènes cibles | Nom des oligos | Oligo 1 | Oligo 2 | Espèces ciblées |
|--------------|----------------|----------------------------|---------------------------|------------------|
| RIPK3 | RIPK3 | caccgccaggtagccctgagactcc | aaacggagtctcagggtacctggc | Souris |
| PPM1B | PPM1B 1 | caccg gggggagtttctgccggcg | aaac cgccggcaggaaactccccc | Humain et souris |
| PPM1B | PPM1B 2 | caccggatgcacacacagctgttg | aaaccaacagctgtgtgcatcc | Humain et souris |
| PPM1B | PPM1B 3 | caccg ttcagagttggataagcact | aaacagtgttatccaactctgaac | Humain et souris |
| PPM1D | PPM1D 7 | caccgctcttcttgggaagttc | aaacgaactccaaggaaagagc | Humain et souris |
| PPM1D | PPM1D 8 | caccgaatggccaaagactatgac | aaacgtcatagtcttggccattc | Humain et souris |
| PPM1D | PPM1D 9 | caccgtctcttcttgggaagttc | aaacgaactccaaggaaagagac | Humain et souris |
| PPM1D | PPM1D 10 | caccgttcccgggagcacttgtg | aaaccacaagtgtctccgggcaac | Humain et souris |

2.a.ii Ligation et transformation

Afin d'intégrer l'ADN guide dans le plasmide comportant le système CRISPR-Cas9, un mix de ligation contenant 50µg du vecteur ptARgenOM, 1µl des oligonucléotides dilués, 1µl du tampon de ligase T4 DNA 10X (Promega, M1804), 0,5µl de l'enzyme T4 DNA ligase (Promega, M1804) complété à 10µl d'eau ultrapure a été réalisé. Après préparation du mix de ligation, les échantillons sont incubés 3h à RT. Les bactéries compétentes *E.coli* C3040 (NEB, C3040I) ont été utilisées pour réaliser la transformation bactérienne selon les recommandations du fournisseur. Les bactéries sont ensuite étalées sur boîte de LB agar contenant 100µg/ml d'Ampicilline et incubées une nuit à 37°C. Le lendemain, au minimum 3 colonies sont repiquées dans 5ml de bouillon LB contenant 100µg/ml d'Ampicilline et incubées une nuit à 37°C.

2.a.iii Vérification du clonage

Pour vérifier l'efficacité du clonage, des extractions d'ADN utilisant le kit « NucleoSpin Plasmid » (740588.50, Macherey-nagel) ont été réalisées. Les ADN plasmides extraits sont ensuite digérés par l'enzyme de restriction NcoI (ThermoFisher #FD0574) 1h à 37°C. Les produits de digestion sont ensuite déposés sur gel pour vérifier la taille des fragments obtenus. Pour la validation du plasmide, des fragments de 7437bp et 2416 bp doivent être observés.

2.b Transfection et sélection des cellules CRISPR-Cas9 positives

Lorsque les plasmides sont validés, une amplification du plasmide et une isolation par « NucleoBond Xtra Midi » (740410.50, Macherey-nagel) est réalisée. Le plasmide CRISPR-Cas9 dirigé contre la

protéine d'intérêt a ensuite été intégré par transfection reverse dans les cellules HT-29 et MC-38. Pour les cellules HT-29, l'agent de transfection utilisé est le réactif Viafect Transfection Reagent (Promega, E4981) utilisant le ratio 3 :1 soit 2µg d'ADN plasmidique pour 6µl de ViaFect dans un volume de transfection de 200µl. Dans une plaque 6 puits, le mix de transfection est déposé en goutte dans les puits et 0,5x10⁶ cellules sont ajoutées. Pour les cellules MC-38, la transfection a pu être réalisée avec le ViaFect ou avec de la Lipofectamine 3000 (ThermoFisher, L3000001) également de façon reverse avec 0,3x10⁶ cellules. 48h après transfection, les cellules ayant intégrées le plasmide sont GFP positives et sont triées par cytométrie (BD FACSAria™). Une cellule par puits est triée de façon à obtenir des clones monoclonaux.

3. Génération de modèles de surexpression par infection virale

Des modèles de surexpression de la protéine RIPK3 ont été réalisés dans les lignées cellulaires de cancer mammaire MDA-MB 231 et de cancer colorectal HCT116 et SW620. Les cellules WT, Caspase 8 -/-, Fadd -/- et Ripk1 -/- de ces trois types cellulaires utilisés dans le travail du Dr Olivier Micheau et Dr Abdelmnim Radoua⁴⁷² ont été utilisées et transduites afin d'exprimer constitutivement la protéine RIPK3.

3.a Production de particules virales

Pour cela, les particules virales sont produites à partir de cellules GP-2. Ainsi, les cellules GP-2 sontensemencées dans une dish de 10cm puis sont transfectées lorsque leur confluence atteint 60 à 70% de confluence. Les cellules sont transfectées avec 15µg de pBabe-puro-RIPK3 (Addgene#78829) et 3µg de pVSV-G à l'aide de PEI selon les instructions du fournisseur pendant 12 heures. Le jour suivant, le milieu est retiré et 10ml de milieu contenant du 10mM de Sodium Butyrate est ajouté pendant 8 à 10 heures. L'ajout d'acide butyrique permet de stimuler la transcription du promoteur CMV et ainsi augmenter la production de particules virale. Le jour suivant, le milieu contenant les particules virales est récolté et centrifugé à 1000g pendant 2 min afin d'éliminer les potentiels débris cellules et est filtré à 45µm. Enfin, 6 ml de milieu contenant de l'acide butyrique est ajouté de nouveau sur les cellules GP-2 pour une seconde infection. Cette étape peut être répétée plusieurs fois selon le nombre d'infection successives réalisées.

3.b Infection des cellules d'intérêt

Dans une plaque 6 puits, les cellules cibles sontensemencées à raison de 50 à 100 000 cellules/puits. Dans notre cas, les cellules à infecter sont les cellules MDA-MB-231, HCT116 et SW620 et pour toutes les cellules WT, Caspase 8 -/-, Fadd -/- et Ripk1 -/-. Après avoir collecté les particules virales produites par les GP-2, 3ml de cette suspension virale sont ajoutés dans les plaques 6 puits. Dans chaque puits,

du polybrène à une concentration finale de 8µg/ml est ajouté dans chaque puits. Du parafilm est ajouté sur les bords de la plaque 6 puits et celle-ci est centrifugée pendant 1h à 800g RT. Après centrifugation, la plaque est placée pendant 8h dans l'incubateur à 37°C. Plusieurs cycles d'infections sont ensuite répétés en changeant et ajoutant 3ml de nouveau milieu contenant les particules virales et le polybrène. Les étapes de centrifugation et incubation à 37°C sont identiques. Pour sélectionner les cellules infectées, une sélection par pyromycine est réalisée à 2,5µg/ml pendant 4 jours. Les cellules résistantes sont alors RIPK3 positives et sont vérifiées par Western-blot.

4. Transfection transitoire

Des transfactions transitoires par lipofection ont été réalisées pour exprimer transitoirement certaines protéines. Pour ce faire, les cellules Hek293 et MC38 ont été transfectées à l'aide du kit FuGene HD (Promega) ou du jetPEI (Startorius) respectivement selon les instructions du fournisseur. Pour augmenter l'efficacité de transfection, la transfection peut être réalisée en utilisant la méthode « reverse » : les cellules ne sont pas ensemencées la veille mais la suspension cellulaire après comptage est ajoutée directement le jour de la transfection sur la plaque contenant les gouttes de l'agent transfectant avec l'ADN. Les cellules en suspension vont ensuite adhérer en intégrant les plasmides. Les cellules sont utilisées 48h post-transfection pour diverses expériences.

Dans ce travail, plusieurs transfactions ont pu être réalisées.

- Co-transfection hWip1 + RIPK3 :

Afin de surexprimer la protéine humaine Wip1 et la protéine humaine RIPK3, des co-transfections ont été réalisées dans les cellules Hek293 à l'aide du kit FuGene HD (Promega). Des quantités égales entre les deux plasmides ont été utilisées pour la transfection. Les plasmides utilisés sont le plasmide hWip1 créé par notre équipe et le plasmide pcDNA4-Flag-RIPK3 (Addgene #78815).

- Transfection mWip1 :

Afin de surexprimer Wip1, les cellules murines MC38 ont été transfectées à l'aide du kit jetPEI (Startorius). Le plasmide mWip1 créé par notre équipe est inséré dans les cellules et une sélection antibiotique est réalisée à l'aide de Zéocin à 100 µg/ml pendant plusieurs jours pour sélectionner uniquement les cellules transfectées. Une fois que des colonies sont obtenues, celles-ci sont repiquées pour amplifier les cellules et sont ensuite testées par Western-blot.

5. Isolation de cellules murines

Des cellules isolées de la moelle osseuse de souris ont été récupérées de souris WT, Wip1^{-/-} et Wip1^{-/-}/p53^{-/-}. Pour isoler ces cellules, les os des membres inférieurs de la souris ont été récupérés après mise à mort de l'animal. Chaque extrémité des os sont coupées et insérées dans un tube de 0,5 ml préalablement percé avec une aiguille dans le fond du tube. Ce même tube de 0,5 ml est placé dans un tube de 1,5 ml. L'ensemble des deux tubes contenant les os de souris est centrifugé 1 min à 10 000xg. Grâce à la force de centrifugation et au trou dans le tube, les cellules de la moelle se retrouvent dans le fond du tube de 1,5 ml. Une lyse des globules rouges est réalisée sur le culot de ces cellules puis elles sont lavées une fois au PBS1X avant d'être mises en culture.

6. Modèle vivo

Toutes les souris ont été maintenues dans des conditions spécifiques exemptes d'agents pathogènes selon des protocoles d'expérimentations examinés et approuvés par le comité d'éthique d'expérimentation animale de l'Université de Bourgogne.

Des souris C57/Bl6j de type sauvage anesthésiées à l'isoflurane ont été injectées par voie sous-cutanée avec 3×10^5 cellules de cancer colorectal murin MC38 sur leur flanc. Après 10 jours, les tumeurs sont mesurées tous les deux jours à l'aide d'un pied à coulisse digital. A chaque visite, la taille des tumeurs (mesure en mm de la longueur L et de la largeur l afin de déterminer le volume tumoral en mm³ grâce à la formule : $\frac{1}{2} \times L \times l^2$) et l'état général des souris ont été vérifiés. Lorsque que la taille des tumeurs atteint le point limite (20mm de diamètre), les souris sont mises à mort par dislocation vertébrale. Immédiatement après, les tumeurs et organes ont été récupérés selon les besoins des différentes expériences réalisées.

II. Traitements

Pour étudier la nécroptose, plusieurs molécules ont été utilisées *in vitro* pour induire la mort cellulaire seuls ou en combinaison et sont énoncés dans le Tableau 5 ci-dessous. La combinaison TB indique la combinaison du TNF à 20ng/ml + Birinapant à 100nM et la combinaison TBZ indique la combinaison du TNF à 20ng/ml + Birinapant à 100nM + z-VAD-FMK 20μM.

Tableau 5 : Les différents traitements utilisés *in vitro* dans l'étude de la nécroptose.

| Abréviations | Molécules | Concentrations | Fournisseur | Références |
|--------------|------------------|------------------|------------------------|------------|
| GSK'843 | GSK'843 | 3µM | Sigma | SML2001 |
| GSK2830371 | GSK2830371 | 5, 10, 20µM | MedChemExpress | HY-15832 |
| LMB | Leptomycine B | 1µM | Sigma | L2913 |
| Nec1s | Necrostatin-1s | 10µM | MedChemExpress | HY-15760 |
| NSA | Necrosulfonamide | 5µM | MedChemExpress | HY-100573 |
| PolyIC | Poly(I:C) HMW | 25µg/ml | InvivoGene | tIrl-pic |
| Seli | Selinexor | 1µM | Selleck | S7252 |
| Biri | Birinapant | 100nM | MedChemExpress | HY-16591 |
| TNF | TNFα | 20, 50, 100ng/ml | Cadeau de S.Nedospasov | |
| z-VAD-FMK | z-VAD-FMK | 20µM | MedChemExpress | HY-16658B |

III. Etudes protéiques

1. Western-blot

1.a Préparation des échantillons

Avec ou sans traitement, les cellules et leur surnageant sont collectés (400G, 5 minutes, 4°C) et lavés dans du PBS 1X (Dutscher), puis lysés à l'aide d'un tampon de lyse composé de Cell Lysis Buffer 10X (Cell Signaling), de cocktail d'inhibiteurs de protéases cOmplete 25X (ROCHE), de cocktails d'inhibiteurs de phosphatases (2 et 3) 100X (Sigma) et d'une solution de fluorure de phénylméthanésulfonyle 100X (PMSF) (Sigma), le tout dilué jusqu'à une solution de travail finale concentrée 1X dans de l'eau distillée. Les échantillons sont lysés pendant 30 minutes sur glace en vortexant toutes les 10 minutes. Les échantillons sont ensuite centrifugés à 20000G pendant 10 minutes à 4°C pour récupérer le surnageant contenant le lysat protéique. Les protéines sont dosées en utilisant le kit Precision Red Advanced Protein Assay (Cytoskeleton) puis diluées avec un tampon Laemmli 5X pour obtenir une concentration finale 1X (50mM Tris, 2% SDS, 100mM DTT, 0,01% bleu de bromophénol et 10% glycérol, pH = 6,8).

1.b Migration et transfert

Des quantités variables en protéines ont pu être déposées : au minimum 10µg par échantillon pouvant aller jusqu'à 50µg pour les protéines nécessitant une grande quantité de protéines. Les échantillons sont déposés dans des gels d'acrylamides et migrent entre 100 et 150V dans du tampon Tris-Glycine (25mM Tris, 192mM Glycine, 0,1% SDS) pendant environ 1 heure et 30 minutes. Des transferts semi-secs ont ensuite été réalisés en utilisant un tampon Bjerrum Schafer-Nielsen (48 mM Tris, 39mM Glycine, 20% EtOH) pendant 30 minutes à 1 heure à 25V sur membrane PVDF 0,2µm ou 0,45µm.

1.c Blocage, incubations et anticorps primaires

Les membranes sont ensuite bloquées 1 heure avec du TBS-T 0,1% avec 5% de BSA ou lait selon les protéines à révéler. Les anticorps primaires sont dilués dans du TBS-T BSA 3% et incubés à 4°C toute la nuit. Le Tableau 6 ci-dessous énumère les anticorps utilisés.

Tableau 6 : Les différents anticorps primaires utilisés dans les études de Western-blot.

| Cibles | Anticorps | Fournisseur | Références |
|-------------------------|--|------------------|-----------------|
| B-actine | Anti-β-Actin–Peroxidase antibody, Mouse monoclonal | Sigma | A3854 |
| Caspase 3 | Caspase-3 Antibody Caspase-3 (D3R6Y) Rabbit mAb | Cell Signaling | #14220 |
| Caspase 8 | Anti-Caspase-8 (Human) mAb | MBL Life Science | M032-3 |
| EIF2 | eIF2α Antibody | Cell Signaling | 9722 |
| FADD | BD Transduction Laboratories™ Purified Mouse Anti-Human FADD | BD Bioscience | 610400 |
| GAPDH | GAPDH (14C10) Rabbit mAb | Cell Signaling | 2118 |
| HMGB1 | Hybridoma supernatant | DSHB | PCRP-HMGB1-4F10 |
| HSP70 | HSP70/HSP72 polyclonal antibody | Enzo | ADI-SPA-811 |
| Ikba | IkBα (L35A5) Mouse mAb (Amino-terminal Antigen) | Cell Signaling | 4814 |
| MLKL (human specific) | MLKL (D2I6N) Rabbit mAb | Cell signaling | 14993 |
| MLKL (mouse specific) | MLKL (D6W1K) Rabbit mAb | Cell signaling | 37705 |
| PARP | PARP (46D11) Rabbit mAb | Cell signaling | 9535 |
| pEIF2 | Phospho-eIF2α (Ser51) (D9G8) XP® Rabbit mAb | Cell Signaling | 3398 |
| pMLKL (human specific) | Anti-MLKL (phospho S358) antibody | Abcam | Ab187091 |
| pMLKL (mouse specific) | Phospho-MLKL (Ser345) (D6E3G) Rabbit mAb | Cell signaling | 37333 |
| PPM1B | PPM1B Polyclonal Antibody | ProteinTech | 13193-1-AP |
| pRIPk3 (human specific) | Phospho-RIP3 (Ser227) (D6W2T) Rabbit mAb | Cell signaling | 93654 |
| pRIPK3 (mouse specific) | Phospho-RIP3 (Thr231/Ser232) (E7S1R) Rabbit mAb | Cell Signaling | 91702 |
| RIPK1 | RIP (D94C12) XP | Cell Signaling | 3493 |
| RIPK3 (Human specific) | RIP3 (E1Z1D) Rabbit mAb | Cell Signaling | 13526 |
| RIPK3 (mouse specific) | RIP3 (D8J3L) Rabbit mAb | Cell Signaling | 15828 |
| RIPK3 (Human & mouse) | Anticorps RIP3 (B-2) | Santa Cruz | sc-374639 |
| Vinculine | Monoclonal Anti-Vinculin antibody produced in mouse | Sigma | V9131 |
| V5 | V5 Tag Monoclonal Antibody (TCM5), eBioscience™ | Invitrogen | 14-6796-82 |
| Wip1 | WIP1 (D4F7) Rabbit mAb | Cell Signaling | 11901 |
| Wip1 | Wip1 (F-10) | Santa Cruz | sc-376257 |

1.d Anticorps secondaires et révélations

Le lendemain, les membranes sont lavées 3 fois 10 minutes avec du TBS-T 0,1% et sont incubées avec des anticorps secondaires couplés à la HRP. Pour les western-blot sur lysats totales, les anticorps secondaires anti-lapin ou anti-souris sont dilués au 1/10000^e dans du TBS-T 0,1% avec 3% de BSA (souris (7076) ou de lapin (7074) (Cell Signaling Technologies)) et incubés 1 heure à RT. Pour les western-blots d'immunoprécipitation, les anticorps secondaires sont des anticorps VeriBlot (ab131366) (Abcam) et sont dilués au 1/1000^e dans du TBS-Tween20 0,1% avec 5% de lait supplémenté de 1% de caséine 1 heure à RT. Indépendamment du type de western blot, l'incubation avec les anticorps secondaires dure une heure et se fait à température ambiante. Après ce temps, les membranes sont lavées 3 fois 10 minutes dans du TBS-Tween 0,1%. Les révélations se font par chimioluminescence en utilisant du Clarity Western ECL (BioRad) ou SuperSignal West Femto (Fisher), et les images sont acquises avec un Chemidoc MP Imaging System.

2. Co-immunoprécipitation

Avec ou sans traitement, les cellules et les surnageants sont récoltés et centrifugés 5min à 400g à 4°C puis lavés 2 fois avec du PBS 1X (Dutscher). La lyse des échantillons est réalisée grâce à un tampon de lyse composé de Cell Lysis Buffer 10X (Cell Signaling), de cocktail d'inhibiteurs de protéases cOmplete 25X (ROCHE) et du cocktail d'inhibiteurs de phosphatases 2 (Sigma), tous dilués jusqu'à une solution finale 1X dans de l'eau distillée. Pour la lyse, les échantillons sont placés sur agitateur rotatif 30 minutes à 4°C. Ensuite, les échantillons sont centrifugés à 10000G 10 minutes à 4°C et les lysats sont transférés dans de nouveaux tubes. Comme pour les échantillons classiques, les protéines sont dosées avec le kit Precision Red Advanced Protein Assay (Cytoskeleton) et 30µg sont conservés pour réaliser les inputs. Pour les conditions d'immunoprécipitation, entre 500µg et 1mg de protéines des échantillons sont utilisés et incubés avec 2µg d'anticorps de capture. Les tubes contenant le lysat protéique et les anticorps de capture sont incubés pendant une nuit sur agitateur rotatif et les inputs sont dénaturés de la même façon que des échantillons classiques de Western-blot. Pour immunoprécipiter la kinase RIPK3, les anticorps #13526 pour RIPK3 d'origine humain et #15828 pour RIPK3 d'origine murin de Cell Signaling ont été utilisés. Pour immunoprécipiter MLKL, l'anticorps #14993 de Cell Signaling a été utilisé. Le lendemain, 50µl de protéines A µMACS™ sont incubées directement dans les échantillons et incubées 30 minutes à 4°C. Cette étape permet aux billes de se fixer à l'anticorps de capture présent dans le lysat protéique. Ce mélange lysats et billes est ensuite déposé sur des colonnes µ positionnées sur un aimant séparateur µMACS. Les colonnes sont lavées 4 fois avec le tampon de lyse et les protéines sont dénaturées et éluées en utilisant un Laemmli 1X plus concentré en agent dénaturant, chauffé à 95°C (50mM Tris, 4% SDS, 200mM DTT, 0,01% bleu de bromophénol et 10% glycérol, pH =

6,8) pendant 5 minutes. Les échantillons sont prêts à être chargés dans des gels et sont traités de la même manière que pour les western blots.

3. Isolation du cytoplasme et du noyau

Les isollements cyto-noyaux ont été réalisés à partir de minimum 5 millions de cellules pour chaque condition, en suivant les instructions du protocole du kit d'extraction cytoplasmique et nucléaire NEPER™ (Thermo, 78835). Les réactifs du kit ont été supplémentés en cocktail d'inhibiteurs de protéases cOMplete 25X (ROCHE) et inhibiteurs de phosphatases 2 et 3 (Sigma) 100X.

4. Western-blot sur surnageant

Pour les expériences de Western-blot réalisées sur surnageant de cellules en culture, les traitements des cellules doivent être réalisés dans du milieu sans sérum afin de ne pas contaminer les protéines du surnageant avec les protéines contenues dans le sérum. Ainsi, les cellules sontensemencées à raison de 1 million par puits dans une plaque 6 puits dans un volume de 500µl. Après traitement, le surnageant des cellules (500µl) est récolté et centrifugé à 400xg pour éviter les potentiels débris (les cellules sont également récupérées pour une lyse protéique classique). Ensuite, les 500µl sont déposés sur les colonnes de concentrations 3kD (Amicon Ultra-0,5, UFC500324 Millipore) préalablement laver à l'eau distillée. Pour concentrer les protéines, les instructions du fournisseur sont suivies. Lorsque la concentration est terminée, les protéines sont dosées à l'aide du kit Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad, 500-0001) et le reste de l'expérience suit le protocole classique d'un Western-blot.

5. Immunofluorescence

Comme les expériences ont été réalisées sur des cellules adhérentes, elles ont étéensemencées sur lamelle de verre (coverslips) au minimum la veille de l'expérience (300 000 cellules/puits dans une plaque 12 puits avec des coverslips de 13mm de diamètre). Après traitement ou non, les lamelles avec les cellules accrochées à leur surface sont lavées au PBS1X puis fixées dans de la paraformaldéhyde (PFA) 4% diluée à partir d'un stock à 16 % sans méthanol (Pierce™) pendant 15 minutes à RT. Les cellules sont ensuite perméabilisées à l'aide de Triton X-100 0,1% pendant 20min à RT. Les cellules sont ensuite lavées une fois au PBS1X et sont incubées avec une solution de saturation de TBS-T avec 2% de BSA. La même solution de saturation est utilisée pour incuber les anticorps primaires sur la nuit à 4°C dans une chambre humide. Le lendemain, les coverslips portant les cellules sont lavées 3 fois en bain en TBS-T 0,1% et sont incubés avec un anticorps secondaire anti-anticorps primaires de souris (ThermoFisher, A-11004 ou A-11059) ou lapin (ThermoFisher A-1108 ou A10042) selon les marquages réalisés pendant 1 heure. Ces anticorps sont couplés avec Alexa Fluor 488 ou Alexa Fluor 568. Les coverslips sont de nouveaux lavés 3 fois avec du TBS-T et les cellules sont marquées au DAPI contenu

dans le milieu de montage ProLong Gold DAPI (Fisher). Les images de microscopie ont été acquises par un Axio Imager 2 (Carl Zeiss Microscopy GmbH) en utilisant une caméra CCD AxioCam MRm (Carl Zeiss GmbH). Les anticorps utilisés sont listés dans le Tableau 7 ci-dessous.

Tableau 7 : Anticorps utilisés pour les marquages d'immunofluorescence.

| Cibles | Anticorps | Fournisseur | Références |
|------------|---|----------------|------------|
| IκBα | IκBα (L35A5) Mouse mAb (Amino-terminal Antigen) | Cell Signaling | 4814 |
| IgG Mouse | Mouse (G3A1) mAb IgG1 Isotype Control | Cell Signaling | 5415 |
| IgG Rabbit | Rabbit (DA1E) mAb IgG XP® Isotype Control | Cell Signaling | 3900 |
| RIPK3 | Anticorps RIP3 (B-2): | Santa Cruz | sc-374639 |
| RIPK3 | RIP3 (E1Z1D) Rabbit mAb | Cell Signaling | 13526 |
| Wip1 | WIP1 (D4F7) Rabbit mAb | Cell Signaling | 11901 |

6. Expériences de ligature de proximité duolink (PLA)

Comme les expériences ont été réalisées sur des cellules adhérentes, elles ont étéensemencées sur lamelle de verre (coverslips) au minimum la veille de l'expérience (300 000 cellules/puits dans une plaque 12 puits avec des coverslips de 13mm de diamètre). Après traitement ou non, les lamelles contenant les cellules accrochées à leur surface sont lavées au PBS1X puis sont fixées dans de la PFA 4% diluée à partir d'un stock à 16 % sans méthanol (Pierce™) pendant 15 minutes à RT. Les lamelles sont lavées 1 fois au PBS1X puis sont perméabilisées à l'aide d'une solution de PBS 1X 0,1% Triton X-100. Les cellules fixées et perméabilisées sont bloquées à l'aide de TBS-T avec 2% de BSA pendant 30 minutes, puis les coverslips sont incubés avec des anticorps primaires dilués dans le tampon de blocage sur la nuit à 4°C dans une chambre humide. Le lendemain, les expériences Duolink® sont réalisées en suivant les consignes du fabricant (Sigma-Aldrich, SaintLouis, MO, USA) et montées avec le milieu ProLong Gold avec DAPI (Fisher). Les images de microscopie ont été acquises par un Axio Imager 2 (Carl Zeiss Microscopy GmbH) en utilisant une caméra CCD AxioCam MRm (Carl Zeiss GmbH). Le plugin 'Spot detector' du logiciel ICY a été utilisé pour compter le nombre de points par cellule. Le Tableau 8 ci-dessous énumère les anticorps utilisés pour ce test.

Tableau 8 : Anticorps utilisés pour les expériences de ligature de proximité duolink.

| Cibles | Anticorps | Fournisseur | Références |
|--------------|---|----------------|------------|
| IgG Rabbit | Rabbit (DA1E) mAb IgG XP® Isotype Control | Cell Signaling | 3900 |
| RIPK1 Humain | RIP (D94C12) XP | Cell Signaling | 3493 |
| RIPK3 Humain | Anticorps RIP3 (B-2): | Santa Cruz | sc-374639 |
| Wip1 | WIP1 (D4F7) Rabbit mAb | Cell Signaling | 11901 |

IV. Test de mortalité

1. Incucyte – 7AAD

La veille, les cellules ont étéensemencées à raison entre 10 000 et 30 000 cellules par puits selon le type cellulaire. Pour suivre la mortalité, le marqueur d'ADN 7-AAD a été ajouté dans les traitements réalisés. Après traitement, la plaque de culture est placée dans l'Incucyte® S3 (incubateur couplé à un microscope, Sartorius). Des images toutes les heures ont été acquises selon les temps de traitement indiqués. Pour l'analyse des résultats, l'aire des objets rouge soit des objets 7-AAD positifs correspondant aux cellules mortes est normalisée par rapport à l'aire de confluence des cellules (nommés Red Area/Phase Area %).

2. Cell Titer Glo (CTG)

La veille, les cellules ont étéensemencées à une densité de 30 000 cellules par puits dans des plaques noires stériles opaques de 96 puits, dans 100µL. Le jour de l'expérience, les traitements sont réalisés et les tests CTG ont été réalisés en suivant le protocole du fabricant.

Résultats

I. Développement de lignées KO et de modèles de surexpression

Dans ce travail, plusieurs modèles de lignées génétiquement modifiées ont été utilisés : certains sont des modèles de délétions génétiques utilisant la technologie CRISPR-Cas9 et d'autres sont des modèles de surexpressions obtenues par expériences de transfection transitoire ou de transduction (infection virale). Des modèles de déficiences pour RIPK3, Wip1, PPM1B ont été mis au point dans des lignées de cancer colorectal humain HT-29, de cancer colorectal murin MC38 et de fibroblastes murin L929. Le design de ces modèles de délétions génétiques est décrit ci-dessous. Les modèles de surexpression de la protéine RIPK3 ont été réalisées dans divers modèles cellulaires (HCT116, MDA-MB-231, SW620) par transduction et des modèles de surexpression de la protéine Wip1 ont été obtenus après transfection transitoire et sélection. Ces modèles sont également décrits ci-dessous.

1. Modèles de déficiences CRISPR-Cas9

1.a Stratégies de clonages

Pour garantir l'obtention de cellules knock-out (KO) pour nos protéines d'intérêts, plusieurs ARN guides (gRNA) ont été testés pour développer les constructions plasmidiques de CRISPR-Cas9. Pour cela, comme décrit dans le matériel et méthodes page 102-103, plusieurs gRNA ont été clonés et après transformation bactérienne 3 colonies par construction sont testées. Pour vérifier les différentes constructions obtenues, l'ADN plasmidique est digéré par l'enzyme NcoI comme décrit précédemment et est migré sur un gel d'agarose (**Figure 22**).

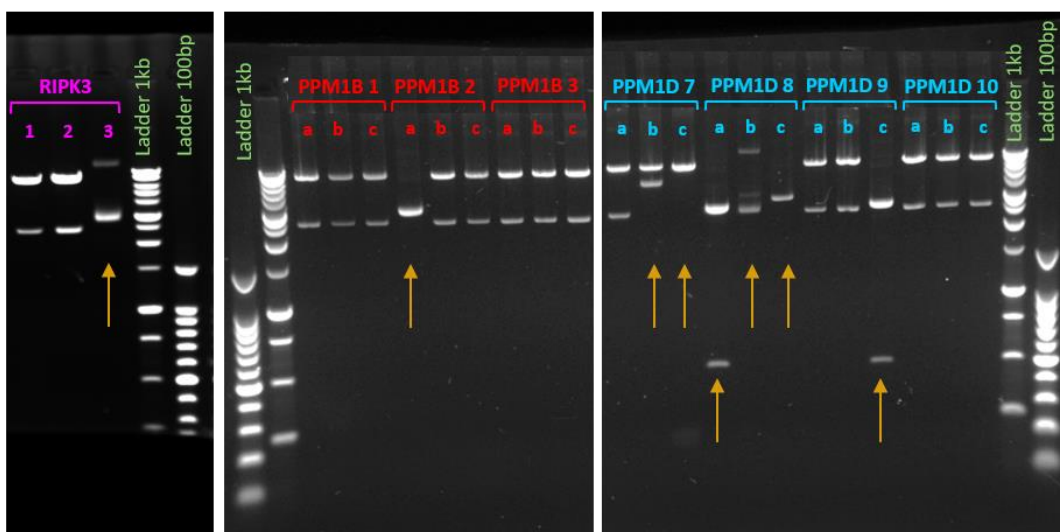


Figure 22 : Gel d'agarose des gRNA digérés par NcoI afin de valider les constructions plasmidiques de CRISPR-Cas9. Plusieurs gRNA ont été testés pour les gènes donnés et les flèches orange indiquent les constructions non conformes.

Pour que le plasmide soit valide, deux fragments dont un à 7437 pb et un à 2416 pb doivent s'observer après digestion. Ainsi, les flèches en jaune sur la **Figure 22** montrent les constructions plasmidiques non conformes. Pour la construction RIPK3, une colonie sur trois n'est pas bonne et le plasmide RIPK3 2 sera utilisé pour les transfections. Pour la construction PPM1D 8, toutes les colonies ne sont pas valides et ce plasmide est donc éliminé. Arbitrairement, les plasmides PPM1B 1a, PPM1B 2b, PPM1B 3a, PPM1D 7a, PPM1D 9a et PPM1D 10a sont sélectionnés, amplifiés et utilisés pour les étapes de transfection dans les cellules HT-29, MC38 et L929. Les phosphatases de la famille des PP2C présentant une grande homologie entre l'Homme et la souris, les constructions plasmidiques sont utilisées dans les cellules humaines et murines.

1.b Génération de lignées Wip1 KO et PPM1B KO

Après transfection transitoire avec les plasmides CRISPR-Cas9 Wip1 et PPM1B, une sélection monoclonale est réalisée sur les cellules après tri GFP. Regardant la difficulté de transférer les cellules HT-29, peu de clones ont été obtenus. Cependant, le clone 3a B3 semble déficient pour la protéine PPM1B et est utilisé pour les prochaines expériences (clone obtenu grâce à la construction PPM1B 3a) (**Figure 23A**). Pour la délétion de Wip1, plusieurs clones ont été obtenus et le clone 10a A3 est choisi pour les prochaines expériences (clone obtenu grâce à la construction PPM1D 10a) (**Figure 23B**). Pour les cellules MC38, la construction PPM1B 3a ne semble pas avoir fonctionné dans ce type cellulaire puisque seulement des clones ont été obtenus avec les constructions PPM1B 1a et PPM1B 2b. Pour la suite des expériences, le clone 2b A3 est choisi (**Figure 23C**). Pour la délétion Wip1, peu de clones ont également été obtenus et le clone 10a A1 est utilisé (**Figure 23D**). Les cellules L929 ont seulement été transfectées avec la construction PPM1B 2b et plusieurs clones ont été obtenus. Le clone 18 a été sélectionné pour le reste des expériences (**Figure 23E**). Enfin, le clones 28 obtenu après transfection avec le plasmide CRISPR-Cas Wip1 est sélectionné (**Figure 23F**). Même si le Western-blot n'est pas probant des expériences supplémentaires dont des isolations de cytoplasme et de noyau ont permis de s'assurer que le clone 28 était bien déficient pour la protéine Wip1.

Ainsi, les expériences de transfection CRISPR-Cas9 ont permis d'obtenir pour les cellules HT-29, MC38 et L929 des modèles de déficiences pour la phosphatase PPM1B et Wip1. La sélection clonale est illustrée en Figure 23 et les clones utilisés pour le reste des expériences sont marqués par un astérisque rouge.

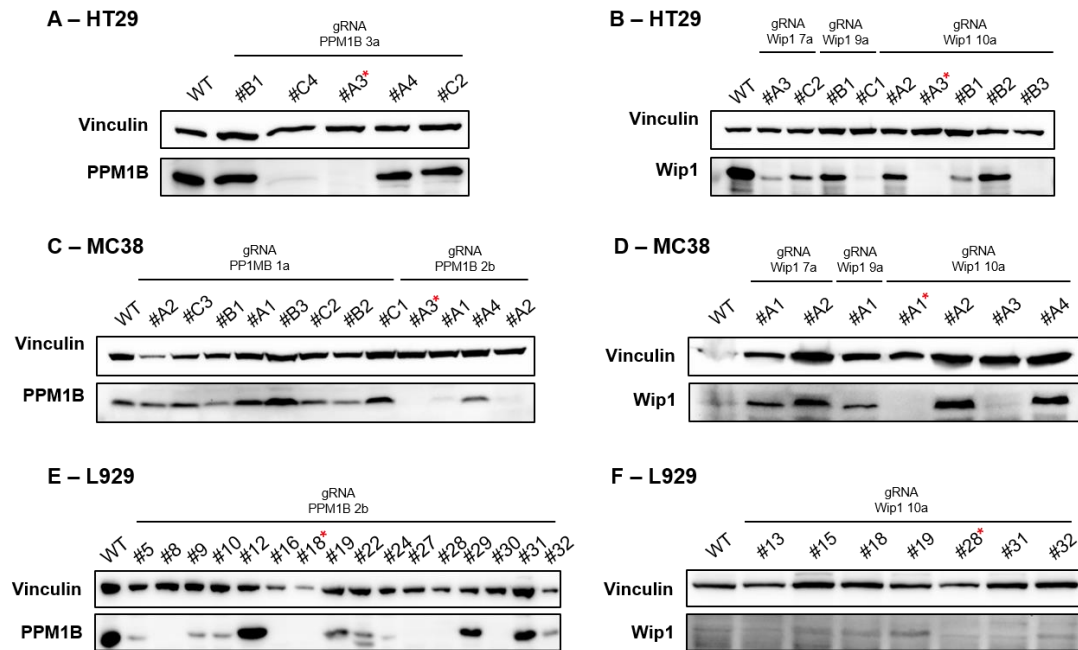


Figure 23 : Western-blots de la sélection monoclonale des modèles CRISPR-Cas9 pour les protéines PPM1B et Wip1 dans les lignées HT-29, MC38 et L929. (A) Caractérisation des clones PPM1B KO dans la lignée HT-29 ; (B) Caractérisation des clones Wip1 KO dans la lignée HT-29 ; (C) Caractérisation des clones PPM1B KO dans la lignée MC38 ; (D) Caractérisation des clones Wip1 KO dans la lignée MC38 ; (E) Caractérisation des clones PPM1B KO dans la lignée L929 ; (F) Caractérisation des clones Wip1 KO dans la lignée L929. Les * rouges représentent les clones sélectionnés pour le reste des expériences.

1.c Génération des lignées DKO Wip1 et PPM1B dans les cellules MC38

Pour obtenir des cellules DKO, les clones des cellules MC38 précédemment décrits sont utilisés et transfectés de nouveau avec les plasmides pour les phosphatases « inverse ». Ainsi, le clone Wip1 KO est transfecté avec le plasmide PPM1B 2b (**Figure 24B**) et le clone PPM1B KO est transfecté avec le plasmide PPM1D 10a (**Figure 24A**). Après transfection, une sélection monoclonale est réalisée par tri GFP. De nombreux clones ont été obtenus dans les deux sens de transfection. Arbitrairement, le clone MC38 10a A1 DKO 22 a été sélectionné et est utilisé pour le reste des expériences.

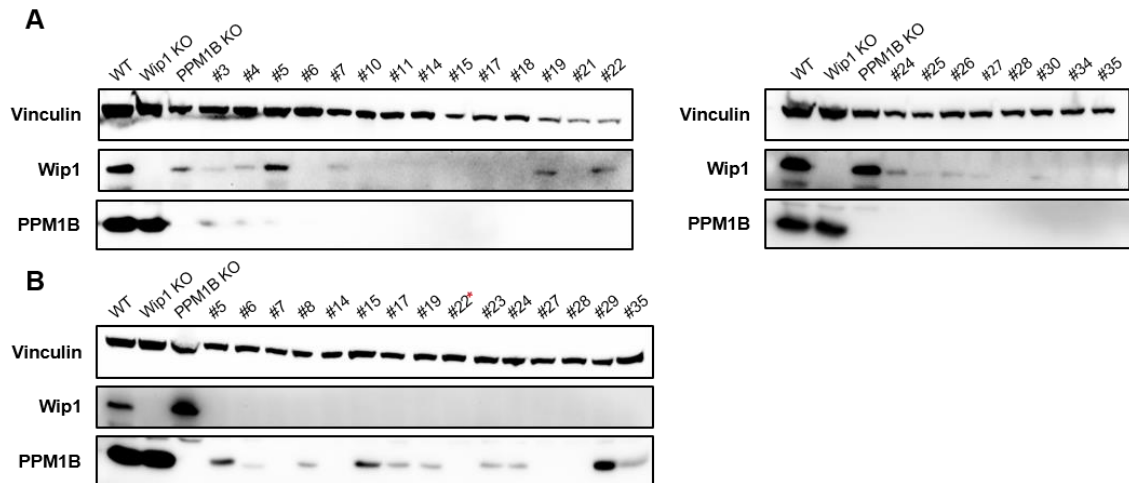


Figure 24 : Western-blots de la sélection monoclonale des modèles CRISPR-Cas9 DKO pour les protéines PPM1B et Wip1 dans les cellules MC38. (A) Caractérisation des clones DKO PPM1B/Wip1 obtenus à partir des clones PPM1B KO ; (B) Caractérisation des clones DKO PPM1B/Wip1 obtenus à partir des clones Wip1 KO.

1.d Génération de lignées MC38 RIPK3 KO

Après transfection transitoire avec les plasmides CRISPR-Cas9 RIPK3 dans les cellules MC38, une sélection monoclonale est réalisée. Plusieurs clones ont été obtenus et le clone B2 est utilisé pour le reste des expériences (**Figure 25**).



Figure 25 : Western-blots de la sélection monoclonale des modèles RIPK3 KO dans les cellules MC38.

2. Modèles de surexpression protéique

2.a Modèles de surexpression de la protéine RIPK3 humaine

Comme cité précédemment, la majorité des cellules cancéreuses n'expriment pas la kinase RIPK3²⁵⁵ comme les cellules HCT116, SW620 et MDA-MB-231. En collaboration avec le Dr Micheau et Dr Radoua, les modèles WT, Caspase 8 $-/-$, Fadd $-/-$ et Ripk1 $-/-$ pour les cellules HCT116, SW620 et MDA-MB231 utilisées dans leur travaux⁴⁷² ont été modifiées par infection virale de façon à exprimer RIPK3 constitutivement. La caractérisation de ces cellules est illustrée par la **Figure 26**. Ainsi, nous pouvons observer que la protéine RIPK3 est bien exprimée dans les cellules correspondantes et que la délétion de la Caspase 8, FADD ou encore de RIPK1 n'altère pas son expression.

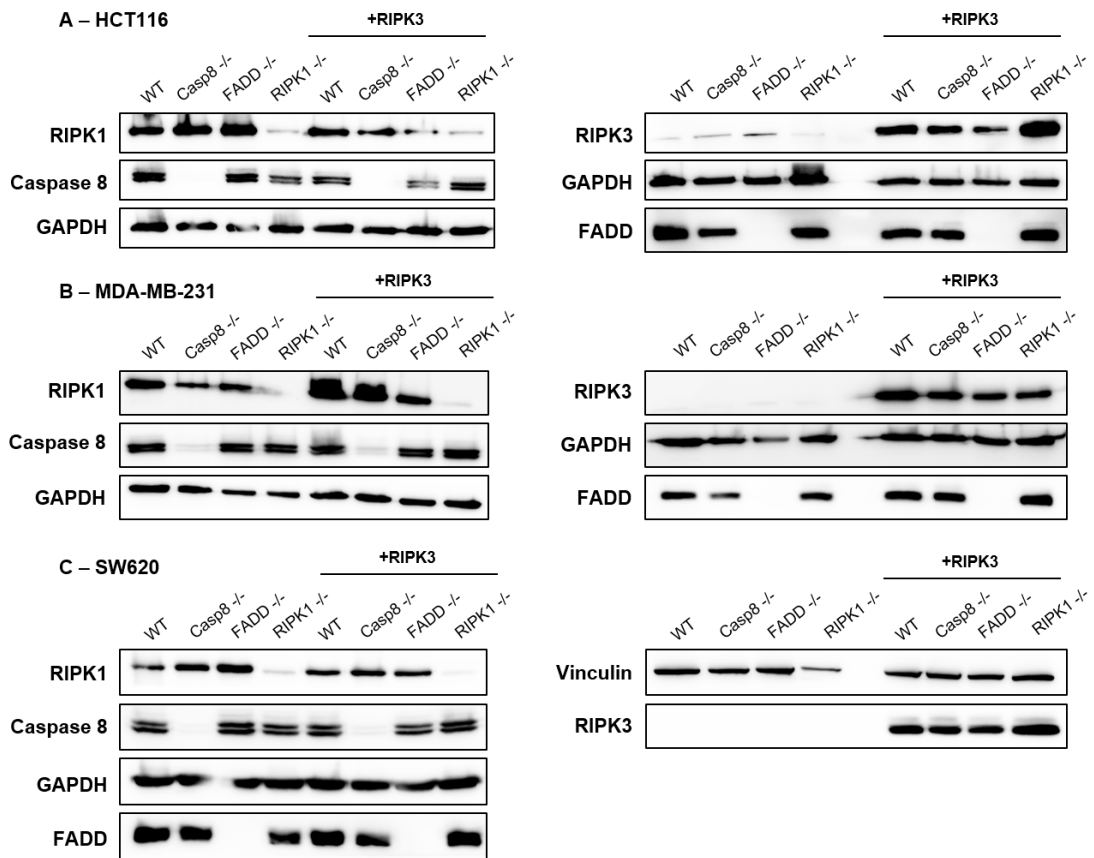


Figure 26 : Western-blots des lignées HCT116, MDA-MB-231 et SW620 déficientes pour la Caspase 8, FADD et RIPK1 surexprimant ou non la kinase RIPK3. (A) Caractérisation des cellules HCT116 WT, Caspase 8^{-/-}, FADD^{-/-} et RIPK1^{-/-} déficientes ou surexprimant RIPK3 ; (B) Caractérisation des cellules MDA-MB-231 WT, Caspase 8^{-/-}, FADD^{-/-} et RIPK1^{-/-} déficientes ou surexprimant RIPK3 ; (C) Caractérisation des cellules SW620 WT, Caspase 8^{-/-}, FADD^{-/-} et RIPK1^{-/-} déficientes ou surexprimant RIPK3.

2.b Modèle de surexpression de la protéine Wip1

Après transfection avec le plasmide mWip1 dans les cellules MC38, une sélection à la Zéocine est réalisée de façon à sélectionner uniquement les cellules ayant intégrées le plasmide. Lorsque des colonies se forment, chacune est alors repiquée et amplifiée. Plusieurs clones ont été testés et le clone 10 a été sélectionné. En effet, on observe une expression de V5 dans le clone 10 qui est un tag contenu dans la construction plasmidique du plasmide mWip1. De plus cette expression de V5 est corrélée à une augmentation de l'expression de Wip1 (**Figure 27**).

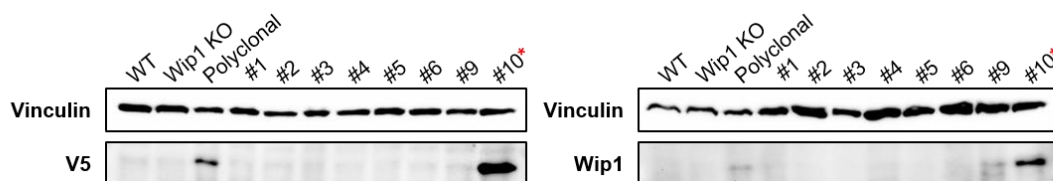


Figure 27 : Western-blots de la sélection monoclonale des cellules MC38 surexprimant Wip1.

II. Induction *in vitro* de la nécroptose

1. L'inhibition de Wip1 par le GSK2830371 potentialise les morts cellulaires dépendantes du TNF

In vitro, l'induction de la nécroptose peut être réalisée avec différents traitements. Pour définir le meilleur temps de traitement et la combinaison ou non des différentes molécules utilisées, la mort cellulaire a été suivie au cours du temps grâce à l'Incucyte. L'Incucyte est un incubateur couplé à un microscope qui permet de suivre un paramètre donné au cours du temps. Dans notre étude, la mort cellulaire est suivie par ajout de 7-AAD et peut également s'observer par la morphologie des cellules. Différents traitements ont alors été testés : le TNF seul à 20, 50 et 100 ng/ml, la combinaison TB (TNF 20 ng/ml et Birinapant 100nM) et la combinaison TBZ (TNF 20ng/ml, Birinapant 100nM et le z-VAD-FMK 20µM). Les concentrations ont été choisies selon différents travaux^{311,473,474}. L'ajout de TNF seul doit activer le complexe I responsable de l'activation de NFκB, la combinaison TB l'induction de l'apoptose et la combinaison TBZ l'induction de la nécroptose. En combinaison avec chaque traitement, l'inhibiteur GSK2830371 est ajouté pour étudier l'effet de l'inhibition de Wip1. Modèle d'étude de la nécroptose, les cellules HT-29 ont été utilisées avec les diverses combinaisons de traitements. Pour avoir l'équivalent murin, les cellules MC-38 sont également utilisées. De plus, les cellules L929 ont servies de modèles d'études. La **Figure 28** ci-dessous représente la quantification de la mort cellulaire au cours du temps dans les trois modèles.

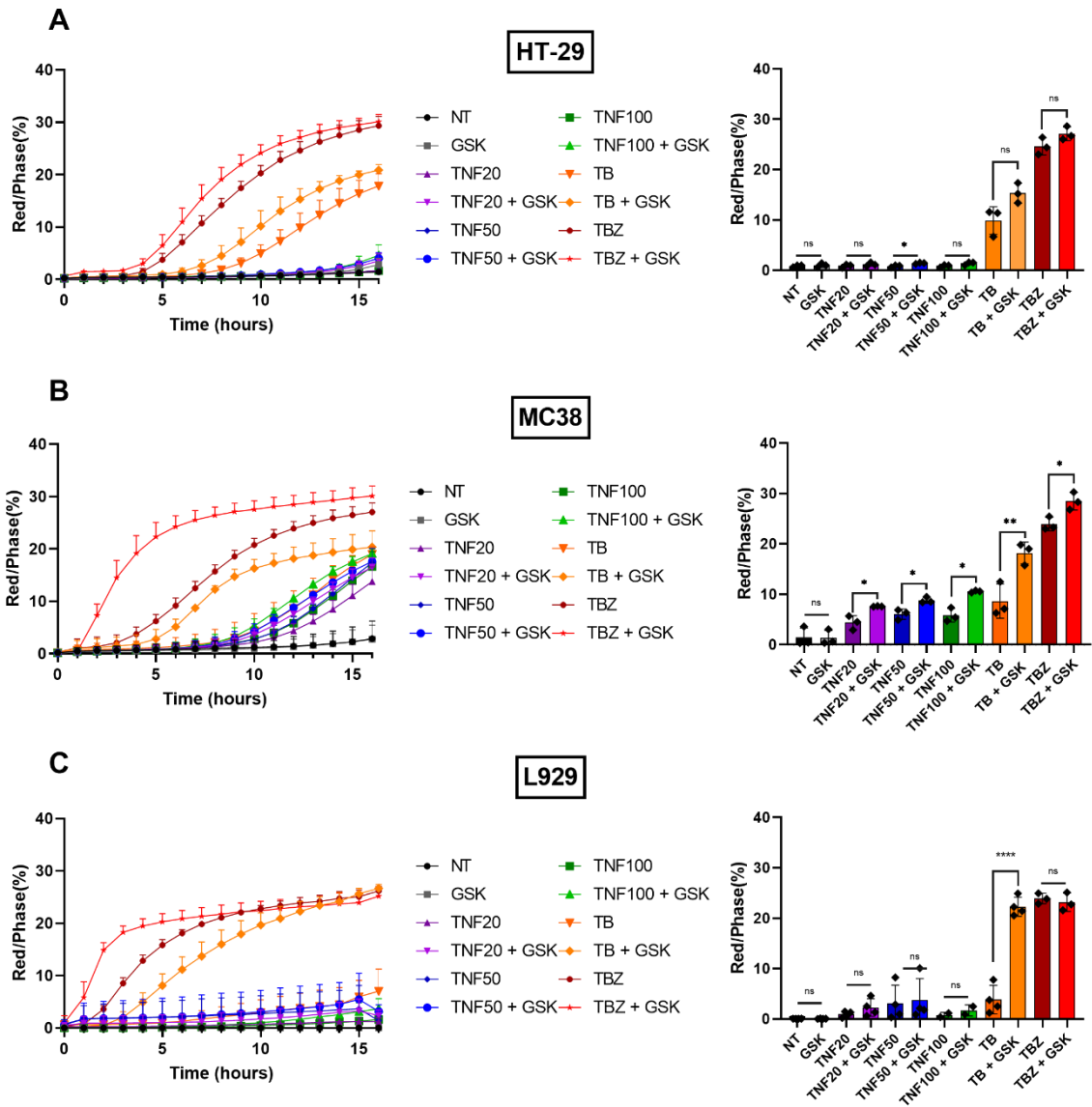


Figure 28 : L'inhibition de Wip1 par le GSK2830371 potentialise les différentes morts cellulaires dépendantes du TNF. La mort cellulaire est quantifiée à l'aide d'un marquage 7-AAD suivi par Incucyte dans les cellules HT-29 (A), MC38 (B) et L929 (C). GSK=GSK2830371 20 μ M, TNF20 = TNF 20ng/ml, TNF50 = 50ng/ml, TNF100 = TNF 100ng/ml, TB = TNF à 20ng/ml + Birinapant 100nM, TBZ = TNF 20ng/ml + Birinapant 100nM + z-VAD-FMK 20 μ M. Les histogrammes représentent la mort cellulaire à t=12h (n=3). Les données sont représentées sous forme de moyenne \pm SD, test T de Student (*p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001, ****p < 0,0001).

Dans les cellules HT-29, l'ajout de TNF seul n'induit pas de mort cellulaire majeure à l'inverse des cellules MC38 où on observe une induction de mort cellulaire à partir de 10h de traitement. Inversement à ce qui peut être décrit dans la littérature, le TNF seul dans les cellules L929 n'induit pas d'activation de mort cellulaire. Pour les trois types cellulaires, la combinaison TB induit la mort cellulaire tout comme la combinaison TBZ. Cependant, nous pouvons observer que l'induction de la nécroptose par TBZ induit une mort cellulaire plus rapide et plus importante que l'induction de l'apoptose par TB.

Pour tous les traitements, l'ajout de GSK2830371 potentialise l'induction de la mort cellulaire, significativement ou non. Ceci indique alors un potentiel rôle de la phosphatase Wip1 dans les différentes morts cellulaires induites par le TNF. Comme décrit dans la littérature^{439,440,443}, l'addition de GSK2830371 potentialise l'induction de l'apoptose ici activée par la combinaison TB. De plus, l'ajout de ce même inhibiteur avec la combinaison TBZ semble induire le même effet de potentialisation et semble être encore plus marqué pour les cellules MC38 et L929 puisque la mort cellulaire totale est plus élevée et son induction nettement plus rapide. En effet, pour toutes les combinaisons les cellules murines MC38 et L929 semblent plus sensibles. Enfin, l'inhibiteur de Wip1 GSK2830371 seule ne semble pas induire de toxicité pour les trois types cellulaires.

Pour les cellules HT-29, l'inhibition de Wip1 ne semble pas avoir d'effet significatif à 12h comme l'indique la représentation en histogramme mais l'effet est plus marqué en amont avant d'atteindre un plateau. Pour cela et comme dans certaines études, l'étude la nécroptose pour les prochaines expériences se fera généralement à 8h, temps où les différences semblent les plus élevées (**Figure 28A**). Pour les cellules MC38, même si à 12h l'addition de GSK2830371 potentialise la mort induite par la combinaison TBZ, les cellules pour les prochaines expériences ne sont pas récupérées à 8h ou 12h de traitement mais après 4h de traitement (**Figure 28B**). Le temps 4h a été choisi en fonction de la cinétique car la différence entre la combinaison TBZ et TBZ + GSK semble être maximale à ce point et également pour avoir encore assez de matériel biologique pour réaliser diverses expériences comme des études par Western-blot. En effet, nous pouvons observer que les cellules MC38 traitées avec la combinaison TBZ+GSK meurent très rapidement comme l'indique les images acquises par l'Incucyte (**Figure 28B**). Enfin, nous n'observons plus de différence à 12h entre les conditions TBZ et TBZ+GSK dans les cellules L929 puisque ces cellules sont très sensibles au traitement et les différences s'observent largement en amont (**Figure 28C**). Pour cela, les cellules L929 sont récupérées après 2h de traitement TBZ puisqu'il s'agit du temps où on observe une grande différence entre TBZ et TBZ+GSK et où les cellules ne sont pas encore totalement mortes afin de pouvoir réaliser des études par Western-blot.

Ainsi, ces études préliminaires ont permis de confirmer l'efficacité cytotoxique de la combinaison TBZ sur nos modèles cellulaires où l'inhibition de Wip1 par le GSK2830371 potentialise son effet. Pour confirmer que la nécroptose est induite, des études protéiques par Western-blot ont été conduites dans les trois modèles cellulaires.

2. L'inhibition de Wip1 par le GSK2830371 potentialise l'induction de la nécroptose

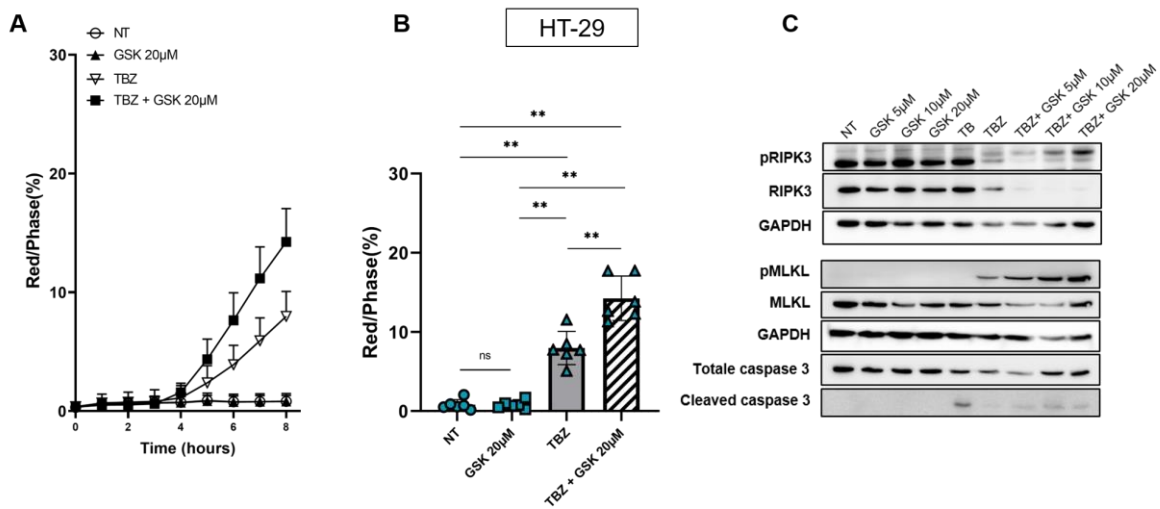


Figure 29 : L'inhibition de Wip1 par le GSK2830371 potentialise la nécroptose dans les cellules HT-29. (A) Suivi de la mort cellulaire par marquage 7-AAD par Incucyte (n=6) ; (B) Quantification de la mort cellulaire 8h après traitements TBZ (n=6) ; (C) Western-blot des cellules HT-29 8h après traitements TB, TBZ +/- GSK2830371. Les données sont représentées sous forme de moyenne \pm SD, test Mann-Whitney (*p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001, ****p < 0,0001).

8h après le traitement TBZ, l'addition de GSK2830371 potentialise l'induction de la mort cellulaire par le traitement TBZ pour les cellules HT-29 (**Figure 29A-B**). Nous pouvons alors observer que cette augmentation de mort cellulaire s'accompagne d'une augmentation des signaux pro-nécroptotiques. En effet, l'étude protéique par Western-blot montre que la combinaison de traitement TBZ induit la phosphorylation des protéines RIPK3 et MLKL qui sont des protéines clés de la nécroptose indépendamment de l'activation de marqueurs de l'apoptose. En effet, la condition TB induisant l'apoptose se caractérise par le clivage de la caspase 3 qui est très faible dans les conditions TBZ. De plus, la phosphorylation de ces protéines est augmentée par l'ajout de GSK2830371 de façon dose-dépendante puisqu'on observe une augmentation de pRIPK3 et pMLKL (**Figure 29C**).

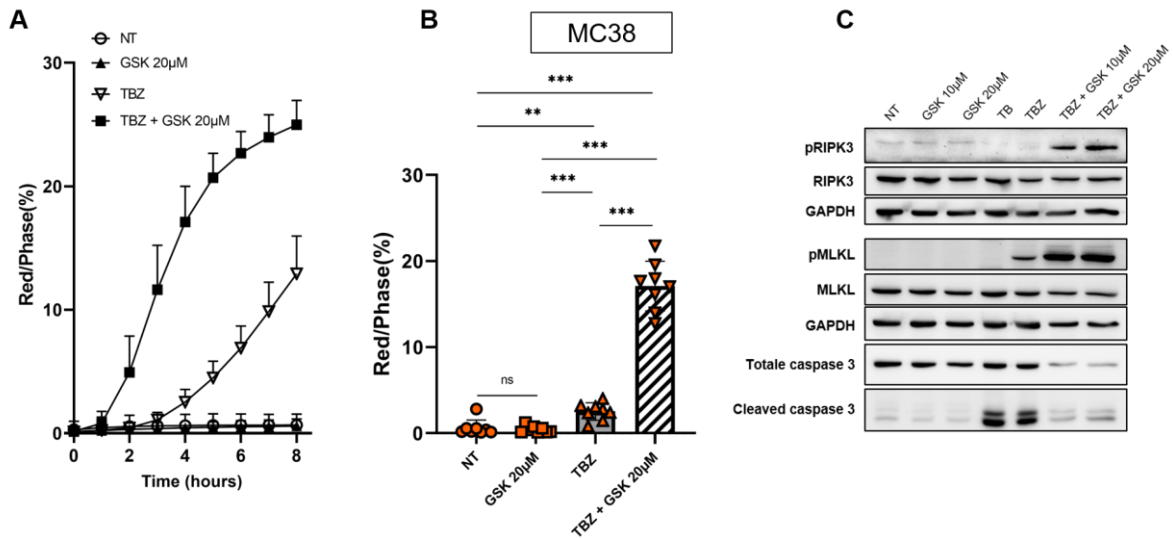


Figure 30 : L'inhibition de Wip1 par le GSK2830371 potentialise la nécroptose dans les cellules MC38. (A) Suivi de la mort cellulaire par marquage 7-AAD par Incucyte (n=8) ; (B) Quantification de la mort cellulaire 4h après traitements TBZ (n=8) ; (C) Western-blot des cellules MC38 4h après traitements TB, TBZ +/- GSK2830371. Les données sont représentées sous forme de moyenne \pm SD, test Mann-Whitney (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$).

4h après traitement TBZ, l'addition de GSK2830371 potentialise l'induction de la mort cellulaire par le traitement TBZ pour les cellules MC38 (**Figure 30A-B**). Nous pouvons alors observer que cette augmentation de mort cellulaire s'accompagne d'une augmentation des signaux pro-nécroptotiques. En effet, l'étude protéique par Western-blot montre que la combinaison de traitement TBZ induit la phosphorylation des protéines RIPK3 et MLKL qui sont des protéines clés de la nécroptose qui sont largement augmentées en combinaison avec l'inhibiteur GSK283071 dans les cellules MC38. La condition TB induit également l'activation de l'apoptose puisque l'on observe un clivage de la caspase 3 indépendamment de la phosphorylation des protéines nécroptotiques. A l'inverse des cellules HT-29, le traitement TBZ dans les cellules MC38 induit également un clivage des caspases 3 en même temps qu'une activation des protéines nécroptotiques. Il est à noter que l'ajout de GSK2830371 induit une disparition du clivage de la caspase 3 et une augmentation de la phosphorylation de RIPK3 et MLKL (**Figure 30C**). Certaines études ont pu montrer que l'inhibiteur de caspases z-VAD-FMK semblaient moins efficaces dans les cellules murines et pourrait expliquer ce clivage de caspases⁴⁷⁶.

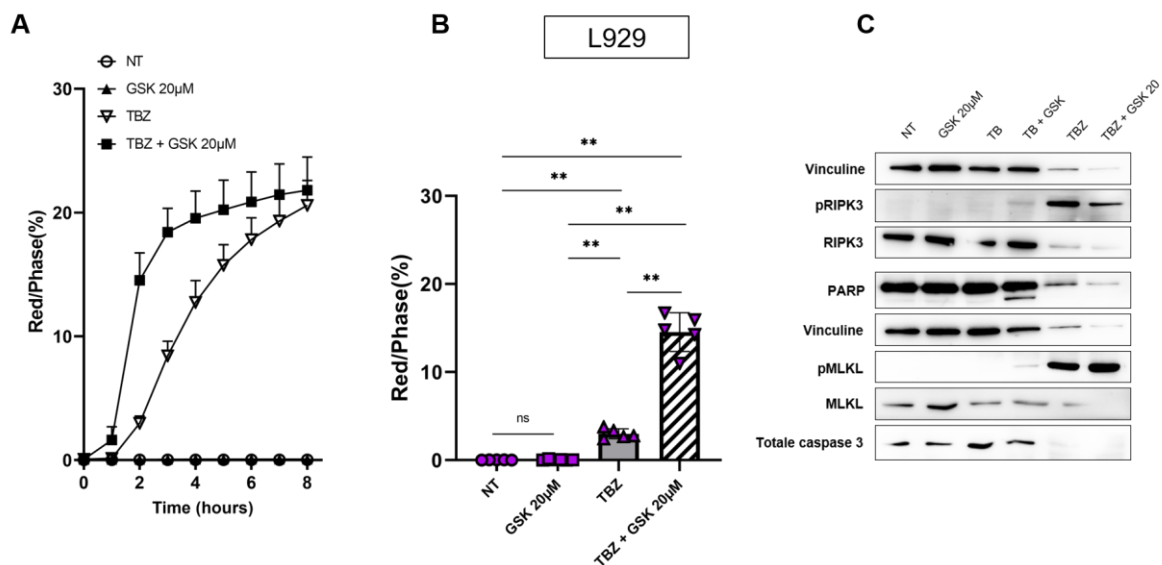


Figure 31 : L'inhibition de Wip1 par le GSK2830371 potentialise la nécroptose dans les cellules L929. (A) Suivi de la mort cellulaire par marquage 7-AAD par Incucyte (n=5) ; (B) Quantification de la mort cellulaire 2h après traitements TBZ (n=5) ; (C) Western-blot des cellules L929 2h après traitements TB, TBZ +/- GSK2830371. Les données sont représentées sous forme de moyenne \pm SD, test Mann-Whitney (*p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001, ****p < 0,0001).

2h après traitement TBZ, l'addition de GSK2830371 potentialise l'induction de la mort cellulaire par le traitement TBZ pour les cellules L929 (**Figure 31A-B**). Nous pouvons alors observer **Figure 31C** que cette augmentation de mort cellulaire s'accompagne d'une augmentation des signaux pro-nécroptotiques. Comme pour les cellules HT-29 et MC38, l'étude protéique par Western-blot montre que la combinaison de traitement TBZ induit la phosphorylation des protéines RIPK3 et MLKL qui sont largement augmentées en combinaison avec l'inhibiteur GSK283071 dans les cellules L929. Bien que les cellules soient récupérées seulement deux heures après le traitement TBZ afin d'avoir assez de matériel biologique pour réaliser une extraction protéique, nous pouvons observer que le traitement TBZ induit une très forte mort cellulaire puisque la vinculine est modulée et que ceci est encore plus marqué avec le GSK2830371. Ainsi, si la quantité de pRIPK3 et pMLKL est rapportée à la Vinculine, nous pouvons observer que l'addition de GSK2830371 augmente largement la nécroptose induite par le TBZ. De plus, la condition TB dans les cellules L929 d'induit pas d'activation de la nécroptose mais bien de la nécroptose puisque l'on observe le clivage de la PARP, absente dans la condition TBZ.

Ainsi, les études protéiques confirment que la combinaison TBZ induit de la mort cellulaire par activation de la nécroptose et qu'elle est augmentée lorsque l'inhibiteur de Wip1 GSK2830371 est ajouté.

3. La kinase RIPK3 est nécessaire à l'activation de la nécroptose

Pour confirmer que la combinaison de traitement TBZ est responsable de l'induction de la nécroptose, la mort cellulaire a été mesurée dans les cellules MC38 RIPK3 KO (**Figure 32**). Ainsi, nous pouvons observer que comparé aux cellules WT, l'absence génétique de RIPK3 empêche d'induire la mort cellulaire par le traitement TBZ.

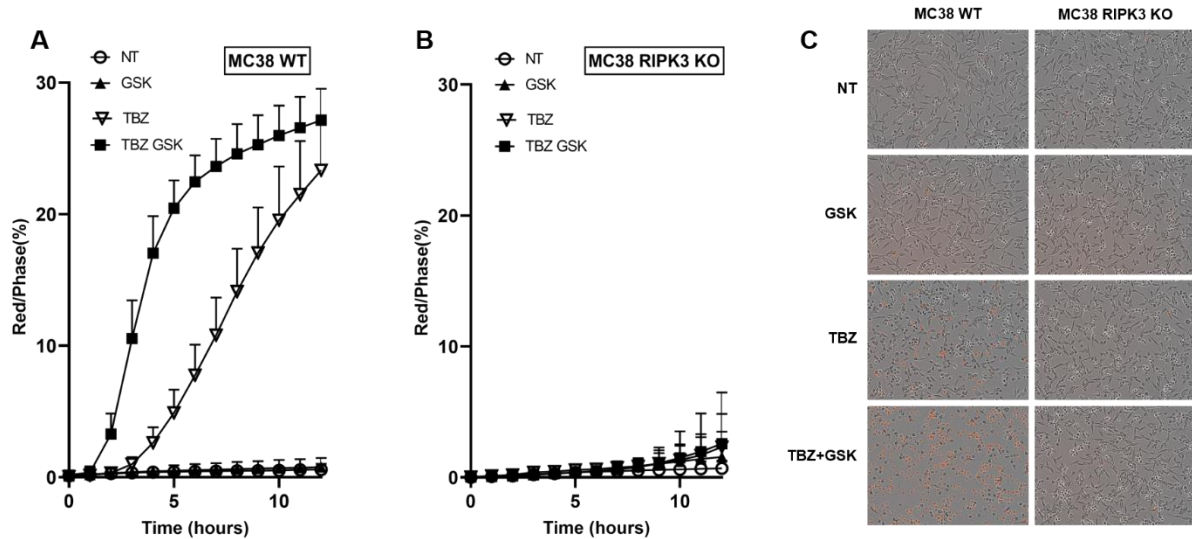


Figure 32 : La kinase RIPK3 est nécessaire à l'activation de la nécroptose par le traitement TBZ. (A) Suivie de la mort cellulaire par marquage 7-AAD par Incucyte dans les cellules MC38 WT (n=6) ; (B) Suivie de la mort cellulaire par marquage 7-AAD par Incucyte dans les cellules MC38 RIPK3 KO (n=6) ; (C) Images prises par l'Incucyte 4h traitement marquées au 7-AAD. Les données sont représentées sous forme de moyenne \pm SD.

Également, l'utilisation d'inhibiteurs de nécroptose peut permettre de vérifier l'induction et l'activation de la nécroptose par un traitement. Si l'inhibiteur permet de restaurer la sensibilité des cellules à la mort induite alors la nécroptose est activée. Pour se faire, les inhibiteurs Nec1s, GSK'843 et NSA ont été utilisés (Nec1s inhibe RIPK1, GSK'843 inhibe RIPK3 et NSA inhibe MLKL) avec le traitement TBZ et sont illustrés par la **Figure 33**.

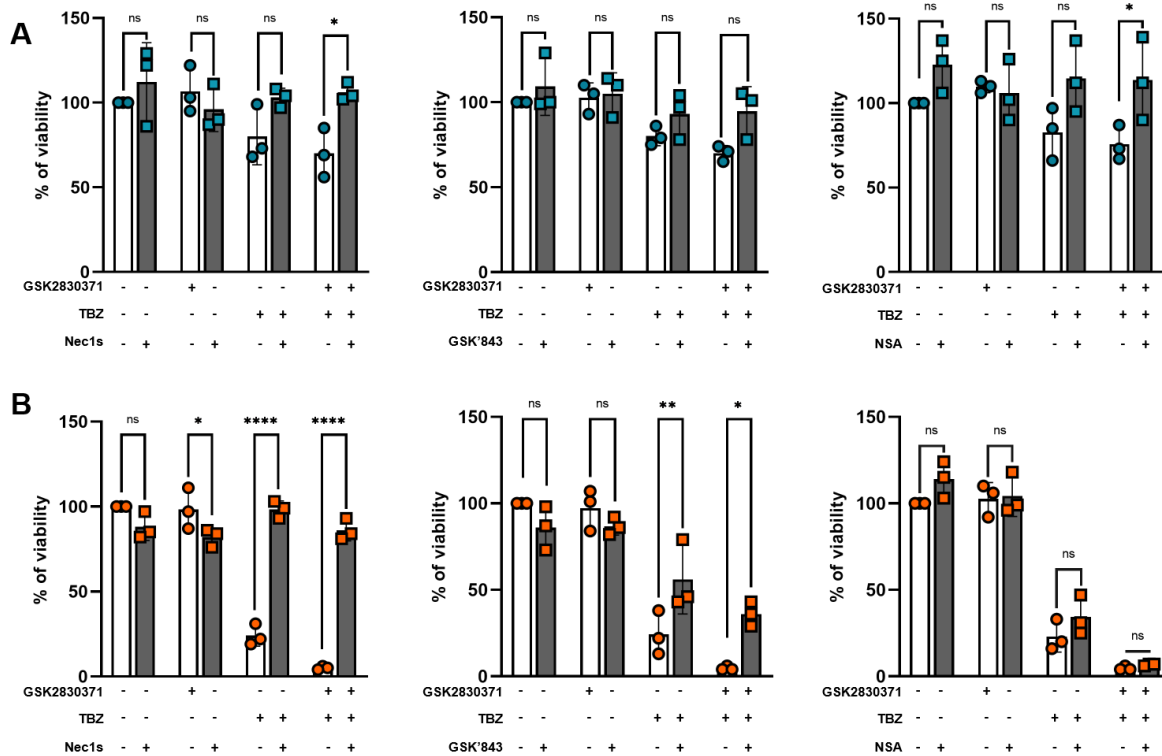


Figure 33 : L'utilisation d'inhibiteurs de nécroptose Nec1s, GSK'843 et NSA inhibe la mort induite par la combinaison TBZ. (A) Quantification de la viabilité cellulaire dans les cellules HT-29 8h après traitements (n=3), (Test Cell Title Glow, Promega) ; (B) Quantification de la viabilité cellulaire dans les cellules MC38 4h après traitements (n=4), (Test Cell Title Glow, Promega). Les données sont représentées sous forme de moyenne \pm SD, test Two-way ANOVA (*p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001, ****p < 0,0001).

Dans les cellules HT-29, l'ajout de Nec1s, GSK'843 et NSA semble empêcher la sensibilité des cellules au traitement TBZ (**Figure 33A**). En effet, nous pouvons observer que lorsqu'un des inhibiteurs est ajouté en même temps que le traitement TBZ on observe une tendance dans la réduction de la mort cellulaire, et ceci est d'autant plus marqué lorsque GSK2830371 est présent. Les mêmes expériences sont réalisées sur les cellules MC38 (**Figure 33B**). Tout d'abord, ce test de viabilité cellulaire mesurant l'ATP relargué relatif à la mort cellulaire montre encore une fois que les cellules MC38 sont beaucoup plus sensibles au traitement TBZ que les cellules HT29. Enfin, nous pouvons également constater que les inhibiteurs Nec1s et GSK'843 empêche de sensibiliser les cellules MC38 au traitement TBZ. L'ajout de Nec1s en même temps que le traitement TBZ dans les cellules MC38 permet de supprimer presque totalement la mort induite par TBZ puisque la viabilité des cellules est proche de 100%. L'ajout de

GSK'843 permet également de restaurer la sensibilité des cellules au traitement TBZ mais de façon moins importante qu'avec le Nec1s. Inhibiteur de RIPK1, l'ajout de Nec1s permet de bloquer l'induction de la mort cellulaire très en amont de la signalisation cellulaire et ainsi empêcher l'induction de l'apoptose et de la nécroptose et restaurer une viabilité presque de 100%. L'ajout de GSK'843 permet seulement d'inhiber RIPK3 et donc uniquement la nécroptose. Comme nous l'avons observé dans la **Figure 30** précédemment, le traitement TBZ dans les cellules MC38 permet également une activation de l'apoptose. Ainsi, l'ajout de GSK'843 ne permet pas d'empêcher aussi drastiquement la mort cellulaire que Nec1s car une partie de la mort induite par TBZ doit activer légèrement l'apoptose dans les cellules MC38. Pour finir, l'ajout de NSA n'a pas d'effet sur la toxicité induite par le traitement TBZ puisque l'inhibiteur de MLKL NSA n'a pas d'effet sur les cellules murines³²². Pour limiter totalement la mort induite par le traitement TBZ, des expériences en utilisant les inhibiteurs en pré-traitement auraient pu être réalisées pour inhiber davantage les protéines nécroptotiques et réduire la mort induite par le traitement TBZ.

Pour finir, pour s'assurer que le traitement TBZ induit la nécroptose par le recrutement de la kinase RIPK3, les cellules HCT116, SW620 et MDA-MB-231 sont traitées par la combinaison TBZ (**Figure 34**). Comme ces trois types cellulaires n'expriment pas RIPK3, ces cellules doivent être insensibles à la mort induite par le traitement TBZ et l'ajout de RIPK3 doit restaurer cette sensibilité. De plus, les modèles Caspase 8 $-/-$, FADD $-/-$ et RIPK1 $-/-$ vont permettre de confirmer que le traitement TBZ induit la mort cellulaire par activation de la nécroptose et non par une autre voie. En effet, les protéine Caspase 8 et FADD étant indispensables à l'induction de l'apoptose, leur absence ne doit pas affecter l'induction à la nécroptose induite par le traitement TBZ. D'autre part, le traitement TBZ induisant la voie canonique dépendante de RIPK1, l'absence de RIPK1 doit empêcher l'induction de la nécroptose. Ainsi, les cellules WT, Caspase 8 $-/-$, FADD $-/-$ et RIPK1 $-/-$ sont traitées avec la combinaison TB et TBZ qui induisent l'apoptose et la nécroptose réciproquement. Pour suivre l'effet de notre traitement, la mort cellulaire est suivie par Incucyte en utilisant du 7-AAD. Ces expériences sont réalisées dans les cellules HCT116 (**Figure 34A**), MDA-MB-231 (**Figure 34B**) et SW620 (**Figure 34C**).

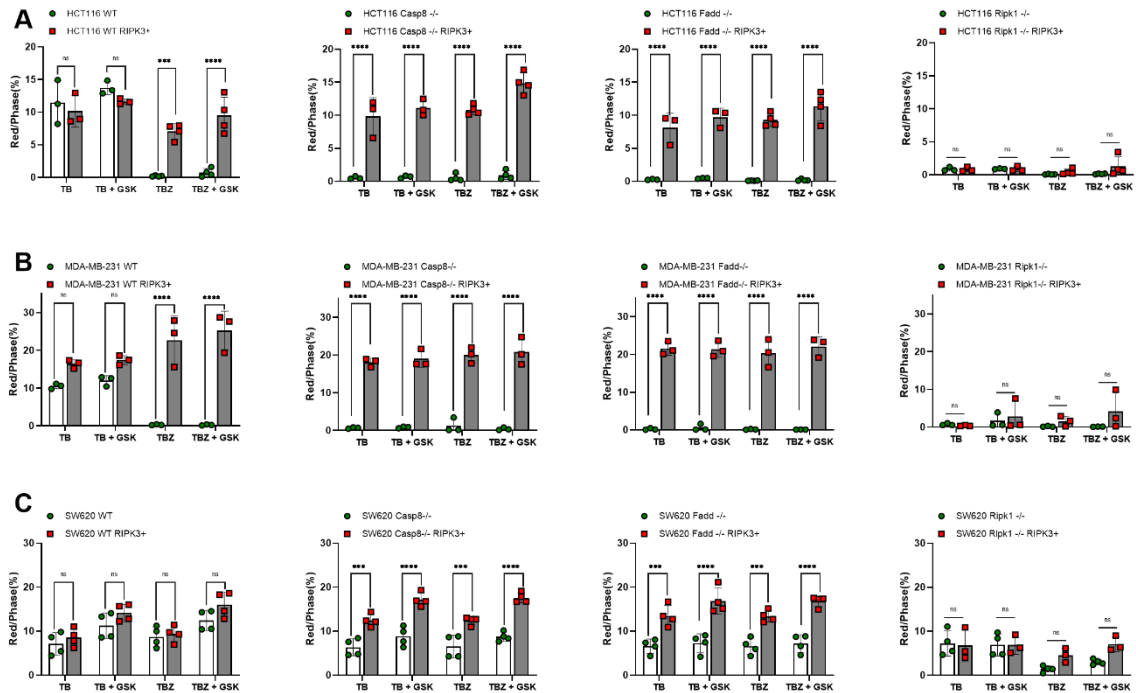


Figure 34 : L'ajout de la kinase RIPK3 sensibilise les cellules à la nécroptose par le traitement TBZ de façon RIPK1-dépendante. (A) Quantification de la mort cellulaire par Incucyte par marquage 7-ADD 12h après traitements dans les cellules HCT116 (n=3) ; (B) Quantification de la mort cellulaire par Incucyte par marquage 7-ADD 12h après traitements dans les cellules MDA-MB-231 (n=3) ; (C) Quantification de la mort cellulaire par Incucyte par marquage 7-ADD 12h après traitements dans les cellules SW620 (n=3). Les données sont représentées sous forme de moyenne \pm SD, test Two-way ANOVA (*p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001, ****p < 0,0001).

Dans les cellules HCT116 WT, MDA-MB-231 et SW620 WT, nous pouvons observer que le combinaison TB induisant l'apoptose permet d'induire la mort cellulaire, qui semble être augmentée lorsque l'inhibiteur GSK2830371 est ajouté. La caspase 8, Fadd et Ripk1 participe à la mort induite par la combinaison TB car nous pouvons observer que lorsque ces protéines sont absentes dans les cellules HCT116, MDA-MB-231 et SW620 il n'y a plus de mort induite. Ces résultats sont attendus car il est connu que la caspase 8, fadd et ripk1 participe à l'induction de l'apoptose.

Les cellules HCT116 WT, MDA-MB-231 WT et SW620 WT sont insensibles au traitement TBZ en présence ou en absence de GSK2830371. A l'inverse, l'expression de la kinase RIPK3 dans ces cellules permet d'induire la mort cellulaire à la suite du traitement TBZ, qui semble être légèrement augmentée par l'ajout du GSK2830371. Il est important de souligner que l'absence de la caspase 8 ou de Fadd n'impacte pas la mort induite par le traitement TBZ dans les cellules RIPK3+. De plus, la mort induite par la combinaison TB ou bien TBZ ne se produit plus dans les cellules où la kinase RIPK1 est absente. Ainsi, ces expériences permettent de confirmer que la combinaison de traitement TBZ permet d'induire spécifiquement la nécroptose canonique. En effet, la kinase étant spécifique de la nécroptose son ajout dans les cellules permet d'activer alors la mort cellulaire à la suite du traitement TBZ. De

plus, la combinaison TBZ permet d'activer la nécroptose canonique activée par le complexe IIb de façon Ripk1 dépendante comme décrit pas la **Figure 11**. Enfin, ces expériences permettent de confirmer que la combinaison TBZ induit la nécroptose indépendamment de l'activation de l'apoptose car l'absence de la caspase 8 et de Fadd n'impacte pas la mort induite par le TBZ en présence de Ripk3.

III. L'absence de phosphatases PP2C potentialise l'induction de la nécroptose

Connaissant le rôle de la phosphatase Wip1 dans diverses morts cellulaires telles que l'apoptose, la sénescence ou encore son rôle dans l'autophagie, cette protéine pourrait alors jouer un rôle dans d'autres mécanismes morts. Les expériences décrites précédemment semblent montrer un rôle potentiel de la phosphatase Wip1 dans la nécroptose puisque l'utilisation de GSK2830371 permet de potentialiser la nécroptose induite par le TBZ. Pour vérifier ces hypothèses, des cellules déficientes pour Wip1 ont été créées et ont été exposées à un traitement au TBZ. De plus, les cellules surexprimant Wip1 ont également été mises au point et sont aussi traitées au TBZ (**Figure 35A**).

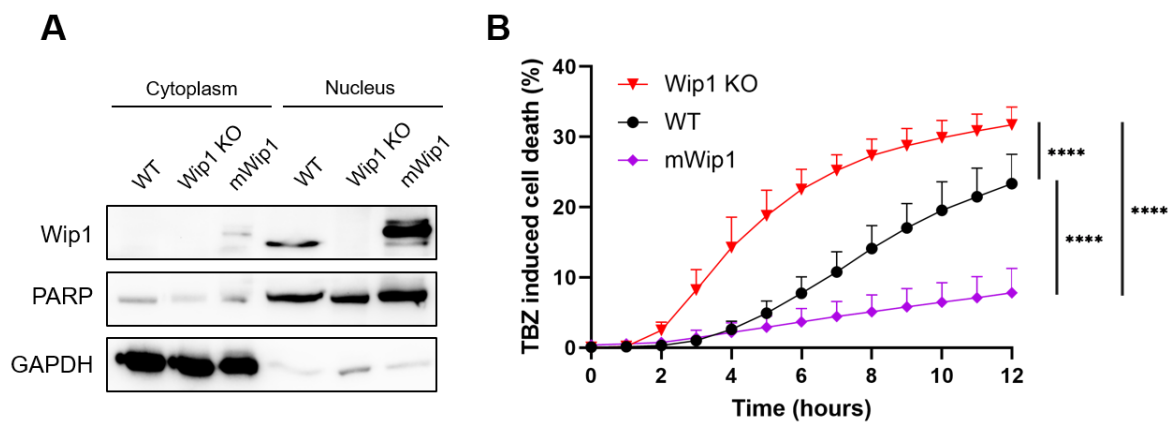


Figure 35 : L'expression de la phosphatase Wip1 module la mort induite par nécroptose à la suite du traitement TBZ dans les cellules MC38. (A) Western-blot des cellules MC38 WT, déficientes pour Wip1 (Wip1 KO) et surexprimant Wip1 (mWip1) après extraction du cytoplasme et du noyau ; (B) Suivi de la mort cellulaire par marquage 7-AAD par Incucyte (n=7). Les données sont représentées sous forme de moyenne \pm SD, test Two-way ANOVA (*p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001, ****p < 0,0001).

Ainsi, nous pouvons observer que l'absence génétique de Wip1 potentialise la mort induite par le traitement TBZ soit par nécroptose par rapport aux cellules WT. Inversement, la surexpression de Wip1 retarde l'induction de la nécroptose (**Figure 35B**). En effet, les cellules surexprimant Wip1 sont beaucoup moins sensibles au traitement TBZ car même après 8h de traitement le nombre de cellules mortes reste plus faible comparément aux cellules WT et Wip1 KO.

Ces résultats utilisant un modèle de délétion génétique de Wip1 nous permettent de confirmer les observations précédemment décrites avec l'utilisation de l'inhibiteur chimique de Wip1, le GSK2830371. Comme l'absence génétique de la protéine Wip1 ou son inhibition chimique sensibilisent l'induction de la nécroptose par le TBZ et que la surexpression de cette protéine induit le phénotype inverse, l'hypothèse selon laquelle la phosphatase Wip1 intervient dans la nécroptose semble se confirmer.

En 2015, la phosphatase PPM1B appartenant à la famille des PP2C a été décrite comme jouant un rôle dans la nécroptose⁴⁷⁷. En effet, cette phosphatase a été décrite comme régulateur négatif de la nécroptose à travers son interaction avec la kinase RIPK3. Par son activité de phosphatase, la protéine PPM1B régule négativement RIPK3 dans le cytoplasme et réprime la nécroptose. Ainsi, l'absence de PPM1B permet à RIPK3 d'être plus phosphorylé et participer davantage à la phosphorylation de MLKL et ainsi augmenter la nécroptose.

Comme très peu d'inhibiteurs sont dirigés contre la phosphatase PPM1B, nous avons mis au point des cellules déficientes pour la protéine PPM1B afin de vérifier le phénotype observé en 2015. De plus, comme nous observons un effet de l'inhibiteur GSK2830371 nous voulons nous assurer que l'effet observé est bien dû à l'inhibition de Wip1 et non pas à l'inhibition de PPM1B qui a déjà été décrite comme régulant la nécroptose.

Pour cela, les modèles de déficiences pour la protéine PPM1B KO ont été réalisés dans des modèles de HT-29, MC38 et L929. Après obtention des clones et pour vérifier la spécificité de l'inhibiteur GSK2830371, des études par Western-blot ont été réalisées (**Figure 36**). Pour faciliter la visualisation de Wip1 qui est une protéine nucléaire, des expériences par extraction du cytoplasme et du noyau ont été réalisées.

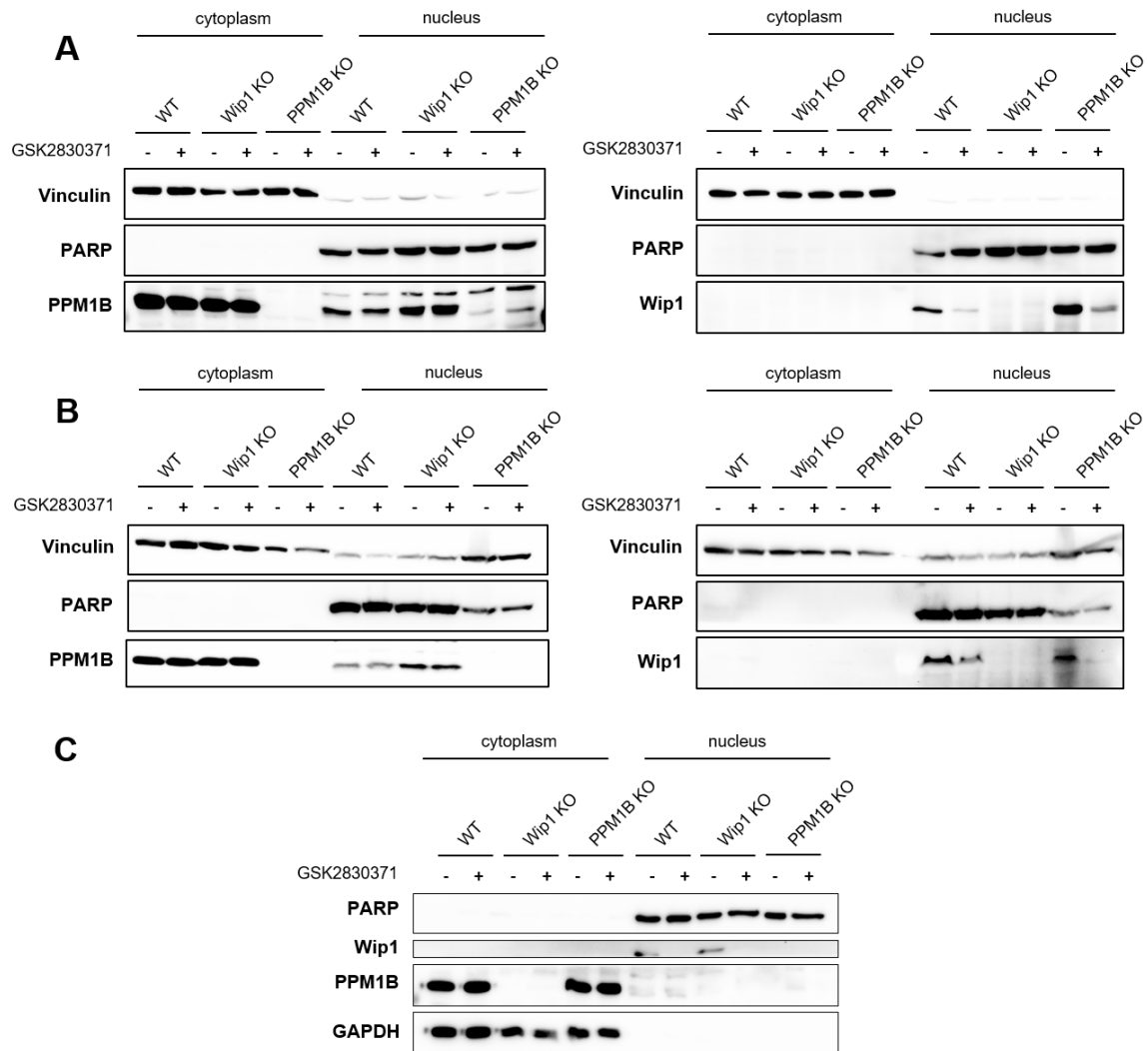


Figure 36 : La délétion de la phosphatase Wip1 semble induire l'expression de la phosphatase PPM1B et inversement. (A) Western-blot des cellules HT29 WT, Wip1 KO et PPM1B KO après extraction du cytoplasme et du noyau 6h après traitement au GSK2830371 20 μ M ; (B) Western-blot des cellules MC38 WT, Wip1 KO et PPM1B KO après extraction du cytoplasme et du noyau 6h après traitement au GSK2830371 20 μ M ; (C) Western-blot des cellules L929 WT, Wip1 KO et PPM1B KO après extraction du cytoplasme et du noyau 6h après traitement au GSK2830371 20 μ M.

Ainsi, nous pouvons observons que les clones sélectionnés n'expriment plus la protéine d'intérêt puisque Wip1 est absent dans les cellules Wip1 KO et PPM1B absent dans les cellules PPM1B KO. De plus, l'inhibiteur GSK2830371 ne semble pas inhiber la phosphatase PPM1B et permet bien de réduire l'expression de Wip1 (**Figure 36**). Cependant, il semble que l'absence d'une phosphatase permet la surexpression d'une autre. En effet, les cellules Wip1 KO semblent exprimer plus fortement PPM1B par rapport aux cellules WT et inversement les cellules Wip1 KO semblent exprimer plus fortement Wip1 par rapport aux cellules WT, notamment dans les cellules HT-29 et MC38 (**Figure 36A-B**). Ainsi, il semblerait qu'une compensation s'opère entre ces deux phosphatases appartenant à la famille des PP2Cs. Pour éliminer ce biais de compensation entre ces deux protéines, des cellules DKO Wip1 et PPM1B ont alors été mises au point dans les cellules MC38.

Ayant tous les modèles de délétions génétiques simples ou doubles (**Figure 36A**) dans les cellules MC38, la sensibilité de ces cellules à l'induction de la nécroptose a été mesurée en quantifiant la mort cellulaire totale par Incucyte. Pour cela, la nécroptose a été induite par le traitement TBZ. Ainsi, nous pouvons observer que l'absence de PPM1B ne semble pas avoir d'effet sur l'induction de la nécroptose et que les cellules DKO suivent le même profil que les cellules Wip1 KO (**Figure 37B**). De plus, l'étude protéique par Western-blot permet de confirmer que les cellules Wip1 KO et DKO sont plus sensibles à l'induction de la nécroptose car elles présentent des niveaux de phosphorylation plus importante pour pMLKL (**Figure 37C**).

Ces résultats semblent indiquer que l'absence de la protéine Wip1 suffit à sensibiliser les cellules à la nécroptose et que la protéine seule de PPM1B ne semble pas sensibiliser les cellules comme le montre le papier de Chen *et al*⁴⁷⁷.

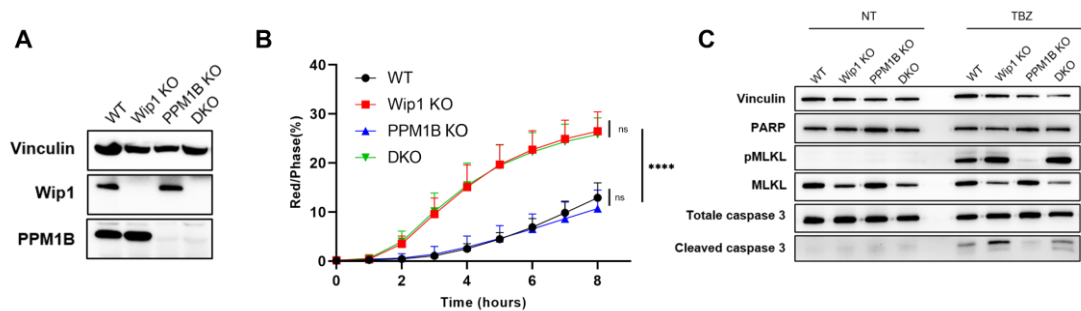


Figure 37 : L'absence de phosphatases PP2Cs potentialise l'induction de la nécroptose par le traitement TBZ. (A) Western-blot des différentes lignées MC38 déficientes pour les phosphatases Wip1 et/ou PPM1B ; (B) Suivi de la mort cellulaire induite par le traitement TBZ par marquage 7-AAD par Incucyte dans les cellules MC38 (n=8) ; (C) Western-blot des modèles MC38 déficients pour les PP2Cs 4h après traitement TBZ. Les données sont représentées sous forme de moyenne \pm SD, test Two-way ANOVA (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$).

Pour tester la spécificité de l'inhibiteur de Wip1 sur l'induction de la nécroptose par le traitement TBZ, les cellules WT, Wip1 KO, PPM1B KO et DKO ont été traitées par le traitement TBZ seul et en combinaison avec le GSK2830371. La mort totale a été suivie par Incucyte et des analyses par Western-blot ont été réalisées.

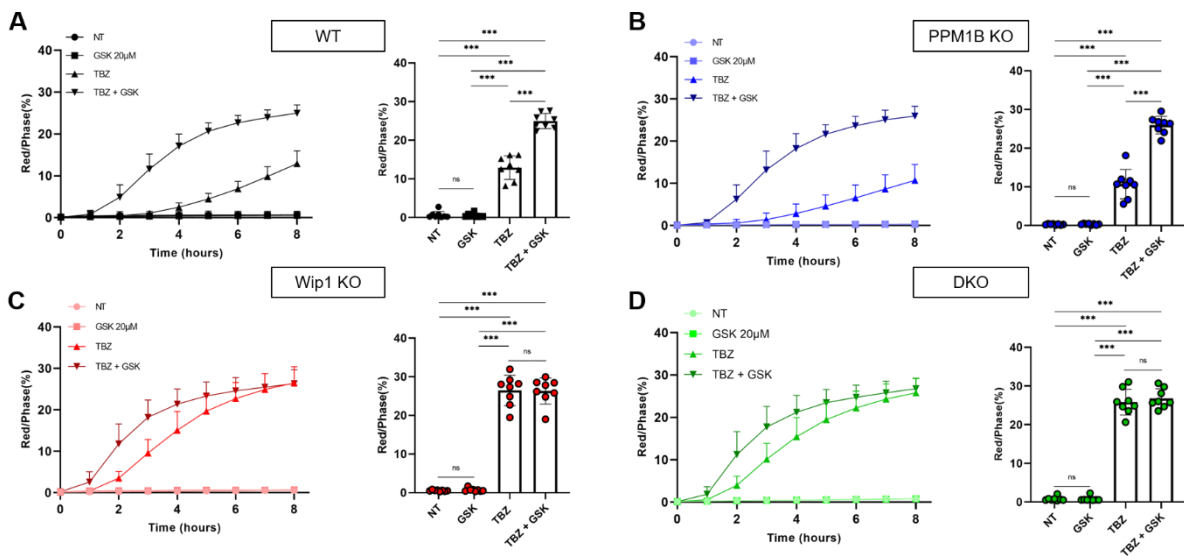


Figure 38 : L'inhibition de Wip1 par le GSK2830371 potentialise la mort cellulaire induite par la combinaison TBZ même en absence de Wip1. (A) Suivi de la mort cellulaire par marquage 7-AAD par Incucyte dans les cellules MC38 WT ; (B) Suivi de la mort cellulaire par marquage 7-AAD par Incucyte dans les cellules MC38 PPM1B KO ; (C) Suivi de la mort cellulaire par marquage 7-AAD par Incucyte dans les cellules Wip1 KO ; (D) Suivi de la mort cellulaire par marquage 7-AAD par Incucyte dans les cellules MC38 DKO Wip1/PPM1B. Les histogrammes représentent la mort cellulaire à t=8h (n=8). Les données sont représentées sous forme de moyenne \pm SD, test Mann-Whitney (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$).

Nous pouvons alors observer que le GSK2830371 semble avoir une autre cible que la phosphatase Wip1 puisque l'addition du GSK2830371 au traitement TBZ dans les cellules Wip1 KO permet toujours de potentialiser l'induction à la nécroptose (**Figure 38C**). Néanmoins, nous pouvons exclure le fait que l'inhibiteur GSK2830371 agit sur la phosphatase PPM1B car les cellules PPM1B répondent toujours à l'inhibiteur lorsqu'il est couplé au traitement TBZ (**Figure 38B**). Pour vérifier un éventuel effet compensatoire de la délétion d'une phosphatase PP2Cs sur une autre, les cellules DKO ont également été traitées. Nous pouvons observer que la cinétique de réponse au traitement TBZ+GSK dans les cellules DKO est identique à celle observée pour les cellules Wip1 KO signifiant que l'inhibiteur GSK283071 possèdent une autre cible que la phosphatase Wip1 mais qui n'est pas la phosphatase PPM1B (**Figure 38A**). Pour vérifier si une différence s'observe dans la signalisation cellulaire, des études par Western-blot sont réalisées (**Figure 39**).

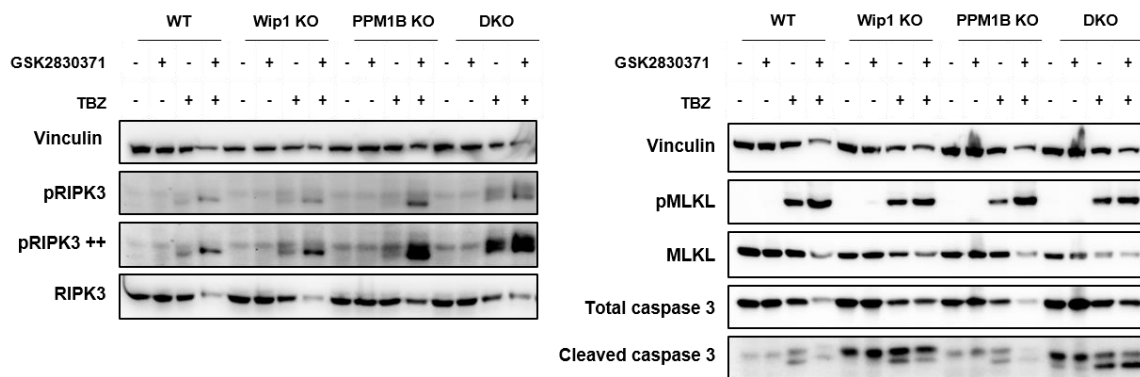


Figure 39 : L'absence de phosphatases PP2Cs augmente la phosphorylation des protéines nécroptotiques. Western-blot des modèles MC38 déficients pour les PP2Cs 4h après traitement TBZ ± GSK2830371.

L'analyse protéique en **Figure 39** confirme bien que les cellules PPM1B KO présentent le même phénotype que les cellules WT à savoir que l'addition de GSK2830371 au TBZ augmente nettement la phosphorylation de RIPK3 et MLKL. Dans les cellules Wip1 KO, l'effet du GSK2830371 est toujours légèrement présent avec une phosphorylation accrue de pRIPK3 et pMLKL avec l'inhibiteur. Dans les cellules DKO, l'effet du GSK2830371 semble moins marqué puisque que les niveaux de phosphorylation de RIPK3 et MLKL semblent presque identiques avec et sans inhibiteur. Ainsi, la délétion des deux phosphatases Wip1 et PPM1B semblent davantage sensibiliser les cellules à la nécroptose qu'une simple délétion de Wip1.

Comme observé précédemment, un clivage de la caspase 3 s'observe dans les cellules WT à la suite du traitement TBZ et diminue lorsqu'il est couplé à l'inhibiteur GSK2830371. C'est observation est également retrouvée dans les cellules PPM1B KO. Conformément à la littérature, l'absence de Wip1 sensibilise les cellules à l'apoptose puisqu'on observe un plus fort clivage de la caspase 3 même en présence de l'inducteur de nécroptose TBZ. Comme dans les cellules WT et PPM1B, l'addition du GSK2830371 au TBZ réduit le clivage de la caspase 3 dans les cellules Wip1 KO. En revanche, cet effet ne s'observe plus dans les cellules DKO.

Pour conclure sur cette partie, nous n'observons pas le même phénotype observé en 2015 où la phosphatase PPM1B a été décrite comme régulateur de la nécroptose. Il est important de souligner que les expériences ont été réalisées sur des cellules cancéreuses murines et non pas sur des fibroblastes murins comme dans le travail de Chen *et al*⁴⁷⁷. Par ailleurs, l'absence de la phosphatase Wip1 potentialise la nécroptose induite par la combinaison TBZ. Comme les cellules DKO répondent de la même façon que les cellules Wip1 KO et que les cellules PPM1B KO répondent comme les cellules sauvages, cela suggère que PPM1B n'a pas de rôle dans la nécroptose. Néanmoins, l'analyse protéique révèle une différence entre les cellules Wip1 KO et DKO au niveau de la phosphorylation de RIPK3 ne pouvant pas exclure totalement le rôle de PPM1B dans cette voie de mort cellulaire.

IV. Nécroptose nucléaire et interaction entre Wip1 et RIPK3

1. Localisation nucléaire de la phosphatase Wip1

L'activation de la nécroptose est permise par de multiples modifications post-traductionnelles et la plus importante est la phosphorylation des protéines RIPK1, RIPK3 et MLKL. Comme l'inhibition de la phosphatase Wip1 permet d'augmenter la nécroptose illustrée par une augmentation de la phosphorylation des protéines RIPK3 et MLKL, l'hypothèse selon laquelle la phosphatase Wip1 pourrait réguler négativement la nécroptose fait sens. En effet, la phosphatase Wip1 pourrait réguler négativement la nécroptose en déphosphorylant directement ou indirectement les protéines nécroptotiques. Réciproquement, l'inhiber permet aux protéines nécroptotiques d'être phosphorylées et déclencher la nécroptose.

Cependant, la nécroptose est décrite comme un évènement cytoplasmique et la phosphatase Wip1 est une protéine nucléaire.

La localisation de la phosphatase Wip1 est controversée dans la littérature. En effet, certaines études montrent cette protéine comme étant une protéine cytoplasmique⁴⁷⁸ et d'autres nucléaire^{368,479}. Pour vérifier la localisation de Wip1, une étude par immunofluorescence a été réalisée dans les cellules MCF-7 (**Figure 40A**). Les cellules MCF-7 sont des cellules de cancer mammaire connues pour avoir un niveau d'expression basal élevé pour la protéine Wip1⁴⁰⁷. Ainsi, nous pouvons observer que Wip1 se retrouve strictement dans le noyau. Pour augmenter l'expression de Wip1, les cellules MCF-7 sont également traitées au CisPlatine connu pour induire des dommages à l'ADN permettant d'augmenter l'expression de Wip1. Pour vérifier la localisation de cette phosphatase dans les cellules HT-29 et MC38, une extraction du cytoplasme et du noyau est réalisée. Ainsi, le Western-blot en **Figure 40B-C** réalisé sur les fractions cytoplasmiques et nucléaires montre que Wip1 est strictement dans le noyau et que son expression est diminuée lorsque l'inhibiteur GSK2830371 est ajouté. Ces observations sont cohérentes avec les études décrivant que la protéine possède une séquence de localisation nucléaire NLS (Nuclear Localization sequence) indiquant sa localisation nucléaire^{480,481}.

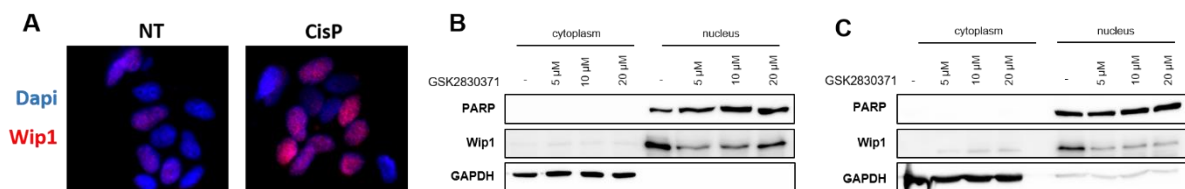


Figure 40 : La phosphatase Wip1 est strictement nucléaire et son expression est diminuée en présence de GSK2830371. (A) Immunofluorescence des cellules MCF-7 traitées ou non à la CisPlatine (x40) ; (B) Western-blot des cellules HT29 WT traitées ou non au GSK2830371 pendant 6h après extraction du cytoplasme ; (C) Western-blot des cellules MC38 WT traitées ou non au GSK2830371 pendant 6h après extraction du cytoplasme.

Comme la phosphatase Wip1 est nucléaire et que la nécroptose est largement décrite comme cytoplasmique, un lien entre une interaction directe semble discutable. Cependant, plusieurs travaux de recherche ont pu montrer que les protéines nécroptotiques peuvent se retrouver au sein du noyau. Tout d'abord, avant que la nécroptose soit bien décrite dans la littérature une étude de 2004 a pu montrer que la kinase RIPK3 était une protéine de navette nucléocytoplasmique⁴⁸². En effet, la protéine RIPK3 possède un motif NLS et deux régions de Nuclear Export Sequence (NES) dépendante de CRM1. Les protéines ayant une localisation et fonction nucléaire possèdent généralement un motif NLS nécessaire à leur transport dans le noyau⁴⁸³ et un motif NES nécessaire à leur export⁴⁸⁴. Ainsi, en 2004 RIPK3 fût déjà décrite comme pouvant être nucléaire en dehors de sa fonction nécroptotique. Par ailleurs, deux études majeures réalisées en 2016⁴⁸⁵ et 2018⁴⁸⁶ montrent que la nécroptose peut être nucléaire en démontrant la localisation des protéines fonctionnelles RIPK1, RIPK3 et MLKL dans le noyau. En 2016, Wallach *et al* décrivent majoritairement la translocation de MLKL phosphorylée associé à RIPK1 et RIPK3 dans le noyau. En effet, ces auteurs décrivent des séquences NLS dans les protéines RIPK3 et MLKL. Ainsi, MLKL phosphorylé est décrit comme pouvant être dans le noyau mais aucun mécanisme relatif à son rôle dans la nécroptose est décrit.

L'étude de Vandenamee *et al* réalisée en 2018 apporte plus de connaissances concernant le rôle de cette nécroptose nucléaire. Tout d'abord, des expériences bloquant l'export des protéines montrent une forte accumulation de RIPK3 et de MLKL dans le noyau. De plus, des expériences de transfections utilisant RIPK3-NLS (censé augmenter l'accumulation de RIPK3 dans le noyau) montrent que la nécroptose est augmentée après un traitement TBZ comparé à RIPK3 WT. Ces expériences semblent alors montrer que la translocation de RIPK3 dans le noyau permet d'augmenter la nécroptose induite. De plus, l'accumulation de RIPK3-NLS est accompagnée d'une augmentation de pMLKL dans le noyau montrant que RIPK3 phosphoryle MLKL à cet endroit. Cette étude démontre que RIPK3 et MLKL sont présents dans le noyau et peuvent être phosphorylés et oligomérisés pour pouvoir être ensuite exportés pour participer à la nécroptose. Cependant, la mesure dans laquelle le passage nucléaire est important pour l'induction de la nécroptose reste inconnue. Enfin, ces travaux sont également confirmés par une étude récemment publiée en 2024 montrant également que les protéines nécroptotiques actives peuvent se trouver dans le noyau pour participer à la nécroptose⁴⁸⁷. Par conséquent, le point de vue selon lequel la nécroptose peut être nucléaire représente une potentielle piste pouvant expliquer le rôle de la phosphatase nucléaire Wip1 dans la nécroptose.

2. Localisation nucléaire de la kinase RIPK3

Pour étudier la possible localisation nucléaire de la kinase RIPK3, des expériences d'immunofluorescence sur les cellules MDA-MB-231 RIPK3+ ont été réalisées en présence ou en absence de Leptomycine B (LMB). La LMB est un inhibiteur d'export nucléaire puisqu'il inactive l'exportine CRM1 (XPO-1) empêchant alors les protéines de s'échapper du noyau⁴⁸⁸. Cette molécule a été utilisée par Vandenameele *et al* pour observer l'accumulation de RIPK3 dans le noyau⁴⁸⁶. Pour vérifier que la Leptomycine B bloque l'export du noyau, un marquage I κ B α a été réalisé en parallèle comme dans certains travaux^{489,490}. Nous pouvons alors observer en **Figure 41** que les cellules RIPK3+ possèdent une expression majoritairement cytoplasmique mais on peut également observer dans certaines cellules que le marquage peut être nucléaire. Après une heure de traitement à la Leptomycine B, la protéine RIPK3 se trouve majoritairement dans le noyau, tout comme I κ B α . Cette expérience confirme les expériences des travaux de la littérature montrant que RIPK3 peut être transloqué dans le noyau. Ces résultats s'observent également dans les cellules HCT116 RIPK3, SW620 RIPK3+ et HT29 mais ne sont pas montrés ici.

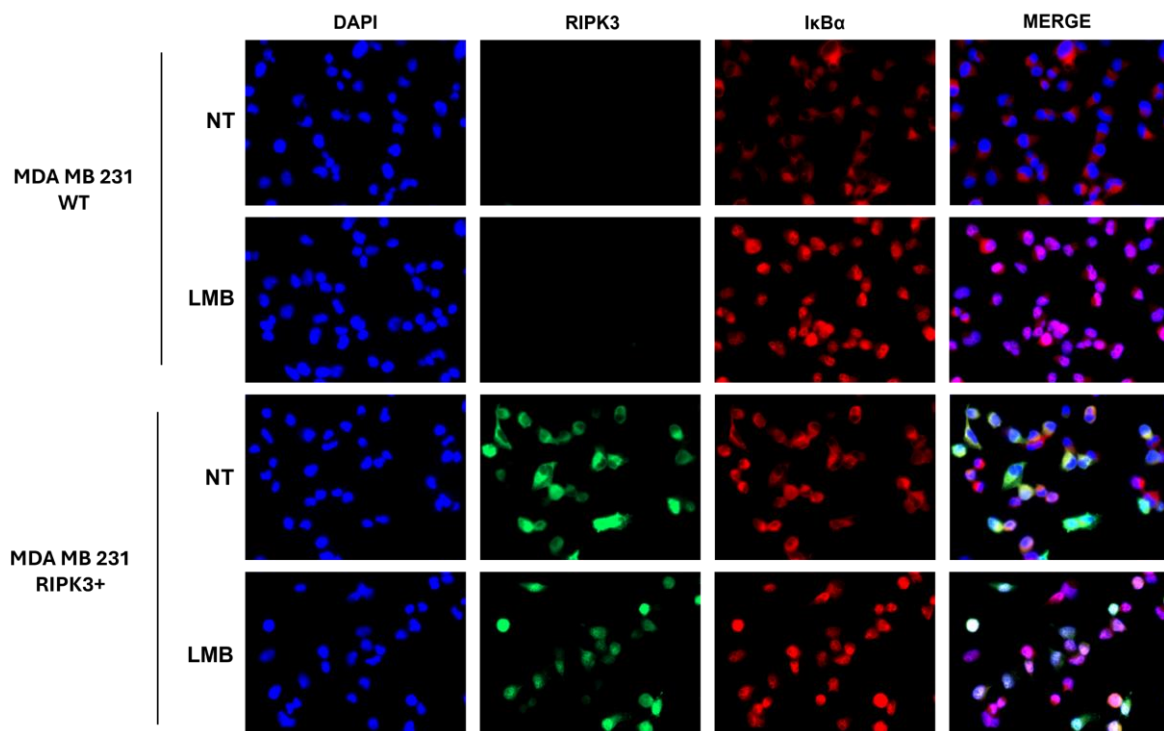


Figure 41 : La kinase RIPK3 possède une localisation nucléaire renforcée après traitement à la Leptomycine B. Immunofluorescence réalisée sur les cellules MDA-MB-231 WT et RIPK3+ traitées ou non à la Leptomycine B à 1 μ M pendant 1h (x40).

Pour vérifier que les protéines nécroptotiques peuvent se retrouver dans le noyau, des études par Western-blot après isolation du cytoplasme et du noyau ont pu être réalisées (**résultats non montrés**). Pour induire l'accumulation dans le noyau, les cellules sont traitées au Selinexor qui est un inhibiteur

de l'XPO1 comme la LMB. Dans ces expériences, le Selinexor a été privilégié car à l'inverse de la LMB il semble être moins toxique et est utilisé en essai clinique⁴⁹¹. Pour témoigner de l'efficacité du Selinexor, la localisation de la protéine IκBα est également suivie par immunofluorescence.

Les études protéiques par Western-blot montrent que les protéines peuvent être nucléaires. En présence du traitement TBZ, nous observons la phosphorylation des protéines RIPK3 et MLKL dans la fraction cytoplasmique, qui est augmentée en présence de GSK2830371. Au niveau nucléaire, on retrouve également la présence de protéines nécroptotiques phosphorylées (**résultats non montrés**). Pour la phosphorylation de MLKL, on observe la présence de pMLKL dans le noyau dans les conditions TBZ, et qui est augmentée lorsque le GSK2830371 est combiné. Pour la phosphorylation de RIPK3, ceci est plus difficilement observable puisque les anticorps utilisés sont beaucoup moins spécifiques que pour pMLKL.

Ainsi, même si la forme totale des protéines RIPK3 et MLKL semble majoritairement se trouver au niveau du cytoplasme une fraction non négligeable de celle-ci se trouve au niveau du noyau. Cette observation est cohérente avec les travaux énoncés précédemment^{485,486}.

Possédant les cellules MC38 déficientes pour Wip1 et/ou PPM1B, les mêmes expériences en isolant les cytoplasmes et les membranes en présence du traitement TBZ ± GSK2830371 ont été réalisées (**Figure 42**). Au niveau de pRIPK3 dans les cellules MC38, il semblerait que des bandes soient visibles dans le noyau même pour les conditions basales. Ces bandes représentent probablement des bandes non spécifiques puisque lorsque l'on observe les **Figure 42B** et **Figure 42D** pour les cellules MC38 Wip1 KO et DKO censées exercer le plus la nécroptose une double bande est présente uniquement pour les conditions TBZ et TBZ+GSK2830371. La bande la plus basse de ces deux bandes doit représenter celle correspondante à pRIPK3 puisqu'elle se retrouve dans le cytoplasme et dans le noyau pour les conditions TBZ et TBZ+GSK2830371. Ainsi, nous pouvons observer que celles-ci sont plus importantes pour les cellules Wip1 KO et DKO dans le noyau. Concernant la phosphorylation de MLKL, pour les cellules PPM1B nous observons le même profil que pour les cellules WT soit une phosphorylation de MLKL plus importante en présence de la combinaison TBZ + GSK2830371 dans le cytoplasme et le noyau. Comme observé en **Figure 37**, les cellules Wip1 KO et DKO présentent une phosphorylation accrue de MLKL par rapport aux cellules WT et PPM1B KO qui se retrouvent dans le cytoplasme et le noyau. De plus, on observe toujours un effet de l'inhibiteur puisque la phosphorylation de MLKL est légèrement augmentée dans le cytoplasme et le noyau lorsque les cellules sont traitées par le TBZ + GSK2830371.

Nous confirmons alors encore une fois que la nécroptose peut également se produire dans le noyau et que les protéines caractéristiques de la nécroptose se retrouve plus facilement dans le noyau en absence de Wip1.

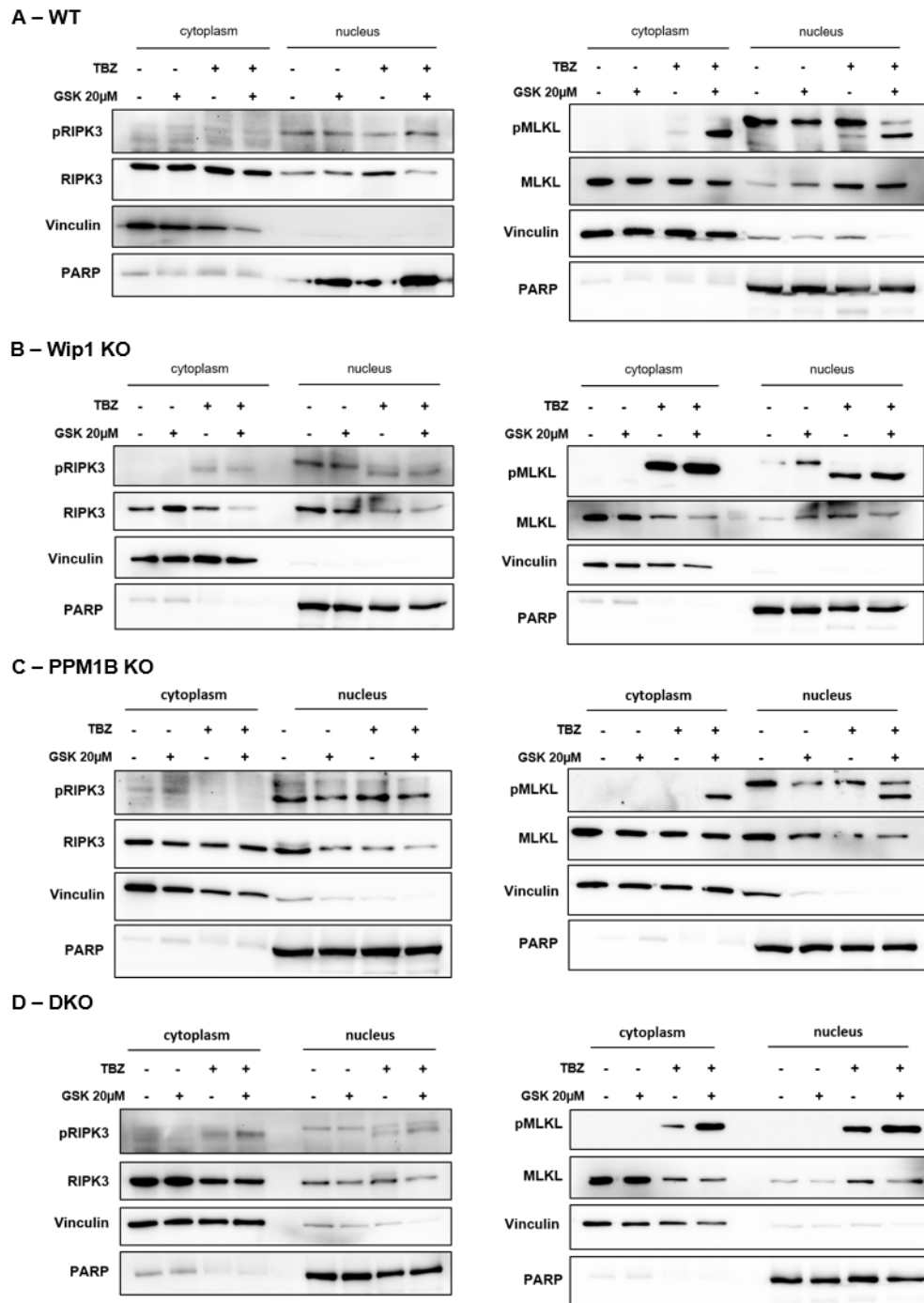


Figure 42 : L'absence de PP2Cs induit l'accumulation de protéines nécroptotiques dans le noyau. (A) Western-blot des cellules MC38 WT après traitement au TBZ \pm GSK2830371 pendant 4h après extraction du cytoplasme et du noyau ; (B) Western-blot des cellules MC38 Wip1 KO après traitement au TBZ \pm GSK2830371 pendant 4h après extraction du cytoplasme et du noyau ; (C) Western-blot des cellules MC38 PPM1B KO après traitement au TBZ \pm GSK2830371 pendant 4h après extraction du cytoplasme et du noyau ; (D) Western-blot des cellules MC38 DKO après traitement au TBZ \pm GSK2830371 pendant 4h après extraction du cytoplasme et du noyau.

3. Wip1 semble interagir avec RIPK3 au niveau du noyau

Afin d'étudier une potentielle interaction entre les protéines responsables de la nécroptose et Wip1, des expériences permettant d'étudier les interactions entre protéines ont été réalisées. Tout d'abord, des expériences de co-immunoprécipitations de RIPK3 et MLKL ont été menées dans les cellules MC38 (Figure 43).

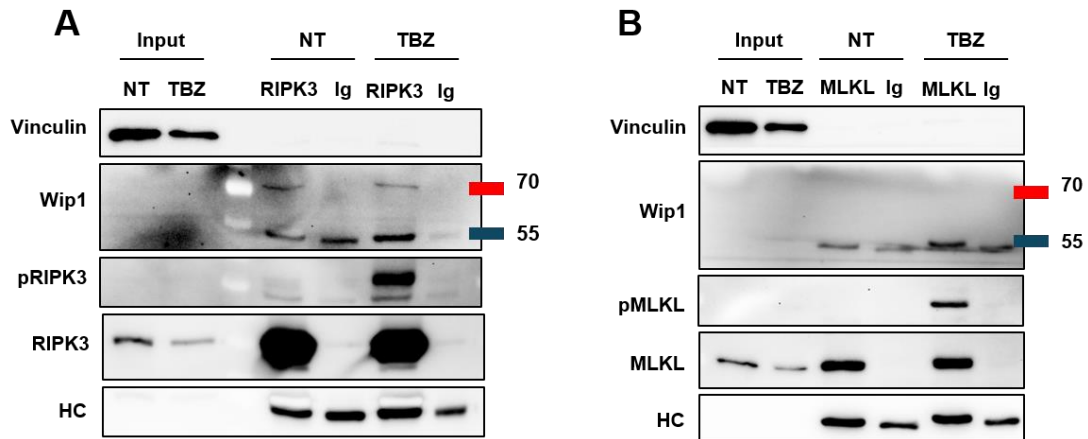


Figure 43 : La phosphatase Wip1 semble interagir avec la kinase RIPK3 et non avec la pseudokinase MLKL dans les cellules MC38. Les cellules sont traitées ou non pendant 4h avec TBZ. (A) Co-immunoprécipitation de RIPK3 dans les cellules MC38 ; (B) Co-immunoprécipitation de MLKL dans les cellules MC38.

Ainsi, ces premières expériences semblent indiquer une potentielle interaction entre les protéines RIPK3 et Wip1 qui semble être absente entre MLKL et Wip1. Expériences préliminaires, ces résultats ont été confirmés par la suite notamment en réalisant des optimisations pour que tous les contrôles dont les inputs soient corrects. Les expériences de co-immunoprécipitations ont donc été répétées dans les cellules HT-29 (Figure 44A), MC38 (Figure 44B) et L929 (Figure 44C).

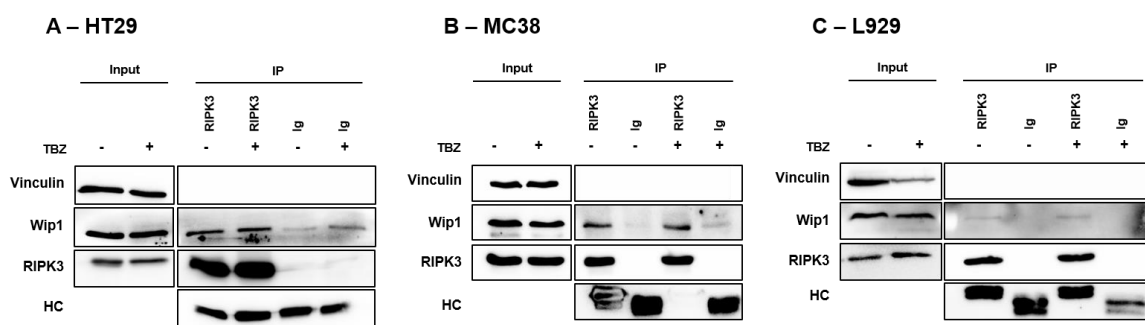


Figure 44 : La phosphatase Wip1 interagit avec la kinase RIPK3 dans diverses lignées cellulaires. Les cellules sont traitées ou non pendant 4h avec TBZ. (A) Co-immunoprécipitation de RIPK3 dans les cellules HT-29 ; (B) Co-immunoprécipitation de RIPK3 dans les cellules MC38 ; (C) Co-immunoprécipitation de RIPK3 dans les cellules L929.

Ainsi, les expériences de co-immunoprécipitations montrent une potentielle interaction entre les protéines RIPK3 et Wip1 qui semblent être basale puisque l'ajout du traitement TBZ ne semble pas affecter l'interaction.

Pour confirmer la potentielle interaction entre la protéine Wip1 et la protéine RIPK3, des expériences de ligature de proximité Duolink appelées PLA ont été menées. Cette expérience permet d'étudier une proximité entre deux protéines espacées de maximum 40nm et est également intéressante puisqu'elle permet de localiser spatialement où se trouve l'interaction. Il est important dans ce type d'expérience sensible de posséder un contrôle négatif et positif permettant de valider les résultats obtenus. Pour cela, l'interaction RIPK3-Ig est utilisée comme contrôle négatif et l'interaction RIPK1-RIPK3 est utilisée comme contrôle positif. L'interaction RIPK1-RIPK3 est largement reconnue puisqu'il s'agit de la première interaction nécessaire à l'induction de la nécroptose. Par soucis techniques, les expériences ont seulement pu être réalisées seulement sur les cellules HT29 (**Figure 45**).

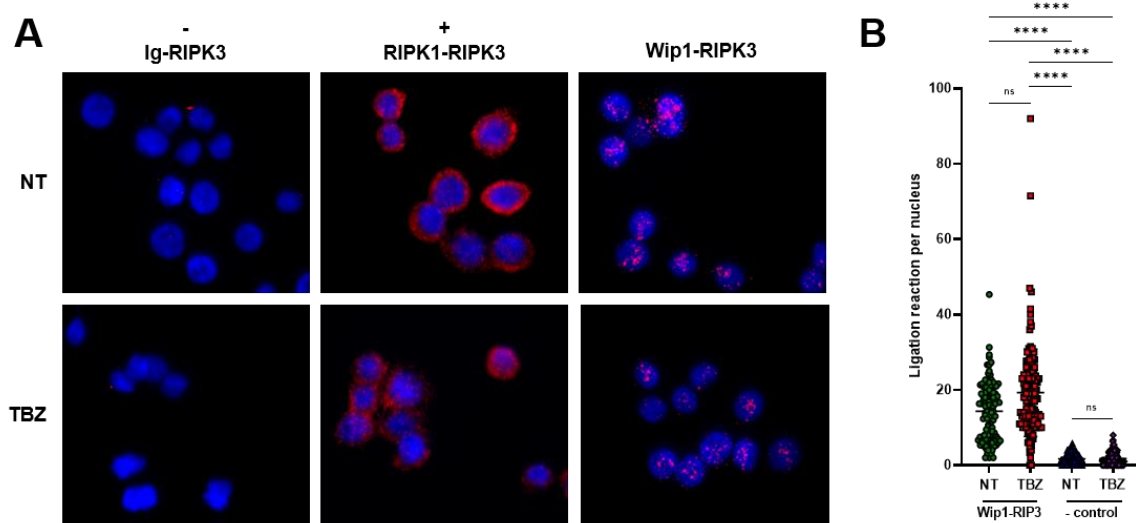


Figure 45 : La phosphatase Wip1 interagit avec RIPK3 dans le noyau dans les cellules HT-29. Les cellules sont traitées ou non pendant 4h avec TBZ. (A) Proximity Ligation Assay entre les protéines Wip1 et RIPK3 (x40) ; (B) Quantification du nombre de ligation par noyau (n=3). Les données sont représentées sous forme de moyenne \pm SD, test One-way ANOVA avec comparaison multiple Kruskal-Wallis (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$).

Tout d'abord, les contrôles positifs de cette expérience sont valides. En effet, il n'y a bien aucun point rouge synonyme d'interaction dans la condition RIPK3-Ig et un fort signal dans le contrôle positif RIPK1-RIPK3. Comme décrit dans la littérature et notamment dans des expériences de PLA^{492,493}, l'interaction RIPK1-RIPK3 se retrouve au niveau du cytoplasme. Concernant l'interaction Wip1-RIPK3, celle-ci se retrouve principalement dans le noyau et est indépendante d'une induction ou non du traitement TBZ (**Figure 45**).

Les niveaux de Wip1 pouvant être difficiles à détecter notamment par la qualité des anticorps utilisés et le niveau d'expression basal de Wip1, des expériences où la protéine Wip1 est surexprimée transitoirement ont été réalisées. Pour cela, les cellules Hek293 pour leur facilité de transfection sont choisies. Comme ces cellules sont déficientes pour la protéine RIPK3²⁵⁵, elles ont donc été transfectées

avec deux plasmides : un pour surexprimé Wip1 et l'autre pour surexprimé RIPK3. Ainsi, les mêmes expériences de co-immunoprécipitation et PLA sont conduites (**Figure 46**).

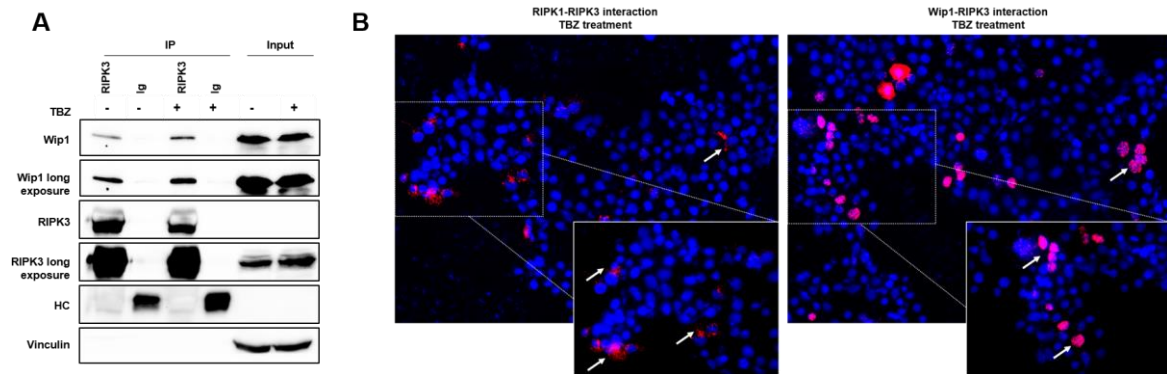


Figure 46 : Wip1 et RIPK3 interagissent dans le noyau lorsque ces protéines sont exprimées après transfection dans les cellules Hek293. Les cellules sont traitées ou non pendant 4h avec TBZ. (A) Co-immunoprécipitation de RIPK3 dans les cellules Hek293 après transfection de Wip1 et RIPK3 (traitement TBZ pendant 4h) ; (B) Proximity Ligation Assay entre les protéines Wip1 et RIPK3 dans les cellules Hek293 Hek293 après transfection de Wip1 et RIPK3 (traitement TBZ pendant 4h) (x20).

Ces expériences sur ces cellules exprimant artificiellement Wip1 et RIPK3 confirment les résultats précédemment obtenus sur les cellules HT-29. En effet, les résultats de co-immunoprécipitation montrent bien que Wip1 interagit avec RIPK3 lorsque RIPK3 est immunoprécipité (**Figure 46A**). Au niveau de la PLA, toutes les cellules ne présentent pas de signaux car l'efficacité de transfection n'est pas de 100%. Ainsi, nous pouvons observer que l'interaction RIPK1-RIPK3 se situe toujours au niveau du cytoplasme et que l'interaction Wip1-RIPK3 se situe strictement dans le noyau (**Figure 46B**). Ces expériences de surexpression permettent d'obtenir un signal plus important que dans des cellules avec un niveau d'expression basale des protéines.

Ainsi, ces expériences d'études d'interactions protéiques semblent illustrer que la phosphatase Wip1 interagit avec la kinase RIPK3 dans le noyau.

Discussion

Les PP2Cs, protéines régulatrices intervenant dans la nécroptose

- ***La nécroptose est un évènement à la fois cytoplasmique et nucléaire***

Dans ce travail, nous avons pu obtenir les mêmes résultats préalablement observés dans la littérature à savoir que la nécroptose n'est pas uniquement cytoplasmique mais qu'elle peut également avoir lieu dans le noyau⁴⁸⁵⁻⁴⁸⁷. En effet, nous avons démontré que les protéines RIPK3 et MLKL à l'état basal se trouvent dans les deux compartiments et qu'en présence d'inducteurs de nécroptose les formes phosphorylées peuvent également avoir les deux localisations. Néanmoins, même si l'addition d'inhibiteurs d'export nucléaire permet l'accumulation de ces protéines dans le noyau cela ne change pas drastiquement la mort cellulaire totale. En outre, si le passage dans le noyau était indispensable à l'induction de la nécroptose alors bloquer l'export du noyau diminuerait ou bloquerait totalement la voie de signalisation. Or, ce n'est pas ce que nous observons car même en présence de LMB ou de Selinexor la nécroptose se produit toujours, à l'inverse de Vandenamee *et al* qui ont montré que l'induction de la nécroptose couplée au LMB réduit la mort cellulaire. Ainsi les résultats présentés dans ce travail et ceux de la littérature permettent d'affirmer qu'une partie de la nécroptose se déroule au sein du noyau mais son rôle reste encore incompris. Une récente étude en 2024 confirme encore que la nécroptose se déroule dans le noyau par l'intermédiaire de la prélamine A⁴⁸⁷. Dans cette étude les auteurs décrivent que les trois protéines à savoir RIPK1, RIPK3 et MLKL transloquent dans le noyau indiquant qu'il aurait peut-être été nécessaire de s'intéresser à la kinase RIPK1 dans nos études.

- ***Wip1, une phosphatase régulant négativement la nécroptose par son interaction avec RIPK3***

L'utilisation de l'inhibiteur GSK2830371 ainsi que les expériences réalisées à l'aide des cellules déficientes pour Wip1 nous ont permis de déterminer que la phosphatase Wip1 joue un rôle dans l'induction de la nécroptose à la suite du traitement TBZ. En effet, l'inhibition chimique ou génétique de Wip1 permet de potentialiser la mort induite par la combinaison de traitement TBZ et augmenter la phosphorylation des protéines RIPK3 et MLKL. Cette sensibilité à la nécroptose par l'absence de Wip1 semble s'expliquer par son interaction avec RIPK3. En effet, les expériences de co-immunoprécipitation et de PLA ont permis de mettre en évidence que Wip1 et RIPK3 interagissent au niveau du noyau. Wip1 étant une phosphatase, celle-ci serait alors un régulateur négatif de la kinase RIPK3. Ainsi, lorsque Wip1 est présente ou surexprimée, cette phosphatase déphosphoryle RIPK3 dans le noyau l'empêchant alors de phosphoryler la pseudokinase MLKL induisant la nécroptose. Réciproquement, lorsque Wip1 est absente, la kinase RIPK3 est phosphorylée davantage pouvant à son tour phosphoryler MLKL et induire la nécroptose.

Pour corroborer ces résultats, en collaboration avec le NIH des études de déphosphorylation *in vitro* ont permis d'identifier la protéine RIPK3 comme un substrat potentiel de la phosphatase Wip1, au même titre qu'ATM par exemple. Ces résultats préliminaires apportent des preuves supplémentaires concernant l'interaction entre Wip1 et RIPK3 par action de déphosphorylation.

- **Participation de la phosphatase PPM1B dans la nécroptose**

En 2015, la phosphatase PPM1B a été décrite comme régulateur négatif de la nécroptose par son interaction avec la kinase RIPK3⁴⁷⁷. Afin d'éliminer la possibilité que l'effet que nous observions avec le GSK2830371 soit dû à un effet non spécifique comme l'inhibition de PPM1B, plusieurs lignées cellulaires à savoir les cellules humaines et murines de cancer colorectal HT-29 et MC38 respectivement, ainsi que les fibroblastes murins L929 sont traités avec cet inhibiteur. De plus, pour vérifier le phénotype observé en 2015, des lignées PPM1B KO ont été créées.

Alors, le traitement par le GSK2830371 induit bien l'inhibition de Wip1 et non celle de PPM1B (**Figure 36**). Cependant, l'extraction du cytoplasme et du noyau révèlent que PPM1B peut être cytoplasmique et nucléaire dans les lignées cancéreuses HT-29 et MC38 à l'inverse des lignées L929 où celle-ci semble être seulement cytoplasmique. Ces données obtenues dans les cellules L929 sont cohérentes avec les travaux de 2015. Néanmoins, il semblerait que la phosphatase PPM1B peut également être cytosolique et nucléaire comme le montre la **Figure 36** et certains travaux^{494,495}. Concernant la sensibilité des cellules à l'induction de la nécroptose par le traitement TBZ, l'absence de PPM1B dans les cellules MC38 n'induit aucune différence dans l'induction à la nécroptose et présente un phénotype identique à celui des cellules WT. Cela suggère alors que PPM1B ne régule pas cette voie. De plus, le phénotype des cellules MC38 DKO PPM1B/Wip1 présentent un phénotype similaire à celui des cellules Wip1 renforçant cette hypothèse. Cependant, les expériences d'induction de nécroptose réalisées sur les cellules L929 PPM1B KO et Wip1 KO nuancent ces observations (**Figure 47**).

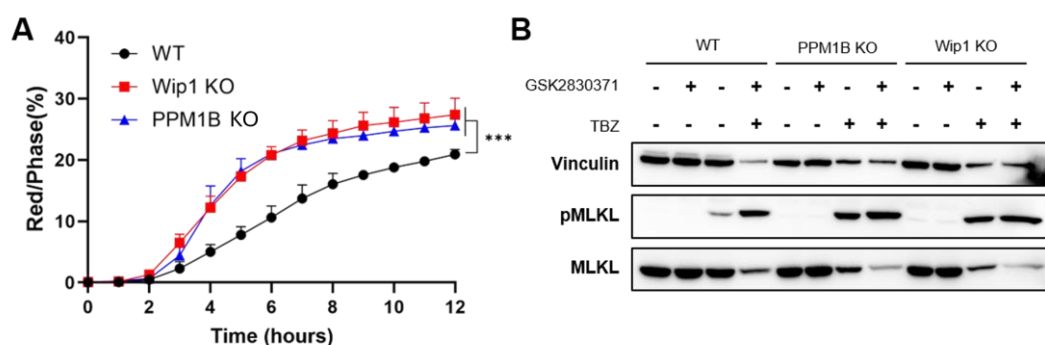


Figure 47 : L'absence des phosphatases PPM1B et Wip1 potentialise l'induction de la nécroptose par le traitement TBZ dans les L929. (A) Suivi de la mort cellulaire par le traitement TBZ marquage 7-AAD par Incucyte (n=3) ; (B) Western-blot des différentes lignées L929 déficientes pour les phosphatases Wip1 ou PPM1B ; (B). Les données sont représentées sous forme de moyenne \pm SD, test Two-way ANOVA (*p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001, ****p < 0,0001).

Comme pour les cellules MC38, la délétion de Wip1 potentialise la mort induite par la combinaison TBZ comparé aux cellules WT. Par ailleurs, la délétion de PPM1B KO potentialise également la mort induite par le traitement TBZ comme dans les travaux de Chen *et al*⁴⁷⁷. Ainsi, nous reproduisons le phénotype observé dans les cellules L929 (**Figure 47**). Cette différence peut notamment s'expliquer par le fait que les cellules L929 ne sont pas des cellules cancéreuses à l'inverse des cellules MC38. De plus, nous pouvons également remarquer que l'effet du GSK2830371 semble moindre, en particulier dans les cellules L929 Wip1 KO.

Enfin, après plusieurs tentatives et stratégies avec des expériences d'immunoprécipitation nous ne sommes pas en mesure d'affirmer que l'interaction RIPK3-PPM1B a lieu constitutivement. Comme l'indique la **Figure 48**, il semblerait que la protéine PPM1B interagisse avec la protéine RIPK3 dans les cellules L929. Cependant, nous n'avons pas réussi à toujours reproduire ces résultats notamment dans d'autres lignées cellulaires. Cependant, en immunoprécipitant RIPK3, les cellules PPM1B KO présentent une fraction plus importante de protéine Wip1 liée à RIPK3. Ainsi, dans les cellules MC38 PPM1B KO nous n'observons peut-être pas l'effet de l'absence de PPM1B car il y a beaucoup de protéine Wip1 interagissant avec RIPK3 régulant alors à la baisse la nécroptose.

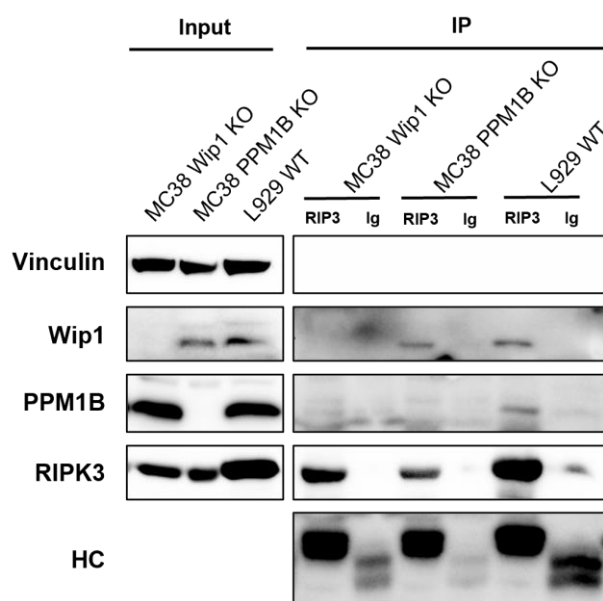


Figure 48 : Les phosphatases PP2Cs semblent interagir différemment avec la kinase RIPK3 selon le type cellulaire.

Ainsi, il semblerait que la phosphatase PPM1B régule la nécroptose mais que ce mécanisme semble être dépendant du type cellulaire, cancéreux ou non. Les protéines de la famille des PP2C ayant une grande homologie, il serait également intéressant d'étudier les autres membres phosphatases de cette famille.

- *L'inhibiteur GSK2830371 possède une autre cible que la phosphatase Wip1*

Les expériences de Western-blot après extraction du cytoplasme et du noyau permettent de confirmer que l'inhibiteur GSK2830371 fonctionne puisque l'on observe une disparition de Wip1 lorsque les cellules sont traitées (**Figure 36**). En revanche, il semblerait que cet inhibiteur possède un effet non spécifique puisque l'on observe toujours son effet lorsqu'il est couplé au traitement TBZ même dans les cellules MC38 déficientes pour Wip1. Les cellules DKO PPM1B/Wip1 présentent également le même profil permettant d'affirmer que le GSK2830371 n'agit pas sur PPM1B dans ces cellules. Pour vérifier le phénotype observé, des cellules de la moelle osseuse ont été extraites des souris WT et Wip1^{-/-}. Ces cellules sont ensuite mises en culture et sont traitées avec TB ou TBZ en combinaison ou non avec le GSK2830371. Ainsi, nous pouvons observer en **Figure 49** que même dans des cellules primaires nous observons toujours un effet de potentialisation de l'absence de Wip1 sur l'induction de la nécroptose, que celle-ci soit chimique ou génétique.

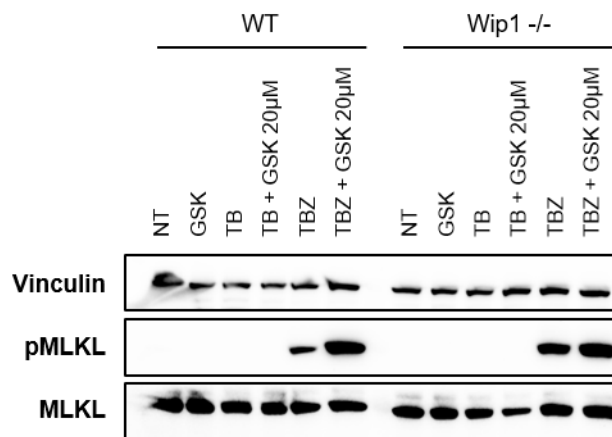


Figure 49 : L'absence de Wip1 dans les cellules de souris Wip1^{-/-} potentialise l'induction à la nécroptose. Western-blot de cellules extraites de la moelle osseuse de souris WT et Wip1^{-/-} traitées par la combinaison TB, TB ± GSK2830371.

En effet, les cellules primaires de souris WT traitées présentent le même profil que les lignées cellulaires. Dans les cellules issues de souris déficientes pour Wip1, nous pouvons observer qu'à la suite du traitement TBZ le niveau de pMLKL est supérieure à celui observé pour les cellules de souris WT. Cependant, lorsque les cellules sont traitées avec la combinaison TBZ + GSK2830371 nous observons toujours un effet sur la phosphorylation de MLKL même dans les cellules isolées à partir de souris Wip1^{-/-} (**Figure 49**). Ainsi, ces résultats obtenus sur les cellules isolées à partir d'animaux Wip1^{-/-} ainsi que ceux obtenus avec les lignées cellulaire Wip1 KO indiquent que l'inhibiteur GSK2830371 possède une autre cible cellulaire.

Immunogénicité de la nécroptose

Comme décrit en introduction, la nécroptose représente l'une des morts cellulaires les plus immunogènes et induire cette mort représente une alternative thérapeutique afin de lever certaines résistances aux traitements anti-cancéreux. Cependant, comme la nécroptose induit également beaucoup d'inflammation elle peut également être décrite comme un processus pro-tumoral. Dans nos modèles d'études, les surnageants des cellules traitées par la combinaison TBZ ont été récupérés afin de vérifier si l'induction de la nécroptose était corrélée à un relargage de DAMPs. Ainsi, dans les cellules HT-29 et MC38 nous pouvons observer en **Figure 50A-B** que la combinaison TBZ permet le relargage de HSP70, pEIF2 α et de HMGB1, molécules caractéristiques de DAMPs dans le surnageants lorsqu'elles diminuent dans les cellules²³⁰. De plus, l'inhibition de Wip1 par le GSK2830371 augmente le relargage de ces molécules ce qui est cohérent au fait que l'ajout de cet inhibiteur potentialise la nécroptose induite par la combinaison TBZ. Pour vérifier si la délétion de Wip1 qui potentialise l'induction à la nécroptose impacte également le relargage de DAMPs, les protéines relarguées dans le surnageant des cellules MC38 Wip1 KO ont été analysées. Ainsi, nous pouvons observer que l'absence de Wip1 augmente le relargage de DAMPs à la suite d'une induction au TBZ (**Figure 50C**). Ainsi, ces données apportent de nouvelles informations sur l'impact de l'absence de Wip1 dans l'induction de la nécroptose. Les mêmes expériences ont été réalisées sur les cellules MC38 PPM1B KO et présentent les mêmes résultats que les cellules WT, confirmant encore une fois que dans notre modèle d'étude l'absence de PPM1B n'a pas d'impact sur la nécroptose (**Figure 50D**).

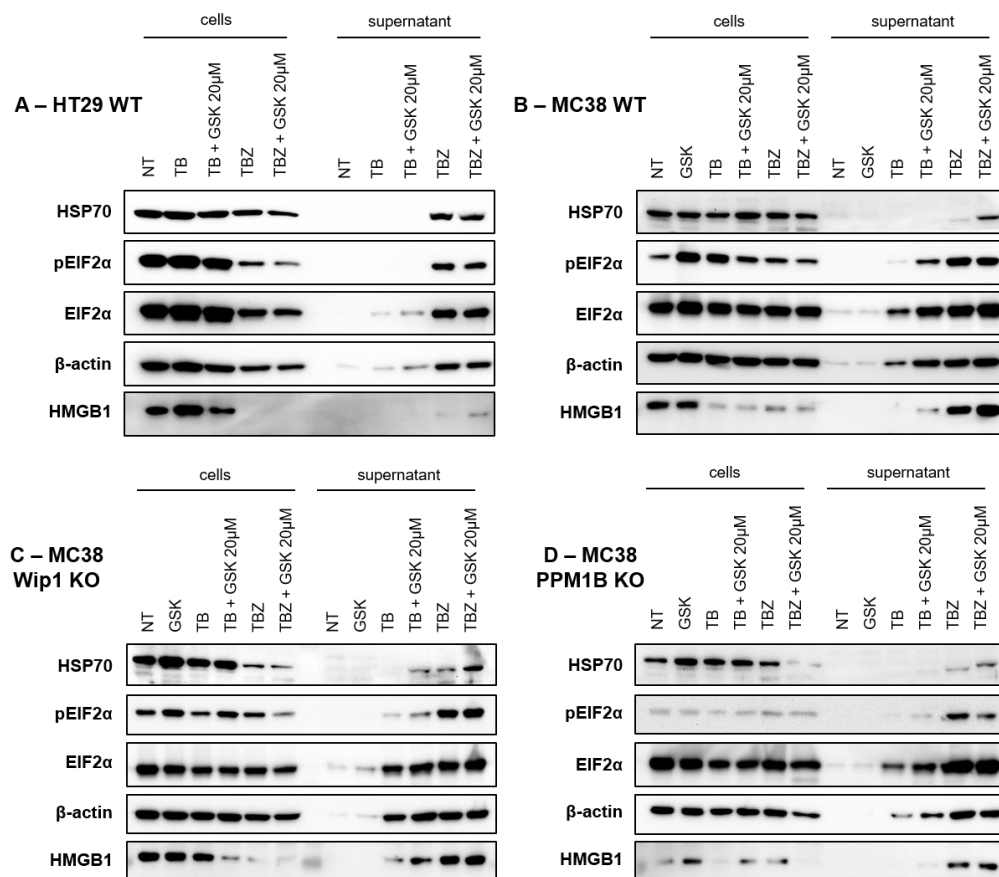
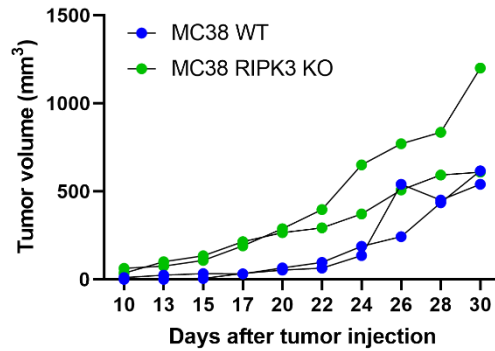


Figure 50 : L'induction de la nécroptose permet le relargage de DAMPs et est modulée selon l'expression de Wip1. (A) Western-blot des cellules et surnageants des cellules HT-29 traitées par les combinaisons TB et TBZ ± GSK2830371 pendant 8h ; (B) Western-blot des cellules et surnageants des cellules MC38 WT traitées par les combinaisons TB et TBZ ± GSK2830371 pendant 4h ; (C) Western-blot des cellules et surnageants des cellules MC38 Wip1 KO traitées par les combinaisons TB et TBZ ± GSK2830371 pendant 4h ; (D) Western-blot des cellules et surnageants des cellules MC38 PPM1B KO traitées par les combinaisons TB et TBZ ± GSK2830371 pendant 4h.

Pour vérifier si l'augmentation de relargage de DAMPs causée par l'absence de Wip1 joue un effet immunogène, il serait intéressant de réaliser des expériences de cocultures entre les cellules cancéreuses traitées au TBZ selon leur statut pour Wip1 ou combinées au GSK2830371, avec des cellules immunitaires effectrices tels que des lymphocytes ou encore des cellules myéloïdes. Ainsi, les gènes d'activation des cellules immunitaires et les cytokines relarguées pourraient être analysés pour vérifier le profil d'activation des cellules immunitaires exposées à des cellules cancéreuses en nécroptose. Les mêmes expériences pourraient également être réalisées simplement avec du surnageant de cellules tumorales contenant les DAMPs ajoutés aux cellules immunitaires.

Figure 51 : L'absence de la kinase RIPK3 induit une accélération de la croissance tumorale. Les cellules MC38 ont été injectées en sous-cutanée dans des souris C57Bl/6 et les tumeurs ont été mesurées tous les deux jours.

Afin de vérifier l'immunogénicité associée à la nécroptose *in vivo*, les cellules MC38 RIPK3 KO ont été injectées en sous-cutanée dans des souris



C57Bl/6 WT. L'absence de RIPK3 dans les cellules MC38 permet alors d'accélérer la croissance tumorale comparément aux cellules WT (**Figure 51**). Ces résultats préliminaires, puisque seulement réalisés avec deux souris par groupes, semblent indiquer que l'absence de RIPK3 a un effet négatif sur la croissance tumoral, comme l'indique les travaux cités en introduction^{260,289,290}. Pour aller plus loin dans l'analyse, ces résultats doivent être répétés sur un plus grand groupe d'individus et l'analyse de l'infiltration immunitaire tumoral pourrait être étudié par immunophénotypage avec des expériences d'immunohistochimies et de cytométries. Ainsi, nous nous attendons que les souris injectées avec des cellules RIPK3 KO présentent une croissance tumorale plus rapide s'illustrant par une diminution de l'infiltrat immunitaire anti-tumoral. De plus, il serait intéressant d'ajouter à ces expériences de croissance tumorale l'injection de cellules déficientes pour Wip1 simplement ou doublement pour Wip1 et PPM1B. Ainsi, nous pourrions investiguer si l'absence de Wip1 ou de Wip1 et PPM1B influencent la croissance tumorale et si leurs absences modifient l'expression et la phosphorylation des protéines RIPK3 et MLKL. Des expériences mesurant l'infiltration immunitaire pourront être réalisées. Ces expériences nous permettrait ainsi de déterminer si cibler les phosphatases PP2C et en particulier PPM1D serait une potentielle stratégie thérapeutique afin d'augmenter l'immunogénicité des tumeurs. En effet, nous pensons que la combinaison d'un inhibiteur de PPM1D et peut-être d'inhibiteurs de PP2C à spectre plus large rendra la mort cellulaire plus immunogène lors de chimiothérapies et immunothérapies actuelles.

Conclusion générale

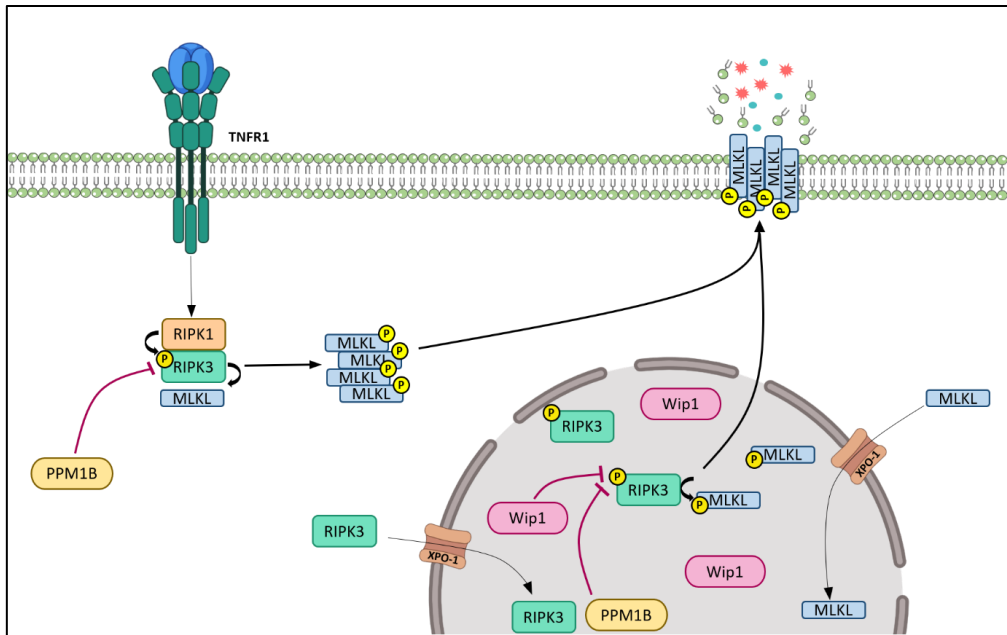


Figure 52 : Les phosphatases PPM1B et Wip1 sont capables de réguler la nécroptose au niveau du cytoplasme et du noyau. Dans le cytoplasme, la nécroptose est régulée négativement par la phosphatase PPM1B interagissant avec RIPK3. Lors de la nécroptose nucléaire, la phosphatase Wip1 régule négativement la nécroptose par son interaction avec la kinase RIPK3.

Pour conclure, l'ensemble de ce travail indique une nouvelle fois que les phosphatases de la famille des PP2C jouent un rôle central dans la régulation des morts cellulaires dépendantes du TNF et plus particulièrement dans la nécroptose. Ainsi, la régulation de la nécroptose par les PP2C semblent être dépendants du type cellulaire, de type cancéreux ou non. Par son interaction avec la kinase RIPK3, la phosphatase Wip1 agit comme régulateur négatif de RIPK3 au niveau du noyau. Ainsi, l'absence par délétion génétique ou inhibition chimique de Wip1 permet de potentialiser l'induction de la nécroptose médiée par l'activation du TNFR1. Amplifiée dans de nombreux cancers et intervenant dans de multiples mécanismes liés aux mécanismes de tumorigenèse, l'inhibition de la phosphatase Wip1 a déjà été décrite comme stratégie thérapeutique prometteuse. Les résultats obtenus dans ce travail soutiennent cette idée en décrivant Wip1 comme régulateur négatif de la nécroptose, mort cellulaire hautement immunogène. L'induction de morts immunogènes est déjà décrite et utilisée comme stratégie thérapeutique afin de renforcer l'efficacité de traitements anti-cancéreux et pallier les phénomènes de résistances. Ainsi, inhiber Wip1 dans les cellules cancéreuses permettrait de sensibiliser les cellules à la nécroptose et ainsi augmenter l'efficacité de certaines thérapies anti-cancéreuses. Des efforts doivent encore être fournis afin de développer des inhibiteurs spécifiques de PP2Cs et plus particulièrement de Wip1, afin de proposer des molécules utilisables en clinique dans le but d'améliorer les traitements anti-cancéreux actuels.

Références bibliographiques

1. Ferlay, J. *et al.* Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *Int. J. Cancer* **144**, 1941–1953 (2019).
2. Hajdu, S. I. A note from history: Landmarks in history of cancer, part 1. *Cancer* **117**, 1097–1102 (2011).
3. Hajdu, S. I. A note from history: Landmarks in history of cancer, part 2. *Cancer* **117**, 2811–2820 (2011).
4. Faguet, G. B. A brief history of cancer: age-old milestones underlying our current knowledge database. *Int J Cancer* **136**, 2022–2036 (2015).
5. Di Lonardo, A., Nasi, S. & Pulciani, S. Cancer: We Should Not Forget The Past. *J Cancer* **6**, 29–39 (2015).
6. Ferlay, J. *et al.* Cancer statistics for the year 2020: An overview. *Int J Cancer* (2021) doi:10.1002/ijc.33588.
7. Chhikara, B. S. & Parang, K. Global Cancer Statistics 2022: the trends projection analysis. *Chemical Biology Letters* **10**, 451–451 (2023).
8. Soerjomataram, I. & Bray, F. Planning for tomorrow: global cancer incidence and the role of prevention 2020-2070. *Nat Rev Clin Oncol* **18**, 663–672 (2021).
9. Rahman, M. S., Suresh, S. & Waly, M. I. Risk Factors for Cancer: Genetic and Environment. in *Bioactive Components, Diet and Medical Treatment in Cancer Prevention* (eds. Waly, M. I. & Rahman, M. S.) 1–23 (Springer International Publishing, Cham, 2018). doi:10.1007/978-3-319-75693-6_1.
10. Vineis, P. & Wild, C. P. Global cancer patterns: causes and prevention. *The Lancet* **383**, 549–557 (2014).
11. Gatto, N. M. Environmental Carcinogens and Cancer Risk. *Cancers (Basel)* **13**, 622 (2021).
12. Loomans-Kropp, H. A. & Umar, A. Cancer prevention and screening: the next step in the era of precision medicine. *npj Precision Onc* **3**, 1–8 (2019).
13. Carbone, A. Cancer Classification at the Crossroads. *Cancers (Basel)* **12**, 980 (2020).
14. Brierley, J. *et al.* Global Consultation on Cancer Staging: promoting consistent understanding and use. *Nat Rev Clin Oncol* **16**, 763–771 (2019).
15. Rosen, R. D. & Sapra, A. TNM Classification. in *StatPearls* (StatPearls Publishing, Treasure Island (FL), 2023).
16. Morris, L. G. T. & Chan, T. A. Therapeutic targeting of tumor suppressor genes. *Cancer* **121**, 1357–1368 (2015).
17. Proto-oncogenes to Oncogenes to Cancer | Learn Science at Scitable. <https://www.nature.com/scitable/topicpage/proto-oncogenes-to-oncogenes-to-cancer-883/>.
18. De Falco, G. *et al.* Burkitt lymphoma beyond MYC translocation: N-MYC and DNA methyltransferases dysregulation. *BMC Cancer* **15**, 668 (2015).

19. Fernández-Medarde, A. & Santos, E. Ras in Cancer and Developmental Diseases. *Genes Cancer* **2**, 344–358 (2011).
20. Brodeur, G. M., Seeger, R. C., Schwab, M., Varmus, H. E. & Bishop, J. M. Amplification of N-myc in untreated human neuroblastomas correlates with advanced disease stage. *Science* **224**, 1121–1124 (1984).
21. Kontomanolis, E. N. *et al.* Role of Oncogenes and Tumor-suppressor Genes in Carcinogenesis: A Review. *Anticancer Research* **40**, 6009–6015 (2020).
22. Shen, L., Shi, Q. & Wang, W. Double agents: genes with both oncogenic and tumor-suppressor functions. *Oncogenesis* **7**, 1–14 (2018).
23. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. The hallmarks of cancer. *Cell* **100**, 57–70 (2000).
24. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**, 646–674 (2011).
25. Hanahan, D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discovery* **12**, 31–46 (2022).
26. Giancotti, F. G. Deregulation of Cell Signaling in Cancer. *FEBS Lett* **588**, 2558–2570 (2014).
27. Burkhart, D. L. & Sage, J. Cellular mechanisms of tumour suppression by the retinoblastoma gene. *Nat Rev Cancer* **8**, 671–682 (2008).
28. Deshpande, A., Sicinski, P. & Hinds, P. W. Cyclins and cdks in development and cancer: a perspective. *Oncogene* **24**, 2909–2915 (2005).
29. Sherr, C. J. & McCormick, F. The RB and p53 pathways in cancer. *Cancer Cell* **2**, 103–112 (2002).
30. Vousden, K. H. & Lane, D. P. p53 in health and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 275–283 (2007).
31. Ozaki, T. & Nakagawara, A. Role of p53 in Cell Death and Human Cancers. *Cancers (Basel)* **3**, 994–1013 (2011).
32. Kerr, J. F. R., Wyllie, A. H. & Currie, A. R. Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wide-ranging Implications in Tissue Kinetics. *Br J Cancer* **26**, 239–257 (1972).
33. Neophytou, C. M., Trougakos, I. P., Erin, N. & Papageorgis, P. Apoptosis Deregulation and the Development of Cancer Multi-Drug Resistance. *Cancers* **13**, 4363 (2021).
34. Mantovani, F., Collavin, L. & Del Sal, G. Mutant p53 as a guardian of the cancer cell. *Cell Death Differ* **26**, 199–212 (2019).
35. Tong, X. *et al.* Targeting cell death pathways for cancer therapy: recent developments in necroptosis, pyroptosis, ferroptosis, and cuproptosis research. *J Hematol Oncol* **15**, 1–32 (2022).
36. Trybek, T., Kowalik, A., Gózdź, S. & Kowalska, A. Telomeres and telomerase in oncogenesis (Review). *Oncology Letters* **20**, 1015–1027 (2020).
37. GOMEZ, D. E. *et al.* Telomere structure and telomerase in health and disease. *Int J Oncol* **41**, 1561–1569 (2012).
38. Herbig, U., Jobling, W. A., Chen, B. P. C., Chen, D. J. & Sedivy, J. M. Telomere Shortening Triggers Senescence of Human Cells through a Pathway Involving ATM, p53, and p21CIP1, but Not p16INK4a. *Molecular Cell* **14**, 501–513 (2004).

39. Shay, J. W. Role of Telomeres and Telomerase in Aging and Cancer. *Cancer Discovery* **6**, 584–593 (2016).
40. Counter, C. M. *et al.* Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity. *EMBO J* **11**, 1921–1929 (1992).
41. Robinson, N. J. & Schieman, W. P. Telomerase in Cancer: Function, Regulation, and Clinical Translation. *Cancers* **14**, 808 (2022).
42. Nishida, N., Yano, H., Nishida, T., Kamura, T. & Kojiro, M. Angiogenesis in Cancer. *Vasc Health Risk Manag* **2**, 213–219 (2006).
43. Huang, T., Sun, L., Yuan, X. & Qiu, H. Thrombospondin-1 is a multifaceted player in tumor progression. *Oncotarget* **8**, 84546–84558 (2017).
44. Carmeliet, P. VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer. *Oncology* **69 Suppl 3**, 4–10 (2005).
45. Goel, H. L. & Mercurio, A. M. VEGF targets the tumour cell. *Nat Rev Cancer* **13**, 871–882 (2013).
46. Lopes-Coelho, F., Martins, F., Pereira, S. A. & Serpa, J. Anti-Angiogenic Therapy: Current Challenges and Future Perspectives. *Int J Mol Sci* **22**, 3765 (2021).
47. Garcia, J. *et al.* Bevacizumab (Avastin®) in cancer treatment: A review of 15 years of clinical experience and future outlook. *Cancer Treat Rev* **86**, 102017 (2020).
48. Berx, G. & van Roy, F. Involvement of Members of the Cadherin Superfamily in Cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **1**, a003129 (2009).
49. Liu, M., Yang, J., Xu, B. & Zhang, X. Tumor metastasis: Mechanistic insights and therapeutic interventions. *MedComm* **2**, 587–617 (2021).
50. Fares, J., Fares, M. Y., Khachfe, H. H., Salhab, H. A. & Fares, Y. Molecular principles of metastasis: a hallmark of cancer revisited. *Sig Transduct Target Ther* **5**, 1–17 (2020).
51. Hoadley, K. A. *et al.* Cell-of-Origin Patterns Dominate the Molecular Classification of 10,000 Tumors from 33 Types of Cancer. *Cell* **173**, 291–304.e6 (2018).
52. Greten, F. R. & Grivnenkov, S. I. Inflammation and Cancer: Triggers, Mechanisms and Consequences. *Immunity* **51**, 27–41 (2019).
53. Grivnenkov, S. I., Greten, F. R. & Karin, M. Immunity, Inflammation, and Cancer. *Cell* **140**, 883–899 (2010).
54. Schreiber, R. D., Old, L. J. & Smyth, M. J. Cancer Immunoediting: Integrating Immunity’s Roles in Cancer Suppression and Promotion. *Science* **331**, 1565–1570 (2011).
55. Romero-Garcia, S., Lopez-Gonzalez, J. S., B´ez-Viveros, J. L., Aguilar-Cazares, D. & Prado-Garcia, H. Tumor cell metabolism. *Cancer Biol Ther* **12**, 939–948 (2011).
56. Vander Heiden, M. G., Cantley, L. C. & Thompson, C. B. Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Science* **324**, 1029–1033 (2009).
57. Pliszka, M. & Szablewski, L. Glucose Transporters as a Target for Anticancer Therapy. *Cancers (Basel)* **13**, 4184 (2021).

58. Fu, Y. *et al.* Lipid metabolism in cancer progression and therapeutic strategies. *MedComm (2020)* **2**, 27–59 (2020).
59. Wei, Z., Liu, X., Cheng, C., Yu, W. & Yi, P. Metabolism of Amino Acids in Cancer. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* **8**, (2021).
60. Quezada, S. A., Peggs, K. S., Simpson, T. R. & Allison, J. P. Shifting the equilibrium in cancer immunoediting: from tumor tolerance to eradication. *Immunol Rev* **241**, 104–118 (2011).
61. Kim, S. K. & Cho, S. W. The Evasion Mechanisms of Cancer Immunity and Drug Intervention in the Tumor Microenvironment. *Front Pharmacol* **13**, 868695 (2022).
62. Yuan, S., Norgard, R. J. & Stanger, B. Z. Cellular Plasticity in Cancer. *Cancer discovery* **9**, 837 (2019).
63. Shih, I.-M. *et al.* Top-down morphogenesis of colorectal tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 2640–2645 (2001).
64. Friedmann-Morvinski, D. & Verma, I. M. Dedifferentiation and reprogramming: origins of cancer stem cells. *EMBO Rep* **15**, 244–253 (2014).
65. de Thé, H. Differentiation therapy revisited. *Nat Rev Cancer* **18**, 117–127 (2018).
66. Krah, N. M. *et al.* The acinar differentiation determinant PTF1A inhibits initiation of pancreatic ductal adenocarcinoma. *eLife* **4**, e07125.
67. John, R. M. & Rougeulle, C. Developmental Epigenetics: Phenotype and the Flexible Epigenome. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* **6**, (2018).
68. Tulsyan, S. *et al.* Molecular basis of epigenetic regulation in cancer diagnosis and treatment. *Frontiers in Genetics* **13**, (2022).
69. Torres, C. M. *et al.* The linker histone H1.0 generates epigenetic and functional intratumor heterogeneity. *Science* **353**, aaf1644 (2016).
70. Yang, J. *et al.* Epigenetic regulation in the tumor microenvironment: molecular mechanisms and therapeutic targets. *Sig Transduct Target Ther* **8**, 1–26 (2023).
71. Lythgoe, M. P., Mullish, B. H., Frampton, A. E. & Krell, J. Polymorphic microbes: a new emerging hallmark of cancer. *Trends in Microbiology* **30**, 1131–1134 (2022).
72. Sears, C. L. & Garrett, W. S. Microbes, Microbiota and Colon Cancer. *Cell Host Microbe* **15**, 317–328 (2014).
73. Pleguezuelos-Manzano, C. *et al.* Mutational signature in colorectal cancer caused by genotoxic pks+ *E. coli*. *Nature* **580**, 269–273 (2020).
74. Bhatt, A. P., Redinbo, M. R. & Bultman, S. J. The Role of the Microbiome in Cancer Development and Therapy. *CA Cancer J Clin* **67**, 326–344 (2017).
75. Nejman, D. *et al.* The human tumor microbiome is composed of tumor type-specific intracellular bacteria. *Science* **368**, 973–980 (2020).
76. Kumari, R. & Jat, P. Mechanisms of Cellular Senescence: Cell Cycle Arrest and Senescence Associated Secretory Phenotype. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* **9**, (2021).

77. Yang, J., Liu, M., Hong, D., Zeng, M. & Zhang, X. The Paradoxical Role of Cellular Senescence in Cancer. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* **9**, (2021).
78. Lau, L. & David, G. Pro- and Anti-Tumorigenic Functions of the Senescence-Associated Secretory Phenotype. *Expert Opin Ther Targets* **23**, 1041–1051 (2019).
79. Weston, A. & Harris, C. C. Multistage Carcinogenesis. in *Holland-Frei Cancer Medicine. 6th edition* (BC Decker, 2003).
80. Loeb, L. A. & Harris, C. C. Advances in Chemical Carcinogenesis: A Historical Review and Prospective. *Cancer Res* **68**, 6863–6872 (2008).
81. Hanselmann, R. G. & Welter, C. Origin of Cancer: Cell work is the Key to Understanding Cancer Initiation and Progression. *Front. Cell Dev. Biol.* **10**, 787995 (2022).
82. Siddiqui, I. A., Sanna, V., Ahmad, N., Sechi, M. & Mukhtar, H. Resveratrol nanoformulation for cancer prevention and therapy. *Ann N Y Acad Sci* **1348**, 20–31 (2015).
83. Liu, Y. *et al.* Mammalian models of chemically induced primary malignancies exploitable for imaging-based preclinical theragnostic research. *Quant Imaging Med Surg* **5**, 708–729 (2015).
84. Schwartz, R. S. Immunodeficiency, Immunosuppression, and Susceptibility to Neoplasms. *JNCI Monographs* **2000**, 5–9 (2000).
85. Burnet, F. M. The concept of immunological surveillance. *Prog Exp Tumor Res* **13**, 1–27 (1970).
86. Teng, M. W. L., Galon, J., Fridman, W.-H. & Smyth, M. J. From mice to humans: developments in cancer immunoediting. *J. Clin. Invest.* **125**, 3338–3346 (2015).
87. Falzone, L., Salomone, S. & Libra, M. Evolution of Cancer Pharmacological Treatments at the Turn of the Third Millennium. *Front Pharmacol* **9**, (2018).
88. Debela, D. T. *et al.* New approaches and procedures for cancer treatment: Current perspectives. *SAGE Open Med* **9**, 20503121211034366 (2021).
89. DeVita, V. T., Jr. & Chu, E. A History of Cancer Chemotherapy. *Cancer Research* **68**, 8643–8653 (2008).
90. Amjad, M. T., Chidharla, A. & Kasi, A. Cancer Chemotherapy. in *StatPearls* (StatPearls Publishing, Treasure Island (FL), 2023).
91. Bukowski, K., Kciuk, M. & Kontek, R. Mechanisms of Multidrug Resistance in Cancer Chemotherapy. *International Journal of Molecular Sciences* **21**, 3233 (2020).
92. Anand, U. *et al.* Cancer chemotherapy and beyond: Current status, drug candidates, associated risks and progress in targeted therapeutics. *Genes & Diseases* **10**, 1367–1401 (2023).
93. Lemaitre, F. *et al.* [5-fluorouracil therapeutic drug monitoring: Update and recommendations of the STP-PT group of the SFPT and the GPCO-Unicancer]. *Bull Cancer* **105**, 790–803 (2018).
94. Lagunas-Rangel, F., Liu, W. & Schiöth, H. Can Exposure to Environmental Pollutants Be Associated with Less Effective Chemotherapy in Cancer Patients? *International Journal of Environmental Research and Public Health* **19**, 2064 (2022).
95. Shuel, S. L. Targeted cancer therapies. *Can Fam Physician* **68**, 515–518 (2022).

96. Zahavi, D. & Weiner, L. Monoclonal Antibodies in Cancer Therapy. *Antibodies (Basel)* **9**, 34 (2020).
97. Adams, G. P. & Weiner, L. M. Monoclonal antibody therapy of cancer. *Nat Biotechnol* **23**, 1147–1157 (2005).
98. Sun, G. *et al.* Role of Small Molecule Targeted Compounds in Cancer: Progress, Opportunities, and Challenges. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* **9**, (2021).
99. Zhong, L. *et al.* Small molecules in targeted cancer therapy: advances, challenges, and future perspectives. *Sig Transduct Target Ther* **6**, 1–48 (2021).
100. Waarts, M. R., Stonestrom, A. J., Park, Y. C. & Levine, R. L. Targeting mutations in cancer. *J Clin Invest* **132**, e154943 (2022).
101. Papaioannou, N. E., Beniata, O. V., Vitsos, P., Tsitsilonis, O. & Samara, P. Harnessing the immune system to improve cancer therapy. *Ann Transl Med* **4**, (2016).
102. Hulen, T. M., Chamberlain, C. A., Svane, I. M. & Met, Ö. ACT Up TIL Now: The Evolution of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Adoptive Cell Therapy for the Treatment of Solid Tumors. *Immuno* **1**, 194–211 (2021).
103. Qin, S. S., Melucci, A. D., Chacon, A. C. & Prieto, P. A. Adoptive T Cell Therapy for Solid Tumors: Pathway to Personalized Standard of Care. *Cells* **10**, 808 (2021).
104. Graham, C., Hewitson, R., Pagliuca, A. & Benjamin, R. Cancer immunotherapy with CAR-T cells – behold the future. *Clin Med (Lond)* **18**, 324–328 (2018).
105. Chen, L., Xie, T., Wei, B. & Di, D.-L. Current progress in CAR-T cell therapy for tumor treatment (Review). *Oncology Letters* **24**, 1–12 (2022).
106. Parsonidis, P. & Papatotiriou, I. Adoptive Cellular Transfer Immunotherapies for Cancer. *Cancer Treatment and Research Communications* **32**, 100575 (2022).
107. B, F. *et al.* Folate-targeted immunotherapies: Passive and active strategies for cancer. *Cytokine & growth factor reviews* **45**, (2019).
108. Galluzzi, L. *et al.* Classification of current anticancer immunotherapies. *Oncotarget* **5**, 12472–12508 (2014).
109. Dobosz, P. & Dzieciatkowski, T. The Intriguing History of Cancer Immunotherapy. *Front Immunol* **10**, 2965 (2019).
110. Parmiani, G., Pilla, L., Maccalli, C. & Russo, V. Autologous versus allogeneic cell-based vaccines? *Cancer J* **17**, 331–336 (2011).
111. Rafieenia, F. *et al.* Allogeneic tumor cell line-based vaccines: A good alternative to autologous and cancer stem cell vaccines in colorectal cancer. *Iran J Basic Med Sci* **24**, 1231–1239 (2021).
112. Immune Checkpoint Inhibitors - NCI. <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types/immunotherapy/checkpoint-inhibitors> (2019).
113. Li, B., Jin, J., Guo, D., Tao, Z. & Hu, X. Immune Checkpoint Inhibitors Combined with Targeted Therapy: The Recent Advances and Future Potentials. *Cancers* **15**, 2858 (2023).
114. Wang, Y. *et al.* Immune checkpoint modulators in cancer immunotherapy: recent advances and emerging concepts. *Journal of Hematology & Oncology* **15**, 111 (2022).

115. Lei, Z.-N. *et al.* Understanding and targeting resistance mechanisms in cancer. *MedComm* **4**, e265 (2023).
116. Giddings, E. L. *et al.* Mitochondrial ATP fuels ABC transporter-mediated drug efflux in cancer chemoresistance. *Nat Commun* **12**, 2804 (2021).
117. Xiao, H., Zheng, Y., Ma, L., Tian, L. & Sun, Q. Clinically-Relevant ABC Transporter for Anti-Cancer Drug Resistance. *Front Pharmacol* **12**, 648407 (2021).
118. Housman, G. *et al.* Drug Resistance in Cancer: An Overview. *Cancers (Basel)* **6**, 1769–1792 (2014).
119. Mansoori, B., Mohammadi, A., Davudian, S., Shirjang, S. & Baradaran, B. The Different Mechanisms of Cancer Drug Resistance: A Brief Review. *Adv Pharm Bull* **7**, 339–348 (2017).
120. Townsend, D. M. & Tew, K. D. The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance. *Oncogene* **22**, 7369–7375 (2003).
121. Emran, T. B. *et al.* Multidrug Resistance in Cancer: Understanding Molecular Mechanisms, Immunoprevention and Therapeutic Approaches. *Frontiers in Oncology* **12**, (2022).
122. Li, L., Guan, Y., Chen, X., Yang, J. & Cheng, Y. DNA Repair Pathways in Cancer Therapy and Resistance. *Frontiers in Pharmacology* **11**, (2021).
123. Du, B. & Shim, J. S. Targeting Epithelial–Mesenchymal Transition (EMT) to Overcome Drug Resistance in Cancer. *Molecules* **21**, 965 (2016).
124. Ashrafizadeh, M. *et al.* New insight towards development of paclitaxel and docetaxel resistance in cancer cells: EMT as a novel molecular mechanism and therapeutic possibilities. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **141**, 111824 (2021).
125. Xie, M. *et al.* Activation of notch-1 enhances epithelial–mesenchymal transition in gefitinib-acquired resistant lung cancer cells. *Journal of Cellular Biochemistry* **113**, 1501–1513 (2012).
126. Wu, Y. *et al.* Expression of Wnt3 activates Wnt/ β -catenin pathway and promotes EMT-like phenotype in trastuzumab-resistant HER2-overexpressing breast cancer cells. *Mol Cancer Res* **10**, 1597–1606 (2012).
127. Della Corte, C. M. *et al.* SMO Gene Amplification and Activation of the Hedgehog Pathway as Novel Mechanisms of Resistance to Anti-Epidermal Growth Factor Receptor Drugs in Human Lung Cancer. *Clin Cancer Res* **21**, 4686–4697 (2015).
128. Walcher, L. *et al.* Cancer Stem Cells—Origins and Biomarkers: Perspectives for Targeted Personalized Therapies. *Front Immunol* **11**, 1280 (2020).
129. Phi, L. T. H. *et al.* Cancer Stem Cells (CSCs) in Drug Resistance and their Therapeutic Implications in Cancer Treatment. *Stem Cells Int* **2018**, 5416923 (2018).
130. Chen, K. *et al.* The metabolic flexibility of quiescent CSC: implications for chemotherapy resistance. *Cell Death Dis* **12**, 835 (2021).
131. Ranjan, T. *et al.* Cancer stem cell assay-guided chemotherapy improves survival of patients with recurrent glioblastoma in a randomized trial. *Cell Rep Med* **4**, 101025 (2023).
132. Qing, B., Wang, S., Du, Y., Liu, C. & Li, W. Crosstalk between endoplasmic reticulum stress and multidrug-resistant cancers: hope or frustration. *Front Pharmacol* **14**, 1273987 (2023).

133. Zhang, A., Miao, K., Sun, H. & Deng, C.-X. Tumor heterogeneity reshapes the tumor microenvironment to influence drug resistance. *Int J Biol Sci* **18**, 3019–3033 (2022).
134. Peng, F. *et al.* Regulated cell death (RCD) in cancer: key pathways and targeted therapies. *Sig Transduct Target Ther* **7**, 1–66 (2022).
135. Eda Dogan, M. S. C., Hale Guler Kara, P. H. D., Buket Kosova, P. H. D. & Vildan Bozok Cetintas, P. H. D. Targeting Apoptosis to Overcome Chemotherapy Resistance. *Exon Publications* 163–180 (2022) doi:10.36255/exon-publications.metastasis.chemotherapy-resistance.
136. Wong, R. S. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* **30**, 87 (2011).
137. Galluzzi, L. *et al.* Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ* **25**, 486–541 (2018).
138. Dickens, L. S. *et al.* A Death Effector Domain Chain DISC Model Reveals a Crucial Role for Caspase-8 Chain Assembly in Mediating Apoptotic Cell Death. *Mol Cell* **47**, 291–305 (2012).
139. Hillert, L. K. *et al.* Dissecting DISC regulation via pharmacological targeting of caspase-8/c-FLIPL heterodimer. *Cell Death Differ* **27**, 2117–2130 (2020).
140. Ivanisenko, N. V. & Lavrik, I. N. Mechanisms of Procaspase-8 Activation in the Extrinsic Programmed Cell Death Pathway. *Mol Biol* **53**, 732–738 (2019).
141. Kitazumi, I. & Tsukahara, M. Regulation of DNA fragmentation: the role of caspases and phosphorylation. *The FEBS Journal* **278**, 427–441 (2011).
142. Bedoui, S., Herold, M. J. & Strasser, A. Emerging connectivity of programmed cell death pathways and its physiological implications. *Nat Rev Mol Cell Biol* **21**, 678–695 (2020).
143. García-Aranda, M., Pérez-Ruiz, E. & Redondo, M. Bcl-2 Inhibition to Overcome Resistance to Chemo- and Immunotherapy. *Int J Mol Sci* **19**, 3950 (2018).
144. Rathore, R., McCallum, J. E., Varghese, E., Florea, A.-M. & Büsselberg, D. Overcoming chemotherapy drug resistance by targeting inhibitors of apoptosis proteins (IAPs). *Apoptosis* **22**, 898–919 (2017).
145. Lu, G. *et al.* Autophagy in health and disease: From molecular mechanisms to therapeutic target. *MedComm* **3**, e150 (2022).
146. Li, X. *et al.* Autophagy: A novel mechanism of chemoresistance in cancers. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **119**, 109415 (2019).
147. Chang, H. & Zou, Z. Targeting autophagy to overcome drug resistance: further developments. *Journal of Hematology & Oncology* **13**, 159 (2020).
148. Badadani, M. Autophagy Mechanism, Regulation, Functions, and Disorders. *International Scholarly Research Notices* **2012**, e927064 (2012).
149. Sui, X. *et al.* Autophagy and chemotherapy resistance: a promising therapeutic target for cancer treatment. *Cell Death Dis* **4**, e838–e838 (2013).
150. Yun, C. W. & Lee, S. H. The Roles of Autophagy in Cancer. *Int J Mol Sci* **19**, 3466 (2018).
151. Vega-Rubín-de-Celis, S. The Role of Beclin 1-Dependent Autophagy in Cancer. *Biology (Basel)* **9**, 4 (2019).

152. Das, C. K., Mandal, M. & Kögel, D. Pro-survival autophagy and cancer cell resistance to therapy. *Cancer Metastasis Rev* **37**, 749–766 (2018).
153. Ahmadi-Dehlaghi, F. *et al.* Autophagy: A challengeable paradox in cancer treatment. *Cancer Medicine* **12**, 11542–11569 (2023).
154. Blagosklonny, M. V. Cancer prevention with rapamycin. *Oncotarget* **14**, 342–350 (2023).
155. Zhang, C., Liu, X., Jin, S., Chen, Y. & Guo, R. Ferroptosis in cancer therapy: a novel approach to reversing drug resistance. *Molecular Cancer* **21**, 47 (2022).
156. Chen, Z. *et al.* Ferroptosis as a potential target for cancer therapy. *Cell Death Dis* **14**, 1–15 (2023).
157. Dai, E. *et al.* Ferroptotic damage promotes pancreatic tumorigenesis through a TMEM173/STING-dependent DNA sensor pathway. *Nat Commun* **11**, 6339 (2020).
158. Chen, C. *et al.* GPX4 is a potential diagnostic and therapeutic biomarker associated with diffuse large B lymphoma cell proliferation and B cell immune infiltration. *Heliyon* **10**, e24857 (2024).
159. Song, X., Wang, X., Liu, Z. & Yu, Z. Role of GPX4-Mediated Ferroptosis in the Sensitivity of Triple Negative Breast Cancer Cells to Gefitinib. *Front Oncol* **10**, 597434 (2020).
160. Lu, B. *et al.* The Role of Ferroptosis in Cancer Development and Treatment Response. *Front Pharmacol* **8**, 992 (2018).
161. Nie, Z. *et al.* Ferroptosis and Tumor Drug Resistance: Current Status and Major Challenges. *Front Pharmacol* **13**, 879317 (2022).
162. Yu, P. *et al.* Pyroptosis: mechanisms and diseases. *Sig Transduct Target Ther* **6**, 1–21 (2021).
163. Lu, L. *et al.* Emerging mechanisms of pyroptosis and its therapeutic strategy in cancer. *Cell Death Discov.* **8**, 1–13 (2022).
164. Wang, Y. *et al.* Chemotherapy drugs induce pyroptosis through caspase-3 cleavage of a gasdermin. *Nature* **547**, 99–103 (2017).
165. Zhang, Z. *et al.* Gasdermin E suppresses tumour growth by activating anti-tumour immunity. *Nature* **579**, 415–420 (2020).
166. Zhou, Z. *et al.* Granzyme A from cytotoxic lymphocytes cleaves GSDMB to trigger pyroptosis in target cells. *Science* **368**, eaaz7548 (2020).
167. Fan, J.-X. *et al.* Epigenetics-Based Tumor Cells Pyroptosis for Enhancing the Immunological Effect of Chemotherapeutic Nanocarriers. *Nano Lett* **19**, 8049–8058 (2019).
168. Huang, H. *et al.* Molecular mechanisms of pyroptosis and its role in anti-tumor immunity. *Int J Biol Sci* **19**, 4166–4180 (2023).
169. Laster, S. M., Wood, J. G. & Gooding, L. R. Tumor necrosis factor can induce both apoptotic and necrotic forms of cell lysis. *J Immunol* **141**, 2629–2634 (1988).
170. Vercammen, D. *et al.* Dual Signaling of the Fas Receptor: Initiation of Both Apoptotic and Necrotic Cell Death Pathways. *Journal of Experimental Medicine* **188**, 919–930 (1998).
171. Holler, N. *et al.* Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule. *Nat Immunol* **1**, 489–495 (2000).

172. Degtarev, A. *et al.* Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. *Nat Chem Biol* **1**, 112–119 (2005).
173. Degtarev, A. *et al.* Identification of RIP1 kinase as a specific cellular target of necrostatins. *Nat Chem Biol* **4**, 313–321 (2008).
174. Cho, Y. *et al.* Phosphorylation-Driven Assembly of RIP1-RIP3 Complex Regulates Programmed Necrosis and Virus-Induced Inflammation. *Cell* **137**, 1112–1123 (2009).
175. Sun, L. *et al.* Mixed Lineage Kinase Domain-like Protein Mediates Necrosis Signaling Downstream of RIP3 Kinase. *Cell* **148**, 213–227 (2012).
176. Liu, X. *et al.* The role of necroptosis in disease and treatment. *MedComm (2020)* **2**, 730–755 (2021).
177. Grootjans, S., Vanden Berghe, T. & Vandenabeele, P. Initiation and execution mechanisms of necroptosis: an overview. *Cell Death Differ* **24**, 1184–1195 (2017).
178. Yan, J., Wan, P., Choksi, S. & Liu, Z.-G. Necroptosis and tumor progression. *Trends Cancer* **8**, 21–27 (2022).
179. Vanlangenakker, N., Vanden Berghe, T. & Vandenabeele, P. Many stimuli pull the necrotic trigger, an overview. *Cell Death Differ* **19**, 75–86 (2012).
180. Su, Z., Yang, Z., Xie, L., DeWitt, J. P. & Chen, Y. Cancer therapy in the necroptosis era. *Cell Death Differ* **23**, 748–756 (2016).
181. Tummers, B. & Green, D. R. Mechanisms of TNF-independent RIPK3-mediated cell death. *Biochemical Journal* **479**, 2049–2062 (2022).
182. Meng, M.-B. *et al.* Necroptosis in tumorigenesis, activation of anti-tumor immunity, and cancer therapy. *Oncotarget* **7**, 57391–57413 (2016).
183. Degtarev, A., Zhou, W., Maki, J. L. & Yuan, J. Assays for Necroptosis and Activity of RIP Kinases. in *Methods in Enzymology* vol. 545 1–33 (Elsevier, 2014).
184. Ye, K., Chen, Z. & Xu, Y. The double-edged functions of necroptosis. *Cell Death Dis* **14**, 1–12 (2023).
185. Gong, Y. *et al.* The role of necroptosis in cancer biology and therapy. *Molecular Cancer* **18**, 100 (2019).
186. Strilic, B. *et al.* Tumour-cell-induced endothelial cell necroptosis via death receptor 6 promotes metastasis. *Nature* **536**, 215–218 (2016).
187. Pasparakis, M. & Vandenabeele, P. Necroptosis and its role in inflammation. *Nature* **517**, 311–320 (2015).
188. Yang, D. *et al.* ZBP1 mediates interferon-induced necroptosis. *Cell Mol Immunol* **17**, 356–368 (2020).
189. Thapa, R. J. *et al.* Interferon-induced RIP1/RIP3-mediated necrosis requires PKR and is licensed by FADD and caspases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, E3109–E3118 (2013).
190. Chaouhan, H. S. *et al.* Necroptosis: A Pathogenic Negotiator in Human Diseases. *International Journal of Molecular Sciences* **23**, 12714 (2022).

191. Kaiser, W. J. *et al.* Toll-like Receptor 3-mediated Necrosis via TRIF, RIP3, and MLKL. *J Biol Chem* **288**, 31268–31279 (2013).
192. He, S., Liang, Y., Shao, F. & Wang, X. Toll-like receptors activate programmed necrosis in macrophages through a receptor-interacting kinase-3-mediated pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108**, 20054–20059 (2011).
193. Choi, M. E., Price, D. R., Ryter, S. W. & Choi, A. M. K. Necroptosis: a crucial pathogenic mediator of human disease. *JCI Insight* **4**, e128834 (2019).
194. Chen, X. *et al.* ZBP1-Mediated Necroptosis: Mechanisms and Therapeutic Implications. *Molecules* **28**, 52 (2022).
195. Hanson, B. Necroptosis: A new way of dying? *Cancer Biol Ther* **17**, 899–910 (2016).
196. Cuny, G. D. & Degterev, A. RIPK protein kinase family: Atypical lives of typical kinases. *Semin Cell Dev Biol* **109**, 96–105 (2021).
197. Seo, J., Nam, Y. W., Kim, S., Oh, D.-B. & Song, J. Necroptosis molecular mechanisms: Recent findings regarding novel necroptosis regulators. *Exp Mol Med* **53**, 1007–1017 (2021).
198. Liu, X. *et al.* RIPK1 in the inflammatory response and sepsis: Recent advances, drug discovery and beyond. *Front. Immunol.* **14**, (2023).
199. Wang, Q. *et al.* The latest information on the RIPK1 post-translational modifications and functions. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **142**, 112082 (2021).
200. He, S. & Wang, X. RIP kinases as modulators of inflammation and immunity. *Nat Immunol* **19**, 912–922 (2018).
201. Yu, P. W. *et al.* Identification of RIP3, a RIP-like kinase that activates apoptosis and NFkappaB. *Curr Biol* **9**, 539–542 (1999).
202. Sun, X. *et al.* RIP3, a novel apoptosis-inducing kinase. *J Biol Chem* **274**, 16871–16875 (1999).
203. Shlomovitz, I., Zargrian, S. & Gerlic, M. Mechanisms of RIPK3-induced inflammation. *Immunology & Cell Biology* **95**, 166–172 (2017).
204. Moriwaki, K. & Chan, F. K.-M. RIP3: a molecular switch for necrosis and inflammation. *Genes Dev* **27**, 1640–1649 (2013).
205. Moriwaki, K. & Chan, F. K.-M. The inflammatory signal adaptor RIPK3: functions beyond necroptosis. *Int Rev Cell Mol Biol* **328**, 253–275 (2017).
206. Samson, A. L. *et al.* A toolbox for imaging RIPK1, RIPK3, and MLKL in mouse and human cells. *Cell Death Differ* **28**, 2126–2144 (2021).
207. Torii, S. *et al.* Identification of a phosphorylation site on Ulk1 required for genotoxic stress-induced alternative autophagy. *Nat Commun* **11**, 1754 (2020).
208. Torii, S. & Shimizu, S. Involvement of phosphorylation of ULK1 in alternative autophagy. *Autophagy* **16**, 1532–1533.
209. Lawlor, K. E. *et al.* RIPK3 promotes cell death and NLRP3 inflammasome activation in the absence of MLKL. *Nat Commun* **6**, 6282 (2015).

210. Conos, S. A. *et al.* Active MLKL triggers the NLRP3 inflammasome in a cell-intrinsic manner. *Proc Natl Acad Sci U S A* **114**, E961–E969 (2017).
211. Zhang, D.-W. *et al.* RIP3, an Energy Metabolism Regulator That Switches TNF-Induced Cell Death from Apoptosis to Necrosis. *Science* **325**, 332–336 (2009).
212. Liu, S., Joshi, K., Denning, M. F. & Zhang, J. RIPK3 signaling and its role in the pathogenesis of cancers. *Cell Mol Life Sci* **78**, 7199–7217 (2021).
213. Manning, G., Whyte, D. B., Martinez, R., Hunter, T. & Sudarsanam, S. The protein kinase complement of the human genome. *Science* **298**, 1912–1934 (2002).
214. Boudeau, J., Miranda-Saavedra, D., Barton, G. J. & Alessi, D. R. Emerging roles of pseudokinases. *Trends Cell Biol* **16**, 443–452 (2006).
215. Martinez-Osorio, V., Abdelwahab, Y. & Ros, U. The Many Faces of MLKL, the Executor of Necroptosis. *Int J Mol Sci* **24**, 10108 (2023).
216. Murphy, J. M. The Killer Pseudokinase Mixed Lineage Kinase Domain-Like Protein (MLKL). *Cold Spring Harb Perspect Biol* **12**, a036376 (2020).
217. Kolbrink, B., Riebeling, T., Kunzendorf, U. & Krautwald, S. Plasma Membrane Pores Drive Inflammatory Cell Death. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* **8**, (2020).
218. Davies, K. A. *et al.* The brace helices of MLKL mediate interdomain communication and oligomerisation to regulate cell death by necroptosis. *Cell Death Differ* **25**, 1567–1580 (2018).
219. Petrie, E. J. *et al.* Conformational switching of the pseudokinase domain promotes human MLKL tetramerization and cell death by necroptosis. *Nat Commun* **9**, 2422 (2018).
220. Dovey, C. M. *et al.* MLKL requires the inositol phosphate code to execute necroptosis. *Mol Cell* **70**, 936-948.e7 (2018).
221. Najafov, A. *et al.* TAM Kinases Promote Necroptosis by Regulating Oligomerization of MLKL. *Molecular Cell* **75**, 457-468.e4 (2019).
222. Johnston, A. N. *et al.* Necroptosis-blocking compound NBC1 targets heat shock protein 70 to inhibit MLKL polymerization and necroptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **117**, 6521–6530 (2020).
223. Jacobsen, A. V. *et al.* HSP90 activity is required for MLKL oligomerisation and membrane translocation and the induction of necroptotic cell death. *Cell Death Dis* **7**, e2051 (2016).
224. Yoon, S., Kovalenko, A., Bogdanov, K. & Wallach, D. MLKL, the Protein that Mediates Necroptosis, Also Regulates Endosomal Trafficking and Extracellular Vesicle Generation. *Immunity* **47**, 51-65.e7 (2017).
225. Gong, Y.-N. *et al.* ESCRT-III Acts Downstream of MLKL to Regulate Necroptotic Cell Death and Its Consequences. *Cell* **169**, 286-300.e16 (2017).
226. Ying, Z. *et al.* Mixed Lineage Kinase Domain-like Protein MLKL Breaks Down Myelin following Nerve Injury. *Mol Cell* **72**, 457-468.e5 (2018).
227. Xia, B. *et al.* MLKL forms cation channels. *Cell Res* **26**, 517–528 (2016).
228. Chen, X. *et al.* Translocation of mixed lineage kinase domain-like protein to plasma membrane leads to necrotic cell death. *Cell Res* **24**, 105–121 (2014).

229. Hildebrand, J. M. *et al.* Activation of the pseudokinase MLKL unleashes the four-helix bundle domain to induce membrane localization and necroptotic cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, 15072–15077 (2014).
230. Kaczmarek, A., Vandenabeele, P. & Krysko, D. V. Necroptosis: The Release of Damage-Associated Molecular Patterns and Its Physiological Relevance. *Immunity* **38**, 209–223 (2013).
231. Ahmed, A. & Tait, S. W. G. Targeting immunogenic cell death in cancer. *Molecular Oncology* **14**, 2994–3006 (2020).
232. Zhao, Q. *et al.* RIPK3 Mediates Necroptosis during Embryonic Development and Postnatal Inflammation in Fadd-Deficient Mice. *Cell Reports* **19**, 798–808 (2017).
233. Kelliher, M. A. *et al.* The Death Domain Kinase RIP Mediates the TNF-Induced NF- κ B Signal. *Immunity* **8**, 297–303 (1998).
234. Newton, K., Sun, X. & Dixit, V. M. Kinase RIP3 Is Dispensable for Normal NF- κ Bs, Signaling by the B-Cell and T-Cell Receptors, Tumor Necrosis Factor Receptor 1, and Toll-Like Receptors 2 and 4. *Mol Cell Biol* **24**, 1464–1469 (2004).
235. Wu, J. *et al.* Mlkl knockout mice demonstrate the indispensable role of Mlkl in necroptosis. *Cell Res* **23**, 994–1006 (2013).
236. Zhe-Wei, S., Li-Sha, G. & Yue-Chun, L. The Role of Necroptosis in Cardiovascular Disease. *Front Pharmacol* **9**, 721 (2018).
237. Guo, X., Chen, Y. & Liu, Q. Necroptosis in heart disease: Molecular mechanisms and therapeutic implications. *J Mol Cell Cardiol* **169**, 74–83 (2022).
238. Luedde, M. *et al.* RIP3, a kinase promoting necroptotic cell death, mediates adverse remodelling after myocardial infarction. *Cardiovasc Res* **103**, 206–216 (2014).
239. Zhang, S., Tang, M., Luo, H., Shi, C. & Xu, Y. Necroptosis in neurodegenerative diseases: a potential therapeutic target. *Cell Death Dis* **8**, e2905 (2017).
240. Iannielli, A. *et al.* Pharmacological Inhibition of Necroptosis Protects from Dopaminergic Neuronal Cell Death in Parkinson’s Disease Models. *Cell Rep* **22**, 2066–2079 (2018).
241. Oñate, M. *et al.* The necroptosis machinery mediates axonal degeneration in a model of Parkinson disease. *Cell Death Differ* **27**, 1169–1185 (2020).
242. Zhang, R., Song, Y. & Su, X. Necroptosis and Alzheimer’s Disease: Pathogenic Mechanisms and Therapeutic Opportunities. *J Alzheimers Dis* **94**, S367–S386.
243. Salvadores, N. *et al.* A β oligomers trigger necroptosis-mediated neurodegeneration via microglia activation in Alzheimer’s disease. *Acta Neuropathologica Communications* **10**, 31 (2022).
244. Caccamo, A. *et al.* Necroptosis activation in Alzheimer’s disease. *Nat Neurosci* **20**, 1236–1246 (2017).
245. Kearney, C. J. & Martin, S. J. An Inflammatory Perspective on Necroptosis. *Molecular Cell* **65**, 965–973 (2017).
246. Dhuriya, Y. K. & Sharma, D. Necroptosis: a regulated inflammatory mode of cell death. *J Neuroinflammation* **15**, 199 (2018).

247. Martin, S. J. Cell death and inflammation: the case for IL-1 family cytokines as the canonical DAMPs of the immune system. *The FEBS Journal* **283**, 2599–2615 (2016).
248. Nailwal, H. & Chan, F. K.-M. Necroptosis in anti-viral inflammation. *Cell Death Differ* **26**, 4–13 (2019).
249. Sun, C. *et al.* Regulated necrosis in COVID-19: A double-edged sword. *Front Immunol* **13**, 917141 (2022).
250. Nakamura, H. *et al.* Serum levels of receptor-interacting protein kinase-3 in patients with COVID-19. *Crit Care* **24**, 484 (2020).
251. Li, S. *et al.* SARS-CoV-2 triggers inflammatory responses and cell death through caspase-8 activation. *Signal Transduct Target Ther* **5**, 235 (2020).
252. Cao, L. & Mu, W. Necrostatin-1 and necroptosis inhibition: Pathophysiology and therapeutic implications. *Pharmacol Res* **163**, 105297 (2021).
253. Kang, Y. & Wang, Q. Potential therapeutic value of necroptosis inhibitor for the treatment of COVID-19. *European Journal of Medical Research* **27**, 283 (2022).
254. Najafov, A., Chen, H. & Yuan, J. Necroptosis and Cancer. *Trends Cancer* **3**, 294–301 (2017).
255. Koo, G.-B. *et al.* Methylation-dependent loss of RIP3 expression in cancer represses programmed necrosis in response to chemotherapeutics. *Cell Res* **25**, 707–725 (2015).
256. Morgan, M. J. & Kim, Y.-S. The serine threonine kinase RIP3: lost and found. *BMB Rep* **48**, 303–312 (2015).
257. Sprooten, J. *et al.* Necroptosis in Immuno-Oncology and Cancer Immunotherapy. *Cells* **9**, 1823 (2020).
258. Liu, X. *et al.* Epstein-Barr virus encoded latent membrane protein 1 suppresses necroptosis through targeting RIPK1/3 ubiquitination. *Cell Death Dis* **9**, 1–14 (2018).
259. Shi, F. *et al.* EBV(LMP1)-induced metabolic reprogramming inhibits necroptosis through the hypermethylation of the RIP3 promoter. *Theranostics* **9**, 2424–2438 (2019).
260. Yang, C. *et al.* Regulation of RIP3 by the transcription factor Sp1 and the epigenetic regulator UHRF1 modulates cancer cell necroptosis. *Cell Death Dis* **8**, e3084–e3084 (2017).
261. Najafov, A. *et al.* BRAF and AXL oncogenes drive RIPK3 expression loss in cancer. *PLoS Biol* **16**, e2005756 (2018).
262. Martens, S., Bridelance, J., Roelandt, R., Vandenabeele, P. & Takahashi, N. MLKL in cancer: more than a necroptosis regulator. *Cell Death Differ* **28**, 1757–1772 (2021).
263. Murphy, J. M. *et al.* The Pseudokinase MLKL Mediates Necroptosis via a Molecular Switch Mechanism. *Immunity* **39**, 443–453 (2013).
264. Lalaoui, N. & Brumatti, G. Relevance of necroptosis in cancer. *Immunology & Cell Biology* **95**, 137–145 (2017).
265. Li, X. *et al.* Association of Mixed Lineage Kinase Domain-Like Protein Expression With Prognosis in Patients With Colon Cancer. *Technol Cancer Res Treat* **16**, 428–434 (2017).

266. Moriwaki, K., Bertin, J., Gough, P. J., Orlowski, G. M. & Chan, F. K. Differential roles of RIPK1 and RIPK3 in TNF-induced necroptosis and chemotherapeutic agent-induced cell death. *Cell Death Dis* **6**, e1636–e1636 (2015).
267. Feng, X. *et al.* Receptor-interacting protein kinase 3 is a predictor of survival and plays a tumor suppressive role in colorectal cancer. *Neoplasia* **62**, 592–601 (2015).
268. Bozec, D., Iuga, A. C., Roda, G., Dahan, S. & Yeretssian, G. Critical function of the necroptosis adaptor RIPK3 in protecting from intestinal tumorigenesis. *Oncotarget* **7**, 46384–46400 (2016).
269. Nugues, A.-L. *et al.* RIP3 is downregulated in human myeloid leukemia cells and modulates apoptosis and caspase-mediated p65/RelA cleavage. *Cell Death Dis* **5**, e1384 (2014).
270. Höckendorf, U. *et al.* RIPK3 Restricts Myeloid Leukemogenesis by Promoting Cell Death and Differentiation of Leukemia Initiating Cells. *Cancer Cell* **30**, 75–91 (2016).
271. Geserick, P. *et al.* Absence of RIPK3 predicts necroptosis resistance in malignant melanoma. *Cell Death Dis* **6**, e1884 (2015).
272. Ertao, Z. *et al.* Prognostic value of mixed lineage kinase domain-like protein expression in the survival of patients with gastric cancer. *Tumour Biol* **37**, 13679–13685 (2016).
273. Seifert, L. *et al.* The Necrosome Promotes Pancreas Oncogenesis via CXCL1 and Mincle Induced Immune Suppression. *Nature* **532**, 245–249 (2016).
274. Wang, H.-H. *et al.* Ablative Hypofractionated Radiation Therapy Enhances Non-Small Cell Lung Cancer Cell Killing via Preferential Stimulation of Necroptosis In Vitro and In Vivo. *International Journal of Radiation Oncology*Biophysics* **101**, 49–62 (2018).
275. Conev, N. V. *et al.* RIPK3 expression as a potential predictive and prognostic marker in metastatic colon cancer. *Clinical and Investigative Medicine* **42**, E31–E38 (2019).
276. Stoll, G. *et al.* Pro-necrotic molecules impact local immunosurveillance in human breast cancer. *Oncoimmunology* **6**, e1299302 (2017).
277. He, L., Peng, K., Liu, Y., Xiong, J. & Zhu, F.-F. Low expression of mixed lineage kinase domain-like protein is associated with poor prognosis in ovarian cancer patients. *Onco Targets Ther* **6**, 1539–1543 (2013).
278. Ruan, J., Mei, L., Zhu, Q., Shi, G. & Wang, H. Mixed lineage kinase domain-like protein is a prognostic biomarker for cervical squamous cell cancer. *Int J Clin Exp Pathol* **8**, 15035–15038 (2015).
279. Colbert, L. E. *et al.* Pronecrotic mixed lineage kinase domain-like protein expression is a prognostic biomarker in patients with early-stage resected pancreatic adenocarcinoma. *Cancer* **119**, 3148–3155 (2013).
280. Li, L., Yu, S. & Zang, C. Low Necroptosis Process Predicts Poor Treatment Outcome of Human Papillomavirus Positive Cervical Cancers by Decreasing Tumor-Associated Macrophages M1 Polarization. *Gynecol Obstet Invest* **83**, 259–267 (2018).
281. Jiao, D. *et al.* Necroptosis of tumor cells leads to tumor necrosis and promotes tumor metastasis. *Cell Res* **28**, 868–870 (2018).
282. Schneider, A. T. *et al.* RIPK1 Suppresses a TRAF2-Dependent Pathway to Liver Cancer. *Cancer Cell* **31**, 94–109 (2017).

283. Bist, P. *et al.* Annexin-1 interacts with NEMO and RIP1 to constitutively activate IKK complex and NF- κ B: implication in breast cancer metastasis. *Oncogene* **30**, 3174–3185 (2011).
284. Park, S. *et al.* The receptor interacting protein (RIP1) inhibits p53 induction through NF- κ B activation and confers a worse prognosis in glioblastoma. *Cancer Res* **69**, 2809–2816 (2009).
285. McCormick, K. D. *et al.* Innate immune signaling through differential RIPK1 expression promote tumor progression in head and neck squamous cell carcinoma. *Carcinogenesis* **37**, 522–529 (2016).
286. Wang, K. *et al.* Up-Regulation of RIP3 Alleviates Prostate Cancer Progression by Activation of RIP3/MLKL Signaling Pathway and Induction of Necroptosis. *Frontiers in Oncology* **10**, (2020).
287. Xu, Y. *et al.* Receptor Interactive Protein Kinase 3 Promotes Cisplatin-Triggered Necrosis in Apoptosis-Resistant Esophageal Squamous Cell Carcinoma Cells. *PLoS One* **9**, e100127 (2014).
288. Zhong, B. *et al.* MLKL and other necroptosis-related genes promote the tumor immune cell infiltration, guiding for the administration of immunotherapy in bladder urothelial carcinoma. *Apoptosis* **28**, 892–911 (2023).
289. Van Hoecke, L., Riederer, S., Saelens, X., Sutter, G. & Rojas, J. J. Recombinant viruses delivering the necroptosis mediator MLKL induce a potent antitumor immunity in mice. *Oncol Immunology* **9**, 1802968 (2020).
290. Van Hoecke, L. *et al.* Treatment with mRNA coding for the necroptosis mediator MLKL induces antitumor immunity directed against neo-epitopes. *Nat Commun* **9**, 3417 (2018).
291. Liu, X. *et al.* Key roles of necroptotic factors in promoting tumor growth. *Oncotarget* **7**, 22219–22233 (2016).
292. Lin, C.-C. *et al.* RIPK3 upregulation confers robust proliferation and collateral cystine-dependence on breast cancer recurrence. *Cell Death Differ* **27**, 2234–2247 (2020).
293. Ando, Y. *et al.* Necroptosis in pancreatic cancer promotes cancer cell migration and invasion by release of CXCL5. *PLoS One* **15**, e0228015 (2020).
294. Hänggi, K. *et al.* RIPK1/RIPK3 promotes vascular permeability to allow tumor cell extravasation independent of its necroptotic function. *Cell Death Dis* **8**, e2588–e2588 (2017).
295. Meier, P., Legrand, A. J., Adam, D. & Silke, J. Immunogenic cell death in cancer: targeting necroptosis to induce antitumour immunity. *Nat Rev Cancer* **24**, 299–315 (2024).
296. Ruan, H., Leibowitz, B. J., Zhang, L. & Yu, J. Immunogenic cell death in colon cancer prevention and therapy. *Mol Carcinog* **59**, 783–793 (2020).
297. Snyder, A. G. *et al.* Intratumoral activation of the necroptotic pathway components RIPK1 and RIPK3 potentiates antitumor immunity. *Sci Immunol* **4**, eaaw2004 (2019).
298. Aaes, T. L. *et al.* Vaccination with Necroptotic Cancer Cells Induces Efficient Anti-tumor Immunity. *Cell Rep* **15**, 274–287 (2016).
299. Nehs, M. A. *et al.* Necroptosis is a novel mechanism of radiation-induced cell death in anaplastic thyroid and adrenocortical cancers. *Surgery* **150**, 1032–1039 (2011).
300. Kadigamuwa, C. *et al.* Role of Retinoic Acid Receptor- γ in DNA Damage-Induced Necroptosis. *iScience* **17**, 74–86 (2019).

301. Wang, Q. *et al.* Epigenetic Regulation of RIP3 Suppresses Necroptosis and Increases Resistance to Chemotherapy in NonSmall Cell Lung Cancer. *Translational Oncology* **13**, 372–382 (2020).
302. Fu, Z. *et al.* The anti-tumor effect of shikonin on osteosarcoma by inducing RIP1 and RIP3 dependent necroptosis. *BMC Cancer* **13**, 580 (2013).
303. Kim, H.-J. *et al.* Shikonin-induced necroptosis is enhanced by the inhibition of autophagy in non-small cell lung cancer cells. *J Transl Med* **15**, 123 (2017).
304. Lu, B. *et al.* Shikonin induces glioma cell necroptosis in vitro by ROS overproduction and promoting RIP1/RIP3 necrosome formation. *Acta Pharmacol Sin* **38**, 1543–1553 (2017).
305. Han, W. *et al.* Shikonin circumvents cancer drug resistance by induction of a necroptotic death. *Molecular Cancer Therapeutics* **6**, 1641–1649 (2007).
306. Han, Q. *et al.* Resibufogenin suppresses colorectal cancer growth and metastasis through RIP3-mediated necroptosis. *J Transl Med* **16**, 201 (2018).
307. Laukens, B. *et al.* Smac Mimetic Bypasses Apoptosis Resistance in FADD- or Caspase-8-Deficient Cells by Priming for Tumor Necrosis Factor α -Induced Necroptosis. *Neoplasia* **13**, 971–979 (2011).
308. Hannes, S., Abhari, B. A. & Fulda, S. Smac mimetic triggers necroptosis in pancreatic carcinoma cells when caspase activation is blocked. *Cancer Letters* **380**, 31–38 (2016).
309. Steinhart, L., Belz, K. & Fulda, S. Smac mimetic and demethylating agents synergistically trigger cell death in acute myeloid leukemia cells and overcome apoptosis resistance by inducing necroptosis. *Cell Death Dis* **4**, e802 (2013).
310. Morrish, E., Brumatti, G. & Silke, J. Future Therapeutic Directions for Smac-Mimetics. *Cells* **9**, 406 (2020).
311. He, S. *et al.* Receptor Interacting Protein Kinase-3 Determines Cellular Necrotic Response to TNF- α . *Cell* **137**, 1100–1111 (2009).
312. Chesnokov, M., Khan, I. & Chefetz, I. Induction and Detection of Necroptotic Cell Death in Mammalian Cell Culture. *Methods Mol Biol* **2255**, 119–134 (2021).
313. Vanlangenakker, N., Bertrand, M. J. M., Bogaert, P., Vandenabeele, P. & Vanden Berghe, T. TNF-induced necroptosis in L929 cells is tightly regulated by multiple TNFR1 complex I and II members. *Cell Death Dis* **2**, e230–e230 (2011).
314. Conrad, M., Angeli, J. P. F., Vandenabeele, P. & Stockwell, B. R. Regulated necrosis: disease relevance and therapeutic opportunities. *Nat Rev Drug Discov* **15**, 348–366 (2016).
315. Chesnokov, M., Khan, I. & Chefetz, I. Induction and Detection of Necroptotic Cell Death in Mammalian Cell Culture. in *Detection of Cell Death Mechanisms: Methods and Protocols* (eds. Alvero, A. B. & Mor, G. G.) 119–134 (Springer US, New York, NY, 2021). doi:10.1007/978-1-0716-1162-3_11.
316. Vercammen, D. *et al.* Inhibition of Caspases Increases the Sensitivity of L929 Cells to Necrosis Mediated by Tumor Necrosis Factor. *Journal of Experimental Medicine* **187**, 1477–1485 (1998).
317. Kearney, C. J., Cullen, S. P., Clancy, D. & Martin, S. J. RIPK1 can function as an inhibitor rather than an initiator of RIPK3-dependent necroptosis. *FEBS J* **281**, 4921–4934 (2014).
318. Takemura, R. *et al.* PolyI:C-Induced, TLR3/RIP3-Dependent Necroptosis Backs Up Immune Effector-Mediated Tumor Elimination In Vivo. *Cancer Immunol Res* **3**, 902–914 (2015).

319. Vandenabeele, P., Grootjans, S., Callewaert, N. & Takahashi, N. Necrostatin-1 blocks both RIPK1 and IDO: consequences for the study of cell death in experimental disease models. *Cell Death Differ* **20**, 185–187 (2013).
320. Gardner, C. R. *et al.* From (Tool)Bench to Bedside: The Potential of Necroptosis Inhibitors. *J. Med. Chem.* **66**, 2361–2385 (2023).
321. Wu, Y., Dong, G. & Sheng, C. Targeting necroptosis in anticancer therapy: mechanisms and modulators. *Acta Pharm Sin B* **10**, 1601–1618 (2020).
322. Zhan, C., Huang, M., Yang, X. & Hou, J. MLKL: Functions beyond serving as the Executioner of Necroptosis. *Theranostics* **11**, 4759–4769 (2021).
323. Wan, P., Yan, J. & Liu, Z. Methodological advances in necroptosis research: From challenges to solutions. *Journal of the National Cancer Center* **2**, 291–297 (2022).
324. Smoly, I., Shemesh, N., Ziv-Ukelson, M., Ben-Zvi, A. & Yeger-Lotem, E. An Asymmetrically Balanced Organization of Kinases versus Phosphatases across Eukaryotes Determines Their Distinct Impacts. *PLoS Comput Biol* **13**, e1005221 (2017).
325. Seok, S.-H. Structural Insights into Protein Regulation by Phosphorylation and Substrate Recognition of Protein Kinases/Phosphatases. *Life (Basel)* **11**, 957 (2021).
326. Ardito, F., Giuliani, M., Perrone, D., Troiano, G. & Muzio, L. L. The crucial role of protein phosphorylation in cell signaling and its use as targeted therapy (Review). *Int J Mol Med* **40**, 271–280 (2017).
327. Kamada, R. *et al.* Metal-dependent Ser/Thr protein phosphatase PPM family: Evolution, structures, diseases and inhibitors. *Pharmacology & Therapeutics* **215**, 107622 (2020).
328. Lu, G. & Wang, Y. Functional Diversity of Mammalian Type 2c Protein Phosphatase Isoforms: New Tales from an Old Family. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* **35**, 107–112 (2008).
329. Gao, C., Cao, N. & Wang, Y. Metal dependent protein phosphatase PPM family in cardiac health and diseases. *Cell Signal* **85**, 110061 (2021).
330. Schwarz, S., Hufnagel, B., Dworak, M., Klumpp, S. & Kriegstein, J. Protein phosphatase type 2C α and 2C β are involved in fatty acid-induced apoptosis of neuronal and endothelial cells. *Apoptosis* **11**, 1111–1119 (2006).
331. Klumpp, S., Thissen, M.-C. & Kriegstein, J. Protein phosphatases types 2C α and 2C β in apoptosis. *Biochemical Society Transactions* **34**, 1370–1375 (2006).
332. Ofek, P., Ben-Meir, D., Kariv-Inbal, Z., Oren, M. & Lavi, S. Cell cycle regulation and p53 activation by protein phosphatase 2C α . *J Biol Chem* **278**, 14299–14305 (2003).
333. Lin, X. *et al.* PPM1A Functions as a Smad Phosphatase to Terminate TGF β Signaling. *Cell* **165**, 498 (2016).
334. Strovel, E. T., Wu, D. & Sussman, D. J. Protein phosphatase 2C α dephosphorylates axin and activates LEF-1-dependent transcription. *J Biol Chem* **275**, 2399–2403 (2000).
335. Berton, S. *et al.* A selective PPM1A inhibitor activates autophagy to restrict the survival of Mycobacterium tuberculosis. *Cell Chemical Biology* **29**, 1126-1139.e12 (2022).

336. Cheng, A., Kaldis, P. & Solomon, M. J. Dephosphorylation of Human Cyclin-dependent Kinases by Protein Phosphatase Type 2C α and β 2 Isoforms*. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 34744–34749 (2000).
337. Prajapati, S., Verma, U., Yamamoto, Y., Kwak, Y. T. & Gaynor, R. B. Protein phosphatase 2C β association with the I κ B kinase complex is involved in regulating NF- κ B activity. *J Biol Chem* **279**, 1739–1746 (2004).
338. Demidov, O. N. *et al.* Wip1 phosphatase regulates p53-dependent apoptosis of stem cells and tumorigenesis in the mouse intestine. *Cell Stem Cell* **1**, 180–190 (2007).
339. Goloudina, A. R., Mazur, S. J., Appella, E., Garrido, C. & Demidov, O. N. Wip1 sensitizes p53-negative tumors to apoptosis by regulating the Bax/Bcl-xL ratio. *Cell Cycle* **11**, 1883–1887 (2012).
340. Goloudina, A. R. *et al.* Wip1 promotes RUNX2-dependent apoptosis in p53-negative tumors and protects normal tissues during treatment with anticancer agents. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **109**, E68-75 (2012).
341. Shreeram, S. *et al.* Regulation of ATM/p53-dependent suppression of myc-induced lymphomas by Wip1 phosphatase. *J Exp Med* **203**, 2793–2799 (2006).
342. Douarre, C. *et al.* DNA damage signaling induced by the G-quadruplex ligand 12459 is modulated by PPM1D/WIP1 phosphatase. *Nucleic Acids Res* **41**, 3588–3599 (2013).
343. Fujimoto, H. *et al.* Regulation of the antioncogenic Chk2 kinase by the oncogenic Wip1 phosphatase. *Cell Death Differ* **13**, 1170–1180 (2006).
344. Feng, Y. *et al.* Wip1 regulates SKOV3 cell apoptosis through the p38 MAPK signaling pathway. *Mol Med Rep* **15**, 3651–3657 (2017).
345. Li, B. *et al.* PPM1D Knockdown Suppresses Cell Proliferation, Promotes Cell Apoptosis, and Activates p38 MAPK/p53 Signaling Pathway in Acute Myeloid Leukemia. *Technol Cancer Res Treat* **19**, 1533033820942312 (2020).
346. Park, D. *et al.* Wip1 regulates Smad4 phosphorylation and inhibits TGF- β signaling. *EMBO Rep* **21**, e48693 (2020).
347. Brichkina, A. & Bulavin, D. V. WIP-ing out atherosclerosis with autophagy. *Autophagy* **8**, 1545–1547 (2012).
348. Liu, G. *et al.* Phosphatase Wip1 negatively regulates neutrophil development through p38 MAPK-STAT1. *Blood* **121**, 519–529 (2013).
349. Chen, Y. *et al.* Wip1 inhibits neutrophil extracellular traps to promote abscess formation in mice by directly dephosphorylating Coronin-1a. *Cell Mol Immunol* **20**, 941–954 (2023).
350. Shen, X.-F. *et al.* Wip1 Deficiency Promotes Neutrophil Recruitment to the Infection Site and Improves Sepsis Outcome. *Front Immunol* **8**, 1023 (2017).
351. Uyanik, B., Grigorash, B. B. & Demidov, O. N. The involvement of DNA damage response pathway in nuclear reorganization during netotic initiation. **35**, 240–241 (2019).
352. He, Z.-Y. *et al.* Gamma-H2AX upregulation caused by Wip1 deficiency increases depression-related cellular senescence in hippocampus. *Sci Rep* **6**, 34558 (2016).

353. Sakai, H., Fujigaki, H., Mazur, S. J. & Appella, E. Wild-type p53-induced phosphatase 1 (Wip1) forestalls cellular premature senescence at physiological oxygen levels by regulating DNA damage response signaling during DNA replication. *Cell Cycle* **13**, 1015–1029 (2014).
354. Fontana, M. C. *et al.* Pharmacological Inhibition of WIP1 Sensitizes Acute Myeloid Leukemia Cells to the MDM2 Inhibitor Nutlin-3a. *Biomedicines* **9**, 388 (2021).
355. Ugalde, A. P. *et al.* Aging and chronic DNA damage response activate a regulatory pathway involving miR-29 and p53. *EMBO J* **30**, 2219–2232 (2011).
356. Chen, Z. *et al.* Wip1 deficiency impairs haematopoietic stem cell function via p53 and mTORC1 pathways. *Nat Commun* **6**, 6808 (2015).
357. Bulavin, D. V. *et al.* Inactivation of the Wip1 phosphatase inhibits mammary tumorigenesis through p38 MAPK-mediated activation of the p16(Ink4a)-p19(Arf) pathway. *Nat Genet* **36**, 343–350 (2004).
358. Wong, E. S. M. *et al.* p38MAPK controls expression of multiple cell cycle inhibitors and islet proliferation with advancing age. *Dev Cell* **17**, 142–149 (2009).
359. Yu, E. *et al.* Overexpression of the wip1 gene abrogates the p38 MAPK/p53/Wip1 pathway and silences p16 expression in human breast cancers. *Breast Cancer Res Treat* **101**, 269–278 (2007).
360. Peng, D., Huang, Z., Yang, H., Luo, Y. & Wu, Z. PPM1G regulates hepatic ischemia/reperfusion injury through STING-mediated inflammatory pathways in macrophages. *Immun Inflamm Dis* **12**, e1189 (2024).
361. Suh, E.-J., Kim, Y.-J. & Kim, S. H. Protein phosphatase 2C γ regulates the level of p21^{Cip1}/WAF1 by Akt signaling. *Biochem Biophys Res Commun* **386**, 467–470 (2009).
362. Suh, E.-J., Kim, T.-Y. & Kim, S. H. PP2C γ -mediated S-phase accumulation induced by the proteasome-dependent degradation of p21(WAF1/CIP1). *FEBS Lett* **580**, 6100–6104 (2006).
363. Saito, J. *et al.* Regulation of apoptosis signal-regulating kinase 1 by protein phosphatase 2C ϵ . *Biochem J* **405**, 591–596 (2007).
364. Zhang, L. *et al.* The expression of apoptosis related genes in HK-2 cells overexpressing PPM1K was determined by RNA-seq analysis. *Front Genet* **13**, 1004610 (2022).
365. Liu, X. *et al.* PPM1K Regulates Hematopoiesis and Leukemogenesis through CDC20-Mediated Ubiquitination of MEIS1 and p21. *Cell Reports* **23**, 1461–1475 (2018).
366. Tan, K. M., Chan, S. L., Tan, K. O. & Yu, V. C. The *Caenorhabditis elegans* sex-determining protein FEM-2 and its human homologue, hFEM-2, are Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase phosphatases that promote apoptosis. *J Biol Chem* **276**, 44193–44202 (2001).
367. Gao, T., Furnari, F. & Newton, A. C. PHLPP: A Phosphatase that Directly Dephosphorylates Akt, Promotes Apoptosis, and Suppresses Tumor Growth. *Molecular Cell* **18**, 13–24 (2005).
368. Fiscella, M. *et al.* Wip1, a novel human protein phosphatase that is induced in response to ionizing radiation in a p53-dependent manner. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 6048–6053 (1997).
369. Lu, X. *et al.* The type 2C phosphatase Wip1: An oncogenic regulator of tumor suppressor and DNA damage response pathways. *Cancer Metastasis Rev* **27**, 123–135 (2008).

370. Nahta, R. & Castellino, R. C. Phosphatase magnesium-dependent 1 δ (PPM1D), serine/threonine protein phosphatase and novel pharmacological target in cancer. *Biochemical Pharmacology* **184**, 114362 (2021).
371. Yamaguchi, H. *et al.* Substrate specificity of the human protein phosphatase 2Cdelta, Wip1. *Biochemistry* **44**, 5285–5294 (2005).
372. Gräf, J. F. *et al.* Substrate spectrum of PPM1D in the cellular response to DNA double-strand breaks. *iScience* **25**, 104892 (2022).
373. Chao, C., Saito, S., Anderson, C. W., Appella, E. & Xu, Y. Phosphorylation of murine p53 at ser-18 regulates the p53 responses to DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 11936–11941 (2000).
374. Lu, X. *et al.* The Wip1 Phosphatase acts as a gatekeeper in the p53-Mdm2 autoregulatory loop. *Cancer Cell* **12**, 342–354 (2007).
375. Moon, S.-H., Nguyen, T.-A., Darlington, Y., Lu, X. & Donehower, L. A. Dephosphorylation of γ -H2AX by WIP1: an important homeostatic regulatory event in DNA repair and cell cycle control. *Cell Cycle* **9**, 2092–2096 (2010).
376. Lu, X., Nannenga, B. & Donehower, L. A. PPM1D dephosphorylates Chk1 and p53 and abrogates cell cycle checkpoints. *Genes Dev* **19**, 1162–1174 (2005).
377. Ak, C., Karlitepe, A., Pilevneli, H., Kaygusuz, N. & Eren, M. K. K. 88P PPM1D/WIP1 phosphatase mediates basal and genotoxic stress-induced autophagy via ULK-1 de-phosphorylation. *Annals of Oncology* **34**, S213 (2023).
378. Torii, S. *et al.* Identification of PPM1D as an essential Ulk1 phosphatase for genotoxic stress-induced autophagy. *EMBO Rep* **17**, 1552–1564 (2016).
379. Chew, J. *et al.* WIP1 phosphatase is a negative regulator of NF-kappaB signalling. *Nat Cell Biol* **11**, 659–666 (2009).
380. Salminen, A. & Kaarniranta, K. Control of p53 and NF- κ B signaling by WIP1 and MIF: role in cellular senescence and organismal aging. *Cell Signal* **23**, 747–752 (2011).
381. Miyashita, T. & Reed, J. C. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* **80**, 293–299 (1995).
382. Nakano, K. & Vousden, K. H. PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol Cell* **7**, 683–694 (2001).
383. Oda, E. *et al.* Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science* **288**, 1053–1058 (2000).
384. Song, J.-Y. *et al.* Wip1 suppresses apoptotic cell death through direct dephosphorylation of BAX in response to γ -radiation. *Cell Death Dis* **4**, e744 (2013).
385. Demidov, O. N. *et al.* Role of Gadd45a in Wip1-dependent regulation of intestinal tumorigenesis. *Cell Death Differ* **19**, 1761–1768 (2012).
386. Golotin, V. *et al.* Wild-type p53-induced phosphatase sensitizes acute myeloid leukemia cells to conventional chemotherapy. *Biological Communications* **66**, 268–273 (2021).
387. Kahn, J. D. *et al.* PPM1D-truncating mutations confer resistance to chemotherapy and sensitivity to PPM1D inhibition in hematopoietic cells. *Blood* **132**, 1095–1105 (2018).

388. Miller, P. G. *et al.* PPM1D modulates hematopoietic cell fitness and response to DNA damage and is a therapeutic target in myeloid malignancy. *Blood* **142**, 2079–2091 (2023).
389. Esfandiari, A., Hawthorne, T. A., Nakjang, S. & Lunec, J. Chemical Inhibition of Wild-Type p53-Induced Phosphatase 1 (WIP1/PPM1D) by GSK2830371 Potentiates the Sensitivity to MDM2 Inhibitors in a p53-Dependent Manner. *Mol Cancer Ther* **15**, 379–391 (2016).
390. Zachari, M. & Ganley, I. G. The mammalian ULK1 complex and autophagy initiation. *Essays Biochem* **61**, 585–596 (2017).
391. Jung, C. H., Ro, S.-H., Cao, J., Otto, N. M. & Kim, D.-H. mTOR regulation of autophagy. *FEBS Lett* **584**, 1287–1295 (2010).
392. Beauvarlet, J. *et al.* Modulation of the ATM/autophagy pathway by a G-quadruplex ligand tips the balance between senescence and apoptosis in cancer cells. *Nucleic Acids Res* **47**, 2739–2756 (2019).
393. Wu, D. *et al.* Heterozygous mutation of ataxia-telangiectasia mutated gene aggravates hypercholesterolemia in apoE-deficient mice. *Journal of Lipid Research* **46**, 1380–1387 (2005).
394. Egan, D. F. *et al.* Phosphorylation of ULK1 (hATG1) by AMP-activated protein kinase connects energy sensing to mitophagy. *Science* **331**, 456–461 (2011).
395. Kim, J., Kundu, M., Viollet, B. & Guan, K.-L. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat Cell Biol* **13**, 132–141 (2011).
396. Song, Y. *et al.* Wip1 Aggravates the Cerulein-Induced Cell Autophagy and Inflammatory Injury by Targeting STING/TBK1/IRF3 in Acute Pancreatitis. *Inflammation* **44**, 1175–1183 (2021).
397. Gui, X. *et al.* Autophagy induction via STING trafficking is a primordial function of the cGAS pathway. *Nature* **567**, 262–266 (2019).
398. Brinkmann, V. *et al.* Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* **303**, 1532–1535 (2004).
399. Fuchs, T. A. *et al.* Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol* **176**, 231–241 (2007).
400. Hickson, J. A., Fong, B., Watson, P. H. & Watson, A. J. PP2Cdelta (Ppm1d, WIP1), an endogenous inhibitor of p38 MAPK, is regulated along with Trp53 and Cdkn2a following p38 MAPK inhibition during mouse preimplantation development. *Mol Reprod Dev* **74**, 821–834 (2007).
401. Zhang, Y. *et al.* Premature senescence of highly proliferative endothelial progenitor cells is induced by tumor necrosis factor- α via the p38 mitogen-activated protein kinase pathway. *FASEB J* **23**, 1358–1365 (2009).
402. López-Otín, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M. & Kroemer, G. Hallmarks of aging: An expanding universe. *Cell* **186**, 243–278 (2023).
403. Birch, J. & Gil, J. Senescence and the SASP: many therapeutic avenues. *Genes Dev* **34**, 1565–1576 (2020).
404. Ventura, A. *et al.* Restoration of p53 function leads to tumour regression in vivo. *Nature* **445**, 661–665 (2007).
405. Xue, W. *et al.* Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas. *Nature* **445**, 656–660 (2007).

406. Stokes, K. L. *et al.* Natural killer cells limit the clearance of senescent lung adenocarcinoma cells. *Oncogenesis* **8**, 24 (2019).
407. Pechackova, S. *et al.* Inhibition of WIP1 phosphatase sensitizes breast cancer cells to genotoxic stress and to MDM2 antagonist nutlin-3. *Oncotarget* **7**, 14458–14475 (2016).
408. Sriraman, A. *et al.* Cooperation of Nutlin-3a and a Wip1 inhibitor to induce p53 activity. *Oncotarget* **7**, 31623–31638 (2016).
409. Inoue, Y. *et al.* Clinical Significance of the Wild Type p53-Induced Phosphatase 1 Expression in Invasive Breast Cancer. *Clinical Breast Cancer* **18**, e643–e650 (2018).
410. Belotserkovskaya, E., Golotin, V., Uyanik, B. & Demidov, O. N. Clonal haematopoiesis - a novel entity that modifies pathological processes in elderly. *Cell Death Discov.* **9**, 1–10 (2023).
411. Duy, C. *et al.* Chemotherapy Induces Senescence-Like Resilient Cells Capable of Initiating AML Recurrence. *Cancer Discov* **11**, 1542–1561 (2021).
412. Salazar-Terreros, M. J. & Vernot, J.-P. In Vitro and In Vivo Modeling of Normal and Leukemic Bone Marrow Niches: Cellular Senescence Contribution to Leukemia Induction and Progression. *Int J Mol Sci* **23**, 7350 (2022).
413. Wang, L., Lankhorst, L. & Bernards, R. Exploiting senescence for the treatment of cancer. *Nat Rev Cancer* **22**, 340–355 (2022).
414. Crescenzi, E. *et al.* Down-regulation of wild-type p53-induced phosphatase 1 (Wip1) plays a critical role in regulating several p53-dependent functions in premature senescent tumor cells. *J Biol Chem* **288**, 16212–16224 (2013).
415. Bogdanova, D. A. *et al.* The Differential Effect of Senolytics on SASP Cytokine Secretion and Regulation of EMT by CAFs. *Int J Mol Sci* **25**, 4031 (2024).
416. Özdemir, A., Şimay Demir, Y. D., Yeşilyurt, Z. E. & Ark, M. Senescent cells and SASP in cancer microenvironment: New approaches in cancer therapy. *Adv Protein Chem Struct Biol* **133**, 115–158 (2023).
417. Roberson, R. S., Kussick, S. J., Vallieres, E., Chen, S.-Y. J. & Wu, D. Y. Escape from therapy-induced accelerated cellular senescence in p53-null lung cancer cells and in human lung cancers. *Cancer Res* **65**, 2795–2803 (2005).
418. Coppé, J.-P. *et al.* Senescence-Associated Secretory Phenotypes Reveal Cell-Nonautonomous Functions of Oncogenic RAS and the p53 Tumor Suppressor. *PLOS Biology* **6**, e301 (2008).
419. Zhang, X. *et al.* The HBP1 Transcriptional Repressor Participates in RAS-Induced Premature Senescence. *Mol Cell Biol* **26**, 8252–8266 (2006).
420. Lee, J.-S. *et al.* Senescent growth arrest in mesenchymal stem cells is bypassed by Wip1-mediated downregulation of intrinsic stress signaling pathways. *Stem Cells* **27**, 1963–1975 (2009).
421. Coombs, C. C. *et al.* Therapy-Related Clonal Hematopoiesis in Patients with Non-hematologic Cancers Is Common and Associated with Adverse Clinical Outcomes. *Cell Stem Cell* **21**, 374–382.e4 (2017).
422. Genovese, G. *et al.* Clonal hematopoiesis and blood-cancer risk inferred from blood DNA sequence. *N Engl J Med* **371**, 2477–2487 (2014).

423. Hsu, J. I. *et al.* PPM1D Mutations Drive Clonal Hematopoiesis in Response to Cytotoxic Chemotherapy. *Cell Stem Cell* **23**, 700–713.e6 (2018).
424. Xu, Y. DNA damage: a trigger of innate immunity but a requirement for adaptive immune homeostasis. *Nat Rev Immunol* **6**, 261–270 (2006).
425. Choi, J. *et al.* Mice deficient for the wild-type p53-induced phosphatase gene (Wip1) exhibit defects in reproductive organs, immune function, and cell cycle control. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 1094–1105 (2002).
426. Schito, M. L., Demidov, O. N., Saito, S., Ashwell, J. D. & Appella, E. Wip1 phosphatase-deficient mice exhibit defective T cell maturation due to sustained p53 activation. *J Immunol* **176**, 4818–4825 (2006).
427. Diehl, N. L. *et al.* Activation of the p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway Arrests Cell Cycle Progression and Differentiation of Immature Thymocytes in Vivo. *J Exp Med* **191**, 321–334 (2000).
428. Sun, L. *et al.* Phosphatase Wip1 is essential for the maturation and homeostasis of medullary thymic epithelial cells in mice. *J Immunol* **191**, 3210–3220 (2013).
429. Gellert, M. V(D)J recombination: RAG proteins, repair factors, and regulation. *Annu Rev Biochem* **71**, 101–132 (2002).
430. Yi, W. *et al.* Phosphatase Wip1 controls antigen-independent B-cell development in a p53-dependent manner. *Blood* **126**, 620 (2015).
431. Liu, G. *et al.* Phosphatase Wip1 negatively regulates neutrophil development through p38 MAPK-STAT1. *Blood* **121**, 519–529 (2013).
432. Le Guezennec, X. *et al.* Wip1-dependent regulation of autophagy, obesity, and atherosclerosis. *Cell Metab.* **16**, 68–80 (2012).
433. Uyanik, B. *et al.* Inhibition of the DNA damage response phosphatase PPM1D reprograms neutrophils to enhance anti-tumor immune responses. *Nat Commun* **12**, 3622 (2021).
434. Zhang, Q. *et al.* Wip 1 inhibits intestinal inflammation in inflammatory bowel disease. *Cell Immunol* **310**, 63–70 (2016).
435. Grigorash, B. B., Uyanik, B., Kochetkova, E. Y., Goloudina, A. R. & Demidov, O. N. Wip1 inhibition leads to severe pro-inflammatory phenotype in skin in response to chemical irritation. *J Dermatol Sci* **87**, 85–88 (2017).
436. Li, D. *et al.* WIP1 Phosphatase Plays a Critical Neuroprotective Role in Brain Injury Induced by High-Altitude Hypoxic Inflammation. *Neurosci Bull* **33**, 292–298 (2017).
437. Yan, F. *et al.* Loss of Wip1 aggravates brain injury after ischaemia/reperfusion by overactivating microglia. *Stroke Vasc Neurol* **6**, 344–351 (2021).
438. Zhu, Y.-H. *et al.* Wip1 regulates the generation of new neural cells in the adult olfactory bulb through p53-dependent cell cycle control. *Stem Cells* **27**, 1433–1442 (2009).
439. Zhu, Y. *et al.* Phosphatase WIP1 regulates adult neurogenesis and WNT signaling during aging. *J Clin Invest* **124**, 3263–3273 (2014).
440. Qiu, C.-W. *et al.* Wip1 knockout inhibits neurogenesis by affecting the Wnt/ β -catenin signaling pathway in focal cerebral ischemia in mice. *Exp Neurol* **309**, 44–53 (2018).

441. Pecháčková, S., Burdová, K. & Macurek, L. WIP1 phosphatase as pharmacological target in cancer therapy. *J Mol Med (Berl)* **95**, 589–599 (2017).
442. Deng, W. *et al.* The Role of PPM1D in Cancer and Advances in Studies of Its Inhibitors. *Biomed Pharmacother* **125**, 109956 (2020).
443. Li, J. *et al.* Oncogenic properties of PPM1D located within a breast cancer amplification epicenter at 17q23. *Nat Genet* **31**, 133–134 (2002).
444. Emelyanov, A. & Bulavin, D. V. Wip1 phosphatase in breast cancer. *Oncogene* **34**, 4429–4438 (2015).
445. Lambros, M. B. *et al.* PPM1D gene amplification and overexpression in breast cancer: a qRT-PCR and chromogenic in situ hybridization study. *Mod Pathol* **23**, 1334–1345 (2010).
446. Li, K., Liu, Y., Xu, S. & Wang, J. PPM1D Functions as Oncogene and is Associated with Poor Prognosis in Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Pathol Oncol Res* **26**, 387–395 (2020).
447. Li, Z.-T., Zhang, L., Gao, X.-Z., Jiang, X.-H. & Sun, L.-Q. Expression and significance of the Wip1 proto-oncogene in colorectal cancer. *Asian Pac J Cancer Prev* **14**, 1975–1979 (2013).
448. Kleiblova, P. *et al.* Gain-of-function mutations of PPM1D/Wip1 impair the p53-dependent G1 checkpoint. *Journal of Cell Biology* **201**, 511–521 (2013).
449. Alzahrani, A. S. *et al.* Absence of EIF1AX, PPM1D, and CHEK2 mutations reported in Thyroid Cancer Genome Atlas (TCGA) in a large series of thyroid cancer. *Endocrine* **63**, 94–100 (2019).
450. Yang, H., Gao, X.-Y., Li, P. & Jiang, T.-S. PPM1D overexpression predicts poor prognosis in non-small cell lung cancer. *Tumour Biol* **36**, 2179–2184 (2015).
451. Zhao, M. *et al.* Association between overexpression of Wip1 and prognosis of patients with non-small cell lung cancer. *Oncol Lett* **11**, 2365–2370 (2016).
452. Pharoah, P. D. P. *et al.* PPM1D Mosaic Truncating Variants in Ovarian Cancer Cases May Be Treatment-Related Somatic Mutations. *J Natl Cancer Inst* **108**, (2016).
453. Richter, M. *et al.* WIP1 Phosphatase as a Potential Therapeutic Target in Neuroblastoma. *PLoS One* **10**, e0115635 (2015).
454. Milosevic, J. *et al.* PPM1D Is a Therapeutic Target in Childhood Neural Tumors. *Cancers* **13**, 6042 (2021).
455. Ruark, E. *et al.* Mosaic PPM1D mutations are associated with predisposition to breast and ovarian cancer. *Nature* **493**, 406–410 (2013).
456. Zajkovicz, A. *et al.* Truncating mutations of PPM1D are found in blood DNA samples of lung cancer patients. *Br. J. Cancer* **112**, 1114–1120 (2015).
457. Choi, J., Appella, E. & Donehower, L. A. The structure and expression of the murine wildtype p53-induced phosphatase 1 (Wip1) gene. *Genomics* **64**, 298–306 (2000).
458. Zhang, L., Hsu, J. I. & Goodell, M. A. PPM1D in Solid and Hematologic Malignancies: Friend and Foe? *Molecular Cancer Research* **20**, 1365–1378 (2022).
459. AACR Project GENIE: Powering Precision Medicine through an International Consortium. *Cancer Discov* **7**, 818–831 (2017).

460. Bulavin, D. V. *et al.* Amplification of PPM1D in human tumors abrogates p53 tumor-suppressor activity. *Nature Genetics* **31**, 210–215 (2002).
461. Tan, D. S. P. *et al.* PPM1D is a potential therapeutic target in ovarian clear cell carcinomas. *Clin Cancer Res* **15**, 2269–2280 (2009).
462. Tokheim, C. *et al.* Systematic characterization of mutations altering protein degradation in human cancers. *Mol Cell* **81**, 1292-1308.e11 (2021).
463. Belova, G. I., Demidov, O., Fornace, A. J. & Bulavin, D. V. Chemical inhibition of Wip1 phosphatase contributes to suppression of tumorigenesis. *Cancer Biology & Therapy* **4**, 1154–1158 (2005).
464. Rayter, S. *et al.* A chemical inhibitor of PPM1D that selectively kills cells overexpressing PPM1D. *Oncogene* **27**, 1036–1044 (2008).
465. Ogasawara, S. *et al.* Novel inhibitors targeting PPM1D phosphatase potently suppress cancer cell proliferation. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **23**, 6246–6249 (2015).
466. Gilmartin, A. G. *et al.* Allosteric Wip1 phosphatase inhibition through flap-subdomain interaction. *Nat Chem Biol* **10**, 181–187 (2014).
467. Miller, P. G. *et al.* Allosteric inhibition of PPM1D serine/threonine phosphatase via an altered conformational state. *Nat Commun* **13**, 3778 (2022).
468. Oliva-Trastoy, M. *et al.* The Wip1 phosphatase (PPM1D) antagonizes activation of the Chk2 tumour suppressor kinase. *Oncogene* **26**, 1449–1458 (2007).
469. Chen, Z. *et al.* Wip1 inhibitor GSK2830371 inhibits neuroblastoma growth by inducing Chk2/p53-mediated apoptosis. *Sci Rep* **6**, 38011 (2016).
470. Kojima, K., Maeda, A., Yoshimura, M., Nishida, Y. & Kimura, S. The pathophysiological significance of PPM1D and therapeutic targeting of PPM1D-mediated signaling by GSK2830371 in mantle cell lymphoma. *Oncotarget* **7**, 69625–69637 (2016).
471. Wu, C.-E. *et al.* In vitro and in vivo study of GSK2830371 and RG7388 combination in liver adenocarcinoma. *Am J Cancer Res* **12**, 4399–4410 (2022).
472. Radoua, A. *et al.* ptARgenOM-A Flexible Vector For CRISPR/CAS9 Nonviral Delivery. *Small Methods* **7**, e2300069 (2023).
473. Li, D. *et al.* A cytosolic heat shock protein 90 and cochaperone CDC37 complex is required for RIP3 activation during necroptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**, 5017–5022 (2015).
474. Akara-amornthum, P., Lomphithak, T., Choksi, S., Tohtong, R. & Jitkaew, S. Key necroptotic proteins are required for Smac mimetic-mediated sensitization of cholangiocarcinoma cells to TNF- α and chemotherapeutic gemcitabine-induced necroptosis. *PLoS One* **15**, e0227454 (2020).
475. Karlitepe, A., Altın, E. D., Ak, C., Bilmen, S. & Eren, M. K. Wip1 phosphatase inhibition enhances etoposide mediated apoptosis by increasing p53 phosphorylation in Rhabdoid tumor cells. *Gene Reports* **31**, 101784 (2023).
476. Rodríguez-Enfedaque, A. *et al.* zVAD-fmk upregulates caspase-9 cleavage and activity in etoposide-induced cell death of mouse embryonic fibroblasts. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **1823**, 1343–1352 (2012).

477. Chen, W. *et al.* Ppm1b negatively regulates necroptosis through dephosphorylating Rip3. *Nat Cell Biol* **17**, 434–444 (2015).
478. Gao, X. *et al.* MicroRNA-16 sensitizes drug-resistant breast cancer cells to Adriamycin by targeting Wip1 and Bcl-2. *Oncol Lett* **18**, 2897–2906 (2019).
479. Apaydin, T. *et al.* WIP1 is a novel specific target for growth hormone action. *iScience* **26**, 108117 (2023).
480. Yoda, A. *et al.* Intrinsic Kinase Activity and SQ/TQ Domain of Chk2 Kinase as Well as N-terminal Domain of Wip1 Phosphatase Are Required for Regulation of Chk2 by Wip1*. *Journal of Biological Chemistry* **281**, 24847–24862 (2006).
481. Chuman, Y. *et al.* PPM1D430, a novel alternative splicing variant of the human PPM1D, can dephosphorylate p53 and exhibits specific tissue expression. *J Biochem* **145**, 1–12 (2009).
482. Yang, Y., Ma, J., Chen, Y. & Wu, M. Nucleocytoplasmic Shuttling of Receptor-interacting Protein 3 (RIP3): IDENTIFICATION OF NOVEL NUCLEAR EXPORT AND IMPORT SIGNALS IN RIP3 *. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 38820–38829 (2004).
483. Lu, J. *et al.* Types of nuclear localization signals and mechanisms of protein import into the nucleus. *Cell Communication and Signaling* **19**, 60 (2021).
484. Xu, D., Farmer, A., Collett, G., Grishin, N. V. & Chook, Y. M. Sequence and structural analyses of nuclear export signals in the NESdb database. *Mol Biol Cell* **23**, 3677–3693 (2012).
485. Yoon, S., Bogdanov, K., Kovalenko, A. & Wallach, D. Necroptosis is preceded by nuclear translocation of the signaling proteins that induce it. *Cell Death Differ* **23**, 253–260 (2016).
486. Weber, K., Roelandt, R., Bruggeman, I., Estornes, Y. & Vandenabeele, P. Nuclear RIPK3 and MLKL contribute to cytosolic necrosome formation and necroptosis. *Commun Biol* **1**, 1–13 (2018).
487. Yang, Y. *et al.* Defective prelamin A processing promotes unconventional necroptosis driven by nuclear RIPK1. *Nat Cell Biol* **26**, 567–580 (2024).
488. Kudo, N. *et al.* Leptomycin B inactivates CRM1/exportin 1 by covalent modification at a cysteine residue in the central conserved region. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 9112–9117 (1999).
489. Galinski, B. *et al.* XPO1 inhibition with selinexor synergizes with proteasome inhibition in neuroblastoma by targeting nuclear export of I κ B. *Translational Oncology* **14**, 101114 (2021).
490. Turner, J. G. *et al.* XPO1 inhibitor combination therapy with bortezomib or carfilzomib induces nuclear localization of I κ B α and overcomes acquired proteasome inhibitor resistance in human multiple myeloma. *Oncotarget* **7**, 78896–78909 (2016).
491. Subhash, V. V. *et al.* Anti-tumor efficacy of Selinexor (KPT-330) in gastric cancer is dependent on nuclear accumulation of p53 tumor suppressor. *Sci Rep* **8**, 12248 (2018).
492. Wang, L., Chang, X., Feng, J., Yu, J. & Chen, G. TRADD Mediates RIPK1-Independent Necroptosis Induced by Tumor Necrosis Factor. *Front. Cell Dev. Biol.* **7**, (2020).
493. Hu, S., Chang, X., Zhu, H., Wang, D. & Chen, G. PI3K mediates tumor necrosis factor induced-necroptosis through initiating RIP1-RIP3-MLKL signaling pathway activation. *Cytokine* **129**, 155046 (2020).

494. Abraham, S. *et al.* The Groucho-associated phosphatase PPM1B displaces Pax transactivation domain interacting protein (PTIP) to switch the transcription factor Pax2 from a transcriptional activator to a repressor. *J Biol Chem* **290**, 7185–7194 (2015).

495. Pereira, J. M. *et al.* Infection Reveals a Modification of SIRT2 Critical for Chromatin Association. *Cell Rep* **23**, 1124–1137 (2018).

Liste des publications et présentations

Publications :

- ❖ Premier auteur : PP2C Phosphatases – Terminators of Suicidal Thoughts (Annexe 1)
- ❖ Inhibition of the DNA damage response phosphatase PPM1D reprograms neutrophils to enhance anti-tumor immune responses (Annexe 2)

Communications affichées :

- ❖ Forum des jeunes chercheurs, Juin 2022, Dijon – Poster (Annexe 3)
- ❖ Swiss Apoptosis & Autophagy Meeting (SA2M 2023), 7-8th of September 2023, Wip1 involvement in necroptosis signaling pathway – Poster (Annexe 4)
- ❖ Journée de l'INSERM U1231/US58, Edition 2024, Wip1 involvement in necroptosis signaling pathway – Poster et Lauréat du meilleur poster

Annexe 1 – Revue 1^{er} auteur

Premier auteur : PP2C Phosphatases – Terminators of Suicidal Thoughts – EN REVISION

1 PP2C Phosphatases - Terminators of Suicidal Thoughts

2 Lisa Lagorgette^{1,2}, Daria A. Bogdanova^{3,4}, Ekaterina V. Belotserkovskaya^{3,4}, Carmen
3 Garrido^{1,2,5} and Oleg N. Demidov^{1,2,3,4}

4 ¹INSERM, UMR 1231, Laboratoire d'Excellence LipSTIC and « Equipe labellisée par la Ligue
5 Nationale contre le Cancer », Dijon, France.

6 ²University of Burgundy, Faculty of Medicine and Pharmacy, 21078 Dijon, France.

7 ³Division of Immunobiology and Biomedicine, Sirius University of Science and Technology, Sirius,
8 Krasnodarsky Krai, 354340 Sochi, Russia

9 ⁴Institute of Cytology RAS, 194064 St. Petersburg, Russia

10 ⁵Center for Cancer Georges-François Leclerc, Dijon, France

11

12 * Correspondence: oleg.demidov@u-bourgogne.fr (O.N.D.)

13 Abstract:

14 Cell death and related pathways are essential during development and in various physiological and
15 pathological conditions. Post-translational modifications such as ubiquitination and
16 phosphorylation play an important role in these signaling pathways. The involvement of kinases -
17 enzymes that catalyze protein phosphorylation - in cell death signaling has been extensively
18 studied. On the other hand, not many studies have been devoted to analyzing the role in cell death
19 of phosphatases, enzymes involved in the removal of phosphorylated residues added to proteins
20 by kinases. Obviously, the two opposite reactions, phosphorylation and dephosphorylation, are
21 equally important in the regulation of protein functions and subsequently in the execution of the
22 cell death program. Here, we have summarized recent work on the involvement of serine-threonine
23 PP2C phosphatases in cell death pathways, senescence, and autophagy, focusing in particular on
24 the most studied phosphatase PP2C delta (PPM1D) as an example of the regulatory role of PP2Cs
25 in cell death. The review should help to draw attention to the importance of phosphatases of the
26 PP2C family in cell death checkpoints and to discover new targets for drug development.

27 **Keywords:** PP2C, cell death, senescence, Wip1, PPM1D, apoptosis, autophagy, NETosis

28 1. Introduction into PP2C phosphatases family

29 The superfamily of metal-dependent protein phosphatases (PPM) includes proteins
30 dephosphorylating serine and threonine residues, which at its turn includes a family of the 2C type
31 protein phosphatases (PP2C)¹. According to different studies, the PP2C members are encoded by
32 16 -18 genes and represented by 20 – 22 isoforms¹⁻³(Figure 1).The protein structure of all PP2C
33 is characterized by a catalytic domain bearing certain homology, which is located most of the time
34 in the N-terminus or the middle of the protein and can be activated by Mn²⁺ and/or Mg²⁺ or
35 lipids⁴. The C-terminus is responsible for the location and substrate specificity⁵. In contrast to
36 PP2A phosphatases PP2Cs do not require targeting or regulatory subunits, and these enzymes

37 functions as monomers¹. It is worth noting that different PP2C members can bind to the same
38 substrates, demonstrating overlapping of substrate specificity and functions (e.g. p53 binds to
39 PPM1A, PPM1B or PPM1D; ULK1 to PPM1B or PPM1D). Although protein phosphatases of the
40 2C type are involved in many signaling cascades, the key functions of these proteins are to control
41 stress-induced responses⁶ and cell cycle (growth/death)¹. PP2Cs may be considered as inhibitors
42 of stress-induced response⁶. Being cell growth regulators, PP2Cs may act as tumor suppressors
43 (PP2CA, PP2CB, ILKAP, PHLPP)¹ or function as activators of oncogenesis (PPM1D)⁷.

44 Intensive study of the PP2C family has been performed in the early 2000s years, when it
45 was elucidated that these enzymes were involved in the control of apoptosis via diverse signaling
46 pathways, such as p53 (PPM1A, PPM1D^{8,9}), TGF β (PPM1A, PPM1D^{10,11}), NF- κ B (PPM1B,
47 PPM1D^{12,13}), Bcl-xL (PPM1A, PPM1B¹⁴), Akt (PHLPP¹⁵) (table 1). More recently, it has been
48 revealed that PP2Cs also participate in other types of programmed cell death, namely autophagy
49 (PPM1A, PPM1B, PPM1D¹⁶⁻¹⁸); NETosis (PPM1D^{19,20}) and ferroptosis (PPM1K²¹) (Figure 2 and
50 Table 1).

51 As we can see from Figure 2, the protein phosphatase PP2C delta (PPM1D) is the most extensively
52 studied in relation to cell death. Using PPM1D as an example of a classical member of PP2C, we
53 will describe how phosphatases of this family regulate different forms of cell death and why they
54 have become a promising target in the treatment of various diseases, including cancer therapy. The
55 PPM1D gene encodes the wild-type p53-induced phosphatase, Wip1, was discovered as a p53
56 target during the era of intensive studies of p53 translational modifications⁵⁰. It soon became clear
57 that phosphorylation positively regulates p53⁵¹. In contrast, Wip1 upregulation during DNA
58 damage forms a negative feedback loop by dephosphorylating p53 and allowing the ubiquitin
59 ligase MDM2 to target p53 for degradation⁵². PPM1D can not only dephosphorylate p53 directly
60 but also targets and desactivate many upstream DNA damage response kinases: ATM²⁶, Chk1⁵³,
61 Chk2²⁸. Later PPM1D was reported as phosphatase targeting other important for cell survival
62 signaling pathways such as mTOR³⁹, p38 MAPK^{34,40}, ULK1^{31,32}, NF- κ B (RelA)^{54,55}, and Coronin-
63 1a¹⁹. Due to interaction with these targets, Wip1 is involved in such cellular processes as DNA
64 damage response (DDR), cell proliferation, apoptosis, autophagy, NETosis and senescence.

65 2.1 Apoptosis

66 Considering the importance of the p53-dependent DNA damage response in the initiation of
67 apoptosis and senescence, Wip1 emerged as a negative regulator of these two cellular processes⁵⁶.
68 The human Wip1 coding gene *PPM1D* is located on chromosome 17q23⁵⁷. This genomic locus is
69 frequently amplified in many human cancers^{58,59}. Alternatively, Wip1 can be stabilized in tumor

70 cells by mutations in the regulatory domain, which, similar to amplification of the gene, affects
71 tumorigenesis⁶⁰ and resistance to anticancer therapy⁶¹.

72 P53 is a transcriptional regulator of several pro-apoptotic genes such as Bax⁶², Puma⁶³ or
73 Noxa⁶⁴. By negatively regulating p53 and its upstream regulators, ATM, Chk2 and others^{28,65,66},
74 Wip1 overexpression protects cells from executing the apoptotic program⁶⁷. On the contrary, Wip1
75 deletion significantly shifts p53 activity threshold towards apoptosis (Figure 2). Increased p53-
76 dependent apoptosis in Wip1-deficient intestinal tumor-initiating stem cells upon DNA damage or
77 oncogenic stress reduced the number of intestinal polyps and prolonged the life of mice with an
78 oncogenic multiple intestinal neoplasia (Min) mutation in the tumor suppressor APC⁸. The
79 phenotype was reversed by deletion of p53 in the tissues of APC (Min) / Wip1^{-/-} mice to almost
80 the wild type tumor number. A similar phenotype was observed in APC (Min) / Wip1^{-/-} mice when
81 *Cdkn2a*, *Chk2* and *Gadd45a* genes were deleted⁶⁸.

82 Interestingly, when the major target of Wip1 (i.e., p53) is absent in cells, Wip1 deletion does
83 not potentiate programmed cell death^{12,25}. Rather, Wip1 overexpression activates Bax expression
84 and apoptosis in p53-null osteosarcoma cells SAOS2 by removing inhibitory phosphorylation of
85 the Bax-regulating transcription factor Runx2 and by reducing anti-apoptotic Bcl-XL levels
86 through suppression of the NFkB pathway²⁵.

87 Recently, numerous papers have been published describing Wip1 inhibition as a strategy to
88 potentiate chemotherapy- or targeted therapy-induced apoptosis for both solid^{8,26} and hematologic
89 malignancies^{61,69,70}. It should be stressed, that inhibition of PPM1D alone doesn't influence to
90 growth of cancer cells, whereas a combination with chemotherapeutic drugs or radiation
91 significantly enhances of cytostatic effect of the DNA damage agents⁶⁹⁻⁷¹.

92 2.2 Autophagy

93 Autophagic cell death or autophagy is defined by the NCCD (Nomenclature Committee on
94 Cell Death) as a type of cell death dependent on the autophagy machinery and can be prevented
95 only by blocking autophagy⁷². Autophagy is considered an intracellular process aimed to degrade
96 dysfunctional cytoplasmic components thereby recycling nutrients and keeping the cell
97 homeostasis⁷³. This type of cell death starts with sequestration of detrimental organelles and
98 macromolecules and formation of double-membrane autophagosome. It is orchestrated by
99 autophagy-related proteins mainly the unc-51-like kinase 1 (ULK1) complex, consisting of ULK1,
100 ATG13, FIP200/RB1CC1, and ATG1016⁷⁴. In turn, this protein complex is controlled by some
101 molecular factors, that converge on the mTOR signaling pathway⁷⁵. After the phagophore is

102 formed, it is transported to lysosomes to produce autolysosomes, where the sequestered contents
103 are degraded by lysosomal enzymes⁷⁶.

104 Besides digestion of organelles and proteins, a number of autophagy-mediated processes
105 include oxidative stress, response to cytotoxic agents, cell survival, resistance to infection by
106 pathogens⁷⁷.

107 Wip1-dependent control of autophagy involves the ATM-mTOR signaling pathway^{33,78}. This
108 was demonstrated in studies aiming to study the role of Wip1 in fat metabolism, cholesterol efflux
109 from macrophages and atherosclerosis^{58,59}. These processes are controlled by the ATM-mTOR
110 cascade⁷⁹, which can be modulated by Wip1 phosphatase through ATM dephosphorylation⁶⁶.
111 Accordingly, *in vivo* studies demonstrated that Wip1 deletion reduced mTOR activation resulting
112 in decreased accumulation of lipid droplets into macrophages. In turn it prevented formation of
113 foam cells and ultimately atherosclerotic plaques³³.

114 In addition to ATM kinase regulation, Wip1 phosphatase is reported to be involved in basal
115 and genotoxic stress-induced autophagy via ULK-1 dephosphorylation^{31,32}. As mentioned before,
116 the ULK1 protein complex plays a central role in autophagy induction, mainly under amino acid
117 starvation. In the presence of amino acids, the ULK1 complex is phosphorylated and inactivated
118 by mTORC1 and AMP-activated protein kinase at different serine/threonine residues⁸⁰⁻⁸². Upon
119 amino acid deprivation, ULK1 is dephosphorylated, resulting in activation of the ULK1 kinase
120 and thus autophagy induction⁷⁴. According to two studies^{31,32} Wip1 phosphatase is responsible for
121 dephosphorylation of ULK1 at Ser637 and induction of basal and genotoxic stress-induced
122 autophagy. Using embryonic fibroblasts and primary thymocytes, Torii and coauthors reported that
123 ip1-mediated Ulk1 dephosphorylation was accompanied by Ulk1 puncta formation³². In contrast
124 to Torii's study, Ak's group explored the MCF7 cell line, demonstrating Wip1 overexpression.
125 They showed that oncogenic Wip1 promoted Ulk1-dephosphorylation at Ser637 leading to
126 accumulation of LC3-II, degradation of p62, and formation of LC3II puncta³¹.

127 Besides ATM-mTOR modulation, Wip1 is involved in regulation of another autophagic
128 molecular mechanism through the STING signaling pathway¹⁷. Previously it was reported that
129 STING was responsible for autophagy⁸³ and at the same time the STING /TBK1/IRF3 cascade
130 was associated with acute pancreatitis development⁸⁴. In this study, knock-down of wip1 in AR42J
131 cells significantly decreased STING-TBK1 signaling, autophagy and acute pancreatitis severity¹⁷.
132 These data indicate that Wip1 may be involved in autophagy and pancreatitis pathogenesis through
133 the STING-TBK1 signaling pathway.

134 In sum, WIP1 can modulate “self-eating” acting as positive or negative regulator of
135 autophagy depending on the circumstances (Figure 2).

136 2.3 NETosis

137 Neutrophil extracellular traps (NETs) are known as structures consisting of DNA, histones,
138 proteins from granules and cytoplasm⁸⁵. Importantly, the main function of NETs are elimination
139 of pathogens and NET formation are considered as a specific cell death type, characteristic of
140 activated neutrophils - NETosis⁸⁶.

141 Previously, it was reported that WIP1 was involved in development and maturation of
142 neutrophils as a negative regulator via p38 MAPK and STAT1 signaling pathways³⁴. This study
143 also demonstrated that Wip1 participated in the antibacterial defense, migration of neutrophils and
144 inflammatory processes³⁴. In line with these findings, the negative effect of Wip1 on neutrophil
145 migration and antimicrobial defense were confirmed in Wip1-KO mice under sepsis conditions²⁹.
146 Hereafter, WIP1 was revealed to be involved in nuclear reorganization during NETosis²⁰. Most
147 intriguingly, a recent study found that WIP1 could inhibit NET formation during infection though
148 the calcium pathway¹⁹. Investigating the mechanism of Wip1 negative effect it was revealed the
149 Coronin-1a was a substrate of Wip1 for direct dephosphorylation. Upregulation of phosphorylated
150 Coronin-1a in neutrophils in which Wip1 was deleted promoted phospholipase C activation and
151 the calcium signaling pathway¹⁹. Taken together, Wip1 is a negative regulator of NETosis and can
152 be considered as potential target for antibacterial therapy.

153 2.4 Ferroptosis

154 Although the role of WIP1 in ferroptosis has not yet been studied, Wip1 participation in an
155 iron-dependent form of cell death can be hypothesized based on the involvement of Wip1 targets
156 such as p53⁸⁷ and ATM⁸⁸.

157 2.5. Senescence

158 Wip1 is interesting in the senescence process because it is an inhibitor of key proteins
159 involved in the DNA damage response (DDR). Among these proteins, the p53-p21 axis plays a
160 specific role in the induction of the senescent phenotype⁸⁹ and, as shown in several articles, the
161 state of senescence can also be mediated by the p38-p16 axis^{40,42,90-92}. Senescence is characterized
162 by permanent cell cycle arrest caused by increased expression of inhibitors of the cyclin-dependent
163 kinase proteins p16 and p21⁹³. At the same time, cells remain metabolically active and secrete a
164 wide range of pro-inflammatory cytokines and chemokines, termed the senescence-associated
165 secretory phenotype (SASP)⁹³. SASP exerts multiple negative effects on both oncogenesis and

166 normal aging⁹⁴. The removal of the negative effects of senescent cells is a field of intensive
167 research⁹⁵. Wip1 may be expected to be an important target and regulator of these processes.

168 2.5.1. P53-p21 axis

169 One of the most significant contributions to this field was the work focused on WIP1-KO
170 mouse embryonic fibroblasts (MEFs)³⁶. Wip1-deficient MEFs were shown to undergo premature
171 senescence at physiological O₂ concentrations³⁶. The onset of senescence was dependent on the
172 functional activation of p53. Interestingly, Wip1-deficient MEFs demonstrated increased levels of
173 H2AX phosphorylation without increased levels of reactive oxygen species (ROS) or DNA base
174 damage, which were present in wild-type MEFs. These data demonstrate that Wip1 prevents the
175 induction of cellular senescence at physiological oxygen levels by attenuating DDR signaling in
176 response to endogenous double-strand breaks (DSBs) that occur during DNA replication³⁶. This
177 hypothesis has latter on been confirmed in other cell types. For example, Wip1 deficiency leads to
178 upregulation of γ -H2AX and cellular senescence in the hippocampus³⁵. Another article highlights
179 that the cellular stress response to elevated ROS during long-term monolayer culture of
180 chondrocytes is enhanced by decreased Wip1 expression, and it may trigger the onset of cellular
181 senescence⁹⁶.

182 The absence of Wip1 leads to increased DDR signaling activity as a result of endogenous
183 DSBs detected during S phase. Interestingly, in several human tumor cell lines, Wip1 protein levels
184 progressively increased from G1 to G2 phases and then decreased during mitosis, revealing the
185 importance of Wip1 in regulating the nature of the cellular response to DDR⁹⁷. Similar data have
186 been obtained in a mouse model of progeria. In *Zmpste24*-deficient mice, a Hutchinson-Gilford
187 model of progeria syndrome, increased miR-29 expression was found both in progeroid *Zmpste24*
188 *-/-* mice and during normal aging of wild-type mice³⁸. The authors concluded that this
189 transcriptional activation of miR-29 is triggered in response to DNA damage and occurs in a p53-
190 dependent manner. Ugalde et al. also showed that miR-29 suppresses the *Ppm1d*, that in turn
191 increases p53 activity³⁸.

192 The state of cellular senescence plays an important role in tumor control and is often
193 mediated by the p53-p21 axis. Therefore, most studies focus on the role of these proteins,
194 overlooking Wip1, which is the major inhibitor of p53. Wip1 inhibitors have been proposed as
195 therapeutic approaches for some cancers⁹⁸. The use of Wip1 inhibitors results in the restoration of
196 p53 activity. However, recovery of p53 does not always induce apoptosis, for instance in soft tissue
197 sarcomas and hepatocellular carcinoma, the initiation of the p53 cascade induces senescence
198 followed by immune-mediated tumor elimination^{99,100}. Similarly, in a model of lung

199 adenocarcinoma, p53 restoration initiates a senescence response followed by immune-mediated
200 clearance, but only in advanced tumor lesions¹⁰¹. Further, pharmacological inhibition of Wip1
201 increases p21 protein levels, one of the major markers of senescence^{37,102,103}. Perhaps the combined
202 use of Wip1 inhibitors and senolytics, which selectively eliminate senescent cells, may be an
203 effective strategy for different tumor types⁹⁵. Investigating Wip1 inhibitors in the context of tumor
204 cell senescence may open up new treatment options for patients, and such strategies may have
205 fewer side effects. This may be of particular interest in the context of oncohematologic diseases,
206 where Wip1 may be overexpressed after selection for clonal hematopoiesis¹⁰⁴. Despite recent
207 advances in the treatment of oncohematologic diseases in the elderly, the median survival rate
208 remains low and the risk of tumor relapse remains high¹⁰⁵. It is increasingly thought that sensitised
209 cancer cells are the cause of these relapse statistics, which persist in bone marrow niches and can
210 re-enter the cell cycle afterwards due to a large number of accumulated mutations and genome
211 instability^{70,106,107}. This re-entry into the cell cycle, following the acquisition of a senescent
212 phenotype, which should be an irreversible state of cell cycle arrest, is a characteristic feature of
213 tumor cells of various origins^{108,109}. It has been demonstrated that this process may be regulated
214 by Wip1¹¹⁰. Wip1 expression is reduced during the acquisition of the senescent phenotype. This
215 reduction is necessary for the establishment of a permanent cell cycle arrest. Conversely, the
216 reintroduction of Wip1 expression results in the resumption of the cell cycle¹¹⁰. The
217 aforementioned findings were obtained in a model of Therapy-Induced Senescence (TIS), which
218 is particularly characteristic of tumor cells. TIS is a phenomenon that occurs during cancer
219 treatment, through the use of radiotherapy, immunotherapy, and chemotherapy¹⁰⁹. A reduction in
220 Wip1 expression and an increase in p53 activity have been demonstrated to be essential for the
221 induction of TIS in human cancer cells by chemotherapeutic drugs¹¹⁰.

222 One of the adverse consequences of the accumulation of senescent cells within a tumor is
223 the secretion of SASP factors^{111,112}. Roberson et al. observed that prematurely senescent cells,
224 which overexpress Wip1, develop amplified SASP¹⁰⁸. The data indicate that p53 is a significant
225 regulator of SASP, with cells lacking p53 secreting higher levels of several SASP components¹¹³.
226 Previously, Leonardi's laboratory also suggested that, consistent with the ability of Wip1 to inhibit
227 some important functions of p53, forced expression of Wip1 led to increased expression of a subset
228 of cytokines and chemokines in prematurely senescent cells, but the exact role of Wip1 and the
229 mechanisms of this modulation require further study¹¹⁰. These data are supported by an earlier
230 review, which illustrated that Wip1 activity decreased with age, likely due to a decline in p53
231 function. This increases the activity of the p38MAPK and NF- κ B pathways, leading to premature

232 cellular senescence and chronic inflammation in some tissues⁵⁵. However, the relationship between
233 Wip1 and SASP has not been directly investigated.

234 2.5.2. P38-p16 axis

235 A number of studies have shown that inhibition of p38 activity under various stress
236 conditions prevents senescence or growth arrest by blocking p16 expression^{40,42,90-92}.

237 One of the earliest publications in 2004 elucidated that Ppm1d-deficient MEFs were resistant
238 to transformation in the presence of different pairs of complementary oncogenes, including ras,
239 myc, E1A and Erbb2. Bulavin et al concluded that inactivation or depletion of Wip1 phosphatase
240 and subsequent activation of p38 MAPK suppressed tumorigenesis by modulating the Cdkn2a
241 (p16) tumor suppressor locus⁴⁰.

242 The same results have also been obtained using human cancer cell lines. In human breast
243 cancer tissues, Wip1 expression levels were shown to be inversely correlated with p38 activity and
244 low p16 levels⁴². It has also been found in breast cancer cell lines that reduced expression of Wip1
245 increases p38 MAPK activity and increases HBP1 protein levels, thereby inducing senescence.
246 These data confirm the role of Wip1 in regulating p38 MAPK signaling in senescence and
247 subsequent tumor suppression. However, this study was focused on HBP1, not p16, in p38 MAPK-
248 induced premature senescence. The authors proposed that HBP1 did not regulate replicative
249 senescence as has been shown in human fibroblasts¹¹⁴. Another investigation clarified that
250 introducing Wip1 into normal human mesenchymal stem cells bypasses senescence and extends
251 the lifespan of the cells¹¹⁵. The bypassing of such growth arrest and replicative senescence may be
252 due to Wip1-induced reduction of p16 expression, as introduction of Wip1 into MSCs
253 (Mesenchymal Stem Cells) significantly reduced p38 activation and p16 expression that occur in
254 senescent MSCs. It was demonstrated that p21Cip1, one of the downstream effectors of the p53
255 senescence pathway, was not induced in senescent MSCs, implying that senescence is mediated
256 by the p38-p16 axis.

257 The use of mouse models altered for p38 α and/or Wip1 has yielded new insights into the
258 mechanisms of p16-dependent regulation of cell proliferation with age⁴¹. It has been shown that
259 during the aging process, a reduction in Wip1 protein levels leads to an increase in p38MAPK
260 activation. Pancreatic β -cells have been demonstrated to suppress Cdkn2a transcription through
261 the action of BMI1, which is present in the *Cdkn2a* locus. However, in senescent cells, p38 signals
262 MK2/MK3 kinases to phosphorylate BMI1, which in turn activates p16 and p19 transcription⁴¹.
263 The expression of cell cycle inhibitors results in a reduction in the proliferation and regeneration
264 of certain self-renewing cell types. Additionally, it has been reported in mouse models that young

265 (4-5 months old) *Ppm1d*-deficient mice and old (22-24 months old) wild-type mice exhibited a
266 considerable elevation in p38MAPK-dependent signaling⁴¹. Furthermore, the Wip1
267 overexpressing mouse model demonstrated a reduction in p38MAPK phosphorylation and a
268 decline in *Cdkn2a* and *Arf* mRNA levels, which resulted in pancreatic islet proliferation⁴¹.
269 Consequently, Wip1 may be considered as a significant physiological regulator of p38 signaling
270 during the aging process.

271 The Figure 4 displays two major cascades that are involved in the process of aging and are
272 regulated by Wip1. In light of the aforementioned evidence, further investigation into the function
273 of Wip1 in the process of senescence is warranted. We suggest that the potential use of Wip1
274 inhibitors to induce senescence in cancer cells with preserved p53 and/or p38 is of considerable
275 interest. The resulting senescent cells could be eliminated with senolytics, which may serve as a
276 new strategy for the treatment of cancer.

277 Concerning Wip1 role in aging of immune cells, it should be mentioned that Wip1
278 expression in hematopoietic stem cells (HSCs) declined with age and Wip1^{-/-} mice characterized
279 by accelerated HSC aging by elevating p53 and mTORC1 activities³⁹. Impairment of the Wip1-
280 p53 signaling cascade in Wip1^{-/-} mice was found to lead HSC differentiation bias towards an
281 increasement of myeloid cells in the peripheral blood. Dysregulation of Wip1-mTORC1 cascade
282 in murine HSCs was associated with phenotypic expansion of HSCs. Thus, Wip1 is involved in
283 HSC aging via Wip1 downstream pathways, particularly p53 and mTORC1³⁹.

284 In agreement with these findings, it has been revealed, that Wip1 played a role in clonal
285 haematopoiesis¹¹⁶⁻¹¹⁸, which is also characterized by age-associated conditions and clonal
286 expansion in peripheral blood^{119,120}. Moreover, recent studies dealing with CHIP impact in
287 COVID-19 infection have demonstrated the prevalence of CHIP in patients with severe forms of
288 COVID-19^{121,122}. Most intriguingly, the *PPM1D* mutation rate among CHIP-positive COVID-19
289 patients was one of the highest¹²². These findings can be explained by old age of the cohort used
290 in the study and *PPM1D* participation in aging of immune cells.

291 3. Conclusion

292 As described above, the accumulating evidence points to PPM1D as a negative regulator of
293 different types of cell death. It is becoming apparent that other members of the PP2C family may
294 act in a similar manner to PPM1D and may replace PPM1D as negative regulators of pro-death
295 molecules in signaling pathways. Therefore, inhibition of PP2C phosphatases is considered a
296 potential therapeutic strategy in various diseases, for example, to potentiate chemotherapy- or
297 targeted therapy-induced apoptosis in both solid and hematological malignancies. We predict that

298 the development of new PP2Cs specific inhibitors in the near future will make this potential
299 strategy a reality and make the treatment of various diseases more efficient.

300 **Author Contributions:**

301 LL prepared part about apoptosis and designed figures. DB wrote about senescence. EVB
302 made a text about autophagy, final edition, references. OND developed concept of the paper,
303 provided the introduction section. CG participated in the development of the concept, final edition,
304 wrote a describing the role of the PP2C family in cell death and senescence. All authors read and
305 approved the final paper.

306

307 **Acknowledgments**

308 We thank la Ligue contre le Cancer, the Fondation Ruban Rose, le “Conseil Regional de
309 Bourgogne Franche Comté”, the FEDER, l’Institut National du Cancer (INCa PLBIO-22-093 and
310 PLBIO21-107), RSF grant 19-75-20128, Ministry of Science and Higher Education Agreement
311 075-10-2021-093, Project IMB-2102, and the program “Investissements d’Avenir” with reference
312 ANR-11-LABX-0021 (LabEX LipSTIC) and ANR-11-LABX-0051 (Labex GR-Ex).

313

314 **Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

315 **References**

- 316 1. Lammers, T. & Lavi, S. Role of type 2C protein phosphatases in growth regulation and in
317 cellular stress signaling. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **42**, 437–461 (2007).
- 318 2. Lu, G. & Wang, Y. Functional Diversity of Mammalian Type 2c Protein Phosphatase
319 Isoforms: New Tales from an Old Family. *Clinical and Experimental Pharmacology and*
320 *Physiology* **35**, 107–112 (2008).
- 321 3. Neumann, J., Boknik, P., Kirchhefer, U. & Gergs, U. The role of PP5 and PP2C in cardiac
322 health and disease. *Cell Signal* **85**, 110035 (2021).
- 323 4. Tong, Y., Quirion, R. & Shen, S. H. Cloning and characterization of a novel mammalian
324 PP2C isozyme. *J Biol Chem* **273**, 35282–35290 (1998).
- 325 5. Marley, A. E. *et al.* Biochemical characterization and deletion analysis of recombinant
326 human protein phosphatase 2C alpha. *Biochem J* **320**, 801–806 (1996).
- 327 6. Stern, A., Privman, E., Rasis, M., Lavi, S. & Pupko, T. Evolution of the metazoan protein
328 phosphatase 2C superfamily. *J Mol Evol* **64**, 61–70 (2007).
- 329 7. Lu, X. *et al.* The type 2C phosphatase Wip1: An oncogenic regulator of tumor suppressor
330 and DNA damage response pathways. *Cancer Metastasis Rev* **27**, 123–135 (2008).

- 331 8. Demidov, O. N. *et al.* Wip1 phosphatase regulates p53-dependent apoptosis of stem cells
332 and tumorigenesis in the mouse intestine. *Cell Stem Cell* **1**, 180–190 (2007).
- 333 9. Ofek, P., Ben-Meir, D., Kariv-Inbal, Z., Oren, M. & Lavi, S. Cell cycle regulation and p53
334 activation by protein phosphatase 2C alpha. *J Biol Chem* **278**, 14299–14305 (2003).
- 335 10. Lin, X. *et al.* PPM1A Functions as a Smad Phosphatase to Terminate TGF β Signaling. *Cell*
336 **165**, 498 (2016).
- 337 11. Park, D. *et al.* Wip1 regulates Smad4 phosphorylation and inhibits TGF- β signaling. *EMBO*
338 *Rep* **21**, e48693 (2020).
- 339 12. Goloudina, A. R., Mazur, S. J., Appella, E., Garrido, C. & Demidov, O. N. Wip1 sensitizes
340 p53-negative tumors to apoptosis by regulating the Bax/Bcl-xL ratio. *Cell Cycle* **11**, 1883–1887
341 (2012).
- 342 13. Prajapati, S., Verma, U., Yamamoto, Y., Kwak, Y. T. & Gaynor, R. B. Protein phosphatase
343 2Cbeta association with the I κ B kinase complex is involved in regulating NF-kappaB activity.
344 *J Biol Chem* **279**, 1739–1746 (2004).
- 345 14. Klumpp, S., Thissen, M.-C. & Krieglstein, J. Protein phosphatases types 2C α and 2C β in
346 apoptosis. *Biochemical Society Transactions* **34**, 1370–1375 (2006).
- 347 15. Gao, T., Furnari, F. & Newton, A. C. PHLPP: A Phosphatase that Directly
348 Dephosphorylates Akt, Promotes Apoptosis, and Suppresses Tumor Growth. *Molecular Cell* **18**,
349 13–24 (2005).
- 350 16. Berton, S. *et al.* A selective PPM1A inhibitor activates autophagy to restrict the survival of
351 *Mycobacterium tuberculosis*. *Cell Chemical Biology* **29**, 1126–1139.e12 (2022).
- 352 17. Song, Y. *et al.* Wip1 Aggravates the Cerulein-Induced Cell Autophagy and Inflammatory
353 Injury by Targeting STING/TBK1/IRF3 in Acute Pancreatitis. *Inflammation* **44**, 1175–1183
354 (2021).
- 355 18. Zheng, Z. *et al.* Lysine crotonylation regulates leucine-deprivation-induced autophagy by
356 a 14-3-3 ϵ -PPM1B axis. *Cell Rep* **41**, 111850 (2022).
- 357 19. Chen, Y. *et al.* Wip1 inhibits neutrophil extracellular traps to promote abscess formation in
358 mice by directly dephosphorylating Coronin-1a. *Cell Mol Immunol* **20**, 941–954 (2023).
- 359 20. Uyanik, B., Grigorash, B. B. & Demidov, O. N. The involvement of DNA damage response
360 pathway in nuclear reorganization during netotic initiation. **35**, 240–241 (2019).
- 361 21. Li, T. *et al.* PPM1K mediates metabolic disorder of branched-chain amino acid and
362 regulates cerebral ischemia-reperfusion injury by activating ferroptosis in neurons. *Cell Death Dis*
363 **14**, 1–15 (2023).
- 364 22. Schwarz, S., Hufnagel, B., Dworak, M., Klumpp, S. & Krieglstein, J. Protein phosphatase
365 type 2Calpha and 2Cbeta are involved in fatty acid-induced apoptosis of neuronal and endothelial
366 cells. *Apoptosis* **11**, 1111–1119 (2006).
- 367 23. Strovel, E. T., Wu, D. & Sussman, D. J. Protein phosphatase 2Calpha dephosphorylates
368 axin and activates LEF-1-dependent transcription. *J Biol Chem* **275**, 2399–2403 (2000).

- 369 24. Cheng, A., Kaldis, P. & Solomon, M. J. Dephosphorylation of Human Cyclin-dependent
370 Kinases by Protein Phosphatase Type 2C α and β 2 Isoforms*. *Journal of Biological Chemistry* **275**,
371 34744–34749 (2000).
- 372 25. Goloudina, A. R. *et al.* Wip1 promotes RUNX2-dependent apoptosis in p53-negative
373 tumors and protects normal tissues during treatment with anticancer agents. *Proc. Natl. Acad. Sci.*
374 *U.S.A.* **109**, E68–75 (2012).
- 375 26. Shreeram, S. *et al.* Wip1 phosphatase modulates ATM-dependent signaling pathways. *Mol*
376 *Cell* **23**, 757–764 (2006).
- 377 27. Douarre, C. *et al.* DNA damage signaling induced by the G-quadruplex ligand 12459 is
378 modulated by PPM1D/WIP1 phosphatase. *Nucleic Acids Res* **41**, 3588–3599 (2013).
- 379 28. Fujimoto, H. *et al.* Regulation of the antioncogenic Chk2 kinase by the oncogenic Wip1
380 phosphatase. *Cell Death Differ* **13**, 1170–1180 (2006).
- 381 29. Shen, X.-F. *et al.* Wip1 Deficiency Promotes Neutrophil Recruitment to the Infection Site
382 and Improves Sepsis Outcome. *Front Immunol* **8**, 1023 (2017).
- 383 30. Li, B. *et al.* PPM1D Knockdown Suppresses Cell Proliferation, Promotes Cell Apoptosis,
384 and Activates p38 MAPK/p53 Signaling Pathway in Acute Myeloid Leukemia. *Technol Cancer*
385 *Res Treat* **19**, 1533033820942312 (2020).
- 386 31. Ak, C., Karlitepe, A., Pilevneli, H., Kaygusuz, N. & Eren, M. K. K. 88P PPM1D/WIP1
387 phosphatase mediates basal and genotoxic stress-induced autophagy via ULK-1 de-
388 phosphorylation. *Annals of Oncology* **34**, S213 (2023).
- 389 32. Torii, S. *et al.* Identification of PPM1D as an essential Ulk1 phosphatase for genotoxic
390 stress-induced autophagy. *EMBO Rep* **17**, 1552–1564 (2016).
- 391 33. Brichkina, A. & Bulavin, D. V. WIP-ing out atherosclerosis with autophagy. *Autophagy* **8**,
392 1545–1547 (2012).
- 393 34. Liu, G. *et al.* Phosphatase Wip1 negatively regulates neutrophil development through p38
394 MAPK-STAT1. *Blood* **121**, 519–529 (2013).
- 395 35. He, Z.-Y. *et al.* Gamma-H2AX upregulation caused by Wip1 deficiency increases
396 depression-related cellular senescence in hippocampus. *Sci Rep* **6**, 34558 (2016).
- 397 36. Sakai, H., Fujigaki, H., Mazur, S. J. & Appella, E. Wild-type p53-induced phosphatase 1
398 (Wip1) forestalls cellular premature senescence at physiological oxygen levels by regulating DNA
399 damage response signaling during DNA replication. *Cell Cycle* **13**, 1015–1029 (2014).
- 400 37. Fontana, M. C. *et al.* Pharmacological Inhibition of WIP1 Sensitizes Acute Myeloid
401 Leukemia Cells to the MDM2 Inhibitor Nutlin-3a. *Biomedicines* **9**, 388 (2021).
- 402 38. Ugalde, A. P. *et al.* Aging and chronic DNA damage response activate a regulatory pathway
403 involving miR-29 and p53. *EMBO J* **30**, 2219–2232 (2011).
- 404 39. Chen, Z. *et al.* Wip1 deficiency impairs haematopoietic stem cell function via p53 and
405 mTORC1 pathways. *Nat Commun* **6**, 6808 (2015).
- 406 40. Bulavin, D. V. *et al.* Inactivation of the Wip1 phosphatase inhibits mammary tumorigenesis
407 through p38 MAPK-mediated activation of the p16(Ink4a)-p19(Arf) pathway. *Nat Genet* **36**, 343–
408 350 (2004).

- 409 41. Wong, E. S. M. *et al.* p38MAPK controls expression of multiple cell cycle inhibitors and
410 islet proliferation with advancing age. *Dev Cell* **17**, 142–149 (2009).
- 411 42. Yu, E. *et al.* Overexpression of the wip1 gene abrogates the p38 MAPK/p53/Wip1 pathway
412 and silences p16 expression in human breast cancers. *Breast Cancer Res Treat* **101**, 269–278
413 (2007).
- 414 43. Peng, D., Huang, Z., Yang, H., Luo, Y. & Wu, Z. PPM1G regulates hepatic
415 ischemia/reperfusion injury through STING-mediated inflammatory pathways in macrophages.
416 *Immun Inflamm Dis* **12**, e1189 (2024).
- 417 44. Suh, E.-J., Kim, T.-Y. & Kim, S. H. PP2Cgamma-mediated S-phase accumulation induced
418 by the proteasome-dependent degradation of p21(WAF1/CIP1). *FEBS Lett* **580**, 6100–6104
419 (2006).
- 420 45. Suh, E.-J., Kim, Y.-J. & Kim, S. H. Protein phosphatase 2Cgamma regulates the level of
421 p21Cip1/WAF1 by Akt signaling. *Biochem Biophys Res Commun* **386**, 467–470 (2009).
- 422 46. Saito, J. *et al.* Regulation of apoptosis signal-regulating kinase 1 by protein phosphatase
423 2Cε. *Biochem J* **405**, 591–596 (2007).
- 424 47. Zhang, L. *et al.* The expression of apoptosis related genes in HK-2 cells overexpressing
425 PPM1K was determined by RNA-seq analysis. *Front Genet* **13**, 1004610 (2022).
- 426 48. Liu, X. *et al.* PPM1K Regulates Hematopoiesis and Leukemogenesis through CDC20-
427 Mediated Ubiquitination of MEIS1 and p21. *Cell Reports* **23**, 1461–1475 (2018).
- 428 49. Tan, K. M., Chan, S. L., Tan, K. O. & Yu, V. C. The *Caenorhabditis elegans* sex-
429 determining protein FEM-2 and its human homologue, hFEM-2, are Ca²⁺/calmodulin-dependent
430 protein kinase phosphatases that promote apoptosis. *J Biol Chem* **276**, 44193–44202 (2001).
- 431 50. Fiscella, M. *et al.* Wip1, a novel human protein phosphatase that is induced in response to
432 ionizing radiation in a p53-dependent manner. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 6048–6053 (1997).
- 433 51. Chao, C., Saito, S., Anderson, C. W., Appella, E. & Xu, Y. Phosphorylation of murine p53
434 at ser-18 regulates the p53 responses to DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 11936–11941
435 (2000).
- 436 52. Lu, X. *et al.* The Wip1 Phosphatase acts as a gatekeeper in the p53-Mdm2 autoregulatory
437 loop. *Cancer Cell* **12**, 342–354 (2007).
- 438 53. Lu, X., Nannenga, B. & Donehower, L. A. PPM1D dephosphorylates Chk1 and p53 and
439 abrogates cell cycle checkpoints. *Genes Dev* **19**, 1162–1174 (2005).
- 440 54. Chew, J. *et al.* WIP1 phosphatase is a negative regulator of NF-kappaB signalling. *Nat Cell*
441 *Biol* **11**, 659–666 (2009).
- 442 55. Salminen, A. & Kaarniranta, K. Control of p53 and NF-κB signaling by WIP1 and MIF:
443 role in cellular senescence and organismal aging. *Cell Signal* **23**, 747–752 (2011).
- 444 56. Goloudina, A. R., Kochetkova, E. Y., Pospelova, T. V. & Demidov, O. N. Wip1
445 phosphatase: between p53 and MAPK kinases pathways. *Oncotarget* **7**, 31563–31571 (2016).
- 446 57. Choi, J., Appella, E. & Donehower, L. A. The structure and expression of the murine
447 wildtype p53-induced phosphatase 1 (Wip1) gene. *Genomics* **64**, 298–306 (2000).

- 448 58. Bulavin, D. V. *et al.* Amplification of PPM1D in human tumors abrogates p53 tumor-
449 suppressor activity. *Nature Genetics* **31**, 210–215 (2002).
- 450 59. Castellino, R. C. *et al.* Medulloblastomas overexpress the p53-inactivating oncogene
451 WIP1/PPM1D. *J Neurooncol* **86**, 245–256 (2008).
- 452 60. Kleiblova, P. *et al.* Gain-of-function mutations of PPM1D/Wip1 impair the p53-dependent
453 G1 checkpoint. *Journal of Cell Biology* **201**, 511–521 (2013).
- 454 61. Kahn, J. D. *et al.* PPM1D-truncating mutations confer resistance to chemotherapy and
455 sensitivity to PPM1D inhibition in hematopoietic cells. *Blood* **132**, 1095–1105 (2018).
- 456 62. Miyashita, T. & Reed, J. C. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the
457 human bax gene. *Cell* **80**, 293–299 (1995).
- 458 63. Nakano, K. & Vousden, K. H. PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol*
459 *Cell* **7**, 683–694 (2001).
- 460 64. Oda, E. *et al.* Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of
461 p53-induced apoptosis. *Science* **288**, 1053–1058 (2000).
- 462 65. Cao, R., Zhang, J., Zhang, M. & Chen, X. PPM1D regulates p21 expression via
463 dephosphorylation at serine 123. *Cell Cycle* **14**, 641–647 (2015).
- 464 66. Shreeram, S. *et al.* Regulation of ATM/p53-dependent suppression of myc-induced
465 lymphomas by Wip1 phosphatase. *J Exp Med* **203**, 2793–2799 (2006).
- 466 67. Song, J.-Y. *et al.* Wip1 suppresses apoptotic cell death through direct dephosphorylation of
467 BAX in response to γ -radiation. *Cell Death Dis* **4**, e744 (2013).
- 468 68. Demidov, O. N. *et al.* Role of Gadd45a in Wip1-dependent regulation of intestinal
469 tumorigenesis. *Cell Death Differ* **19**, 1761–1768 (2012).
- 470 69. Golotin, V. *et al.* Wild-type p53-induced phosphatase sensitizes acute myeloid leukemia
471 cells to conventional chemotherapy. *Biological Communications* **66**, 268–273 (2021).
- 472 70. Miller, P. G. *et al.* PPM1D modulates hematopoietic cell fitness and response to DNA
473 damage and is a therapeutic target in myeloid malignancy. *Blood* **142**, 2079–2091 (2023).
- 474 71. Esfandiari, A., Hawthorne, T. A., Nakjang, S. & Lunec, J. Chemical Inhibition of Wild-
475 Type p53-Induced Phosphatase 1 (WIP1/PPM1D) by GSK2830371 Potentiates the Sensitivity to
476 MDM2 Inhibitors in a p53-Dependent Manner. *Mol Cancer Ther* **15**, 379–391 (2016).
- 477 72. Galluzzi, L. *et al.* Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the
478 Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ* **25**, 486–541 (2018).
- 479 73. Park, W. *et al.* Diversity and complexity of cell death: a historical review. *Exp Mol Med*
480 **55**, 1573–1594 (2023).
- 481 74. Zachari, M. & Ganley, I. G. The mammalian ULK1 complex and autophagy initiation.
482 *Essays Biochem* **61**, 585–596 (2017).
- 483 75. Jung, C. H., Ro, S.-H., Cao, J., Otto, N. M. & Kim, D.-H. mTOR regulation of autophagy.
484 *FEBS Lett* **584**, 1287–1295 (2010).

- 485 76. Klionsky, D. J., Eskelinen, E.-L. & Deretic, V. Autophagosomes, phagosomes,
486 autolysosomes, phagolysosomes, autophagolysosomes... wait, I'm confused. *Autophagy* **10**, 549–
487 551 (2014).
- 488 77. Levine, B. & Kroemer, G. Autophagy in the Pathogenesis of Disease. *Cell* **132**, 27–42
489 (2008).
- 490 78. Beauvarlet, J. *et al.* Modulation of the ATM/autophagy pathway by a G-quadruplex ligand
491 tips the balance between senescence and apoptosis in cancer cells. *Nucleic Acids Res* **47**, 2739–
492 2756 (2019).
- 493 79. Wu, D. *et al.* Heterozygous mutation of ataxia-telangiectasia mutated gene aggravates
494 hypercholesterolemia in apoE-deficient mice. *Journal of Lipid Research* **46**, 1380–1387 (2005).
- 495 80. Egan, D. F. *et al.* Phosphorylation of ULK1 (hATG1) by AMP-activated protein kinase
496 connects energy sensing to mitophagy. *Science* **331**, 456–461 (2011).
- 497 81. Kim, J., Kundu, M., Viollet, B. & Guan, K.-L. AMPK and mTOR regulate autophagy
498 through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat Cell Biol* **13**, 132–141 (2011).
- 499 82. Shang, L. *et al.* Nutrient starvation elicits an acute autophagic response mediated by Ulk1
500 dephosphorylation and its subsequent dissociation from AMPK. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**,
501 4788–4793 (2011).
- 502 83. Gui, X. *et al.* Autophagy induction via STING trafficking is a primordial function of the
503 cGAS pathway. *Nature* **567**, 262–266 (2019).
- 504 84. Zhao, Q., Wei, Y., Pandol, S. J., Li, L. & Habtezion, A. STING Signaling Promotes
505 Inflammation in Experimental Acute Pancreatitis. *Gastroenterology* **154**, 1822–1835.e2 (2018).
- 506 85. Brinkmann, V. *et al.* Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* **303**, 1532–1535
507 (2004).
- 508 86. Fuchs, T. A. *et al.* Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J Cell*
509 *Biol* **176**, 231–241 (2007).
- 510 87. Zhan, J. *et al.* P53 together with ferroptosis: a promising strategy leaving cancer cells
511 without escape. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* **56**, 1–14 (2023).
- 512 88. Wu, H., Liu, Q., Shan, X., Gao, W. & Chen, Q. ATM orchestrates ferritinophagy and
513 ferroptosis by phosphorylating NCOA4. *Autophagy* **19**, 2062–2077 (2023).
- 514 89. Kumari, R. & Jat, P. Mechanisms of Cellular Senescence: Cell Cycle Arrest and
515 Senescence Associated Secretory Phenotype. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* **9**,
516 (2021).
- 517 90. Hickson, J. A., Fong, B., Watson, P. H. & Watson, A. J. PP2Cdelta (Ppm1d, WIP1), an
518 endogenous inhibitor of p38 MAPK, is regulated along with Trp53 and Cdkn2a following p38
519 MAPK inhibition during mouse preimplantation development. *Mol Reprod Dev* **74**, 821–834
520 (2007).
- 521 91. Schraml, E., Fuchs, R., Kotzbeck, P., Grillari, J. & Schauenstein, K. Acute adrenergic stress
522 inhibits proliferation of murine hematopoietic progenitor cells via p38/MAPK signaling. *Stem*
523 *Cells Dev* **18**, 215–227 (2009).

- 524 92. Zhang, D.-W. *et al.* RIP3, an Energy Metabolism Regulator That Switches TNF-Induced
525 Cell Death from Apoptosis to Necrosis. *Science* **325**, 332–336 (2009).
- 526 93. López-Otín, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M. & Kroemer, G. Hallmarks of
527 aging: An expanding universe. *Cell* **186**, 243–278 (2023).
- 528 94. Birch, J. & Gil, J. Senescence and the SASP: many therapeutic avenues. *Genes Dev* **34**,
529 1565–1576 (2020).
- 530 95. Schmitt, C. A., Wang, B. & Demaria, M. Senescence and cancer - role and therapeutic
531 opportunities. *Nat Rev Clin Oncol* **19**, 619–636 (2022).
- 532 96. Cha, B.-H., Lee, J.-S., Kim, S. W., Cha, H.-J. & Lee, S.-H. The modulation of the oxidative
533 stress response in chondrocytes by Wip1 and its effect on senescence and dedifferentiation during
534 *in vitro* expansion. *Biomaterials* **34**, 2380–2388 (2013).
- 535 97. Lowe, J. *et al.* Regulation of the Wip1 phosphatase and its effects on the stress response.
536 *Front Biosci* **17**, 1480–1498 (2012).
- 537 98. Pecháčková, S., Burdová, K. & Macurek, L. WIP1 phosphatase as pharmacological target
538 in cancer therapy. *J Mol Med (Berl)* **95**, 589–599 (2017).
- 539 99. Ventura, A. *et al.* Restoration of p53 function leads to tumour regression *in vivo*. *Nature*
540 **445**, 661–665 (2007).
- 541 100. Xue, W. *et al.* Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine
542 liver carcinomas. *Nature* **445**, 656–660 (2007).
- 543 101. Stokes, K. L. *et al.* Natural killer cells limit the clearance of senescent lung adenocarcinoma
544 cells. *Oncogenesis* **8**, 24 (2019).
- 545 102. Inoue, Y. *et al.* Clinical Significance of the Wild Type p53-Induced Phosphatase 1
546 Expression in Invasive Breast Cancer. *Clinical Breast Cancer* **18**, e643–e650 (2018).
- 547 103. Sriraman, A. *et al.* Cooperation of Nutlin-3a and a Wip1 inhibitor to induce p53 activity.
548 *Oncotarget* **7**, 31623–31638 (2016).
- 549 104. Belotserkovskaya, E., Golotin, V., Uyanik, B. & Demidov, O. N. Clonal haematopoiesis -
550 a novel entity that modifies pathological processes in elderly. *Cell Death Discov.* **9**, 1–10 (2023).
- 551 105. Shimony, S., Stahl, M. & Stone, R. M. Acute myeloid leukemia: 2023 update on diagnosis,
552 risk-stratification, and management. *American Journal of Hematology* **98**, 502–526 (2023).
- 553 106. Duy, C. *et al.* Chemotherapy Induces Senescence-Like Resilient Cells Capable of Initiating
554 AML Recurrence. *Cancer Discov* **11**, 1542–1561 (2021).
- 555 107. Salazar-Terreros, M. J. & Vernot, J.-P. In Vitro and In Vivo Modeling of Normal and
556 Leukemic Bone Marrow Niches: Cellular Senescence Contribution to Leukemia Induction and
557 Progression. *Int J Mol Sci* **23**, 7350 (2022).
- 558 108. Roberson, R. S., Kussick, S. J., Vallieres, E., Chen, S.-Y. J. & Wu, D. Y. Escape from
559 therapy-induced accelerated cellular senescence in p53-null lung cancer cells and in human lung
560 cancers. *Cancer Res* **65**, 2795–2803 (2005).
- 561 109. Wang, L., Lankhorst, L. & Bernards, R. Exploiting senescence for the treatment of cancer.
562 *Nat Rev Cancer* **22**, 340–355 (2022).

- 563 110. Crescenzi, E. *et al.* Down-regulation of wild-type p53-induced phosphatase 1 (Wip1) plays
564 a critical role in regulating several p53-dependent functions in premature senescent tumor cells. *J*
565 *Biol Chem* **288**, 16212–16224 (2013).
- 566 111. Bogdanova, D. A. *et al.* The Differential Effect of Senolytics on SASP Cytokine Secretion
567 and Regulation of EMT by CAFs. *Int J Mol Sci* **25**, 4031 (2024).
- 568 112. Özdemir, A., Şimay Demir, Y. D., Yeşilyurt, Z. E. & Ark, M. Senescent cells and SASP in
569 cancer microenvironment: New approaches in cancer therapy. *Adv Protein Chem Struct Biol* **133**,
570 115–158 (2023).
- 571 113. Coppé, J.-P. *et al.* Senescence-Associated Secretory Phenotypes Reveal Cell-
572 Nonautonomous Functions of Oncogenic RAS and the p53 Tumor Suppressor. *PLOS Biology* **6**,
573 e301 (2008).
- 574 114. Zhang, X. *et al.* The HBP1 Transcriptional Repressor Participates in RAS-Induced
575 Premature Senescence. *Mol Cell Biol* **26**, 8252–8266 (2006).
- 576 115. Lee, J.-S. *et al.* Senescent growth arrest in mesenchymal stem cells is bypassed by Wip1-
577 mediated downregulation of intrinsic stress signaling pathways. *Stem Cells* **27**, 1963–1975 (2009).
- 578 116. Coombs, C. C. *et al.* Therapy-Related Clonal Hematopoiesis in Patients with Non-
579 hematologic Cancers Is Common and Associated with Adverse Clinical Outcomes. *Cell Stem Cell*
580 **21**, 374–382.e4 (2017).
- 581 117. Genovese, G. *et al.* Clonal hematopoiesis and blood-cancer risk inferred from blood DNA
582 sequence. *N Engl J Med* **371**, 2477–2487 (2014).
- 583 118. Hsu, J. I. *et al.* PPM1D Mutations Drive Clonal Hematopoiesis in Response to Cytotoxic
584 Chemotherapy. *Cell Stem Cell* **23**, 700–713.e6 (2018).
- 585 119. Jaiswal, S. *et al.* Age-related clonal hematopoiesis associated with adverse outcomes. *N*
586 *Engl J Med* **371**, 2488–2498 (2014).
- 587 120. Steensma, D. P. *et al.* Clonal hematopoiesis of indeterminate potential and its distinction
588 from myelodysplastic syndromes. *Blood* **126**, 9–16 (2015).
- 589 121. Bolton, K. L. *et al.* Clonal hematopoiesis is associated with risk of severe Covid-19. *Nat*
590 *Commun* **12**, 5975 (2021).
- 591 122. Schenz, J. *et al.* Increased prevalence of clonal hematopoiesis of indeterminate potential in
592 hospitalized patients with COVID-19. *Front Immunol* **13**, 968778 (2022).
- 593
- 594

595 **FIGURE LEGENDS**

596 **Figure 1: Protein structure and list of the PP2C family members.** PP2C family proteins belong
597 to PPM family that require Mn^{2+} and/or Mg^{2+} for activation. PP2Cs family is composed of 20
598 isoforms including PPM1A, PPM1B, PPM1D, PPM1E, PPM1F, PPM1G, PPM1H, PPM1J,
599 PPM1K, PPM1L, PPM1M, PPM1N, ILKAP, PDP1, PDP2, PHLPP1, PHLPP2, PP2D1, PPTC7 et
600 TAB1. Structure protein shown is a simplifying representation from the PDB AF-A0A2U9PMD1-
601 F1 design on Biorender.

602

603 **Figure 2: Involvement of the PP2C family members in different types of cell death and**
604 **senescence.** The most described PP2C proteins including PPM1D, PPM1A, PPM1K, PPM1F,
605 PHLPP, PPM1L, PPM1G and PPM1B are involved in apoptosis and others cell death pathway.
606 Actually, PPM1D, PPM1A, PPM1K, PPM1F, PHLPP, PPM1L, PPM1G and PPM1B have been
607 reported to regulate apoptosis and PPM1G, PPM1B, PPM1D, PPM1A and PPM1K are involved
608 in autophagy mechanisms. PPM1G, PPM1B, PPM1D, PPM1A and PPM1K play a role in
609 senescence pathway. The NETosis cell death is strictly regulated by PPM1D. Ferroptosis
610 regulation involved PPM1K regulation. All these types of cell death are driven by several signaling
611 pathways and PP2C protein regulate many factors shown in this scheme. N.D. annotation means
612 that there is no data about target of the PP2C family member.

613

614 **Figure 3: Wip1-mediated apoptosis and autophagy.** Wip1 is a negative regulator of apoptosis
615 by a p53-dependant manner by its direct interaction with ATM, ATR, Chk1, Chk2 and p53. In p53-
616 negative cells, overexpression of Wip1 regulates positively apoptosis by its inhibition of Nf κ B and
617 activation of RUNX2. Wip1 regulated positively autophagy by its inhibitor functions on ATM and
618 mTOR which are negative regulators of autophagy. Otherwise, Wip1 dephosphorylates Utk1
619 which turns to its activation leading to autophagophore formation responsible for autophagy
620 mechanisms.

621

622 **Figure 4: Schematic of the two main molecular cascades of senescence regulated by Wip1.** In
623 p53-p21 axis, Wip1 regulates senescence mainly by its direct negative interaction with ATM, p53
624 and Chk2 turning to p21 reduction which decreases senescence induction. In a p38-p16 axis, Wip1
625 acts as a negative regulator through its interaction with p38MAPK leading to p16 reduction which
626 turns to senescence decrease.

627

628 **Table 1. Role of the PP2C family members in programmed cell death and senescence**

629

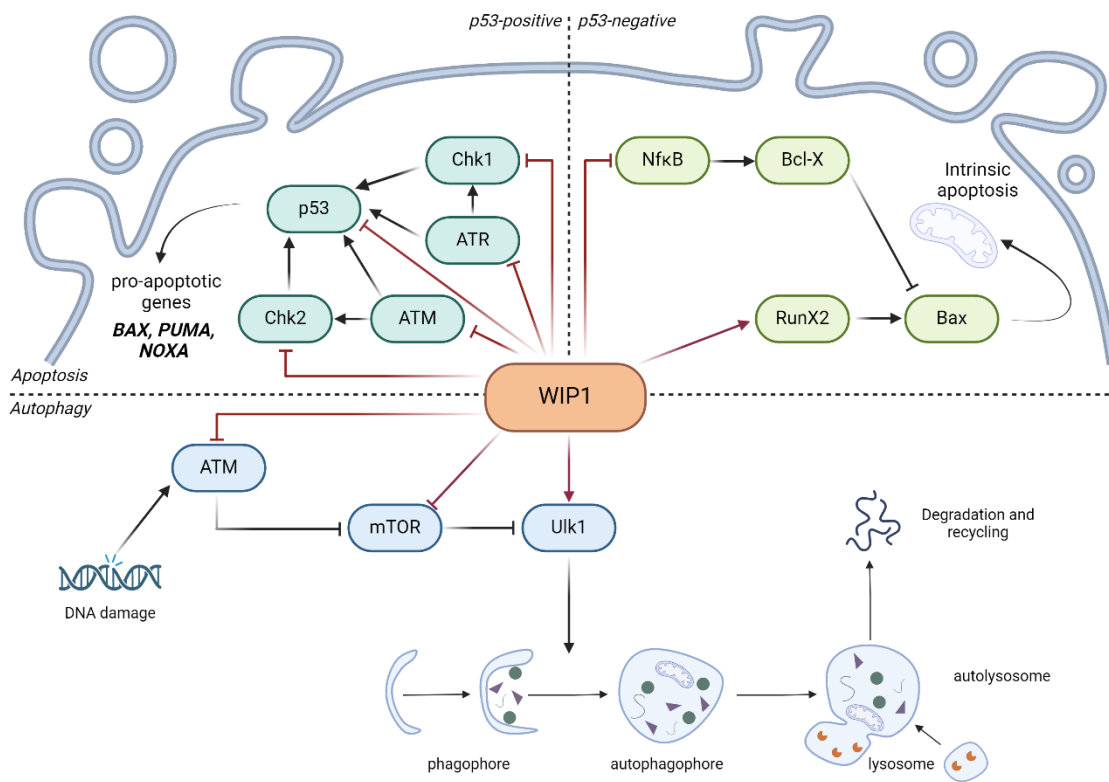


Figure 3

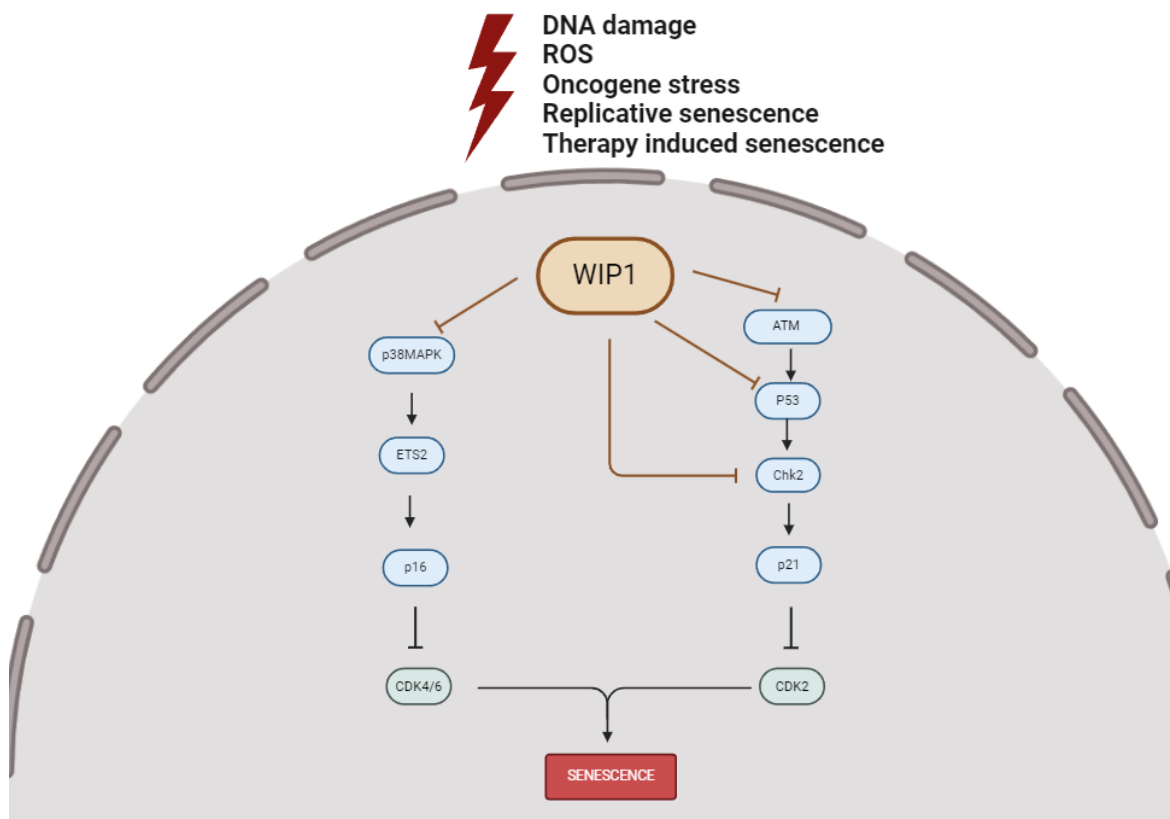
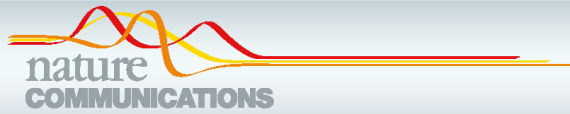


Figure 4

Tableau 1

| PP2C family protein | Type of cell death /senescence | Substrates/pathways of PP2C proteins | References |
|-----------------------------|--------------------------------|---|------------|
| PPM1A (PP2C α) | Apoptosis | n.d. | 22 |
| | | BAD (Bcl-2/Bcl-XL-antagonist, causing cell death) | 14 |
| | | p53 | 9 |
| | | Smad2, Smad3 | 10 |
| | | LEF-1 (Wnt pathway) | 23 |
| | Autophagy | p62-SQSTM1 | 16 |
| Senescence | CDK2, CDK6 | 24 | |
| PPM1B (PP2C β) | Apoptosis | n.d. | 22 |
| | | BAD (Bcl-2/Bcl-XL-antagonist, causing cell death) | 14 |
| | | IKK β | 13 |
| | Autophagy | ULK1 | 18 |
| Senescence | CDK2, CDK6 | 24 | |
| PPM1D/Wip1 (PP2C δ) | Apoptosis | p53 | 8,12,25 |
| | | ATM | 26 |
| | | ATR | 26 |
| | | CHK1 | 27 |
| | | CHK2 | 28 |
| | | RUNX2 | 25 |
| | | Nf- κ B | 25 |
| | | p38MAPK pathway | 29,3 |
| | Autophagy | TGF β | 11 |
| | | ATM | 26 |
| | | ULK1 | 31,32 |
| | | mTOR | 33 |
| | NETosis | STING pathway | 17 |
| | | p38MAPK-STAT1 pathway | 34 |
| | | Coronin-1a | 19 |
| | | n.d. | 29 |
| | | n.d. | 20 |
| | Senescence | H2AX | 35,36 |
| P53 - p21 pathway | | 37,38 | |
| P53-mTORC1 pathway | | 39 | |
| P38 - p16 pathway | | 40-42 | |
| | | | |
| PPM1G (PP2C γ) | Apoptosis | STING pathway | 43 |
| | Senescence | p21WAF1/CIP1/Akt pathway | 44,45 |
| PPM1L (PP2C ϵ) | Apoptosis | ASK1 | 46 |
| PPM1K (PP2C μ) | Apoptosis | n. d. | 47 |
| | Ferroptosis | BCKDHA | 21 |
| | Senescence | MEIS1/p21 | 48 |
| PPM1F (CaMKP/POPX2) | Apoptosis | F1A α | 49 |
| PHLPP/SCOP | Apoptosis | Akt | 15 |

Annexe 2 – Participation publications



ARTICLE



<https://doi.org/10.1038/s41467-021-23330-6>

OPEN

Inhibition of the DNA damage response phosphatase PPM1D reprograms neutrophils to enhance anti-tumor immune responses

Burhan Uyanik^{1,11}, Anastasia R. Goloudina^{1,2,11}, Amir Akbarali³, Bogdan B. Grigorash^{2,4}, Alexey V. Petukhov^{4,5}, Sunil Singhal⁶, Evgeniy Eruslanov⁶, Jeanne Chaloyard¹, Lisa Lagorgette¹, Tarik Hadi¹, Ekaterina V. Baidyuk², Hiroyasu Sakai³, Lino Tessarollo⁷, Bernhard Ryffel⁸, Sharlyn J. Mazur³, Frederic Lirussi^{1,9}, Carmen Garrido^{1,10}, Ettore Appella³ & Oleg N. Demidov^{1,2,4}

PPM1D/Wip1 is a negative regulator of the tumor suppressor p53 and is overexpressed in several human solid tumors. Recent reports associate gain-of-function mutations of *PPM1D* in immune cells with worse outcomes for several human cancers. Here we show that mice with genetic knockout of *Ppm1d* or with conditional knockout of *Ppm1d* in the hematopoietic system, in myeloid cells, or in neutrophils all display significantly reduced growth of syngeneic melanoma or lung carcinoma tumors. *Ppm1d* knockout neutrophils infiltrate tumors extensively. Chemical inhibition of Wip1 in human or mouse neutrophils increases anti-tumor phenotypes, p53-dependent expression of co-stimulatory ligands, and proliferation of co-cultured cytotoxic T cells. These results suggest that inhibition of Wip1 in neutrophils enhances immune anti-tumor responses.

¹INSERM UMR1231, LipSTIC, University of Burgundy Franche-Comté, Dijon, France. ²Institute of Cytology, RAS, St. Petersburg, Russia. ³Laboratory of Cell Biology, Center for Center Research, National Cancer Institute, Bethesda, MD, USA. ⁴NTU Sirius, Sochi, Russia. ⁵Almazov National Medical Research Centre, St. Petersburg, Russia. ⁶Department of Surgery, Perelman School of Medicine, University of Pennsylvania, Philadelphia, PA, USA. ⁷Mouse Cancer Genetics Program, Center for Cancer Research, National Cancer Institute, Frederick, MD, USA. ⁸INEM, Experimental and Molecular Immunology and Neurogenetics, University of Orléans, CNRS, UMRP735, Orléans, France. ⁹PACE, Plateau d'Analyses Chromatographiques et Élémentaires, Department of Pharmacology-Toxicology & Metabolomics, University hospital of Besançon (CHU), 2 Boulevard Fleming, 25030 BESANCON, France. ¹⁰Georges François Leclerc Center, Dijon, France. ¹¹These authors contributed equally: Burhan Uyanik, Anastasia R. Goloudina. ✉email: Carmen.Garrido-Fleury@u-bourgogne.fr, appellae@mail.nih.gov, Oleg.Demidov@u-bourgogne.fr

NATURE COMMUNICATIONS | (2021)12:3622 | <https://doi.org/10.1038/s41467-021-23330-6> | www.nature.com/naturecommunications

1

Immunosurveillance by innate and adaptive immune cells can eliminate aberrant cells and provide effective suppression of tumor initiation¹. However, sustained interactions between tumors and the immune system may lead to immunosuppression through immunoeediting². Immune checkpoint inhibitor-based anticancer therapies employ reducing immunosuppression as an effective therapeutic strategy³. However, current anticancer immunotherapies are only fully effective for a fraction of patients, reflecting the complexity of the immune response to tumors⁴. Along with other hematopoietic cells in the tumor microenvironment (TME), neutrophils shape the antitumor immune response and affect the efficacy of immunotherapeutic protocols. Neutrophils belong to the myeloid lineage of the innate immune system and play a dual role in cancer. At the early stages of tumorigenesis, tumor-associated neutrophils (TANs) stimulate antitumor immune responses⁵. Under continuous pathological signaling from tumor cells, neutrophils may acquire immunosuppressive properties and negatively regulate the principal antitumor effector cells, CD8 + cytotoxic lymphocytes, and NK cells^{6,7}.

Modulation of immune responses in the TME by p53 is becoming recognized as a key aspect of its tumor-suppressive functions^{8–10}. Wild-type p53-induced phosphatase, Wip1, the product of the *PPM1D* gene, is a metal-dependent serine/threonine protein phosphatase that is transcriptionally induced by p53 after exposure to DNA-damaging agents^{11,12}. Cell-based studies have demonstrated that Wip1 negatively regulates several tumor suppressors, including p53, ATM, and MAPK^{13–16}. The *PPM1D* gene is amplified and/or the Wip1 protein is overexpressed in several human cancers; tumors overexpressing Wip1 often retain wild-type p53, albeit with compromised functionality^{17–19}. Wip1 accelerates tumorigenesis in several mouse tumor models and increases the incidence of spontaneous tumors^{13,20–23}.

PPM1D exerts cell-type-specific effects during immune cell differentiation^{24,25}. It positively regulates T- and B-cell development but negatively regulates neutrophil development^{26–30}. Recent work suggests that the level of *PPM1D*/Wip1 activity in immune cells affects tumor progression. The presence of protein-truncating variants (PTVs) of *PPM1D* in immune cells but not in tumors of breast and ovarian cancer patients was associated with worse outcomes³¹. These somatic PTVs of the *PPM1D* gene were clustered in exon 6 and conferred “gain-of-function” through increased protein stability and activity³². For several additional cancers, the presence of PTVs of *PPM1D* in immune cells correlated with worse outcomes for patients^{33–36}. Interestingly, in the recently recognized pre-pathological condition of clonal hematopoiesis of indeterminate potential (CHIP), the same PTVs were found and *PPM1D* was identified as a driver gene³⁷. Unlike other CHIP driver genes, *PPM1D* mutations were not associated with increased risk of developing myelodysplastic syndrome (MDS) or acute myeloid leukemia (AML)³⁸. Clonal hematopoiesis (CH) resulting from *PPM1D* exon 6 mutations was also found to be significantly associated with increasing age³⁹ or prior exposure to chemotherapy^{40,41} and was generally associated with worse outcomes⁴².

We hypothesize that the Wip1 expression level in immune cells affects tumor progression by altering the degree of immunosuppression in the TME. We initiated a study of the effects of Wip1 expression levels or activity on antitumor immune responses.

In this work, we show that *PPM1D* is overexpressed in tumor-infiltrating neutrophils, both in humans and mice, and its genetic deletion or chemical inhibition in myeloid cells increases their anti-tumor phenotypes and suppresses tumorigenesis.

Results

Wip1 deficiency in the hematopoietic system suppresses tumor growth. To investigate the effects on tumor progression of reducing

Wip1 expression in immune cells, we established mouse lines with conditional knockout of the *Ppm1d* gene. Through the Knock-Out Mouse Project (KOMP)⁴³, exon 3 of the *Ppm1d* gene was identified as a critical exon, deletion of which results in loss of Wip1 expression and function (Supplementary Fig. 1a). We injected ES cells bearing the *Ppm1d*^{tm1a(KOMP)Wtsi} gene-trapped allele into pseudopregnant C57Bl/6 mice. Through subsequent crosses of F2 progeny with C57Bl/6 β-actin-cre mice or C57Bl/6 β-actin-flp mice, respectively, we generated mice bearing the *Ppm1d*^{tm1b(KOMP)Wtsi} allele, a germline *Ppm1d* knockout (referred to herein as *Ppm1d*^{KO2}) that expresses the LacZ reporter protein under the control of the endogenous *Ppm1d* promoter, or mice bearing the conditional knockout allele *Ppm1d*^{tm1c(KOMP)Wtsi} (referred to herein as *Ppm1d*^{fl}), which expresses wild-type Wip1. Upon whole-body or tissue-selective exposure to cre recombinase, recombination between LoxP sites flanking exon 3 produces the knockout allele, *Ppm1d*^{tm1d(KOMP)Wtsi}, referred to as *Ppm1d*^{KO3}. The human *FES* promoter is highly active in hematopoietic progenitors and myeloid cells; mice expressing the *Fes*-cre transgene are useful for studying gene deletion in the hematopoietic system^{44,45}. Through successive intercrosses of *Fes*-cre mice with *Ppm1d*^{fl/fl} mice, we produced *Ppm1d*^{fl/fl};Tg(*Fes*-cre) mice, referred to herein as *Ppm1d*^{Fes-cre} mice, which lack expression of Wip1 in hematopoietic cells (Supplementary Fig. 1b). Analysis of genomic DNA from *Ppm1d*^{fl/fl} mice demonstrated the presence of the floxed exon 3 allele in both skin fibroblasts and liver samples (Supplementary Fig. 1c, left panel). In *Ppm1d*^{Fes-cre} mice, which express cre recombinase from the *Fes*-cre transgene only in hematopoietic progenitor cells, genomic DNA from liver sample, which contains liver-residing hematopoietic cells as well as hepatic cells, exhibited loss of exon 3 producing the 296-bp product that represented knockout allele (Supplementary Fig. 1c, right panel and Supplementary Fig. 1d). At the same time, skin fibroblasts, which lack hematopoietic cells, demonstrated the absence of the knockout allele in accordance with their respective hematopoietic cell content. Furthermore, we crossed R26R-EYFP reporter mice⁴⁶ with *Fes*-cre mice to demonstrate successful cre-based recombination occurring in hematopoietic cells but not in other tissue types such as the intestinal epithelium (Supplementary Fig. 1e). Mice homozygous for the floxed allele, *Ppm1d*^{fl/fl}, express wild-type Wip1 and are phenotypically indistinguishable from wild-type mice. In agreement with the results described previously for germline Wip1-knockout mice (*Ppm1d*^{tm1Lad/flmLad})^{27,28,47}, *Ppm1d*^{Fes-cre} mice displayed reduced lymphocyte and increased granulocyte numbers in peripheral blood, with lymphopenia and neutrophilia progressing with age (Fig. 1a).

We investigated the effects of depleting Wip1 in the hematopoietic system on tumor growth using the C57Bl/6 syngeneic B16 F10 melanoma and LLC1 Lewis lung carcinoma tumor models^{48,49}. Compared with *Ppm1d*^{fl/fl} mice, we observed significantly reduced rates of B16 F10 tumor growth in *Ppm1d*^{Fes-cre} mice (Fig. 1b). We observed similar reductions in B16 tumor growth in *Ppm1d*^{KO2/KO2} (germline-knockout) mice compared with *Ppm1d*^{fl/fl} mice (Fig. 1c). To test whether the tumor-suppressive characteristic of *Ppm1d*-depleted immune cells is transferable to wild-type mice, we transplanted bone marrow (BM) cells isolated from wild-type or *Ppm1d*^{KO2/KO2} mice into lethally irradiated wild-type mice. We observed reduced rates of B16 tumor growth in WT recipient mice engrafted with BM cells from knockout compared with wild-type mice (Fig. 1d). As deficiency of Wip1 has been reported to impair HSC functionality⁵⁰, we confirmed effective engraftment of YFP-labeled *Ppm1d*^{KO2/KO2} donor cells 12 weeks after transfer into lethally irradiated WT mice (Supplementary Fig. 2). In addition, we challenged *Ppm1d*^{fl/fl} and *Ppm1d*^{Fes-cre} mice with LLC1 Lewis lung carcinoma cells. Similarly, the growth of LLC1 tumors was delayed in *Ppm1d*^{Fes-cre} mice compared with mice expressing wild-type Wip1 (Fig. 1e). Human population studies have demonstrated an

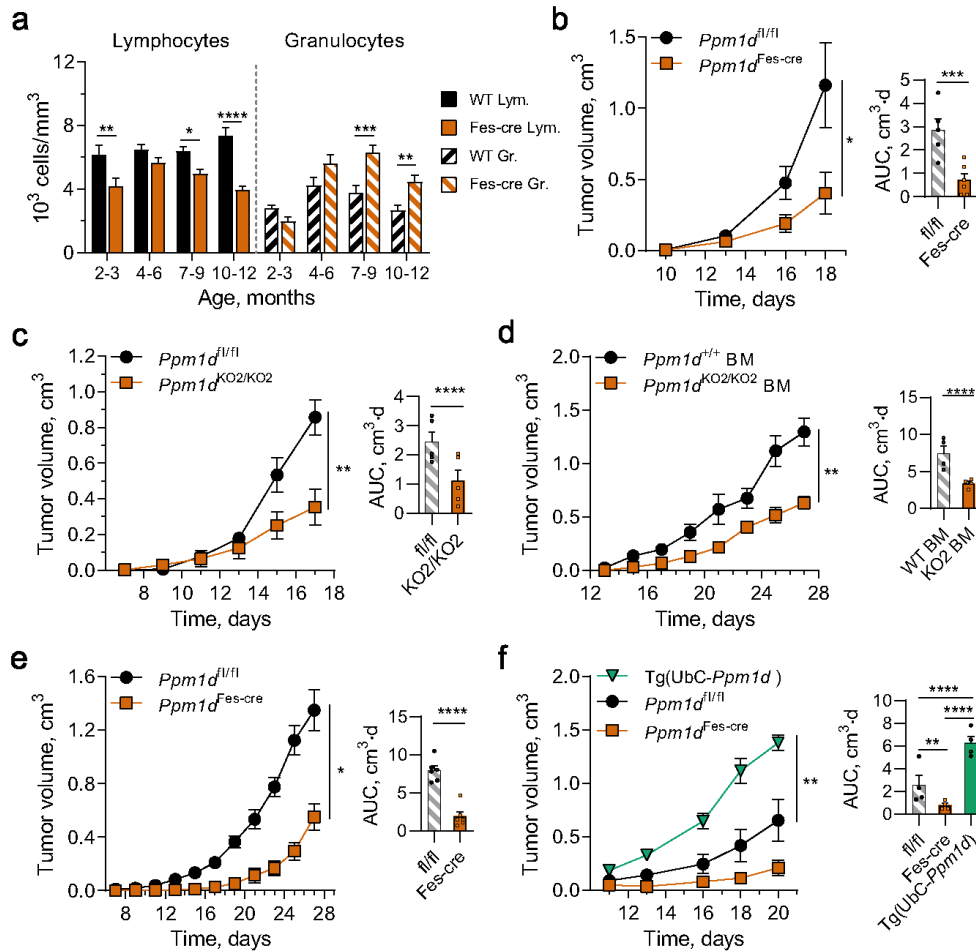


Fig. 1 Wip1 deficiency in hematopoietic cells suppresses the growth of solid tumors. **a** Age-stratified lymphocyte and granulocyte numbers in peripheral blood of *Ppm1d*^{fl/fl} and *Ppm1d*^{Fes-cre} (*Ppm1d*^{fl/fl};Fes-Cre) mice ($n = 12$ each genotype). **b** Tumor volume (left) and tumor growth area under the curve (AUC) (right) for growth of B16 F10 melanoma in *Ppm1d*^{fl/fl} ($n = 5$) and *Ppm1d*^{Fes-cre} ($n = 6$) mice. **c** Tumor volume (left) and AUC (right) for growth of B16 F10 tumors in *Ppm1d*^{fl/fl} and *Ppm1d*^{KO2/KO2} ($n = 5$ each genotype). **d** Tumor volume (left) and AUC (right) for growth of B16 F10 tumors in lethally irradiated WT mice with subsequent adoptive transfer of WT or *Ppm1d*^{KO2/KO2} bone marrow (BM) cells ($n = 4$ each genotype). **e** Tumor volume (left) and AUC (right) for growth of LLC1 lung carcinoma tumors in *Ppm1d*^{fl/fl} and *Ppm1d*^{ΔHSC} mice ($n = 6$ each genotype). **f** Tumor volume (left) and AUC (right) for growth of LLC1 tumors in *Ppm1d*^{fl/fl}, *Ppm1d*^{Fes-cre}, and Tg(UbC-*Ppm1d*) mice ($n = 4$ each genotype). Data are depicted as means \pm SEM. Student's *t* test (two-tailed) (**b–e**), ordinary one-way ANOVA (**f**), and ordinary one-way ANOVA with Sidak's multiple comparison test (**a**): * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$ (one representative experiment out of 3 is shown for Panel **b–f**). Source data are provided as a Source Excel Data file.

association of less favorable patient outcomes with the presence, in blood cells, of *PPM1D* PTV variants that confer increased protein stability^{31,36,42}. To investigate the effects of Wip1 overexpression, we used transgenic mice bearing the UbC-*Ppm1d* transgene, which ubiquitously expresses 2- to 4-fold higher levels of Wip1^{51,52}. Importantly, the growth of LLC1 carcinoma tumors was significantly faster in UbC-*Ppm1d* transgenic mice compared with either *Ppm1d*^{fl/fl} or *Ppm1d*^{Fes-cre} mice (Fig. 1f). These experiments suggest that high levels of Wip1 in hematopoietic cells increase tumor progression.

Wip1-deficient neutrophils extensively infiltrate tumors. Tumor-bearing *Ppm1d*^{Fes-cre} mice exhibited significantly reduced lymphocyte counts and significantly increased granulocyte counts in peripheral blood, compared with tumor-bearing *Ppm1d*^{fl/fl} mice (Fig. 2a). To investigate the mechanisms of tumor suppression resulting from depletion of Wip1 in hematopoietic cells, we characterized immune infiltrates in B16 melanoma tumors in Wip1 WT and Fes-cre mice by flow cytometry (Supplementary Fig. 3). The numbers of CD45+ leukocytes infiltrated into B16-F10 tumors were higher in *Ppm1d*^{Fes-cre} mice compared with

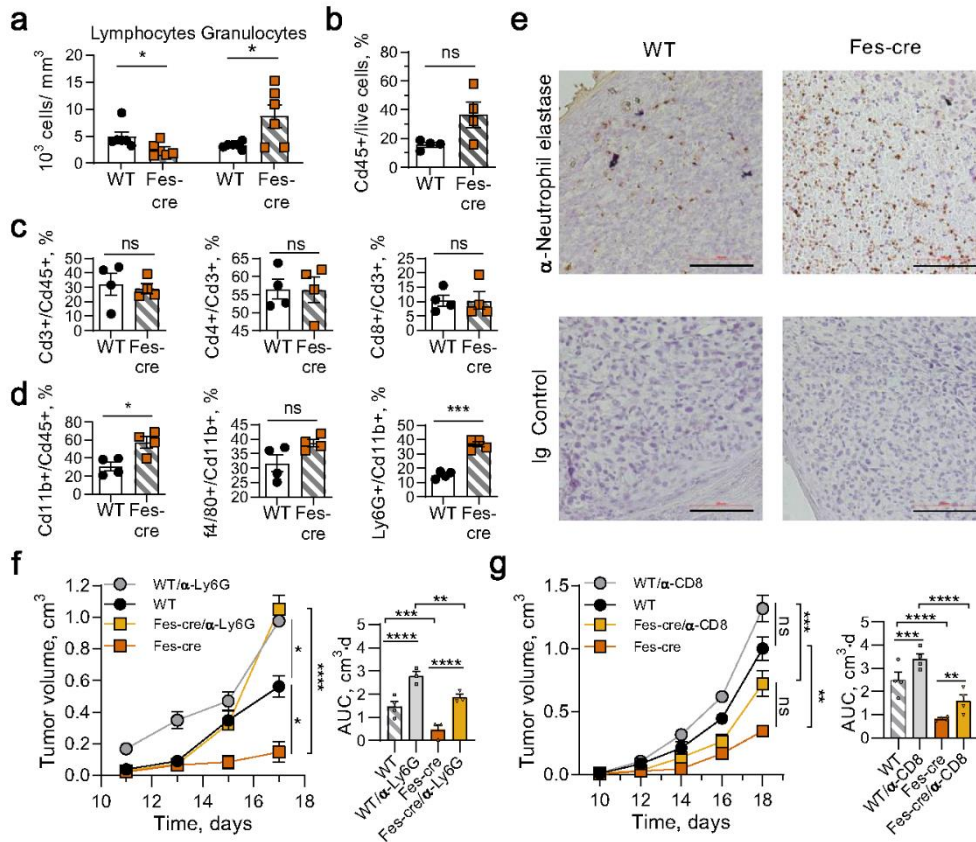


Fig. 2 *Wip1*-deficient neutrophils infiltrate tumors extensively and their depletion accelerates tumorigenesis in *Wip1*-deficient mice. **a** Peripheral blood composition in *Ppm1d*^{fl/fl} (WT) and *Ppm1d*^{Fes-Cre} (Fes-Cre) mice bearing B16. F10 melanoma tumors (day 16, $n = 6$ each genotype). Panels **b–d**. Infiltration of immune cells into B16 tumors in *Ppm1d*^{fl/fl} (WT) and *Ppm1d*^{Fes-Cre} (Fes-Cre) mice ($n = 4$ each genotype). **b** Cd45⁺ leukocytes. **c** Cd3⁺ T cells, Cd4⁺ helper T cells, and Cd8⁺ cytotoxic T cells. **d** Cd11b⁺ myeloid cells, f4/80⁺ macrophages, and Ly6G⁺ neutrophils. **e** Neutrophil infiltration of B16 tumors in *Ppm1d*^{fl/fl} and *Ppm1d*^{Fes-Cre} mice visualized by IHC. Neutrophil elastase-positive cells (α-Elane, brown) with counterstain (blue) (one representative experiment out of 4 is shown). **f, g** Tumor volume (left) and AUC (right) for growth of B16 F10 tumors in WT and *Ppm1d*^{Fes-Cre} mice undergoing immune cell depletion by serial injection of neutralizing anti-Ly6G⁺ antibodies (panel **f**, $n = 4$ for WT and $n = 3$ for the remaining groups) or neutralizing anti-CD8⁺ antibodies (panel **g**, $n = 4$ for each group). Data are depicted as means \pm SEM. Student's *t* test (two-tailed) (**a–d**) or ordinary one-way ANOVA with Sidak's multiple-comparison test (**f, g**): * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$, ns—nonsignificant (one representative experiment out of 2 is shown for panels **f** and **g**). Source data are provided as a Source Excel Data file.

Ppm1d^{fl/fl} mice, but the differences did not reach statistical significance (Fig. 2b). The proportions of CD3⁺ T cells, CD4⁺ T cells, or CD8⁺ T cells (Fig. 2c) did not differ appreciably between *Ppm1d*^{Fes-Cre} and *Ppm1d*^{fl/fl} mice, despite substantial peripheral blood lymphopenia. Compared with tumors in WT mice, tumor-immune infiltrates in *Ppm1d*^{Fes-Cre} mice exhibited significantly increased proportions of CD11b⁺ myeloid cells, unchanged proportions of F4/80⁺ tumor-associated macrophages (TAMs), and significantly increased proportions of Ly6G⁺ tumor-associated neutrophils (TANs) (Fig. 2d). Moreover, immunohistochemical (IHC) analysis revealed substantially increased numbers of neutrophil elastase-positive TANs in tumors from *Ppm1d*^{Fes-Cre} compared with control mice (Fig. 2e).

To test whether *Wip1*-deficient neutrophils directly contributed to tumor suppression, we depleted peripheral neutrophils through serial IV injections of neutralizing anti-Ly6G antibodies. Although neutrophil depletion resulted in increased tumor growth in both wild-type and *Ppm1d*^{Fes-Cre} mice, neutrophil depletion in *Ppm1d*^{Fes-Cre} mice markedly accelerated tumor growth, especially in the later stages (Fig. 2f). Similarly, we depleted peripheral cytotoxic CD8⁺ T lymphocytes (CTLs) through serial IV injections of neutralizing anti-CD8 antibodies (Fig. 2g). CTL depletion significantly accelerated tumor growth in *Ppm1d*^{Fes-Cre} mice, but the effects were smaller than the effects of neutrophil depletion. CTL depletion produced a slightly increased endpoint tumor volumes in both genotypes, but the increase did not reach statistical significance. Together, these observations

suggest that genetic deletion of *Ppm1d* in immune cells suppressed the growth of isograft tumors in immune-competent mice through increased infiltration of neutrophils.

Wip1 inhibition affects neutrophil phenotypes. Recent work has demonstrated that neutrophils are heterogeneous, but the ontogenies and phenotypes of neutrophil subtypes remain incompletely understood^{53–55}. A relevant aspect of neutrophil diversity is their potential polarization as antitumor N1 or pro-tumor N2 subtypes^{56,57}. We investigated the effects of inhibition of Wip1 phosphatase activity by GSK2830371, a potent and specific inhibitor⁵⁸, or genetic knockout of *Ppm1d* on the characteristics of isolated human and mouse neutrophils. When cultured in normal media, isolated human donor blood neutrophils are short-lived, with only 30% surviving 24 h and 5% surviving 36 h; inhibition of Wip1 phosphatase activity with GSK2830371 did not discernably alter the survival of nonactivated neutrophils (Fig. 3a). Compared with normal media, incubation with tumor-conditioned media (TCM) significantly extended their survival, both at 24 h and 36 h, whereas activation with TCM in the presence of GSK2830371 resulted in further significantly increased survival. Correspondingly, tumor-associated neutrophils (TANs) isolated from B16F10 tumors engrafted in *Ppm1d*^{KO2/KO2} mice compared with *Ppm1d*^{+/+} mice exhibited significantly increased survival during TCM culturing (Supplementary Fig. 4a). Hence, loss of Wip1 activity by chemical inhibition or genetic deletion acts synergistically with soluble factors secreted by tumor cells to extend neutrophil lifespan. Transient production of reactive oxygen species (ROS) through a respiratory burst is a neutrophil effector capability associated with antimicrobial and antitumor activity. Inhibition of Wip1 by GSK2830371 produced a dose-dependent increase in ROS production following PMA stimulation of TCM-activated human donor blood neutrophils (Fig. 3b). Similarly, PMA activation of TCM-stimulated murine BM neutrophils isolated from *Ppm1d*^{KO2/KO2} mice exhibited significantly increased ROS production, compared with similarly treated *Ppm1d*^{+/+} BM neutrophils (Supplementary Fig. 4b), consistent with a previous report²⁷. Treatment of WT BM neutrophils with GSK2830371 in TCM prior to PMA stimulation did not significantly increase ROS production. Human neutrophils isolated from healthy donor blood displayed multilobed nuclei characteristic of mature neutrophils; incubation with TCM for 6 h resulted in the prevalence of neutrophils with highly segmented nuclei; addition of GSK2830371 further increased the frequency of highly segmented nuclear morphology (Fig. 3c and Supplementary Fig. 4c). In the absence of GSK2830371, prolonged incubation with TCM resulted in sparse neutrophil survival amid apoptotic neutrophils displaying condensed nuclei, whereas addition of GSK2830371 reduced the incidence of apoptotic cells. In agreement with a previous report²⁷, genetic knockout of *Ppm1d* increased the prevalence of neutrophils with highly segmented nuclei (Supplementary Fig. 4d). Hence, genetic ablation of *Ppm1d* or chemical inhibition of Wip1 alters cell-intrinsic characteristics of human or mouse neutrophils consistent with increased N1 polarization.

Through interactions with tumor cells, stromal cells, and other immune cells, neutrophil polarity can influence the cytokine posture of the TME^{59,60}. We determined the levels of selected pro- or anti-inflammatory cytokine mRNAs in B16 F10 melanoma tumors isolated from WT or Wip1 KO hosts. Tumors from *Ppm1d*^{KO2/KO2} mice expressed increased levels of TNF α mRNA and reduced levels of IL-4, IL-10, Mmp9, Tgfb, and Vegf mRNAs, compared with tumors isolated from *Ppm1d*^{+/+} mice (Fig. 3d). TNF α has been shown to induce N1 phenotypes in neutrophils⁶¹. In contrast, Tgfb has been implicated in tumor immune suppression and has been shown to induce N2 phenotypes in neutrophils⁵⁶. Compared with N1 neutrophils, N2 neutrophils

express higher levels of the cytokines IL-4 and IL-10, the extracellular remodeling factor Mmp9, and the angiogenesis-promoting factor Vegf⁶². We further used a multiplexed bead-based method to quantify the levels of selected cytokines in B16 tumors from *Ppm1d*^{+/+} and *Ppm1d*^{KO2/KO2} mice. The levels of IFN γ and IL-1B were significantly higher and the levels of IL-4, IL-10, and MMP9 were significantly lower in tumors from *Ppm1d*^{KO2/KO2} mice compared with *Ppm1d*^{+/+} mice (Fig. 3e). Exposure to high levels of IFN γ can increase N1 neutrophil polarization⁶¹.

Inactivation of Wip1 in neutrophils promotes tumor suppression. To confirm that Wip1-deficient neutrophils suppressed tumor growth in the absence of Wip1 deletion in adaptive immune cells, we generated mouse lines with myeloid targeting of Wip1 knockout. Among available mouse strains, none exhibits exclusive activity in neutrophils; we chose two models, *LysM-cre* and *Mrp8-cre*^{Tg}, that exhibit high cre activity in neutrophils and differ in their activity profile in other myeloid immune subtypes⁶³. In *MRP8-cre*^{Tg} mice, expression of cre recombinase is driven by the *Mrp8* (*S100a8*) promoter and is highly active in neutrophils and granulocyte-macrophage precursors⁶⁴. We successively crossed *Ppm1d*^{fl/fl} mice with *MRP8-cre*^{Tg} mice to produce *Ppm1d*^{fl/fl}; *Tg(S100A8-cre-EGFP)*^{fl/w} mice, referred to herein as *Ppm1d*^{MRP8-cre} mice. *Ppm1d*^{MRP8-cre} mice exhibited significantly reduced growth of B16 melanoma tumors (Fig. 4a). To further test the importance of deletion of Wip1 in myeloid cells, we used a second myeloid-targeting model. In *LysM-cre* mice, expression of cre recombinase is driven by the lysozyme 2 gene, which is highly active in myeloblasts and their monocyte, macrophage, and granulocyte progeny^{65,66}. Through successive intercrosses of *LysM-cre* mice with *Ppm1d*^{fl/fl} mice, we produced *Ppm1d*^{fl/fl}; *Lyz2*^{tm1(cre)1lo} mice, referred to herein as *Ppm1d*^{LysM-cre} mice (Supplementary Fig. 5a). We further crossed *Ppm1d*^{LysM-cre} mice with R26R-EYFP reporter mice⁴⁶ to demonstrate genetic deletion of *Ppm1d* (Supplementary Fig. 5b) and loss of Wip1 protein expression (Supplementary Fig. 5c) in Cd11b⁺, YFP⁺ myeloid cells. Similar to the above results, *Ppm1d*^{LysM-cre} mice exhibited significantly reduced growth of B16 melanoma tumors (Fig. 4b) and LLC1 lung tumors (Fig. 4c), compared with *Ppm1d*^{fl/fl} mice.

We characterized immune infiltrates in LLC1 lung cancer tumors in *Ppm1d*^{fl/fl} and *Ppm1d*^{LysM-cre} mice (Fig. 4d). The numbers of CD4⁺ T cells were significantly reduced and the numbers of CD8⁺ T cells were significantly increased in *Ppm1d*^{LysM-cre} mice compared with *Ppm1d*^{fl/fl} mice, suggesting an increased antitumor engagement of the adaptive immune system. The numbers of NKp46⁺ natural killer cells and of F4–80⁺ macrophages did not differ significantly in tumors from *Ppm1d*^{LysM-cre} mice compared with *Ppm1d*^{fl/fl} mice. Similar to *Ppm1d*^{Fes-cre} mice, the numbers of TANs were approximately fourfold higher in tumors engrafted in *Ppm1d*^{LysM-cre} compared with *Ppm1d*^{fl/fl} mice ($p = 0.031$). Moreover, as indicated by significantly higher expression of Granzyme B and CD69 markers, CD8⁺ cells infiltrated in B16 F10 tumors in *Ppm1d*^{LysM-cre} mice were more highly activated, compared with WT mice (Fig. 4e). We confirmed the increased infiltration of neutrophils in *Ppm1d*^{LysM-cre} mouse tumors by IHC (Supplementary Fig. 5d, e). The chemokine receptor *Cxcr2* regulates important aspects of neutrophil behavior, including release from the bone marrow and retention at sites of inflammation, including tumors⁶⁶. Previously, neutrophilia in *Ppm1d*^{KO/KO} mice was attributed to increased neutrophil *Cxcr2* expression²⁷. We found that the expression levels of *Cxcr2* mRNA were significantly higher in *Ppm1d*^{KO2/KO2} TANs infiltrated in B16 F10 tumors, compared with *Ppm1d*^{fl/fl} TANs (Supplementary Fig. 5f). To test whether this is a cell-intrinsic characteristic, we adoptively transferred YFP⁺, *Ppm1d*^{+/+}, *LysM-cre*, or YFP⁺, *Ppm1d*^{fl/fl}, and *LysM-cre*

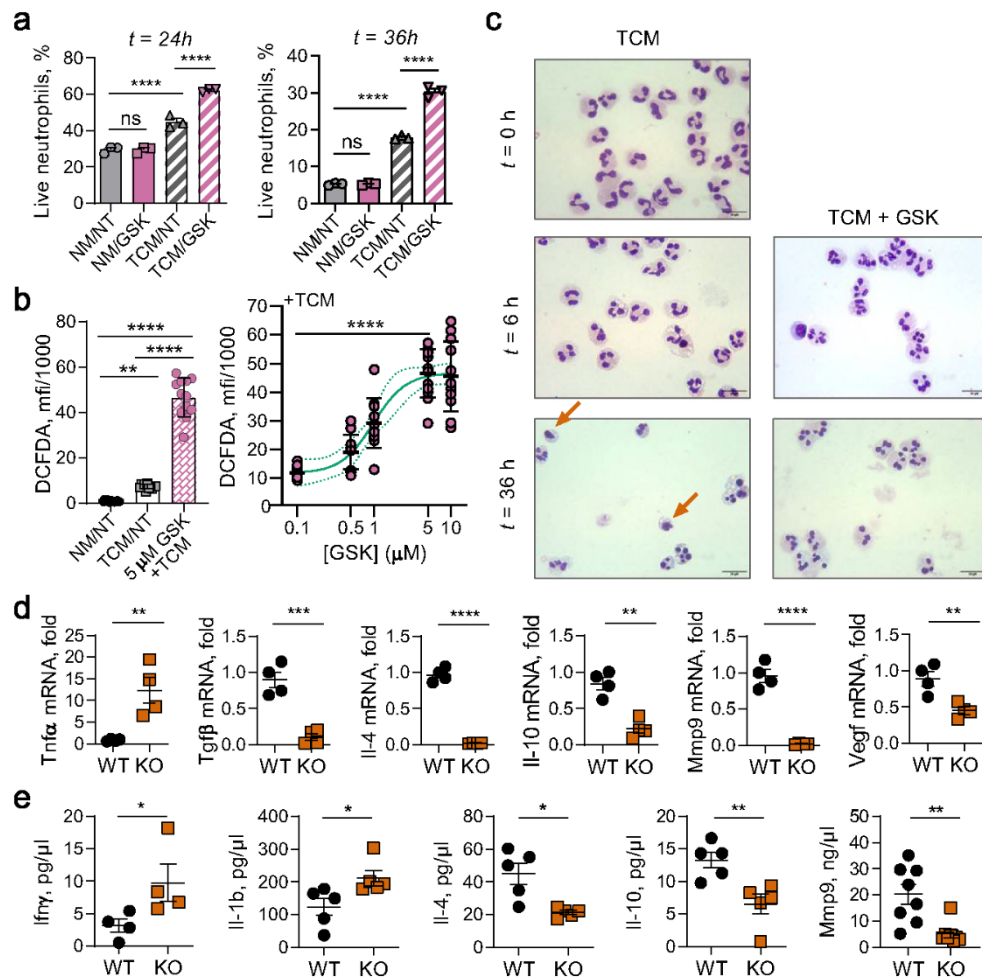


Fig. 3 *Ppm1d*-deficient mouse and *Wip1*-inhibited human neutrophils exhibit characteristics of N1 neutrophils. **a** Survival of human donor blood neutrophils. Freshly isolated neutrophils were cultured in regular media (NA) or in tumor-conditioned media (TCM) and treated with vehicle (NT) or 5 μ M GSK2830371 (GSK) for 24 h (left panel) or 36 h (right panel); $n = 3$ for each condition. **b** DCFDA (2',7'-dichlorofluorescein diacetate) fluorescence as an indicator of reactive oxygen species (ROS) production by donor blood human neutrophils preincubated with vehicle or the indicated concentrations of GSK2830371 for 6 h before activation with PMA ($n = 12$ for each condition). One-way ANOVA with Kruskal-Wallis' multiple-comparison test, $p < 0.05$; **, $p < 0.001$; ****. **c** Morphology of human donor blood neutrophils cultured in tumor-conditioned medium (TCM) with vehicle (TCM) or 5 μ M GSK2830371 (TCM + GSK) for 6 or 36 h. Red arrows indicate apoptotic neutrophils with condensed nuclei. Cytospin spreads were stained with May-Grünwald Giemsa solution and visualized by light microscopy. Scale bar, 20 μ m (one representative experiment out of 6 is shown). **d** Relative mRNA levels of various cytokines in B16 melanoma tumors isolated 16 days after engraftment in *Ppm1d*^{+/+} (WT) or *Ppm1d*^{KO2/KO2} (KO) mice ($n = 4$ for each genotype). **e** Multiplexed bead-based (Luminex) determination of selected cytokine protein levels in B16 tumor lysates from *Ppm1d*^{+/+} (WT) and *Ppm1d*^{KO2/KO2} (KO) mice ($n = 4$ for each genotype for IFN γ , $n = 5$ for each genotype for Il-1 β , 4, 10, and $n = 8$ for each genotype for MMP9). Data are depicted as means \pm SEM. Student's *t* test (two-tailed) (**d**), Mann-Whitney test (two-tailed) (**e**), or ordinary one-way ANOVA with Sidak's multiple-comparison test (**a**): * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$. Source data are provided as a Source Excel Data file.

neutrophils to wild-type mice bearing B16 F10 tumors; YFP + neutrophils with deletion of *Wip1*- infiltrated tumors in significantly higher numbers compared with wild-type *Wip1* YFP + neutrophils (Fig. 4f).

Based on EYFP reporter activity, both the *LysM*-cre and *MRP8*-cre models effectively produce deletion in 70–80% of neutrophils⁶³. Based on the activity profiles of the *LysM*-cre and *MRP8*-cre models, we cannot exclude a possible involvement of

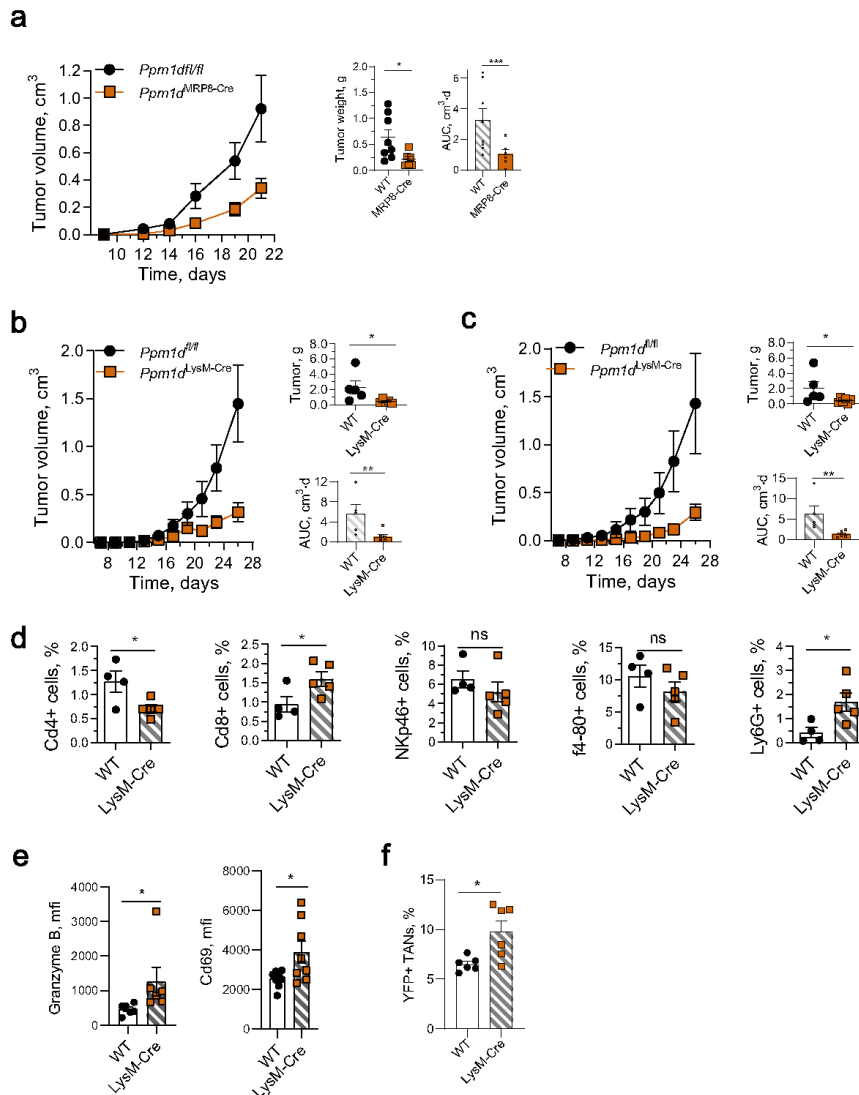


Fig. 4 *Wip1* deficiency in myeloid immune cells suppresses the growth of solid tumors. **a** Tumor volume (left), endpoint tumor weights (center), and AUC (right) for growth of B16 F10 tumors in *Ppm1d^{fl/fl}* ($n=8$) and *Ppm1d^{MRP8-Cre}* ($n=6$) mice. **b** Tumor volume (left), endpoint tumor weights (upper right), and tumor growth area under the curve (AUC) (lower right) for growth of B16 F10 melanoma tumors in *Ppm1d^{fl/fl}* ($n=5$) and *Ppm1d^{LysM-Cre}* ($n=6$) mice. **c** Tumor volume (left), endpoint tumor weights (upper right), and AUC (lower right) for growth of LLC1 lung carcinoma tumors in *Ppm1d^{fl/fl}* ($n=5$) and *Ppm1d^{LysM-Cre}* mice ($n=6$). **d** Infiltration by immune cell subsets into LLC1 tumors engrafted in *Ppm1d^{fl/fl}* (WT, $n=4$) and *Ppm1d^{LysM-Cre}* (LysM-Cre, $n=5$) mice. **e** Expression of activation markers in CD8+ T cells infiltrated in B16 F10 tumors in *Ppm1d^{fl/fl}* (WT, $n=5$) and *Ppm1d^{LysM-Cre}* (LysM-Cre) mice on day 16 (Granzyme B— $n=6$, Cd69— $n=8$ each genotype). **f** Infiltration of B16 F10 tumors by YFP+ WT^{LysM-Cre} or YFP+ *Ppm1d^{LysM-Cre}* neutrophils after their adoptive transfer in wild-type tumor-bearing mice ($n=6$ for each genotype). Data are depicted as means \pm SEM. Student's *t* test (two-tailed) (panels **d**, **e** and panels **a**, **b**, **c**: tumor weights) or Mann-Whitney test (two-tailed) (panels **a**, **b**, **e**: AUC, and panel **f**): * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ (one representative experiment out of 3 is shown for panel **a**, **b** and one out of 2 is shown for panel **f**). Source data are provided as a Source Excel Data file.

Wip1-deficient macrophages in tumor suppression. The possible roles of Wip1-deficient macrophages in the TME lie outside the scope of the current investigation. In combination, the observed substantial increase in tumor infiltration by Wip1-deficient neutrophils, but not Wip1-deficient macrophages (Fig. 2d), and the complete reversal of tumor suppression in Wip1-deficient mice by depletion of neutrophils (Fig. 2f), suggests that Wip1-deficient neutrophils are primarily responsible for the observed phenotype in our models.

Wip1 inhibition increases expression of 4-1BBL and OX-40L.

The activity of cytotoxic CD8 + T cells, the main mediators of antitumor immunity, can be modulated through interactions with neutrophils^{59,67}. At early stages of human lung cancer, neutrophils contribute to the antitumor response by stimulating CD8 + T cells through the 4-1BBL/4-1BB and OX-40L/OX-40 pathways⁵. We investigated the effects of chemical inhibition of Wip1 in neutrophils isolated from human donor blood on their ability to costimulate the proliferation of human donor blood T cells (Fig. 5a). CD3/28-activated human CD8 + T cells exhibited significantly increased proliferation compared with non-activated CD8 + T cells; coculturing with GSK2830371-pretreated human neutrophils further increased proliferation, whereas coculturing with nontreated human neutrophils had no additional effect. In addition, we observed significantly increased proliferation of CD3/28-activated murine CD8 + T cells following coculturing with *Ppm1d*^{+/+} (WT) neutrophils, GSK2830371-treated WT neutrophils, or *Ppm1d*^{KO2/KO2} (KO) neutrophils, compared with activated CD8 + T cells cultured alone (Fig. 5b). Activation of murine CD8 + T cells by itself did not significantly increase their proliferation, or *Ppm1d*^{KO2/KO2} (KO) neutrophils, compared with activated CD8 + T cells cultured alone (Fig. 5b). Genetic deletion of *Ppm1d* or chemical inhibition of Wip1 activity in neutrophils increased the proliferation of cocultured human or mouse T cells.

Proliferation of CD8 + T cells requires combined signaling through the T-cell receptor (TCR) and costimulatory pathways that include the 4-1BB and OX-40 receptors; the respective ligands, 4-1BBL and OX40L, are often expressed by antigen-presenting cells and are critical for stimulating the proliferation and activation of cytotoxic T cells^{68,69}. We investigated whether expression of these costimulatory ligands in neutrophils was affected by Wip1 phosphatase. The relative levels of 4-1BBL and OX40L mRNAs were significantly higher in B16 TANs from tumors engrafted in *Ppm1d*^{KO2/KO2} compared with *Ppm1d*^{+/+} (WT) mice (Fig. 5c). For both 4-1BBL and OX-40L, the respective mRNA levels were nearly the same in WT PBNs as in WT TANs, but the levels were higher in KO PBNs or following incubation with GSK2830371. These results suggest that genetic deletion of *Ppm1d* or the loss of Wip1 activity in neutrophils increased the expression of the costimulatory ligands 4-1BBL and OX40L in neutrophils.

Among its many functions, the tumor suppressor p53 regulates immune responses in the tumor microenvironment^{9,10}. p53 regulates the expression of several tumor necrosis factor super family (TNFSF) cytokines, including 4-1BBL (TNFSF9) and OX-40L (TNFSF4)^{70–72}. We used the public p53 Binding and Expression Resource (BAER)⁷³ to examine the correlation between p53 binding to chromatin near the TNFSF9 and TNFSF4 genes and changes in their expression. Chip-seq data for the TNFSF9 gene show a peak of p53 occupancy in chromatin +47 kb from the transcription start site (TSS) in lymphocytes and selected cancer cell lines (Supplementary Fig. 6a). In the corresponding differential gene expression data sets, TNFSF9 was significantly (adjusted $p < 0.01$) and substantially (fold change >1.5) upregulated in lymphocytes and fibroblasts treated with doxorubicin (DXR) but not in lymphocytes or U2OS cells

treated with Nutlin^{73,74}. Interestingly, the genomic region +47 kb from the TNFSF9 TSS functions as an enhancer to regulate expression of TNFSF9 and CD70, another TNFSF costimulatory cytokine⁷⁵. In the same datasets, chip-seq data for the TNFSF4 gene show a peak of p53 occupancy in chromatin in intron 1 (+1.3 kb from the TSS or –0.5 kb from an alternative TSS) (Supplementary Fig. 6b). Both regions of high p53 chromatin occupancy contain a sequence resembling the canonical p53 response element (Supplementary Fig. 6c). To provide additional support for p53-dependent induction of the TNFSF9 (4-1BBL) and TNFSF4 (OX-40L) genes, we constructed plasmids expressing luciferase under the control of the TNFSF9 or TNFSF4 promoters and transfected these reporter vectors into HCT116 cells with or without functional p53 (Fig. 5d). With both reporter vectors, we observed significantly increased luciferase activity in HCT116 cells with WT p53 (WT) compared with HCT116 cells lacking p53 (*p53*^{-/-}).

Through intercrosses of mice bearing the *Ppm1d*^{KO2} and *Trp53*^{KO}^{14,15} knockout alleles, we obtained mice with homozygous double knockout of Wip1 and p53 (*Ppm1d*^{KO2/KO2}; *Trp53*^{KO/KO}, DKO) and investigated the growth of B16 F10 tumors in *Ppm1d*^{fl/fl} (WT), *Ppm1d*^{KO2/KO2}, and DKO mice. The levels of 4-1BBL and OX-40L mRNAs in B16 TANs from *Ppm1d*^{KO2/KO2} mice were significantly increased compared with their respective levels in B16 TANs from WT mice (Fig. 5e). Importantly, the relative mRNA levels for both costimulatory cytokines, although higher, were not significantly increased in B16 TANs from DKO mice compared with B16 TANs from WT mice. We further investigated the rates of B16 melanoma tumor growth WT, KO, and DKO mice (Fig. 5f). In agreement with our earlier results, the growth of B16 F10 tumors in *Ppm1d*^{KO2/KO2} mice was significantly reduced compared with *Ppm1d*^{fl/fl} mice. Deletion of p53 substantially increased the rate of tumor growth compared with either WT or *Ppm1d*^{KO2/KO2}. Thus, deletion of p53 attenuated antitumor activity of Wip1-deficient hematopoietic cells both in vitro and in vivo.

In addition, we have verified at protein level, that both ligands 4-1BBL and OX-40L are highly expressed on the surface of *Ppm1d*-deficient neutrophils isolated from bone marrow, spleen, and blood (Fig. 5g). Moreover, the neutralization of 4-1BBL and OX-40L on the surface of cells with specific antibodies in *Ppm1d*^{lysM-cre} mice attenuated the tumor-suppressive effect of *Ppm1d* deletion in myeloid cells and significantly accelerated the tumor growth to the same ratio as in wild-type mice (Fig. 5h).

Wip1 inactivation in myeloid cells potentiates antitumor therapies. Our results show that Wip1 is an important modulator of neutrophil behavior, especially as it relates to the organismal antitumor immune response. In four out of five patients with lung cancer, PPM1D mRNA levels were significantly elevated in either TANs, neutrophils isolated from peritumor tissues (pTANs), or both, compared with the patient's PBN PPM1D mRNA levels (Fig. 6a). In addition, we investigated the expression level of *Ppm1d* mRNA in neutrophil populations in tumor-free and B16 F10 melanoma tumor-bearing WT mice (Fig. 6b). Compared with *Ppm1d* mRNA levels in BM neutrophils from tumor-free WT mice, *Ppm1d* mRNA levels were significantly increased both in BM neutrophils from tumor-bearing mice and in TANs. Next, we used heterozygous *Ppm1d*^{+/-KO2} mice, in which the KO2 allele expresses *Escherichia coli* β -galactosidase (*LacZ*) under the control of the endogenous *Ppm1d* promoter. Compared with *Ppm1d* promoter activity in PBNs, *Ppm1d* promoter activity was significantly higher in B16 TANs and spleen neutrophils (Fig. 6c).

Our findings suggest that in the tumor microenvironment, Wip1 deficiency reprograms neutrophils toward higher antitumor

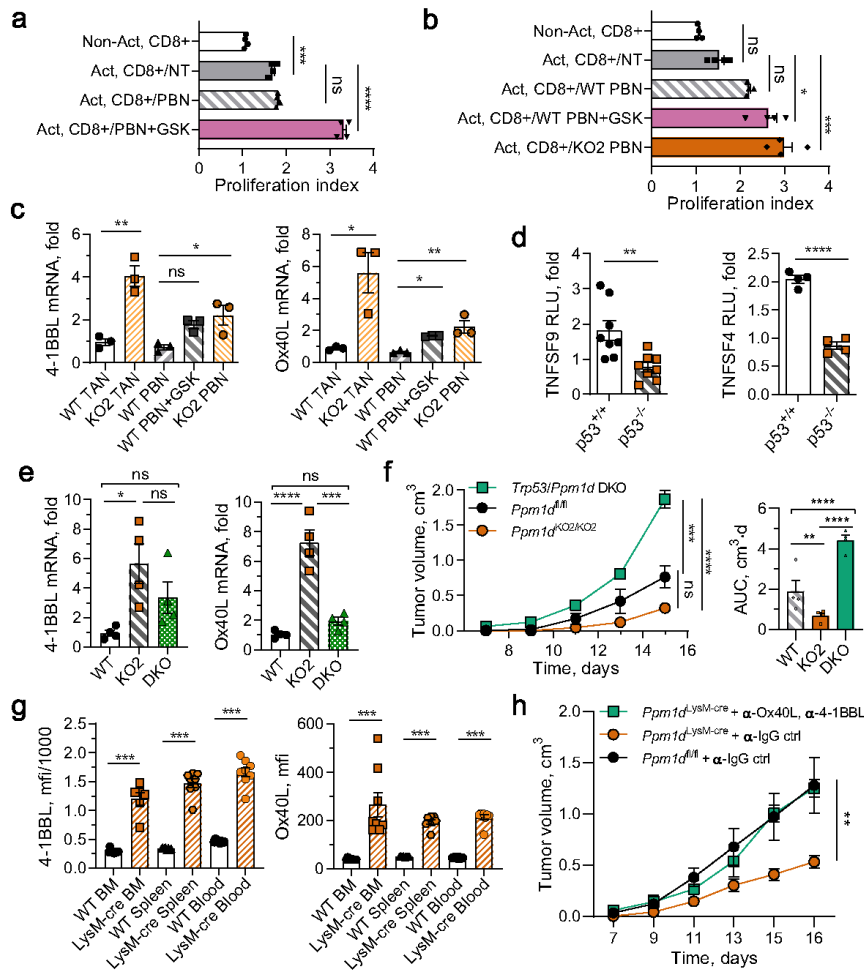


Fig. 5 Chemical inhibition of Wip1 or genetic knockout of *Ppm1d* in neutrophils increased cytotoxic T-cell survival through p53-dependent induction of costimulatory ligands. **a** Proliferation of human cytotoxic T lymphocytes. Human donor blood CD8+ lymphocytes were not activated (Non-Act) or activated by incubation with CD3/28 beads (Act.) and cultured alone (NT), or coincubated with isolated human donor blood neutrophils pretreated for 6 h with vehicle (PBN) or 5 μ M GSK2830371 (PBN + GSK) ($n = 4$ each condition). **b** Proliferation of murine cytotoxic T lymphocytes. *Ppm1d*^{+/+} peripheral blood Cd8+ lymphocytes were not activated (NT) or activated by incubation on CD3/28-coated plates (Act.) and cultured alone (NT), coincubated with *Ppm1d*^{+/+} neutrophils pretreated for 6 h with vehicle (WT PBN) or 5 μ M GSK2830371 (WT PBN + GSK), or coincubated with *Ppm1d*^{KO2/KO2} neutrophils (KO PBN) ($n = 4$ each condition). **c** Expression of 4-1BBL mRNA (left panel) and OX40L mRNA (right panel) in neutrophils isolated from B16 tumors engrafted in *Ppm1d*^{+/+} mice (WT TAN) or *Ppm1d*^{KO2/KO2} mice (KO TAN), isolated from PB of *Ppm1d*^{+/+} mice and treated for with vehicle (WT PBN) or 5 μ M GSK2830371 (WT PBN + GSK), or isolated from PB of *Ppm1d*^{KO2/KO2} mice (KO PBN) ($n = 3$ each condition). **d** Luciferase reporter assay of HCT116 p53^{+/+} and HCT116 p53^{-/-} cells transfected with pGL3 vector expressing luciferase under regulation of the human TNFSF9 (4-1BBL) promoter (left panel, $n = 8$) or the human TNFSF4 (OX40L) promoter (right panel, $n = 4$). **e** Relative levels of 4-1BBL mRNA (left panel) and OX40L mRNA (right panel) in PBNs isolated from *Ppm1d*^{+/+} mice (WT), *Ppm1d*^{KO2/KO2} mice (KO), or *Ppm1d*^{KO2/KO2}/*Trp53*^{KO/KO} double-knockout mice (DKO) ($n = 4$ each genotype). **f** Tumor volume (left) and AUC (right) for growth of B16 F10 tumors in *Ppm1d*^{fl/fl} (WT), *Ppm1d*^{KO2/KO2} (KO2), or *Trp53*/*Ppm1d* double-knockout (DKO) mice ($n = 4$ each genotype). **g** Expression of 4-1BBL (left panel) and OX40L (right panel) protein levels on the surface of PPM1D^{KO2/KO2} neutrophils isolated from bone marrow, spleen, and blood ($n = 8$ each, except LysM-Cre BM $n = 6$). **h** Tumor volume for growth of B16 F10 tumors in *Ppm1d*^{fl/fl} mice after inactivation of 4-1BBL and OX40L ligands on the surface of cells with serial injection of neutralizing anti-4-1BBL and anti-OX40L antibodies ($n = 4$ for each group, except *Ppm1d*^{fl/fl} + α -IgG ctrl $n = 7$). Data are depicted as means \pm SEM. Student's unpaired t test (two-tailed) (panel **d**) and Mann-Whitney's test (two-tailed) (panel **g**), one-way ANOVA (panels **a-c**, **e**, **f**), or two-way ANOVA (**h**): * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ (one representative experiment out of three is shown for panels **f** and **h**). Source data are provided as a Source Excel Data file.

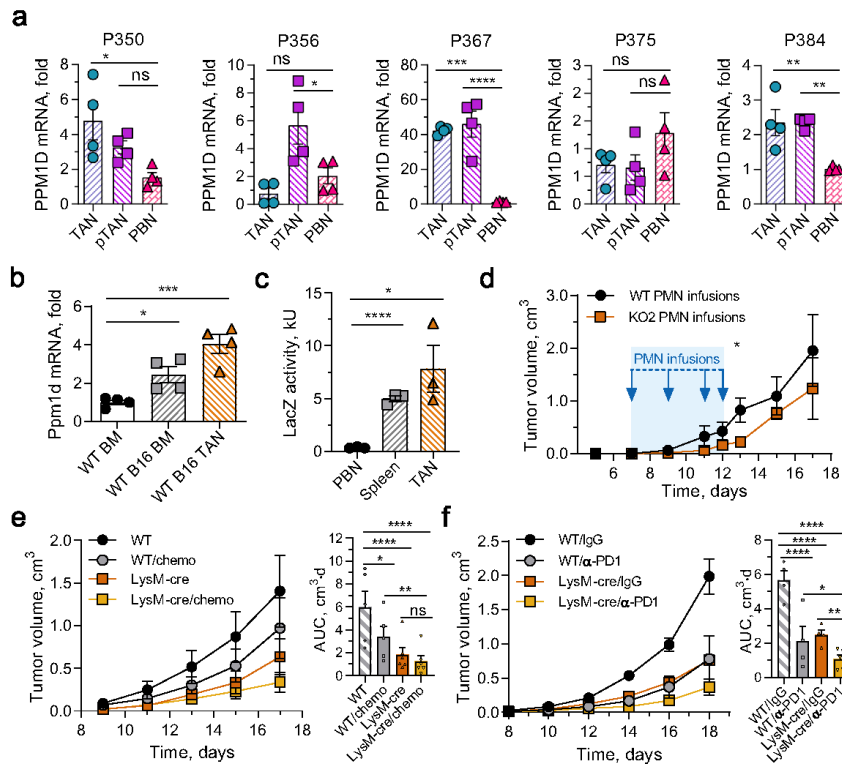


Fig. 6 Tumor-associated neutrophils express high levels of *Wip1* and inactivation of *Wip1* in myeloid cells enhances antitumor responses. **a** Relative PPM1D mRNA levels in neutrophils isolated from surgically resected tumors (TAN), peri-tumor tissues (pTAN), or peripheral blood (PBN) from five patients with Stage I–II lung cancer ($n = 5$ different patients examined over 4 individual experiments). **b** Relative *Ppm1d* mRNA levels in neutrophils isolated from bone marrow of naive (WT BM) or B16 tumor-bearing (WT BM B16) *Ppm1d*^{+/+} mice and from B16 tumors engrafted in *Ppm1d*^{+/+} mice (WT TAN B16) ($n = 4$ each condition). **c** Flow cytometry analysis of LacZ activity in neutrophils isolated from peripheral blood (PBN), spleen (Spleen), or B16 tumors (TAN) of tumor-bearing *Ppm1d* promoter LacZ reporter mice (*Ppm1d*^{+/K₀2}) ($n = 3$ each condition). **d** Growth of B16 melanoma tumors in WT mice treated on days 7, 9, 11, and 12 (blue arrows) with injection of neutralizing anti-Ly6G⁺ antibodies to deplete host neutrophils and infusion of *Ppm1d*^{+/+} (WT PMN) or *Ppm1d*^{K₀2/K₀2} (KO PMN) donor neutrophils ($n = 4$ each genotype). **e** Tumor volume (left) and AUC (right) for growth of B16 F10 tumors in *Ppm1d*^{+/+} (WT, $n = 5$ each condition) and *Ppm1d*^{LysM-Cre} (*LysM-Cre*, $n = 6$ each condition) mice without and with oxaliplatin+5FU combination chemotherapy (chemo). **f** Tumor volume (left) and AUC (right) for growth of B16 F10 tumors in *Ppm1d*^{+/+} (WT, $n = 4$ each condition) and *Ppm1d*^{LysM-Cre} (*LysM-Cre*, $n = 4$, untreated, $n = 5$ α -PD1) mice without and with anti-PD1 antibody treatment (α -PD1). Data are depicted as means \pm SEM. One-way ANOVA with Dunnett's (a–c) or Sidak's (e, f) multiple-comparison test or Student's *t* test (two-tailed) (d, day 13): * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$ (one representative experiment out of two is shown for panel d and out of three is shown for panel e, f). Source data are provided as a Source Excel Data file.

potential, in part through increased expression of lymphocyte costimulatory ligands. These observations may have potential therapeutic utility. Although the recently developed *Wip1* inhibitor is potent and specific, it exhibits poor pharmacokinetics⁵⁸. Moreover, systemic inhibition of *Wip1* produces both direct effects of *Wip1* inhibition in tumor cells and indirect effects of *Wip1* inhibition in infiltrated immune cells. To test whether inhibition of *Wip1* activity in neutrophils enhances antitumor responses, we treated tumor-bearing WT mice with serial WT or *Ppm1d*^{K₀2/K₀2} neutrophil infusions. Mice receiving *Wip1*-deficient neutrophil infusions showed significantly slower growth of B16 melanoma tumors compared with mice receiving WT neutrophil infusions (Fig. 6d and Supplementary Fig. 7a). Interestingly, tumor growth in

mice treated with *Wip1*-deficient neutrophils accelerated rapidly when treatment was stopped after day 12.

We investigated the potential benefits of combining conventional chemotherapy or current immune checkpoint inhibitor therapy with ablation of *Wip1* activity in neutrophils. Treatment with oxaliplatin and 5FU significantly delayed the growth of B16 F10 melanoma tumors in WT mice, but did not significantly delay tumor growth in *Ppm1d*^{LysM-Cre} mice; combining chemotherapy with *Wip1* deficiency in neutrophils resulted in greater tumor suppression (Fig. 6e). Similarly, combining anti-PD1 antibody treatment with *Wip1* deficiency in neutrophils more effectively reduced melanoma tumor growth compared with monotherapy with anti-PD1 or *Wip1* deficiency alone (Fig. 6f).

Discussion

Chemotherapy remains one of the main treatment strategies in oncology, but the effects of cytotoxic treatments on the immune system and immune cell–tumor interactions in the TME are currently active areas of investigation. Activation of the DNA damage response pathway by chemotherapeutic drugs not only induces tumor cell lethality, but additionally remodels the TME and alters antitumor immune responses. DNA damage-induced activation of the p53 signaling pathway exerts cell-type-specific selective pressures. In tumors, chemotherapy-induced selection leads to the survival of clones of tumor cells bearing mutations that afford increased resistance to cytotoxic treatments. In the hematopoietic system, chemotherapy-induced selection may lead to CH, in which the presence of somatic mutations of critical genes in hematopoietic progenitors provides survival and proliferative advantages under cytotoxic selection and produces clonal expansion of hematopoietic progeny with altered phenotypes⁷⁶. Among CH driver genes, mutations in *PPM1D* and *TP53* were most significantly associated with prior exposure to chemotherapy⁷⁷. *PPM1D* “gain-of-function” mutations provide selective advantage in tumor cells^{32,78,79} and in the hematopoietic system, resulting in therapy-induced CH^{40,80}. Interestingly, the splice variant *PPM1D430*, which shares salient characteristics with CH-associated *PPM1D* PTVs and has been detected in several cancer cell lines, is expressed only in leukocytes and testes, among normal tissues tested⁸¹.

The presence of *PPM1D* protein-stabilizing PTVs in the blood cells of patients with several types of solid tumors correlates with worse outcomes^{31,33–36,82}. Our study suggests a possible mechanism linking the presence of clonal expansions of blood cells bearing *PPM1D* PTV mutations with worse outcomes for patients with neoplastic disease. Here we have shown that *Wip1* negatively regulates the antitumor functions of myeloid cells.

We observed that overexpression of *Ppm1d* in blood cells in mice accelerated the growth of solid tumors, whereas deletion of *Ppm1d* in blood cells suppressed tumor growth. The loss of *Wip1* expression in the hematopoietic system significantly increased the infiltration of solid tumors by myeloid granulocytes. Moreover, we observed that the suppression of tumor growth resulting from loss of *Wip1* depended on the presence of neutrophils.

Ppm1d-knockout mice exhibit marked neutrophilia that progresses with increasing age²⁸. Increased *Ppm1d* activity prevents the differentiation of common myeloid progenitors (CMPs) to pro-inflammatory mature granulocytes²⁷. We confirmed here that conditional deletion of *Ppm1d* in the hematopoietic system increased the number of neutrophils in mouse blood and altered neutrophil phenotypes.

During the early phase of tumorigenesis, neutrophils contribute to the antitumor immune response, possibly through stimulation of adaptive immunity and enhancement of CD8 + cytotoxic lymphocyte efficiency⁵. During the later stages, tumors evade recognition by the immune system and promote an immune-suppressive state through recruitment of myeloid-derived suppressive cells (MDSCs), including polymorphonuclear (PMN-MDSCs), which share phenotypic and morphologic features with neutrophils⁷. In the TME, MDSCs block the function of the immune effector cells, T-lymphocytes and NK cells, resulting in ineffective removal of tumor cells by the immune system; MDSCs seriously compromise the efficacy of cancer immunotherapies⁸³. Recently, strategies directed either to eliminate MDSCs or to reprogram PMN-MDSCs have been proposed to increase the efficiency of immune checkpoint inhibitors^{84,85}.

In our study, genetic depletion of *Ppm1d* in neutrophils transformed them into efficient activators of CD8 + cytotoxic lymphocytes, in part, through p53-dependent induction of

lymphocyte costimulating ligands 4-1BBL and OX-40L. Due to the limitation of conditional mouse models, we cannot completely exclude the possibility that certain subsets of monocytes/macrophages myeloid cells share some responsibility for the observed phenotype. Though in our model a single *Ppm1d* targeting anticancer strategy was already very efficient, the depletion of *Ppm1d* in myeloid cells potentiated both anticancer chemotherapy and anticancer immunotherapy. Increased CTL activation and survival is critical for efficacy of the chimeric antigen receptor T-cell (CAR-T) transfer and immune checkpoint therapy⁸⁶. There is a rationale for combining immune checkpoint therapy with genetic or chemical inhibition of *Wip1*. Currently, immune checkpoint therapies target negative regulators of cytotoxic T-lymphocytes and NK cells, such as *PD1*. In contrast, *Wip1* depletion elevates lymphocyte-stimulatory signals in the tumor microenvironment by inducing expression of the stimulatory ligands OX40L and 4-1BBL on the surface of tumor-associated neutrophils. Therefore, by targeting distinct components of the lymphocyte-regulating system, *Wip1* inhibition may potentiate anti-*PD1* therapy by making antitumor immunotherapy more efficient.

As a practical approach, inhibition of *PPM1D* activity by chemical compounds in neutrophils or their precursors could be a valuable strategy to increase the efficiency of current anticancer immunotherapies through CTL stimulation in the TME. This strategy will be particularly important in oncological patients with clonal hematopoiesis driven by *PPM1D*-activating mutations to improve treatment outcomes.

Methods

Patients. This study was approved by the Institutional Review Boards of the Hospital of the University of Pennsylvania. This study has complied with all relevant ethical regulations and informed consent from participants was obtained. Five patients with stage I–II lung cancer, who were scheduled for surgical resection, consented to tissue collection of a portion of their tumor and/or blood for research purposes. Detailed characteristics of the patients are provided in Supplementary table 1. For donors’ blood, ethical review and approval were done by the French Blood Transfusion Center (Etablissement Français du Sang Bourgogne Franche-Comté, Besançon, France). The blood samples were collected within the agreement between the EFS and the Bourgogne Franche-Comté University according to a national blood bank (Etablissement Français du Sang) rules and policies, with written informed consent specifying the exclusive research purpose and the respect of ethical guidelines.

Mouse models. All animals were bred and maintained in specific pathogen-free facilities in accordance with FELASA and Animal Experimental Ethics Committee guidelines (University of Burgundy, France) or with NCI Animal Care and Use Committee guidelines (NCI). This study complied with all relevant ethical regulations for animal testing and research and received ethical approval from the Animal Experimental Ethics Committee (University of Burgundy, France) or with the NCI Animal Care and Use Committee (NCI). Animals had water ad libitum and were fed regular chow. All experiments were carried out in accordance with guidelines prescribed by the Ethics Committee at the University of Burgundy and the NCI Animal Care and Use Committee. Experiments were performed in 8–12-week-old female of the immunocompetent C57BL/6 background. Littermate animals from different cages were randomly assigned into experimental groups and were either cohoused or systematically exposed to other groups’ bedding to ensure equal exposure to common microbiota.

The following strains were generated by our lab using resources from the trans-NIH Knock-Out Mouse Project⁴³: *Ppm1d*^{KO2} (C57BL/6-*Ppm1d*^{tm1bKOMP}/wts), *Ppm1d*^d (C57BL/6-*Ppm1d*^{tm1cKOMP}/wts), and *Ppm1d*^{R03} (C57BL/6-*Ppm1d*^{tm1dKOMP}/wts). The mouse strains C57BL/6J, R26R-EYFP (C57BL/6-*Gt(Rosa)26Sor^{td}(EYFP)Cos*)⁴⁶, *LysM*-cre (B6.129P2-*Lyz2*^{tm1(cre)Bj})⁶⁵, and *MRP8*-cre¹⁸ (B6.Cg-Tg(S100A8-cre-EGFP)^{118v}/y)⁶⁴ were purchased from The Jackson Laboratory. *Tp53*^{KO} mice (B6.129-Tp53^{tm1Brd/N})⁸⁷ were provided by L. Donehower (Baylor College of Medicine, Houston, TX, USA). β -actin-cre¹⁸ (C57BL/6J-Tg(β -actin-cre)) mice⁸⁸ and β -actin-*flp*¹⁸ (C57BL/6J-Tg(β -actin-*flp*)) mice⁸⁹ were provided by L. Tessarollo (Mouse Cancer Genetics Program, National Cancer Institute, Frederick, MD, USA). *Fes*-cre (C57BL/6-Tg(*Fes*-Cre)^{31Bd}) mice⁴⁴ were provided by P. P. Pandolfi (Beth Israel Deaconess Medical Center, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts, USA). *Ubc*-*Ppm1d* C57BL/6-Tg(*Ubc*-*Ppm1d*) mice^{51,52} were provided by D. Bulavin (Institute for Research on Cancer and Aging Nice, France).

Cell lines and primary cell cultures. Cell lines were obtained from ATCC and cultured at 37 °C in a humidified 5% CO₂ atmosphere in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (LLC1 and HTC116) or in RPMI-1640 Medium (B16 F10 and DLD-1) with 10% (v/v) fetal calf serum supplemented with penicillin-streptomycin/amphotericin B (PSA), and 4 mM of 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES). Cells were regularly tested for mycoplasma contamination. Commonly misidentified cell lines were not used.

Isolated CD3⁺ T cells were cultured in RPMI-1640 medium with 10% (v/v) fetal calf serum (heat-inactivated) supplemented with MEM nonessential amino acids (MEM-NEAA), sodium pyruvate, PSA, and 4 mM HEPES and stimulated with plate-bound antibodies against CD3 (2 µg/ml) and CD28 (2 µg/ml).

Cancer cell transplantation and organ harvest. B16 F10 murine melanoma cells (2 × 10⁵) (syngenic with C57BL/6 mice) or murine Lewis lung carcinoma (LLC1) cells (3 × 10⁵) (syngenic with C57BL/6 mice) suspended in 100 µl of Dulbecco-modified phosphate-buffered saline (DPBS) were injected subcutaneously into the right flanks of C57BL/6 mice. Tumor growth was monitored every second or third day using electronic calipers. Tumor size was calculated as (tumor volume = (length × width²)/2). The tumor growth Area Under the Curve metric integrates time-series data using trapezoidal approximation⁹⁰. Mice were euthanized when the tumor reached 1000–2000 mm³, organs were dissected, and single-cell suspensions were prepared from tumor tissue by mechanical disruption followed by enzymatic digestion of 4–6-mm pieces using a cocktail of Collagenases I (45–60 µg/ml), II (15–20 µg/ml) and IV (45–60 µg/ml), and 100 µg/ml DNase I (Roche) in RPMI medium, as described⁴⁵. Digestion mixtures were sequentially passed through 70-µm and 30-µm cell strainers and washed with PBS supplemented with 2 mM EDTA and 1% FBS. Following lysis of erythrocytes using red blood cell lysis buffer (RBC lysis buffer: 150 mM NH₄Cl, 10 mM KHCO₃, and 0.1 mM EDTA), cells were used for immune staining.

Bone marrow transplantation and chimeric mice. Bone marrow chimeric mice were obtained as described elsewhere^{91,92}. Briefly, pooled tibial and femoral bone marrow cells from donor mice were lysed with RBC lysis buffer and assessed for viability with trypan blue. Bone marrow cells were injected retro-orbitally into recipient WT mice (10⁷ cells per each recipient mouse) irradiated with a single dose of 9 Gy. Animals were maintained on trimethoprim-sulfamethoxazole (Hi-Tech Pharmacal) antibiotic water from 1 day prior through 2 weeks after irradiation. Tumor transplantation into chimeric mice was performed at least 8 weeks after reconstitution. Hematopoietic reconstitution of all animals was verified by blood composition analysis using a Scil Vet hemocytometer and by flow cytometry at the end of the experiment.

Mouse in vivo treatments. Depletion of neutrophils or T cells was affected by intravenous (iV) injection of 200 µg of anti-mouse Ly6G (clone 1A8) or anti-mouse CD8a (clone YTS 169.4) antibodies (Bio X Cell, West Lebanon, NH, USA). Immune cell depletion was verified by blood composition analysis using Scil Vet hemocytometer and flow cytometry analysis (Supplementary Fig. 7c, d). Depleting antibodies were first injected 48 h before tumor isograft implantation; subsequent injections of depleting antibodies were repeated every 3–4 days. BM cells were isolated from WT or *Ppm1d*^{KO2/KO2} mice, and BM PMNs were purified using MACS enrichment following the manufacturer's protocol, yielding BM PMNs of >90% purity and 95% viability, as determined by flow cytometry (Supplementary Fig. 7a). Mice were transfused with 2 × 10⁶ BM PMNs in 200 µL of physiological serum by retro-orbital injection (at days 7, 9, 11, and 12). For adoptive transfer of YFP + WT^{LysM-cre} and YFP + *Ppm1d*^{LysM-cre} neutrophils, neutrophils were isolated using Neutrophil Isolation Kit (Miltenyi Biotec) and sorted by FACS (ARIA III, BD Bioscience) (Supplementary Fig. 7b); B16 F10 tumor-bearing mice were then transfused 2 days before the endpoint with 2 × 10⁶ cells in 200 µL of physiological serum by retro-orbital injection. For chemotherapy treatment, mice received 5-fluorouracil (5-FU) (5 mg/kg) and oxaliplatin (6 mg/kg) via intraperitoneal injection once weekly (treatment on days 9 and 13). For anti-PD1 treatment, mouse received 200 µg of anti-PD1 (InVivoMab anti-mouse PD1) (Cd279) (clone RMP1-14) via intraperitoneal injection twice weekly (treatment on days 8, 11, 14, and 17). For anti-OX-40L and 4-1BBL treatment, mouse received 250 µg of anti-OX-40L (InVivoMab anti-mouse OX-40L) (Cd134L) (clone RM34L) and anti-4-1BBL (InVivoMab anti-mouse 4-1BBL) (Cd137L) (clone TKS-1) via intraperitoneal injection every 3 days (treatment on days 6, 9, 12, and 15).

Blood composition analysis. Age-dependent blood composition was analyzed in cohorts of *Ppm1d*^{fl/fl} and *Ppm1d*^{fl/fl}HSC mice (*n* = 10 each genotype). At intervals, a drop of blood from the tail vein was deposited in an EDTA-coated tube (BD Bioscience). Complete blood counts were performed using an automatic hematoanalyzer (ScilVet ABC plus).

Cell purification and in vitro coculture

Mouse. Naive CD3⁺ T cells were obtained from spleens and lymph nodes of C57BL/6 wild-type mice. Cells were purified using the MACS Cell Separation system (Pan T Cell isolation kit, Miltenyi Biotec). Neutrophils were obtained using a mouse Neutrophil Isolation Kit (Miltenyi Biotec). The purity of isolated T-cell

and neutrophil populations routinely exceeded 90%. Naive CD3⁺ T cells were stimulated with plate-bound antibodies against CD3 (2 µg/ml) and CD28 (2 µg/ml) (BioLegend) in the absence or presence of neutrophils. B16F10 cells were used as a source of TCM for ex vivo experiments with murine neutrophils.

Human. CD3⁺ T cells were obtained from buffy coat preparations of human healthy donor blood. T cells were purified using a Pan T Cell Isolation Kit and restimulated with a human T Cell Activation/Expansion Kit (Miltenyi Biotec). Neutrophils from the same donor were obtained by density-gradient centrifugation. TCM (tumor-conditioned media) was prepared by culturing human melanoma SK-MEL cells in DMEM/10% FBS for 72 h under standard cell culture conditions followed by filtration through a sterile 0.45-µm PVDF filter (Millipore).

Preparation of a single-cell suspension from tumor and adjacent lung tissue. Surgically removed fresh lung tumors and adjacent uninvolved lung tissue were processed within 20 min of removal from the patient following the protocol as previously described^{5,93}. Briefly, tumor and adjacent uninvolved lung tissue was sliced into 1–2-mm³ pieces and digested by enzymes. After 45 min, any visible tumor pieces were vigorously pipetted and then further incubated for 30–50 min under the same conditions. The supernatant was passed through a 70-µm nylon cell strainer (BD Falcon). The remaining pieces in the tube underwent further pipetting before being passed through the same cell strainer. Typically, less than 5% of the tissue remained on the cell strainer. After filtration, the red blood cells were lysed using 1x Red Blood Cell (RBC) Lysis Buffer (Santa Cruz, Dallas, TX). The remaining cells were washed twice in RPMI supplemented with 2% FBS and resuspended in the cell culture media.

Neutrophil isolation from human lung tumors. Since temperature gradients can activate neutrophils, all tissues and reagents were maintained at a constant temperature during preparation. After tumor harvest, the neutrophil populations used in this study were prepared at room temperature (RT) and rapidly utilized. TANs were isolated from tumor single-cell suspensions using positive selection of CD66b⁺ cells with microbeads as previously described^{5,93}. PBNs were obtained from EDTA anticoagulated peripheral blood collected from lung cancer patients during surgery or from healthy donors. The PBNs were obtained from Lymphoprep (Accu-Prep, 1.077 g/ml, Oslo, Norway) density-gradient centrifugation followed by erythrocyte lysis with 1x RBC Lysis Buffer. To account for any possible effect of tissue digestion enzymes on the function neutrophils, peripheral blood granulocytes were processed in a similar manner. Specifically, peripheral blood granulocytes were incubated with enzymatic cocktail before positive selection using microbeads.

Flow cytometry. Single-cell suspensions were resuspended in BD stain buffer (BD Bioscience) for 15 min prior to staining with specific antibodies. Antibodies against cell markers: anti-CD45, anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8a, anti-CD11b, anti-F4/80, anti-Ly6G, anti-Ly6C, anti-NKp46(CD335), anti-B220, and anti-CD69, were purchased from BD Bioscience and BioLegend; anti-OX40L and anti-41BBL from Miltenyi Biotec (detailed in Supplementary table 4). Samples were mixed with FVS700 (1/7000) and data were acquired on an LSR Fortessa flow cytometer (BD Biosciences) and analyzed with FlowJo software (Tree Star). ROS generation in cultured neutrophils was determined using either DCFDA/H2DCFDA-Cellular ROS Assay Kit (ab113851) following the manufacturer's protocol or a dihydroethidium (DHE) fluorescent probe. Cells were incubated with DHE (10 µM) in HBSS containing 1.5 mM CaCl₂ and 1 mM MgCl₂ for 30 min at 37 °C and analyzed by flow cytometry. LacZ activity was determined by flow cytometry using Fluorescein diβ-D-galactopyranoside (Sigma, F2756) as described elsewhere⁹⁴.

Immunohistochemistry. FPPE tumor sections (5 µm) from B16-F10 or LLC1 tumors were used to determine the infiltration of neutrophils by immunohistochemistry using rabbit anti-neutrophil elastase antibody (ab68672) (Abcam). Briefly, sections were deparaffinized, then incubated overnight at 4 °C with primary antibodies, washed, and incubated with secondary antibodies (Dako EnVision+ System HRP Labelled Polymer Anti-Rabbit) following the manufacturer's protocol. Slides were counterstained with hematoxylin counterstain and coverslips were mounted using nonaqueous mounting media.

Measurement of cytokines. The profiling of selected cytokines and chemokines was performed by a Mouse Luminex assay (R&D systems) according to the manufacturer's instructions using fresh tumor lysates from equivalent tumor pieces and read on Bio-Plex 200 system (BioRad).

For intracellular cytokine staining, cells were cultured as described above and then stimulated for 4 h at 37 °C in culture medium containing Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA, 50 ng/ml, Sigma) and monensin (2 µM, BioLegend). After staining for surface markers (cf. Flow cytometry section), cells were fixed and permeabilized according to the manufacturer's instructions (BD Biosciences), then intracellular staining was carried out according to the manufacturer's protocol using the fixation/permeabilization solution (BD Biosciences).

Quantitative PCR analysis. Total RNA from T cells was extracted with Trizol (Invitrogen). In all, 300 ng of total RNA was transcribed into cDNA by M-MLV reverse transcriptase with random primers in the presence of RNaseOUT RNase inhibitor (Invitrogen). cDNAs were quantified by real-time PCR with a SYBR Green Real-time PCR kit (Applied Biosystems) on a ViiA7 detection system (Applied Biosystems, France). Relative mRNA levels were determined with the $\Delta\Delta C_T$ method. Oligonucleotides used for qRT-PCR are described in Supplementary table 2.

Transient transfections and luciferase transactivation assay. The pTNFSF4-Luc and pTNFSF9-Luc luciferase reporter constructs were generated by inserting the promoter sequences of the human *TNFSF4* and *TNFSF9* genes, respectively, into the multicloning site of the pGL3 basic vector (Promega). Human genomic DNA was isolated from DLD-1 cells by standard methods. Fragments were amplified by high-fidelity PCR using human DNA as the template and specific primers given in Supplementary table 3.

HCT116 (p53^{+/+}) or HCT116 p53^{-/-} cells were transiently transfected with reporter plasmids (pTNFSF4-Luc, pTNFSF9-Luc, or pGL3 basic vector) and pSV- β -Galactosidase control vector (Promega) using GenJet[™] In Vitro DNA Transfection Reagent (Ver. II) (Sinigen). β -Galactosidase activity was measured using the β -Galactosidase Enzyme Assay System (Promega) after 30 min of incubation at 37 °C with detection at 420 nm. Luciferase activity was measured using the Luciferase Assay System (Promega) according to the manufacturer's instructions. Firefly luciferase activity was measured using an EnVision 2105 Multimode Plate Reader (PerkinElmer).

Data collection and analysis. Flow cytometry data were collected using FACSDiva (BD Biosciences, version 8.0.1). qPCR data were collected using ViiA[™] 7 Software (Applied Biosystems, version 1.2). Luminescence data were collected using PerkinElmer Envision Manager (v1.13.3009.1401). Flow cytometry data were analyzed on FlowJo software (Tree Star, v10.0.2).

Quantification and statistical analysis. The results are shown as mean \pm SD or SEM, and data sets were compared using unpaired Student's *t*-test or ordinary one-way or two-way ANOVA as appropriate. We performed statistical calculations with GraphPad Prism 8.3. All *p* values were two-tailed. A *p* < 0.05 was considered statistically significant for all experiments.

Reporting summary. Further information on research design is available in the Nature Research Reporting Summary linked to this article.

Data availability

The p53 ChIP-seq data and linked expression data^{73,74} were obtained from the human p53 Binding And Expression Resource (BAER) data hub [<https://orio.niehs.nih.gov/ucscview/nguyen/p53BAER/p53BAER.html>] for the human genome assembly hg19 and are available through the UCSC Genome Browser [<https://genome.ucsc.edu>]. Source data are provided with this paper. The remaining data are available within the paper, Supplementary Information or available from the authors upon request.

Received: 20 May 2020; Accepted: 25 March 2021;

Published online: 15 June 2021

References

- Gonzalez, H., Hagerling, C. & Werb, Z. Roles of the immune system in cancer: from tumor initiation to metastatic progression. *Genes Dev.* **32**, 1267–1284 (2018).
- Chen, D. S. & Mellman, I. Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle. *Immunity* **39**, 1–10 (2013).
- Topalian, S. L., Drake, C. G. & Pardoll, D. M. Immune checkpoint blockade: a common denominator approach to cancer therapy. *Cancer Cell* **27**, 450–461 (2015).
- Sambi, M., Bagheri, L. & Szcwczuk, M. R. Current challenges in cancer immunotherapy: multimodal approaches to improve efficacy and patient response rates. *J. Oncol.* **2019**, 4508794 (2019).
- Eruslanov, E. B. et al. Tumor-associated neutrophils stimulate T cell responses in early-stage human lung cancer. *J. Clin. Invest.* **124**, 5466–5480 (2014).
- Gabrilovich, D. I. Myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Immunol. Res.* **5**, 3–8 (2017).
- Zhou, J., Nefedova, Y., Lei, A. & Gabrilovich, D. Neutrophils and PMN-MDSC: their biological role and interaction with stromal cells. *Semin. Immunol.* **35**, 19–28 (2018).
- Cui, Y. & Guo, G. Immunomodulatory function of the tumor suppressor p53 in host immune response and the tumor microenvironment. *Int. J. Mol. Sci.* **17**, 1942 (2016).

- Miciak, J. & Bunz, F. Long story short: p53 mediates innate immunity. *Biochim. Biophys. Acta* **1865**, 220–227 (2016).
- 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).
- Fiscella, M. et al. Wip1, a novel human protein phosphatase that is induced in response to ionizing radiation in a p53-dependent manner. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **94**, 6048–6053 (1997).
- Rossi, M., Demidov, O. N., Anderson, C. W., Appella, E. & Mazur, S. J. Induction of PPM1D following DNA-damaging treatments through a conserved p53 response element coincides with a shift in the use of transcription initiation sites. *Nucleic Acids Res.* **36**, 7168–7180 (2008).
- Bulavin, D. V. et al. Inactivation of the Wip1 phosphatase inhibits mammary tumorigenesis through p38 MAPK-mediated activation of the p16(Ink4a)-p19(Arf) pathway. *Nat. Genet.* **36**, 343–350 (2004).
- Lu, X., Nannenga, B. & Donehower, L. A. PPM1D dephosphorylates Chk1 and p53 and abrogates cell cycle checkpoints. *Genes Dev.* **19**, 1162–1174 (2005).
- Shreeram, S. et al. Wip1 phosphatase modulates ATM-dependent signaling pathways. *Mol. Cell* **23**, 757–764 (2006).
- Takekawa, M. et al. p53-inducible wip1 phosphatase mediates a negative feedback regulation of p38 MAPK-p53 signaling in response to UV radiation. *EMBO J.* **19**, 6517–6526 (2000).
- Castellino, R. C. et al. Medulloblastomas overexpress the p53-inactivating oncogene WIP1/PPM1D. *J. Neurooncol.* **86**, 245–256 (2008).
- Rauta, J. et al. The serine-threonine protein phosphatase PPM1D is frequently activated through amplification in aggressive primary breast tumours. *Breast Cancer Res. Treat.* **95**, 257–263 (2006).
- Saito-Ohara, F. et al. PPM1D is a potential target for 17q gain in neuroblastoma. *Cancer Res.* **63**, 1876–1883 (2003).
- Demidov, O. N. et al. The role of the MKK6/p38 MAPK pathway in Wip1-dependent regulation of ErbB2-driven mammary gland tumorigenesis. *Oncogene* **26**, 2502–2506 (2007).
- Demidov, O. N. et al. Wip1 phosphatase regulates p53-dependent apoptosis of stem cells and tumorigenesis in the mouse intestine. *Cell Stem Cell* **1**, 180–190 (2007).
- Nannenga, B. et al. Augmented cancer resistance and DNA damage response phenotypes in PPM1D null mice. *Mol. Carcinog.* **45**, 594–604 (2006).
- Shreeram, S. et al. Regulation of ATM/p53-dependent suppression of myc-induced lymphomas by Wip1 phosphatase. *J. Exp. Med.* **203**, 2793–2799 (2006).
- Shen, X. F., Zhao, Y., Jiang, J. P., Guan, W. X. & Du, J. F. Phosphatase Wip1 in immunity: an overview and update. *Front. Immunol.* **8**, 8 (2017).
- Uyanik, B., Grigorash, B. B., Goloudina, A. R. & Demidov, O. N. DNA damage-induced phosphatase Wip1 in regulation of hematopoiesis, immune system and inflammation. *Cell Death Discov.* **3**, 17018 (2017).
- Kamada, R., Kudoh, F., Yoshimura, F., Tanino, K. & Sakaguchi, K. Inhibition of Ser/Thr phosphatase PPM1D induces neutrophil differentiation in HL-60 cells. *J. Biochem.* **162**, 303–308 (2017).
- Liu, G. et al. Phosphatase Wip1 negatively regulates neutrophil development through p38 MAPK-STAT1. *Blood* **121**, 519–529 (2013).
- Schito, M. L., Demidov, O. N., Saito, S., Ashwell, J. D. & Appella, E. Wip1 phosphatase-deficient mice exhibit defective T cell maturation due to sustained p53 activation. *J. Immunol.* **176**, 4818–4825 (2006).
- Sun, L. et al. Phosphatase Wip1 is essential for the maturation and homeostasis of medullary thymic epithelial cells in mice. *J. Immunol.* **191**, 3210–3220 (2013).
- Yi, W. et al. Phosphatase Wip1 controls antigen-independent B-cell development in a p53-dependent manner. *Blood* **126**, 620–628 (2015).
- Ruark, E. et al. Mosaic PPM1D mutations are associated with predisposition to breast and ovarian cancer. *Nature* **493**, 406–410 (2013).
- Kleiblova, P. et al. Gain-of-function mutations of PPM1D/Wip1 impair the p53-dependent G1 checkpoint. *J. Cell Biol.* **201**, 511–521 (2013).
- Akbari, M. R. et al. PPM1D mutations in circulating white blood cells and the risk for ovarian cancer. *J. Natl Cancer Inst.* **106**, djt323 (2014).
- Artomov, M., Rivas, M. A., Genovese, G. & Daly, M. J. Mosaic mutations in blood DNA sequence are associated with solid tumor cancers. *npj Genom. Med.* **2**, 22 (2017).
- Cardoso, M., Paulo, P., Maia, S. & Teixeira, M. R. Truncating and missense PPM1D mutations in early-onset and/or familial/hereditary prostate cancer patients. *Genes Chromosomes Cancer* **55**, 954–961 (2016).
- Zajkovic, A. et al. Truncating mutations of PPM1D are found in blood DNA samples of lung cancer patients. *Br. J. Cancer* **112**, 1114–1120 (2015).
- Steenma, D. P. et al. Clonal hematopoiesis of indeterminate potential and its distinction from myelodysplastic syndromes. *Blood* **126**, 9–16 (2015).
- Ogawa, S. Genetics of MDS. *Blood* **133**, 1049–1059 (2019).
- Zink, F. et al. Clonal hematopoiesis, with and without candidate driver mutations, is common in the elderly. *Blood* **130**, 742–752 (2017).

40. Hsu, J. I. et al. PPM1D mutations drive clonal hematopoiesis in response to cytotoxic chemotherapy. *Cell Stem Cell* **23**, 700–713 e706 (2018).
41. Pharoah, P. D. P. et al. PPM1D mosaic truncating variants in ovarian cancer cases may be treatment-related somatic mutations. *J. Natl Cancer Inst.* **108**, djv347 (2016).
42. Gibson, C. J. et al. Clonal hematopoiesis associated with adverse outcomes after autologous stem-cell transplantation for lymphoma. *J. Clin. Oncol.* **35**, 1598–1605 (2017).
43. Ayadi, A. et al. Mouse large-scale phenotyping initiatives: overview of the European Mouse Disease Clinic (EUMODIC) and of the Wellcome Trust Sanger Institute Mouse Genetics Project. *Mamm. Genome* **23**, 600–610 (2012).
44. Keller, P. et al. FES-Cre targets phosphatidylinositol glycan class A (PIGA) inactivation to hematopoietic stem cells in the bone marrow. *J. Exp. Med.* **194**, 581–589 (2001).
45. Visconte, V. et al. Phenotypic and functional characterization of a mouse model of targeted Pdgfra deletion in hematopoietic cells. *Haematologica* **95**, 214–223 (2010).
46. Srinivas, S. et al. Cre reporter strains produced by targeted insertion of EYFP and ECFP into the ROSA26 locus. *BMC Dev. Biol.* **1**, 4 (2001).
47. Choi, J. et al. Mice deficient for the wild-type p53-induced phosphatase gene (Wip1) exhibit defects in reproductive organs, immune function, and cell cycle control. *Mol. Cell Biol.* **22**, 1094–1105 (2002).
48. Bertram, J. S. & Janik, P. Establishment of a cloned line of Lewis Lung Carcinoma cells adapted to cell culture. *Cancer Lett.* **11**, 63–73 (1980).
49. Fidler, I. J. Biological behavior of malignant melanoma cells correlated to their survival in vivo. *Cancer Res.* **35**, 218–224 (1975).
50. Chen, Z. et al. Wip1 deficiency impairs haematopoietic stem cell function via p53 and mTORC1 pathways. *Nat. Commun.* **6**, 6808 (2015).
51. Goloudina, A. R. et al. Wip1 promotes RUNX2-dependent apoptosis in p53-negative tumors and protects normal tissues during treatment with anticancer agents. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **109**, E68–E75 (2012).
52. Wong, E. S. et al. p38MAPK controls expression of multiple cell cycle inhibitors and islet proliferation with advancing age. *Dev. Cell* **17**, 142–149 (2009).
53. Evrard, M. et al. Developmental analysis of bone marrow neutrophils reveals populations specialized in expansion, trafficking, and effector functions. *Immunity* **48**, 364–379.e368 (2018).
54. Ng, L. G., Ostuni, R. & Hidalgo, A. Heterogeneity of neutrophils. *Nat. Rev. Immunol.* **19**, 255–265 (2019).
55. Zilionis, R. et al. Single-cell transcriptomics of human and mouse lung cancers reveals conserved myeloid populations across individuals and species. *Immunity* **50**, 1317–1334.e1310 (2019).
56. Fridender, Z. G. et al. Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF-beta: "N1" versus "N2" TAN. *Cancer Cell* **16**, 183–194 (2009).
57. Shaul, M. E. & Fridender, Z. G. Cancer-related circulating and tumor-associated neutrophils - subtypes, sources and function. *FEBS J.* **285**, 4316–4342 (2018).
58. Gilmarin, A. G. et al. Allosteric Wip1 phosphatase inhibition through flap-subdomain interaction. *Nat. Chem. Biol.* **10**, 181–187 (2014).
59. Giese, M. A., Hind, L. E. & Huttenlocher, A. Neutrophil plasticity in the tumor microenvironment. *Blood* **133**, 2159–2167 (2019).
60. Tecchio, C., Scapini, P., Pizzolo, G. & Cassatella, M. A. On the cytokines produced by human neutrophils in tumors. *Semin. Cancer Biol.* **23**, 159–170 (2013).
61. Sun, R. et al. Neutrophils with protumor potential could efficiently suppress tumor growth after cytokine priming and in presence of normal NK cells. *Oncotarget* **5**, 12621–12634 (2014).
62. Shaul, M. E. et al. Tumor-associated neutrophils display a distinct N1 profile following TGFbeta modulation: a transcriptomics analysis of pro- vs. antitumor TANs. *Oncimmunology* **5**, e1232221 (2016).
63. Abram, C. L., Roberge, G. L., Hu, Y. & Lowell, C. A. Comparative analysis of the efficiency and specificity of myeloid-Cre deleting strains using ROSA-EYFP reporter mice. *J. Immunol. Methods* **408**, 89–100 (2014).
64. Passegue, E., Wagner, E. P. & Weissman, I. L. JunB deficiency leads to a myeloproliferative disorder arising from hematopoietic stem cells. *Cell* **119**, 431–443 (2004).
65. Clausen, B. E., Burkhardt, C., Reith, W., Renkawitz, R. & Forster, I. Conditional gene targeting in macrophages and granulocytes using LysMcre mice. *Transgenic Res.* **8**, 265–277 (1999).
66. Chao, T., Furth, E. E. & Vonderheide, R. H. CXCR2-dependent accumulation of tumor-associated neutrophils regulates T-cell immunity in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Immunol. Res.* **4**, 968–982 (2016).
67. Nicolas-Avila, J. A., Adrover, J. M. & Hidalgo, A. Neutrophils in homeostasis, immunity, and cancer. *Immunity* **46**, 15–28 (2017).
68. Costa, S., Bevilacqua, D., Cassatella, M. A. & Scapini, P. Recent advances on the crosstalk between neutrophils and B or T lymphocytes. *Immunology* **156**, 23–32 (2019).
69. Kober, J. et al. The capacity of the TNF family members 4-1BBL, OX40L, CD70, GITRL, CD30L and LIGHT to costimulate human T cells. *Eur. J. Immunol.* **38**, 2678–2688 (2008).
70. Amundson, S. A. et al. Stress-specific signatures: expression profiling of p53 wild-type and -null human cells. *Oncogene* **24**, 4572–4579 (2005).
71. Rashi-Elkeles, S. et al. Transcriptional modulation induced by ionizing radiation: p53 remains a central player. *Mol. Oncol.* **5**, 336–348 (2011).
72. Stankovic, T. et al. Microarray analysis reveals that TP53- and ATM-mutant B-CLLs share a defect in activating proapoptotic responses after DNA damage but are distinguished by major differences in activating pro-survival responses. *Blood* **103**, 291–300 (2004).
73. Nguyen, T. T. et al. Revealing a human p53 universe. *Nucleic Acids Res.* **46**, 8153–8167 (2018).
74. Younger, S. T., Kenzelmann-Broz, D., Jung, H., Attardi, L. D. & Rinn, J. L. Integrative genomic analysis reveals widespread enhancer regulation by p53 in response to DNA damage. *Nucleic Acids Res.* **43**, 4447–4462 (2015).
75. Croft, M. The role of TNF superfamily members in T-cell function and diseases. *Nat. Rev. Immunol.* **9**, 271–285 (2009).
76. Gibson, C. J. & Steensma, D. P. New insights from studies of clonal hematopoiesis. *Clin. Cancer Res.* **24**, 4633–4642 (2018).
77. Coombs, C. C. et al. Therapy-related clonal hematopoiesis in patients with non-hematologic cancers is common and associated with adverse clinical outcomes. *Cell Stem Cell* **21**, 374–382.e374 (2017).
78. Dudgeon, C. et al. Genetic variants and mutations of PPM1D control the response to DNA damage. *Cell Cycle* **12**, 2656–2664 (2013).
79. Zhang, L. et al. Exome sequencing identifies somatic gain-of-function PPM1D mutations in brainstem gliomas. *Nat. Genet.* **46**, 726–730 (2014).
80. Kahn, J. D. et al. PPM1D-truncating mutations confer resistance to chemotherapy and sensitivity to PPM1D inhibition in hematopoietic cells. *Blood* **132**, 1095–1105 (2018).
81. Chuman, Y. et al. PPM1D430, a novel alternative splicing variant of the human PPM1D, can dephosphorylate p53 and exhibits specific tissue expression. *J. Biochem.* **145**, 1–12 (2009).
82. Swisher, E. M. et al. Somatic mosaic mutations in PPM1D and TP53 in the blood of women with ovarian carcinoma. *JAMA Oncol.* **2**, 370–372 (2016).
83. Tcyganov, E., Mastio, J., Chen, E. & Gabrilovich, D. I. Plasticity of myeloid-derived suppressor cells in cancer. *Curr. Opin. Immunol.* **51**, 76–82 (2018).
84. Hashimoto, A. et al. Inhibition of casein kinase 2 disrupts differentiation of myeloid cells in cancer and enhances the efficacy of immunotherapy in mice. *Cancer Res.* **78**, 5644–5655 (2018).
85. Veglia, F. et al. Fatty acid transport protein 2 reprograms neutrophils in cancer. *Nature* **569**, 73–78 (2019).
86. Katlinski, K. V. et al. Inactivation of interferon receptor promotes the establishment of immune privileged tumor microenvironment. *Cancer Cell* **31**, 194–207 (2017).
87. Donehower, L. A. et al. Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature* **356**, 215–221 (1992).
88. Lewandoski, M., Meyers, E. N. & Martin, G. R. Analysis of Fgf8 gene function in vertebrate development. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **62**, 159–168 (1997).
89. Dymecki, S. M. Flp recombinase promotes site-specific DNA recombination in embryonic stem cells and transgenic mice. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **93**, 6191–6196 (1996).
90. Duan, F. et al. Area under the curve as a tool to measure kinetics of tumor growth in experimental animals. *J. Immunol. Methods* **382**, 224–228 (2012).
91. Diamond, M. S. et al. Type I interferon is selectively required by dendritic cells for immune rejection of tumors. *J. Exp. Med.* **208**, 1989–2003 (2011).
92. Fuertes, M. B. et al. Host type I IFN signals are required for antitumor CD8+ T cell responses through CD8[alpha]+ dendritic cells. *J. Exp. Med.* **208**, 2005–2016 (2011).
93. Singhal, S. et al. Origin and role of a subset of tumor-associated neutrophils with antigen-presenting cell features in early-stage human lung cancer. *Cancer Cell* **30**, 120–135 (2016).
94. Guo, W. et al. Multi-genetic events collaboratively contribute to Pten-null leukaemia stem-cell formation. *Nature* **453**, 529–533 (2008).

Acknowledgements

This research was supported by La Ligue contre le Cancer, Russian Science Foundation grant 19-75-20128, Foundation ARC, Russian Foundation for Basic Research grants 19-315-51035, the Intramural Research Program of the Center for Cancer Research, National Cancer Institute, National Institutes of Health, Russian Foundation for Basic Research grants 18-29-09144, and the European Regional Development Fund (FEDER No. 2016-00110366 and EX005756). The mouse strain C57BL6-Ppm1d^{fl/fl} (KOMP) was generated by the Mouse Cancer Genetics Program, Center for Cancer Research, National Cancer Institute, NIH, using ES cells generated by the trans-NIH Knock-Out Mouse Project and obtained from the KOMP Repository (www.komp.org). NIH grants to Velocigena at Regeneron Inc (U01HG004085) and the CSD Consortium (U01HG004080) funded the generation of gene-targeted ES cells for 8500 genes in the KOMP Program and archived and distributed by the KOMP Repository at UC Davis and CHORI (U42RR024244). We would like to thank Laurent Delva (INSERM UMR1231) for providing Fes-cre mice, and Lionel Apetoh and Dmitry Bulavin for productive discussions.

Author contributions

Conceptualization by O.N.D. and A.R.G.; methodology by B.U., A.R.G., E.E., and F.L.; formal analysis by S.J.M.; investigation by B.U., A.R.G., A.A., T.H., E.E., B.B.G., O.N.D., A.V.P., L.T., L.L., J.C., and H.S.; resources by C.G., E.A., O.N.D., F.L., and A.V.P.; writing, reviewing, and editing by O.N.D., E.A., and S.J.M.; supervision by O.N.D., E.A., and E.E.; funding acquisition by C.G., O.N.D., and E.A.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41467-021-23330-6>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to C.G., E.A. or O.N.D.

Peer review information *Nature Communications* thanks Zvi Fridlender, Peiqing Sun, and the other, anonymous reviewer(s) for their contribution to the peer review of this work.

Reprints and permission information is available at <http://www.nature.com/reprints>

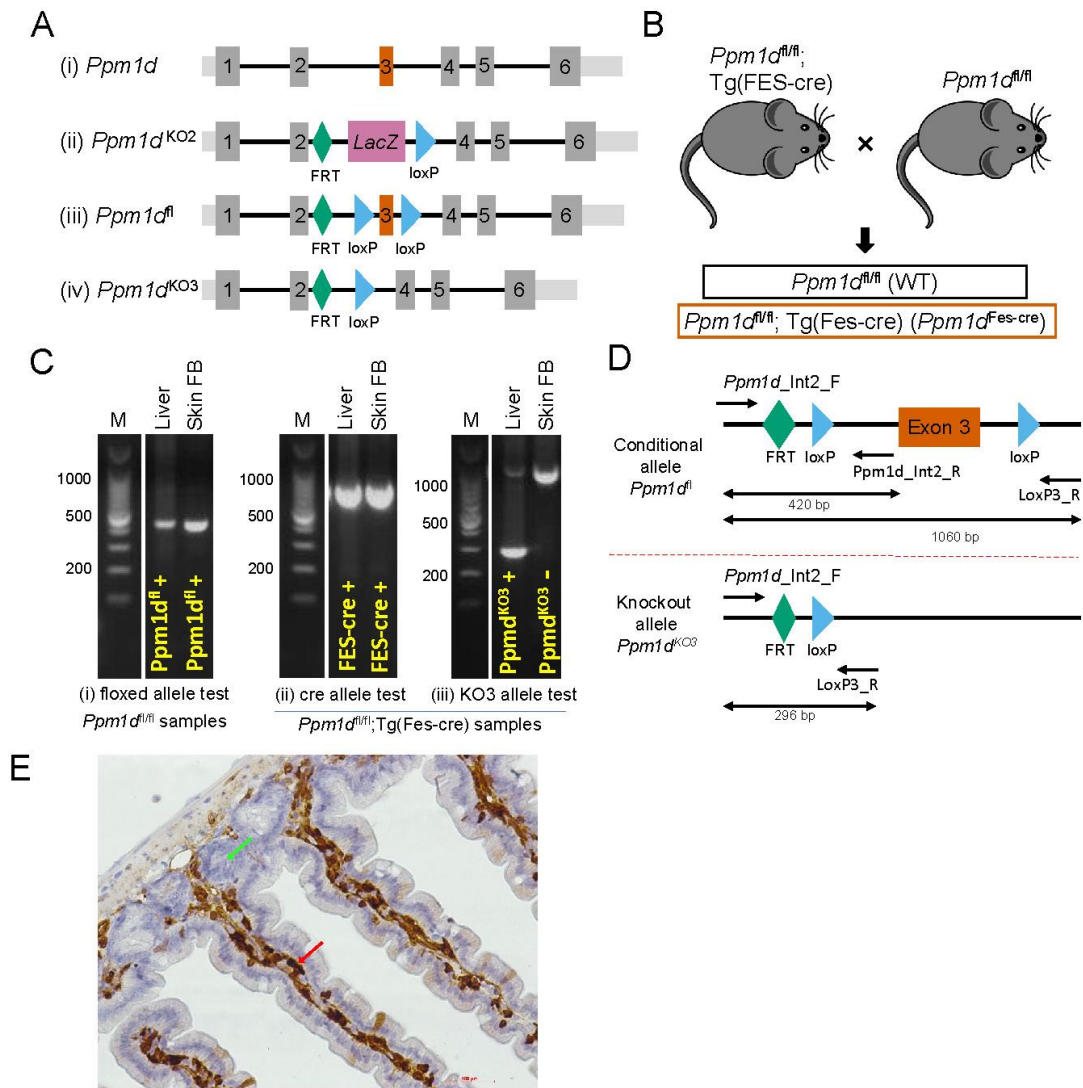
Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



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/>.

© The Author(s) 2021

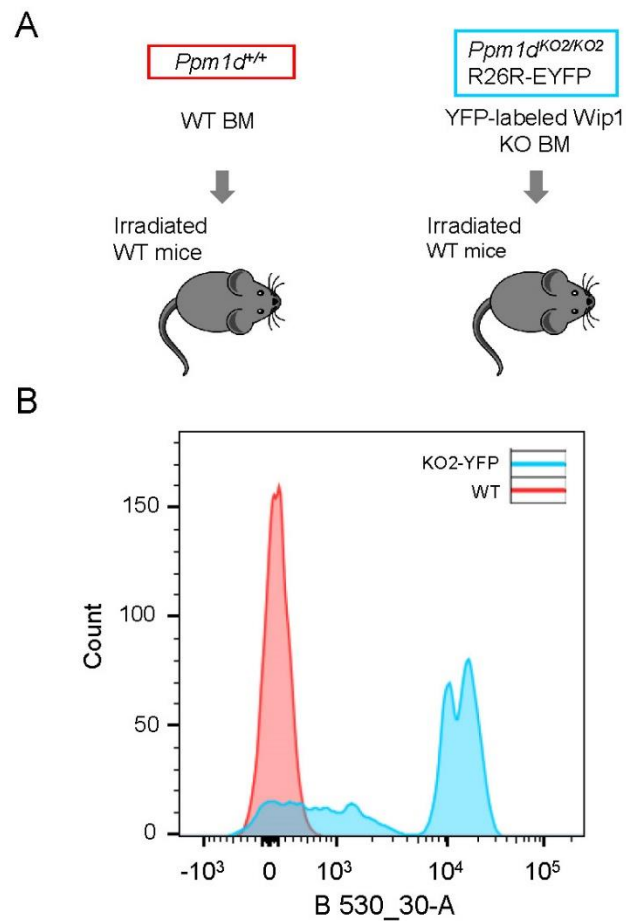
Supplementary Figures and Tables



Supplementary Figure 1. Generation of *Ppm1d* conditional knockout mice.

- A. Schematic of *Ppm1d* gene and targeted mutations. (i) Wildtype *Ppm1d* allele with critical exon 3 indicated (vermillion); (ii) Knockout allele with targeted LacZ insertion, *Ppm1d*^{KO2} (*Ppm1d*^{Tm1b(KOMP)Wtsi}); (iii) Floxed allele with loxP sites flanking exon 3, *Ppm1d*^{fl} (*Ppm1d*^{Tm1c(KOMP)Wtsi}), (Conditional allele); (iv) Knockout allele following exposure of cre recombinase, *Ppm1d*^{KO3} (*Ppm1d*^{Tm1d(KOMP)Wtsi}), (knockout allele).
- B. Breeding scheme for production of littermates with expression of wildtype *Ppm1d* (WT) and with deletion of *Ppm1d* in hematopoietic cells (*Ppm1d*^{Fes-cre}).
- C. Genotyping of liver and skin dermal fibroblasts (FB) samples: (i) PCR test for conditional allele (420 bp) in *Ppm1d*^{fl/fl} samples; (ii) PCR test for Fes-cre allele in *Ppm1d*^{Fes-cre} samples; (iii) PCR test for *Ppm1d*^{KO3} knockout allele (296 bp) in *Ppm1d*^{Fes-cre} samples. The 1060 bp band corresponds to the unmodified *Ppm1d*^{fl} allele, which is weakly detected in liver and strongly detected in FB samples. (One representative experiment out of 5 is shown).
- D. Schematic of PCR strategy for detection of *Ppm1d*^{fl} (conditional, 420 bp) and *Ppm1d*^{KO3} (knockout, 296 bp).
- E. Validation of FES-cre mouse model. Crossing of mice bearing the FES-cre transgene with R26R-EYFP reporter mice produced offspring in which FES-driven expression of cre recombinase in hematopoietic stem cells resulted in deletion of the floxed STOP cassette, allowing expression of YFP. IHC analysis of intestinal epithelial sections demonstrates expression of YFP in hematopoietic cells (anti-YFP, brown stain, red arrow), but not in intestinal epithelium cells (blue counterstain, green arrow). Scale bar: 100 μ m. (One representative experiment out of 4 is shown).

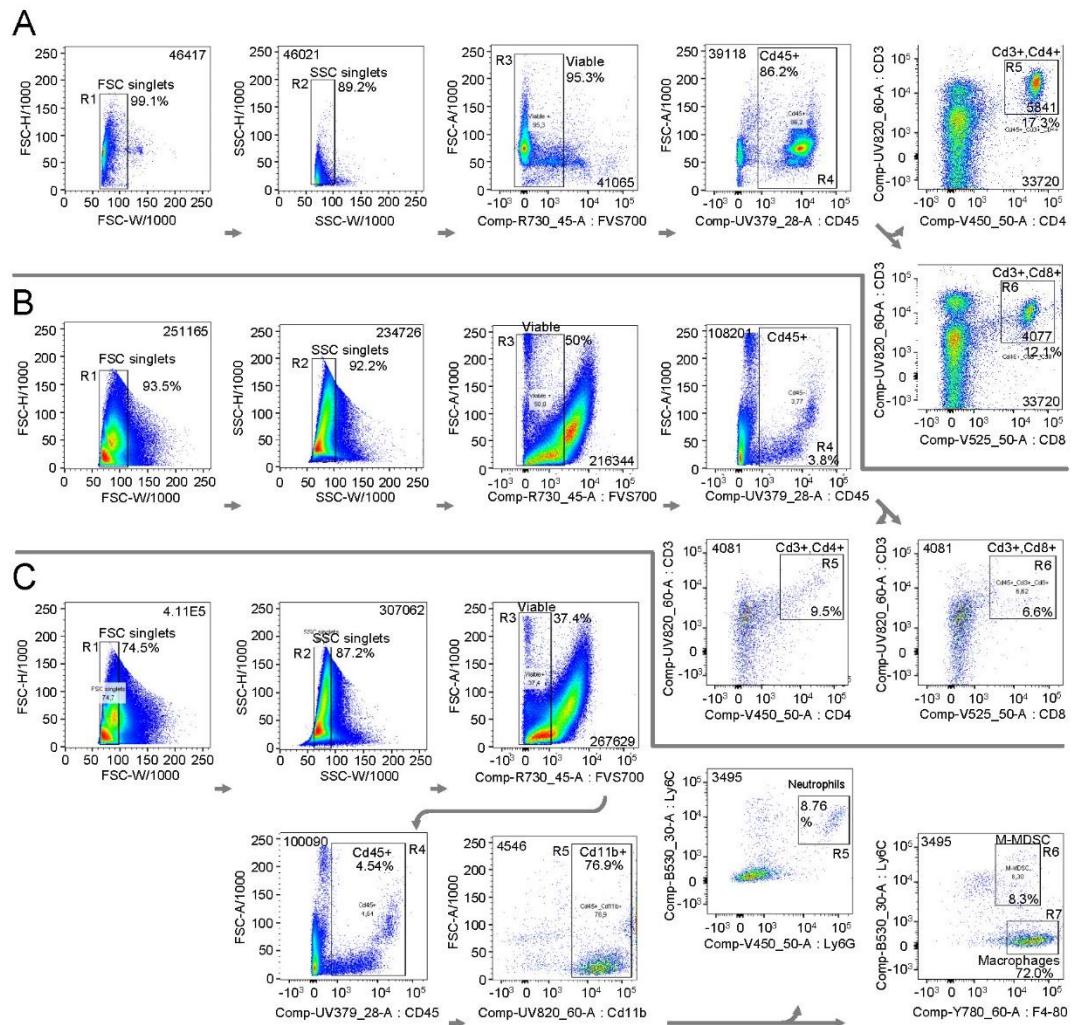
Supplementary Figure 1



Supplementary Figure 2. Engraftment of Yellow Fluorescent Protein (YFP)-expressing *Ppm1d* knockout bone marrow cells into WT recipient mice.

- A. Scheme depicting adoptive transfer of unlabeled WT or YFP-expressing *Ppm1d*^{KO2/KO2} bone marrow (BM) cells into lethally irradiated WT mice.
- B. Analysis by flow cytometry of peripheral blood leukocytes 12 weeks after transfer of BM cells from *Ppm1d*^{+/+} or *Ppm1d*^{KO2/KO2}; R26R-EYFP mice into lethally irradiated WT mice. Histogram of B530/30 channel shows expression of YFP reporter protein corresponding to transplanted population of BM cells.

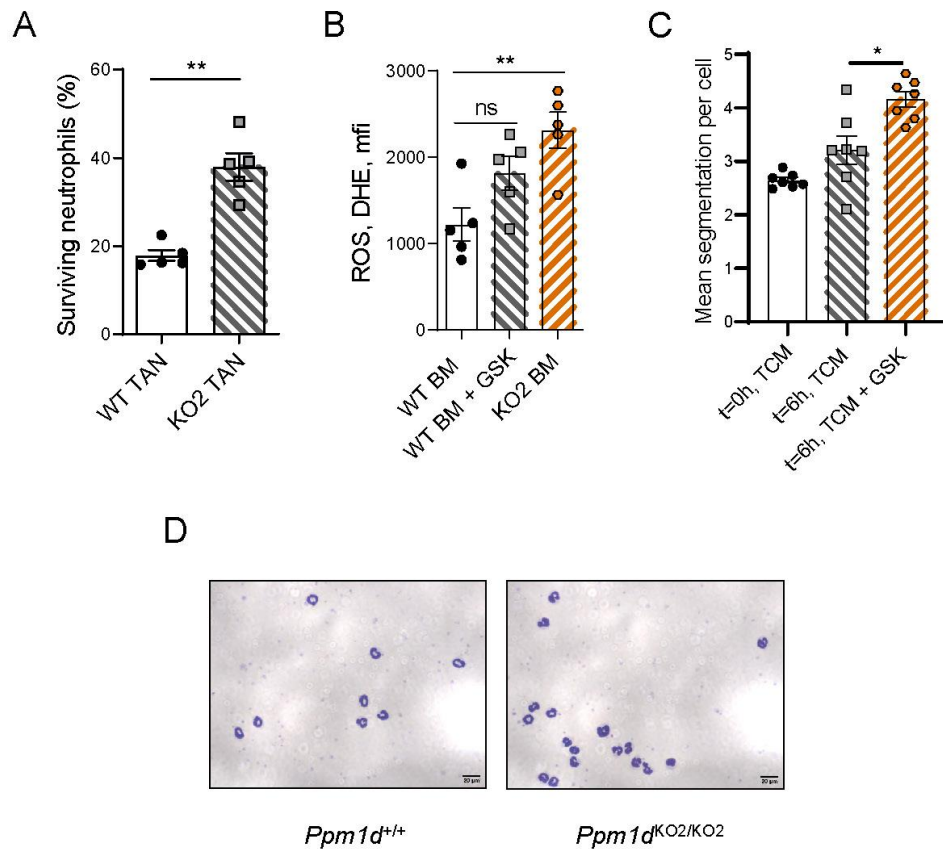
Supplementary Figure 2



Supplementary Figure 3. Gating strategy for flow cytometry analysis or isolation of immune subsets. Cellular suspensions of selected tissues were analyzed by flow cytometry. Data shown are for WT mice bearing B16 tumors.

- A. Gating strategy Cd3+, Cd4+ T cells (Gate R5) and Cd3+, Cd8+ T cells (Gate R6) from spleen.
- B. Gating strategy for tumor infiltrated Cd3+, Cd4+ T cells (Gate R5) and Cd3+, Cd8+ T cells (Gate R6).
- C. Gating strategy for tumor infiltrated Ly6C+, Ly6G+ Neutrophils (Gate R5), Ly6C+, F4-80+ Monocytic, Myeloid-derived Suppressor cells (M-MDSC) (Gate R6), and Ly6C-, F4-80+ Macrophages (Gate R7).

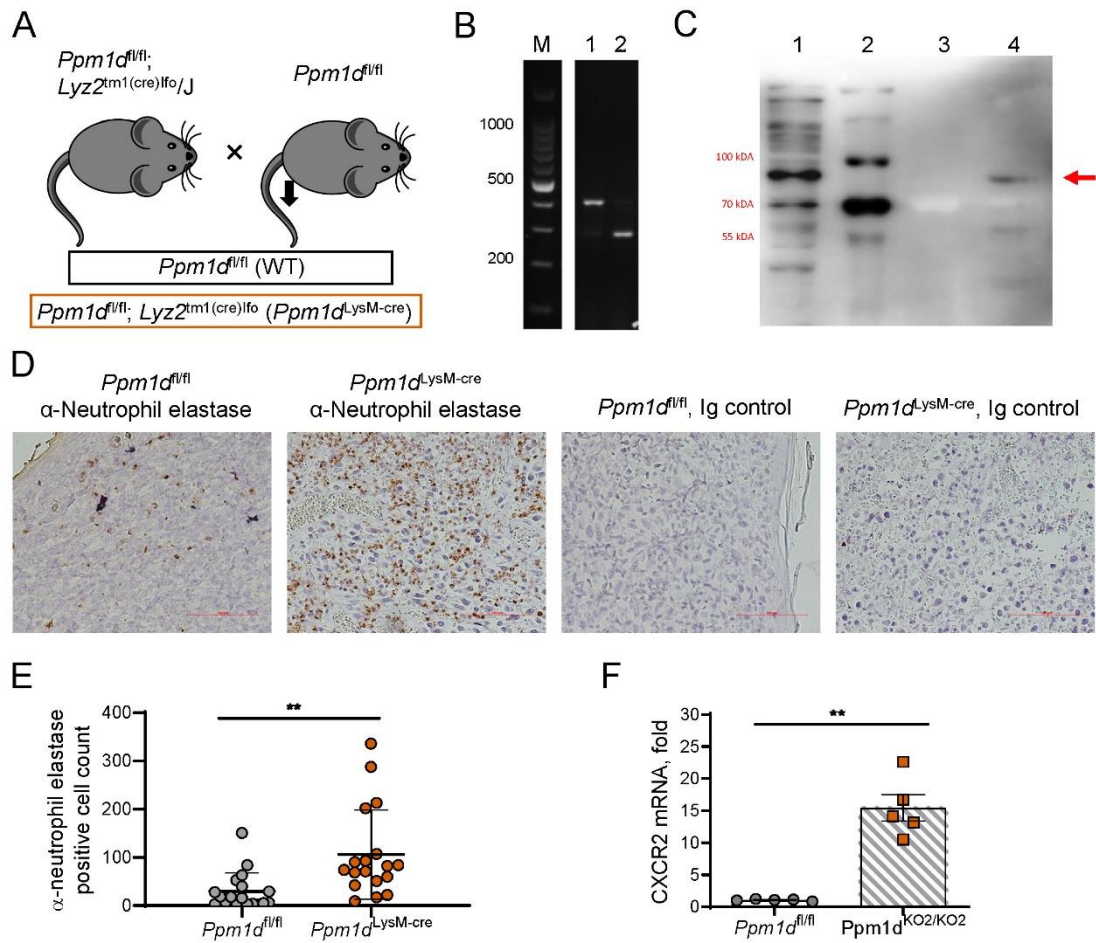
Supplementary Figure 3



Supplementary Figure 4. Genetic knockout or chemical inhibition of *Ppm1d* affects neutrophil properties.

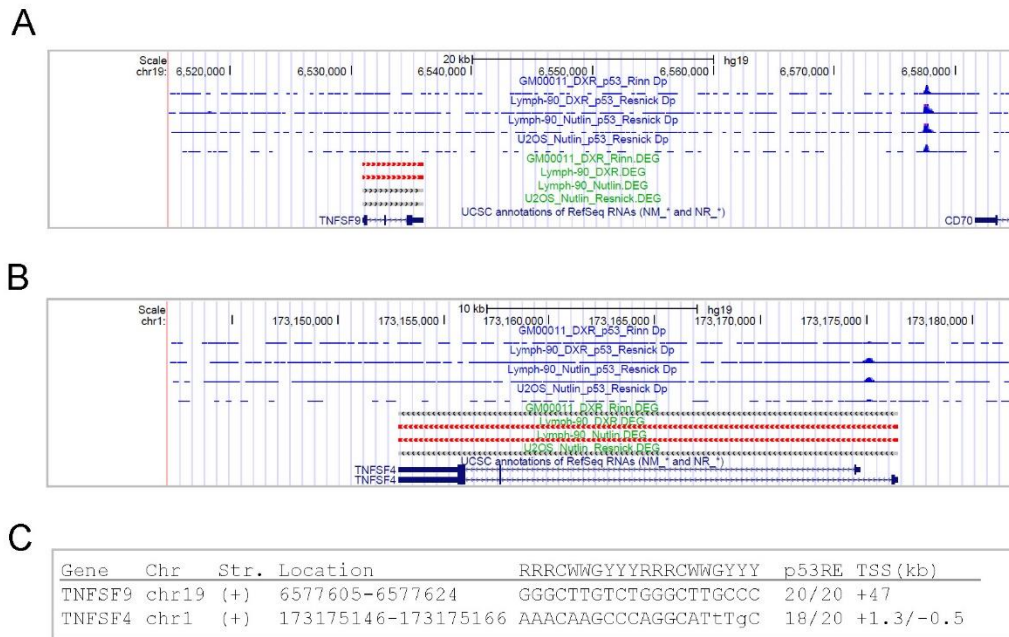
- A. Survival of tumor associated neutrophils (TANs). Neutrophils isolated from B16 F10 tumors engrafted in *Ppm1d*^{+/+} (WT TAN) or *Ppm1d*^{KO2/KO2} (KO2 TAN) mice were cultured for 48 h in tumor conditioned media (TCM). Cell viability was assessed by flow cytometry using 7-aminoactinomycin D (7 AAD). TAN survival: *Ppm1d*^{+/+}, 17.8% ± 1.2%, n = 5; *Ppm1d*^{KO2/KO2}, 38.0% ± 3.1%, n = 5. Graph displays individual points with mean ± SEM. Statistical significance was estimated by Welch's t test (two-tailed) (**, p < 0.01).
- B. Respiratory burst in activated neutrophils. Neutrophils isolated from bone marrow of *Ppm1d*^{+/+} (WT BM) and *Ppm1d*^{KO2/KO2} (KO2 BM) mice were cultured for 6 h in TCM with vehicle or with 5 μM GSK2830371 (+GSK) before activation with PMA. ROS production was detected by dihydroethidium (DHE) fluorescence by flow cytometry, n=5. Graph displays individual points with mean ± SEM. Statistical significance was estimated by one-way ANOVA with Dunnett's multiple testing correction (ns, not significant; **, adj. p < 0.01).
- C. Nuclear segmentation of human donor blood neutrophils. Neutrophils isolated from human donor blood were analyzed fresh (t = 0) or cultured for 6 h in TCM without (TCM) or with 5 μM GSK2830371 (TCM + GSK). Cytospin spreads were stained with May-Grünwald Giemsa solution, visualized by light microscopy, and the mean number of nuclear lobes was determined for 50 cells. n = 7 donors for each condition. Graph displays individual points with mean ± SEM. Statistical significance was estimated by Mann Whitney's t test (two-tailed) (*, p < 0.05).
- D. Morphology of isolated neutrophils from *Ppm1d*^{+/+} and *Ppm1d*^{KO2/KO2} mice. Neutrophil cytospin spreads were stained with May-Grünwald Giemsa solution and visualized by light microscopy. Scale bar, 20 μm. (One representative experiment out of 4 is shown).

Supplementary Figure 4



- Supplementary Figure 5. Infiltration of LLC1 lung cancer tumors by neutrophils in *Ppm1d*^{fl/fl} and *Ppm1d*^{LysM-cre} mice.**
- Breeding scheme for production of littermates with expression of wildtype *Ppm1d* (WT) and with deletion of *Ppm1d* in LysM-cre expressing cells and their progeny (*Ppm1d*^{LysM-cre}).
 - Ppm1d* locus genotyping of peripheral blood cells sorted by cytometry from *Ppm1d*^{LysM-cre}; R26R-EYFP mice. (1) YFP negative cells displaying *Ppm1d*^{fl} allele band (420 bp); (2) YFP positive cells displaying *Ppm1d*^{KO3} allele band (296 bp). (One representative experiment out of 4 is shown).
 - Validation of the lack of Wip1 expression in YFP-positive myeloid cells from *Ppm1d*^{LysM-cre} mice. YFP+ and YFP- cells were FACS sorted and Wip1 presence were detected by western blot with anti-Wip1 antibody (D4F7, Cell Signaling). Lanes: 1. HEK293 cells transfected with mouse Wip1; 2. Molecular weight Marker; 3. YFP- myeloid cells; YFP+ myeloid cells. Red arrow indicates Wip1.
 - Neutrophil infiltration into LLC1 tumors in *Ppm1d*^{fl/fl} and *Ppm1d*^{LysM-cre} mice. FFPE tumor sections (5 μ m) were deparaffinized and subjected to immunohistochemistry staining with anti-neutrophil elastase (α -neutrophil elastase, brown) and counterstained with hematoxylin (blue). Scale bars: 100 μ m. (One representative experiment out of 4 is shown).
 - Neutrophil elastase positive cell count in engrafted LLC1 tumors. Graph displays individual points with mean \pm SD (n = 18, each genotype). Mean neutrophil infiltration is significantly higher (p = 0.0037, Welch's t test (two-tailed)) in LLC1 tumors engrafted in *Ppm1d*^{LysM-cre} mice, with higher variance (p = 0.0008, F test) compared with *Ppm1d*^{fl/fl} mice.
 - Cxcr2* mRNA expression in wild-type and Wip1-deficient B16 tumor infiltration neutrophils (TANs). Graph displays individual points with mean \pm SEM (n = 5, each genotype). *Cxcr2* mRNA is significantly higher in Wip1-deficient TANs, p < 0.01, Mann-Whitney test (two-tailed).

Supplementary Figure 5

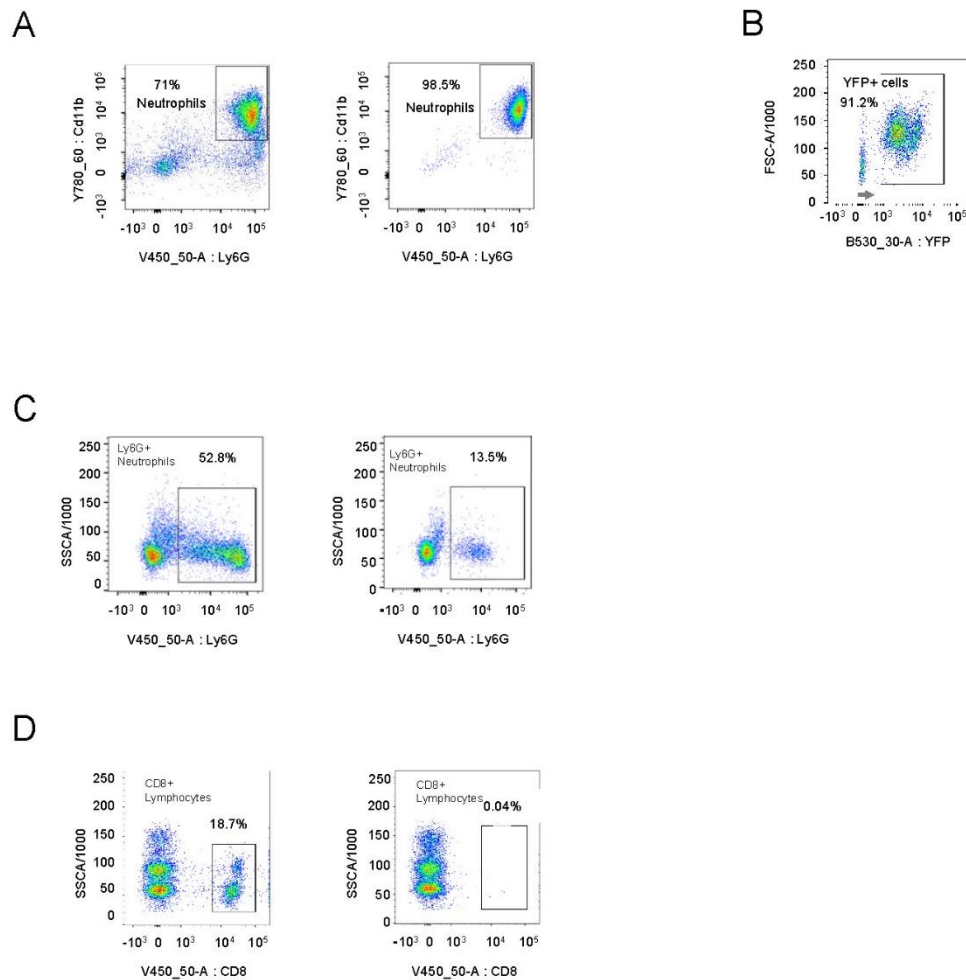


Supplementary Figure 6. Binding of p53 to gene regulatory chromatin near 4-1BBL and OX-40L genes.

UCSC Genome Browser Graphic on Human Feb. 2009 (GRCh37/hg19) Assembly displaying selected p53 chromatin immunoprecipitation sequencing (ChIP-Seq) tracks and associated differential gene expression tracks from the publicly available p53 Binding and Expression Resource (BAER). Tracks shown: Activated p53 ChIP-seq depth (GM00011_DXR_p53_Rinn, Lymph-90_DXR_p53_Resnick, Lymph-90_Nutlin_p53_Resnick, U2OS_Nutlin_p53_Resnick), Differential gene expression associated with human p53 ChIP-seq datasets (GM00011_DXR_Rinn, Lymph-90_DXR, Lymph-90_Nutlin, U2OS_Nutlin_Resnick (red bar, significantly differentially expressed gene; grey, not significant)), NCBI RefSeq gene predictions.

- Genomic context of *TNFSF9* (4-1BBL). P53 ChIP-seq peaks are located downstream of the *TNFSF9* gene at a putative enhancer and are associated with *TNFSF9* gene expression changes in some cell lines.
- Genomic context of *TNFSF4* (OX-40L). P53 ChIP-seq peaks located in intron 1 of the *TNFSF4* gene are associated with *TNFSF9* gene expression changes in some cell lines.
- Putative p53 binding sites within p53 ChIP-seq peak genomic regions. Mismatches to the consensus sequence are indicated by lower case letters. Also given: p53 RE consensus sequence match score, distance from the transcription start site (TSS).

Supplementary Figure 6



Supplementary Figure 7. Cytometry profile of isolated immune cells and verification of immune cells depletion efficiency.

Cellular suspensions of selected tissues were analyzed by flow cytometry. Data shown are for WT mice bearing B16 tumors.

- A. Verification of purity of Miltenyi isolated and FACS sorted YFP+ WT or *Ppm1d^{lysM-cre}* neutrophils. Left: Neutrophil proportion from cells isolated from BM before Miltenyi sorting (71%); Right: Neutrophil proportion from cells isolated from BM after Miltenyi sorting (98.5%).
- B. Verification of purity of Miltenyi isolated and FACS sorted YFP+ WT or *Ppm1d^{lysM-cre}* neutrophils.
- C. Verification of Ly6G+ neutrophils depletion efficiency in mice after treatment with anti-Ly6G antibodies. (Related to Figure 2F). Left: Neutrophil proportion in the blood of non-treated WT mice before depletion (52.8%). Right: Neutrophil proportion in the blood of Ly6G-treated WT mice after depletion (13.5%). FACS analysis of intracellular Ly6G-positive cells.
- D. Verification of CD8+ lymphocytes depletion efficiency in mice after treatment with anti-CD8+ antibodies. (Related to Figure 2G). Left: Cd8+ lymphocytes proportion in the blood of non-treated WT mice before depletion (18.7%). Right: Cd8+ lymphocytes proportion in in the blood of CD8-treated WT mice after depletion (0.04%). FACS analysis of CD8-positive cells.

Supplementary Figure 7

Supplementary Table 1. Patient Characteristics. Related to Figure 6a.

| | |
|-------------------------|-------|
| Cancer Type: | |
| Adenocarcinoma | 4 |
| Squamous Cell Carcinoma | 1 |
| Age: | |
| Median | 73 |
| Average | 67,4 |
| Range | 53-81 |
| Sex: | |
| Male | 1 |
| Female | 4 |
| Race: | |
| White | 4 |
| Black | 1 |
| Tumor Stage: | |
| Stage IB | 3 |
| Stage IIIA | 2 |
| Tumor grade | |
| T1b | 1 |
| T2a | 4 |
| Smoking History: | |
| Current | 1 |
| Never | 1 |
| Former | 3 |

Supplementary Table 2. Oligonucleotides for qRT-PCR. Related to Methods.

| PRIMER | SEQUENCE (5' - 3') | SOURCE |
|------------------|--------------------------------|-------------------|
| Mouse Ppm1d, FW | GCTAGAGGGGAATATCCAGACTGTAGTG | Eurofins Genomics |
| Mouse Ppm1d, RV | AGTATTTGTTGAATTGGTTGGAATGAGG | Eurofins Genomics |
| Mouse Tnfsf9, FW | CTGTGTTCCATCTTCACCC | Eurofins Genomics |
| Mouse Tnfsf9, RV | TGTCTTCTTCGTACCTCAG | Eurofins Genomics |
| Mouse Tnfsf4, FW | TGTATGTGTGGGTTTCAGCAGCC | Eurofins Genomics |
| Mouse Tnfsf4, RV | CCCTCAGGAGTCACCAAGGTGGG | Eurofins Genomics |
| Mouse Gapdh, FW | AATGTGTCCGTCGTGGATCTGA | Eurofins Genomics |
| Mouse Gapdh, RV | GATGCCTGCTTCACCACCTTCT | Eurofins Genomics |
| Mouse Hprt1, FW | GCTTGCTGGTGAAAAGGACCTCTCGAAG | Eurofins Genomics |
| Mouse Hprt1, RV | CCCTGAAGTACTCATTATAGTCAAGGGCAT | Eurofins Genomics |
| Mouse Il10, FW | TGCTAACCGACTCCTTAATGCAGGAC | Eurofins Genomics |
| Mouse Il10, RV | CCTTGATTTCTGGGCCATGCTTCTC | Eurofins Genomics |
| Mouse Il4, FW | AACGTCCTCACAGCAACGAA | Eurofins Genomics |
| Mouse Il4, RV | CAGCTTATCGATGAATCCAGGCA | Eurofins Genomics |
| Mouse Mmp9, FW | GCGACCACATCGAACTTCGACACT | Eurofins Genomics |
| Mouse Mmp9, RV | TCAGGAACTTCCAGTACCAACCGT | Eurofins Genomics |
| Mouse Tgfb1, FW | AGGTTGGCATTCCATTAC | Eurofins Genomics |
| Mouse Tgfb1, RV | AGGGGCTCTAAGACAGTC | Eurofins Genomics |
| Mouse Tnfa, FW | GCAAGCTTCGCTCTTCTGTCTACTGAACTT | Eurofins Genomics |
| Mouse Tnfa, RV | GCTCTAGAATGAGATAGCAAATCGGCTGAC | Eurofins Genomics |
| Mouse Vegf, FW | GAGCCGAGCTCATGGACG | Eurofins Genomics |
| Mouse Vegf, RV | TGAACTTGATCACTTCATGGGACT | Eurofins Genomics |
| Human PPM1D, FW | AGTGATGGACTTTGGAATAT | Eurofins Genomics |
| Human PPM1D, RV | ACTTCTGGAGAGATGCAGATTAC | Eurofins Genomics |
| Human GAPDH, FW | AGATCCCTCCAAAATCAAGTGG | Eurofins Genomics |
| Human GAPDH, RV | GGCAGAGATGATGACCCTTT | Eurofins Genomics |
| Human HPRT1, FW | TGAGGATTTGGAAGGGTGT | Eurofins Genomics |
| Human HPRT1, RV | GAGCACACAGAGGGCTACAA | Eurofins Genomics |

Supplementary Table 3. Oligonucleotides for cloning. Related to Methods

| PRIMER | SEQUENCE (5' - 3') | IDENTIFIER ¹ |
|---|---------------------------------------|---|
| Human TNFSF4 promoter FW (with MluI, NheI sites) | CTCTTACGCGTGCTAGCCTGAGACTGAAAGGTCAGC | chr1:173178514- 173178534 strand (-) |
| Human TNFSF4 promoter RV (with XhoI site) | GATCGCAGATCTCGAGCAATCTGGGTAGAGGGAAGAT | chr1:173176321- 173176341 strand (+) |
| Human TNFSF9 promoter FW (with KpnI/Acc65I site) | TTTCTCTATCGATAGGTACCTTCCGTTCTGCTGGCT | chr19: 6527923- 6527942 strand (+) |
| Human TNFSF9 promoter RV (with HindIII site) | CCGGAATGCCAAGCTTGACGAGAGACTGCCGGAAG | chr19: 6531029- 6531048 strand (-) |

¹Human GRCh37/hg19

Supplementary Table 4. Antibody references and dilutions. Related to Methods.

| Antibody | Dilution |
|--|-----------------|
| Rat anti-mouse CD3 molecular complex (clone 17A2) BD Biosciences Cat#741982 | 1/200 |
| Hamster anti-mouse CD3ε clone 145-2C11), purified BioLegend Cat#100302 | 2µg/ml |
| Rat anti-mouse CD4 (clone GK1.5) BD Biosciences Cat#562891; RRID:AB_2737870 | 1/200 |
| Rat anti-mouse CD8a (clone 53-6.7) BD Biosciences Cat#563068; | 1/200 |
| Rat anti-CD11b (clone M1/70) BD Biosciences Cat#741934 | 1/200 |
| Hamster anti-mouse CD28 (clone 37.51), purified BioLegend Cat#102102 | 2µg/ml |
| Rat anti-mouse CD45 (clone 30-F11) BD Biosciences Cat#564279; | 1/200 |
| Rat anti-mouse CD45R/B220 (clone RA3-6B2) BD Biosciences Cat#563892 | 1/200 |
| Hamster anti-mouse CD69 (clone H1.2F3) BD Biosciences Cat#552879 | 1/100 |
| Rat anti-mouse CD335 (clone 29A1.4) (NK-p46) BD Biosciences Cat#562850 | 1/200 |
| Rat anti-mouse F4/80 (clone BM8) BioLegend Cat#123114 | 1/200 |
| Rabbit anti-GFP mAb (clone D5.1) (detects GFP, YFP, CFP) Cell Signaling Technology Cat#2956 | 1/100 |
| CD137L (4-1BBL) Antibody, anti-mouse, REAfinity (Clone: REA962) Miltenyi Biotec Cat#: 130-116-011 | 1/100 |
| CD252 (OX40L) Antibody, anti-mouse, APC, REAfinity (Clone: REA960) Miltenyi Biotec Cat#: 130-116-073 | 1/100 |
| Mouse anti-human/mouse Granzyme B (clone QA16A02) BioLegend Cat#372204 | 1/100 |
| Rat anti-mouse Ly6C (clone HK1.4) BioLegend Cat#128006 | 1/100 |
| Rat anti-mouse Ly6G (clone 1A8) BD Biosciences Cat#562737; RRID:AB_2737756 | 1/100 |
| Rabbit anti-Neutrophil Elastase antibody Abcam Cat#ab68672 | 1/100 |

Annexe 3



The role of Wip1 in neutrophil functions

Lisa Lagorgette, Oleg Demidov

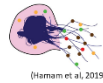
BACKGROUND

Every day, organisms are exposed to injury inducing many cellular responses. Among them, the induction of DNA damages including the p53 cellular pathway is one of the famous one. The protein Wip1 is a phosphatase, which regulated the p53 pathway and controls many cellular mechanisms like DNA damages responses, hematopoiesis and tumorigenesis (Goloudina et al, 2016; Uyanik et al, 2017). Recently, we have demonstrated the role of Wip1 in tumor infiltrating neutrophils through its genetic deletion of chemical inhibition involved in anti-tumor phenotypes and tumorigenesis suppression (Uyanik et al, 2021).

Representing the biggest part of immune cells in the human blood, neutrophils play a key role in the homeostasis and in immunity. Discovered in 2004, NETosis is a cell death that contributed to the host defense against pathogens and linked to various diseases (Brinkmann et al, 2004). During NETosis, neutrophil release neutrophil extracellular traps (NETs) which consist of modified chromatin decorated with bactericidal proteins from granules and cytoplasm. ROS production, visualization of extracellular DNA and citrullination of Histone H3 are markers of NETosis.

Considering that Wip1 is induced by DNA damage and its role in neutrophils, the study of the role of Wip1 in NETosis mechanisms makes sense.

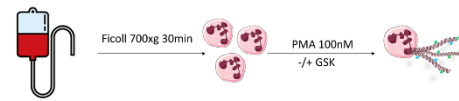
Neutrophil • Histone acetylation (AcH3) • Histone citrullination (CitH3) • MPO • Neutrophil elastase



(Hamann et al, 2015)

METHOD

To investigate the role of Wip1 in NETosis, human neutrophils were isolated from buffy coat of healthy donor using the ficoll gradient. To induce NETosis, cells were treated with Phorbol Myristate Acetate (PMA) known to be a chemical agent inducing NETosis. To modulate Wip1 level, cells were also treated with the GSK2830371, which an inhibitor of Wip1.

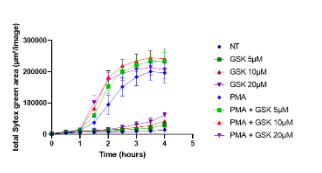


In mice, neutrophils were isolated from bones using magnetic isolation kit. Neutrophils from WT and Wip1 KO were treated with PMA and/or GSK.

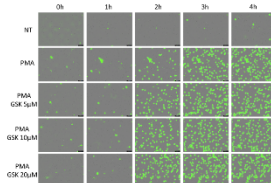


RESULTS

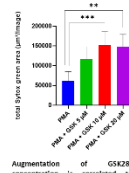
Inhibition of Wip1 potentiates PMA effect



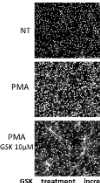
GSK2830371 treatment potentiates PMA effect correlated to a rise of Sytox green area of neutrophils. Quantification of Sytox Green area (µm²/Imag) ± SEM (n=5). Pictures are taken every 30 min with IncuCyte[®] 53.



GSK2830371 treatment potentiates PMA effect since 2h in dose-dependent manner. Pictures from IncuCyte[®] 53 x20



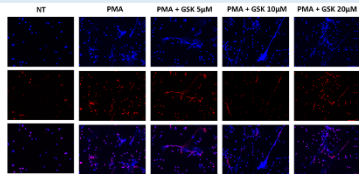
Augmentation of GSK2830371 concentration is correlated to an acceleration of NETosis induction after 2h of PMA treatment. Total Sytox green area ± SD (n=7, Kruskal Wallis test)



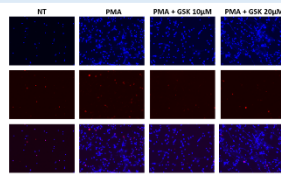
GSK treatment increases the formation of NETs after PMA stimulation (Dapi staining x10 objective)

PMA is triggering NETosis on fresh isolated neutrophils since 1h30 after stimulation characterized by DNA release called NETs for Neutrophil Extracellular Traps. The addition of GSK2830371 seems to reduce the PMA-induced NETosis after 1h30 of stimulation.

Combination of PMA and GSK2830371 increases Histone H3 release in cleaved caspase 3 independant manner



NETs release are characterized by Citrullinated Histone H3 positive netotic cells after 2h of PMA stimulation. Citrullinated Histone H3 in red, dapi staining in blue, image were taken with x20 objective

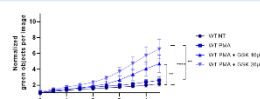


Cell death induced by PMA induction is independent of cleaved caspase 3 activation in presence or absence of GSK2830371 combination. Cleaved caspase 3 in red, dapi staining in blue, image were taken with x20 objective

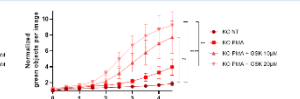
PMA-induced NETosis is characterized by DNA release decorated from citrullinated histone H3 and this cell death is independent of caspase 3 cleavage.

According to increase of DNA release, combination of GSK2830371 improves histone H3 release.

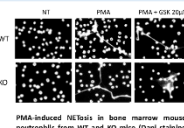
Knock-out Wip1 mice neutrophils response better than Wild-type mice neutrophils



GSK2830371 potentiates PMA-induced NETosis on bone marrow isolated neutrophils from WT and KO Wip1 mice. Normalisation of Sytox objects per Image ± SD (n=5, Friedman test, p<0,05). Pictures are taken every 30 min with IncuCyte[®] 53.



GSK2830371 potentiates PMA-induced NETosis on bone marrow isolated neutrophils from WT and KO Wip1 mice. Normalisation of Sytox objects per Image ± SD (n=5, Friedman test, p<0,05). Pictures are taken every 30 min with IncuCyte[®] 53.



PMA-induced NETosis in bone marrow mouse neutrophils from WT and KO mice (Dapi staining x10 objective)

Even mouse neutrophils are less sensible to PMA, addition of GSK2830371 improves PMA effects. Wip1 KO bone marrow neutrophils are more sensible to PMA stimulation and surprisingly response to GSK2830371 meaning that this inhibitor doesn't act only on Wip1.

CONCLUSION & PERSPECTIVES

As key players and first barrier against pathogens and injuries, neutrophils protect ourself from a lot of external and internal aggressions. In response to these injuries, neutrophils can release their internal DNA component and perform NETosis. In this study, we shown that fresh isolated human neutrophils response to PMA induction and that this is improved with the addition of GSK2830371 resulting of the inhibition of Wip1. Moreover, this rise of this cell death is characterized by Histone H3 release in cleaved caspase 3 independant manner. Neutrophils isolated from WT and KO mice response also to PMA and Wip1 inhibition, surprisingly in both model indicating that GSK2830371 doesn't only acts on Wip1 inhibition. Because we found that inhibition of Wip1 in neutrophil in tumoral context, **Wip1 inhibition in NETosis in pathological context needs to be investigated to understand its effect in NETosis.**

REFERENCES

Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, Weinrauch Y & Zychlinsky A (2004) Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 303: 1532–1535
 Goloudina AR, Kochetkova EY, Pospelova TV & Demidov ON (2016) Wip1 phosphatase: between p53 and MAPK kinases pathways. *Oncotarget* 7: 31563–31571
 Uyanik B, Goloudina AR, Akbarali A, Grigorash BB, Petukhov AV, Singhal S, Eruslanov E, Chaloyard J, Lagorgette L, Hadi T, et al (2021) Inhibition of the DNA damage response phosphatase PPM1D reprograms neutrophils to enhance anti-tumor immune responses. *Nat Commun* 12: 3622
 Uyanik B, Grigorash BB, Goloudina AR & Demidov ON (2017) DNA damage-induced phosphatase Wip1 in regulation of hematopoiesis, immune system and inflammation. *Cell Death Discov* 3: 1–5²

Annexe 4

Swiss Apoptosis & Autophagy Meeting
SA2M 2023



Wip1 involvement in necroptosis signaling pathway

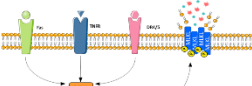
Lisa Lagorgette², Oleg Demidov^{1,2,4,5}, Carmen Garrido^{1, 2, 3}

INSERM U1231, Faculty of Medicine and Pharmacy, Dijon, France¹; University of Bourgogne-Franche Comté, Dijon, France²; Cancer Center George François Leclerc, 21000 Dijon, France³; Institute of Cytology, RAS, St.Petersburg⁴, Russia; NTU Sirius, Sochia, Russia⁵.

BACKGROUND

Inducing cell death is a therapeutic strategy that helps prevent patients from developing resistance to chemotherapy. Notably, DAMPs release associated to cell death could improve immune cells activation with anticancer properties. One of the most immunogenic cell deaths is **necroptosis**, a programmed cell death causing high cellular release and inflammation. Necroptosis signaling pathway is triggered by receptor activation like TNFR1 receptor leading to phosphorylation of key proteins. Phosphorylation cascade, including phosphorylation of RIP1 and **RIP3** leading to phosphorylation of the pseudokinase **MLKL**, which induces its oligomerization making pores in the plasma membrane, causing cell death^{1,2}.

Our protein of interest, **Wip1**, is a phosphatase involved in many cellular process such as hematopoiesis, cell death and cancer progression^{3,4}. Studies have shown Wip1 involvement in autophagy and our team already demonstrates that Wip1 regulates cell death like apoptosis and results have suggested possible link between TNFα signaling and Wip1. Considering that, we wanted to investigate possible role of Wip1 in necroptosis. Chemical induction was used to trigger necroptosis and the allosteric Wip1 inhibitor GSK2830371 was used to study Wip1 functions.



METHODS

| Materials | Methods |
|---|--|
| Human cells Hek293T HT-29 | Cell death quantification using Incucyte [®] cell imaging |
| Mouse cells MC38 | Western-blot |
| Necroptosis inducers (TBZ) • TNFα • Birinapant • Z-VAD-FMK | Co-immunoprecipitation |
| Wip1 inhibition GSK2830371 | Proximity Ligation assay (PLA) |
| Nuclear export inhibition Selinexor | Immunofluorescence |

RESULTS

Wip1 inhibition potentiates necroptosis associated cell death

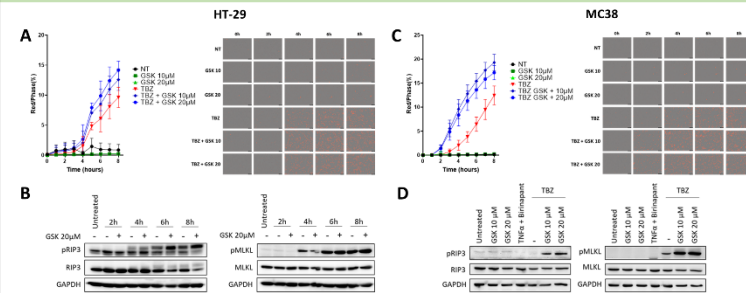


Figure 1: Inhibition of Wip1 potentiates TBZ-induced necroptosis in colon cancer cells HT-29 and MC38 (TBZ = TNFα 20ng/ml, Birinapant 100nM, z-VAD-FMK 20μM).

(A) Quantification of 7AAD measured by Incucyte in HT29, pictures are taken every 1 hour with Incucyte[®] 53; (B) Analysis of necroptosis signaling pathway in HT-29 by Western-blot; (C) Quantification of 7AAD measured by Incucyte in MC38, pictures are taken every 1 hour with Incucyte[®] 53; (D) Analysis of necroptosis signaling pathway in MC38 by Western-blot.

- Combination of TNFα, Birinapant, z-VAD-FMK (TBZ) induces cell death associated to phosphorylation of RIP3 and MLKL.
- Inhibition of Wip1 by GSK2830371 during TBZ treatment increases cell death associated with higher phosphorylation of necroptotic proteins.

Wip1 inhibition increases accumulation of necroptotic proteins in the nucleus

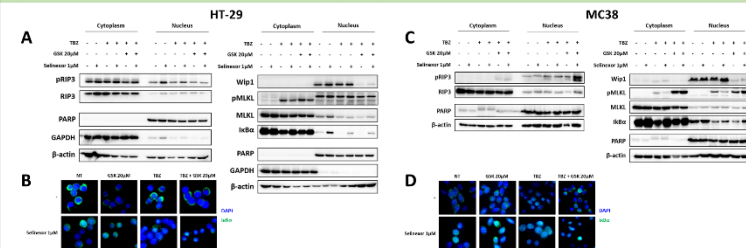


Figure 2: Wip1 inhibition induces accumulation of necroptotic proteins after nuclear export blocking (TBZ = TNFα 20ng/ml, Birinapant 100nM, z-VAD-FMK 20μM).

(A) Analysis of necroptosis signaling pathway after extraction of cytoplasm and nucleus fraction in HT-29; (B) Ixβ staining by immunofluorescence in HT-29; (C) Analysis of necroptosis signaling pathway after extraction of cytoplasm and nucleus fraction in MC38; (D) Ixβ staining by immunofluorescence in MC38

- Necroptotic proteins RIP3 and MLKL are present in the nucleus (already shown in literature^{5,6}).
- Ixβ staining was used to verify blockage of nuclear export by Selinexor.
- Wip1 inhibition by GSK2830371 appears to induce accumulation of necroptotic proteins in the nucleus following blockade of nuclear export.

Wip1 seems to interact with RIPK3 in the nucleus

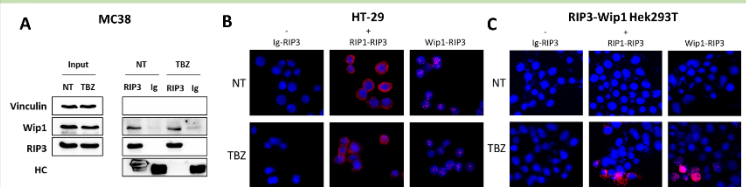


Figure 3: Wip1 and RIP3 interact in the nucleus.

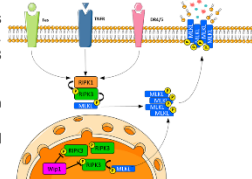
(A) Co-immunoprecipitation between Wip1 and RIP3 on MC38; (B) Proximity Ligation Assay in HT29; (C) Proximity Ligation Assay on RIP3 and Wip1 transfected Hek293T.

- RIP3 and Wip1 interact without necroptosis induction.
- RIP3 and Wip1 are closely located in the nucleus at basal level.
- RIP3 and Wip1 are closely localized in the nucleus, especially after TBZ induction with artificial expression of RIP3 and Wip1.

CONCLUSION & PERSPECTIVES

Already shown in apoptosis, Wip1 seems to play a role in necroptosis signaling pathway notably through its interaction with RIP3 in the nucleus. We suppose that by its dephosphorylation function, Wip1 represses RIPK3 protein preventing its kinase activity involved in necroptosis mechanism.

Wip1 inhibition by GSK2830371 could be use as cancer therapeutic strategy in order to amplify necroptosis induction for its immunogenic properties. These data need to be confirm with knock out cells and *in vivo* studies should be performed to investigate immunogenic effects.



REFERENCES

- Choi, M. E., Price, D. R., Ryter, S. W. & Choi, A. M. K. Necroptosis: a crucial pathogenic mediator of human disease. *JCI Insight* 4, e128834 (2019).
- Ye, K., Chen, Z. & Xu, Y. The double-edged functions of necroptosis. *Cell Death Dis* 14, 1–12 (2023).
- Pecháňová, S., Burdová, K. & Macurek, L. WIP1 phosphatase as pharmacological target in cancer therapy. *J Mol Med (Berl)* 95, 589–599 (2017).
- Uyanik, B., Gligorash, B. B., Goloušina, A. R. & Demidov, O. N. DNA damage-induced phosphatase Wip1 in regulation of hematopoiesis, immune system and inflammation. *Cell Death Discov.* 3, 1–5 (2017).
- Weber, K., Roelandt, R., Bruzgeman, I., Estomes, Y. & Vandenabeele, P. Nuclear RIPK3 and MLKL contribute to cytosolic necrosome formation and necroptosis. *Commun Biol* 1, 1–13 (2018).
- Yoon, S., Bogdanov, K., Kovalenko, A. & Wallach, D. Necroptosis is preceded by nuclear translocation of the signaling proteins that induce it. *Cell Death Differ* 23, 253–260 (2016).

Rôle de la phosphatase Wip1 dans la nécroptose

Mots clés : *Wip1, Phosphatase, Nécroptose, Mort cellulaire, Cancer*

Indispensable à la signalisation cellulaire, la phosphorylation des protéines joue un rôle clef dans les voies de morts cellulaires et est largement décrite dans la littérature s'intéressant aux différentes kinases impliquées. A l'inverse, la déphosphorylation des protéines est moins étudiée mais les phosphatases jouent un rôle prédominant dans ces mécanismes de morts cellulaires. Nouvelle mort cellulaire programmée, la nécroptose se présente comme une mort cellulaire aux fortes propriétés immunogènes. L'induction de mort cellulaire immunogène peut être proposée comme stratégie thérapeutique afin d'améliorer les traitements anti-cancéreux existants et contourner les mécanismes de résistance. Surexprimée dans de nombreux cancers, la phosphatase PPM1D, également appelée Wip1, est décrite comme un régulateur majeur des voies de morts cellulaires comme l'apoptose, l'autophagie ou la sénescence. Ce travail s'intéresse alors au rôle de la phosphatase Wip1 dans la nécroptose. A l'aide de plusieurs modèles cellulaires de déficiences génétiques, nous proposons Wip1 comme un régulateur négatif de la nécroptose par son interaction avec la kinase RIPK3 dans le noyau. Enfin, l'inhibition de Wip1 est proposée comme une stratégie thérapeutique prometteuse afin d'augmenter l'induction de morts cellulaires immunogènes.

Role of Wip1 phosphatase in necroptosis

Keywords: *Wip1, Phosphatases, Necroptosis, Cell death, Cancer*

Phosphorylation of critical proteins in cell death pathways is well described in the literature, but mostly from the point of kinases. Dephosphorylation is usually studied much less, but phosphatases could prevent the execution of suicidal cell death programs. Necroptosis appears as a new type of programmed cell death known for its immunogenic properties. Inducing immunogenic cell death could be proposed to improve cancer treatment and avoid multidrug resistance. Overexpressed in several cancers, the phosphatase PPM1D, also named Wip1, is described as central regulator of cell death pathways such as apoptosis, autophagy or senescence. This work investigates the role of the phosphatase Wip1 in the programmed necroptosis cell death. Using several genetically deficient cell line models, we propose Wip1 as a negative regulator of necroptosis through its interaction with the kinase RIPK3 into the nucleus. Finally, Wip1 inhibition is proposed as a promising therapeutic strategy in order to improve immunogenic cell death induction.