

UNIVERSITÉ DE TLEMCEEN – ABOU-BEKR BELKAÏD
FACULTÉ SNV-STU – DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE

LABORATOIRE DE BIOLOGIE MOLECULAIRE APPLIQUEE ET IMMUNOLOGIE – BIOMOLIM W0414100

MEMOIRE

Présenté par

SERIR Hanane Latifa

En vue de l'obtention du

Diplôme de Master

Spécialité Immunologie

Thème

P53 et immunité anti tumorale

**Sous la direction du Professeur
Mourad ARIBI**

Soutenu le 20/09/2020

Devant le jury :

Président	Dr Chems Eddine SMAHI	Professeur	Université de Tlemcen
Directeur de thèse	Dr Mourad ARIBI	Professeur	Université de Tlemcen
Examinatrice	Dr Nabila BRAHAMI	Maître de conférences A	Université de Tlemcen

Septembre 2020

Résumé

Introduction : L'altération du génome d'une cellule normale conduit à des modifications phénotypiques qui entraînent des transformations et un développement d'une tumeur. Le gène *P53* est le plus fréquemment muté dans le cancer humain. Son typage moléculaire est ainsi nécessaire, non seulement dans le diagnostic de biologie moléculaire, mais également dans la recherche et la médecine translationnelle en oncologie. Dans cette optique, nous avons procédé à la conception d'amorces spécifiques du gène *P53*.

Objectif : Conception d'amorces spécifiques qui encadrent le gène *P53*.

Matériel et méthodes : L'intégrité du gène *P53* a été identifiée avec la base de données Ensembl. L'exon 13 a été sélectionné pour obtenir l'amorce spécifique à partir de dix paires d'amorces spécifiques du gène *P53* obtenues en utilisant Primer-BLAST.

Résultats : La paire d'amorces suivante a été obtenue : (i) F primer ; 5'GTCAGCTCATCAACCAGGCT3' (TM ; 55°C, teneur en GC ; 55, longueur des nucléotides ; 20), (ii) R primer ; xxx (TM ; 50°C, teneur en GC ; 50, longueur des nucléotides ; 20).

Conclusion : La conception avec spécificité des amorces encadrant le gène *P53*, afin de pouvoir réaliser par la suite une amplification optimale par PCR, pourrait faire plus tard l'objet d'une recherche en immunologie et dans le diagnostic moléculaire des cancers.

Mots clé : cancer, tumeur, p53, PCR, amorces

Abstract

Background: The alteration of the genome of a normal cell leads to phenotypic changes which lead to development of a tumor. The *P53* gene is most frequently mutated in human cancer. Its molecular typing is thus necessary, not only in the diagnosis of molecular biology, but also in research and translational medicine in oncology. With this in mind, we proceeded to design a specific primers for the *P53* gene.

Objective: Design of specific primers that flank the *P53* gene.

Material and Methods: The integrity of the *P53* gene was identified with the Ensembl database. Exon 13 was selected to obtain the specific primer from ten pairs of primers specific for the *P53* gene obtained using Primer-BLAST.

Results: The following pair of primers was obtained: (i) F primer; 5'GTCAGCTCATCAACCAGGCT3 '(TM; 55 ° C, GC content; 55, nucleotide length; 20), (ii) R primer; xxx (MT; 50 ° C, GC content; 50, nucleotide length; 20).

Conclusion: The design with specificity of the primers flanking the *P53* gene, in order to subsequently achieve optimal amplification by PCR, could later be the subject of research in immunology and in the molecular diagnosis of cancers.

Keywords: cancer, tumor, p53, PCR, primers

مقدمة: يؤدي تغيير مورثات الخلية الطبيعية إلى تغيرات نمطية تؤدي إلى تطور ورم. غالباً ما تؤدي الطفرات على مستوى مورثة *P53* إلى سرطان عند الإنسان. وبالتالي فإن تصنيفها ضروري ، ليس فقط في تشخيص الحالة على المستوى الجزيئي ، ولكن أيضاً في البحث في علم الأورام و الطب. مع وضع هذا في الاعتبار، شرعنا في تصميم بادئات خاصة بالمورثة *P53*.

الهدف: تصميم بادئات محددة تحيط بالمورثة *P53*.

المواد و الطرق: تم التعرف على المورثة *P53* في قاعدة بيانات Ensembl. تم اختيار القطعة الدالة 1، من بين 10 أزواج من البادئات الخاصة بالمورثة *P53* باستخدام Primer-BLAST .

النتائج: تم الحصول على زوج من البادئات.

الخلاصة: التصميم بخصوصية للبادئات المحيطة بالمورثة *P53*، من أجل التمكن لاحقاً من إجراء تفاعل البوليميراز المتسلسل ، يمكن أن يكون لاحقاً موضوعاً للبحث في علم المناعة والتشخيص الجزيئي للسرطانات.

الكلمات المفتاحية: السرطان، الورم، *P53*، PCR ، برايمر.

*Avant tout je remercie Allah
tout puissant de m'avoir guidé
vers le chemin du savoir et de
m'avoir donné le courage et la
volonté pour réaliser ce modeste
travail.*

Avant-propos

Ce mémoire de Master a été réalisé au sein du Laboratoire de Biologie Moléculaire Appliquée et Immunologie (BIOMOLIM, W0414100), Université de Tlemcen, sous la direction du Professeur Mourad ARIBI.

J'adresse tout d'abord mes vifs remerciements et ma vive reconnaissance à mon encadreur Pr. Mourad ARIBI, pour m'avoir encadré, pour sa disponibilité et pour tout son soutien et conseils durant mon Master et mes travaux de mémoire.

Je remercie chaleureusement les membres du jury qui me font l'honneur de juger mon travail de thèse malgré leurs obligations professionnelles, la distance et leurs emplois du temps chargés.

Je remercie toute l'équipe du Laboratoire du Pr. Mourad ARIBI, ainsi que les ingénieurs de recherche, Mme Zeyneb HADJIDJ et Mme Rabia MESSALI.

Je remercie vivement mon équipe Lamia et Sarah, ainsi que toute la Promotion 2018-2020 de Master Immunologie, pour leur soutien et la très bonne ambiance de travail durant les deux années passées.

Je dédie ce travail :

À mes parents à qui je dois la vie, je ne saurais jamais exprimer mon respect, mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices qu'ils ont consenti pour mon instruction et mon bien être.

À mes chers grands parents Hocine et Fatima, en témoignage de gratitude d'estime et d'attachement, puisse Dieu vous accorder santé, longue vie et prospérité. À la mémoire de ma grand-mère Fatma, que Dieu ait ton âme dans sa sainte miséricorde.

À ma très chère sœur Fadia, je te souhaite une vie pleine de bonheur et de réussite, que Dieu te protège et te garde.

À mes oncles, Arslane, Riad, Fouad, Fazil et à ma chère tante Nabahats, chanceuse de vous compter dans ma vie.

À mes chers petits cousins que j'aime énormément, Yasmine, Abdelkader, Abdellatif, Amir, Moncif, Djawed, Imene et Malak.

À mes amies et sœurs Lamia Senoussaoui et Sarah Sekouri avec qui j'ai partagé des moments de joie, de rire et de bonheur, merci d'avoir été là à tout moment, Merci !!!

À toute ma famille, je vous aime.

Hanane Serir

TABLE DES MATIÈRES

Résumé	ii
Abstract	i
Résumé en Arabe	v
Avant-propos	v
Table des matières	i
Liste des figures	v
Liste des tableaux	ii
Liste des abréviations	x
Introduction	i
Introduction	1
Chapitre 1 Revue de littérature	
1. Revue de littérature	3
1.1 Cancer	4
1.1.1 Généralités	4
1.1.1.1 Définition	4
1.1.1.2 Epidémiologie	4
1.1.1.3 Facteurs déclencheurs	5
1.1.1.4 Caractéristiques	5
1.1.1.5 Cancérogenèse	8
1.1.2 Immunité anti tumorale	9
1.1.2.1 Immunosurveillance	10
1.1.2.2 Immunoediting	11
1.1.3 Stratégies activatrices d'immunité anti tumorale	13
1.1.3.1 Vaccination	
1.1.3.2 Virus oncologiques	
1.1.3.3 ACT	
1.1.3.4 Immunothérapies	

1.2 P53	19
1.2.1 Généralités	19
1.2.1.1 Définition	19
1.2.1.2 Structure	19
1.2.1.3 Rôle	20
1.2.1.4 Régulation	21
1.2.1.5 Activation	21
1.2.1.6 Fonctions non transcriptionnelles	22
1.2.2 P53 et réponses anti tumorales	24
1.2.3 P53 et cancer	28
1.2.4 P53 en thérapeutique anti cancéreuse	30
1.3 PCR	33
1.3.1 Généralités	33
1.3.1.1 Définition	33
1.3.1.2 Acteurs	33
1.3.1.3 Principe	33
1.3.1.4 Etapes	33
1.3.2 Amorces	35
1.3.2.1 Définition	35
1.3.2.2 Caractéristiques d'une bonne paire d'amorces	35
1.3.3 Banques et bases de données	36
1.3.3.1 Banque de données	36
1.3.3.2 Base de données	36
1.4 Problématique et objectifs	37
2.1 Matériels et méthodes	39
3.1 Résultats	44
Discussion	47
Conclusion	48
Références	49

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1. Sélection clonale et progression tumorale.

Figure 1.2. Phase d'élimination.

Figure 1.3. Structure de la protéine p53.

Figure 1.4. Rôle de la protéine p53 avec ses différentes voies d'activation, d'inhibition et ses gènes cible.

Figure 1.5. Modèle d'activation de p53.

Figure 1.6. Les différents membres de la famille Bcl-2.

Figure 1.7. Différentes réponses anti-tumorales de p53, et les gènes cibles impliqués dans chacune de ces fonctions.

Figure 1.8. Schéma de la structure de la protéine p53 (hotspots).

Figure 1.9. Stratégies activatrices du p53 en thérapeutique anti cancéreuse.

Figure 1.10. Principe de la PCR.

Figure 2.1. Plateforme de la base de données Ensembl.

Figure 2.2. Séquence du gène p53.

Figure 2.3. Séquence encadrée du gène p53.

Figure 2.4. Plateforme de la base de données NCBI.

Figure 2.5. Outil Primer Blast.

Figure 2.6. Changements de quelques paramètres.

Figure 2.7. Résultats.

Figure 2.8. Confirmation des résultats par PCR in-Silico.

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1. Liste des inhibiteurs de point de contrôle approuvés.

Tableau 1.2. Exemples de cycles PCR en fonction des fragments.

Tableau 2.1. Critères de notre paire d'amorces.

LISTE DES ABRÉVIATIONS**A**

ACT: adoptif cells transfert

ADN : acide désoxyribonucléique

ADNp : ADN polymérase

B

BCL : B cells lymphoma

BER: base excision repair

C

c-onc : oncogène cellulaire

CIRC : centre international de recherches sur le cancer

CMH: complexe majeur d'histocompatibilité

CCNP: cancer cell nanoparticules

CAR: chimerique antigene receptor

CTLA-4: antigène 4 associé aux lymphocytes T cytotoxiques.

CPA: cellule présentatrice d'antigènes

CHK : check point kinase

D

DDR: DNA damage response

DRS: death receptors

DBD : DNA binding protein

E

EMT: transition épithéliomésenchymateuse

G

GM-CSF : granulocytes macrophages cells steam factor

H

HPV : humain papilloma virus

HSV : herpes simplex virus

I

IL: interleukines

IPS: induced pluripotents stem cells

INF: interferon

IDO : indoléamine 2,3 dioxygénase

M

M1: macrophage 1

MDM: murin double minute

MOMP: mitochondrial out of membrane permeabilization

MDSC: myeloid driven suppressor cells

N

NK :natural killer

NP: nanoparticules

O

OMS : organisation mondiale de la santé

P

p53 : protéine 53

PCR : polymérisation chaîne réaction

PGE: prostaglandines

PDGF: plaquettes driven growth factor

pRb: protéine de rétinoblastome

R

ROS: reactive oxygen species

S

SASP: senescence associated secretory phenotype

T

TRAIL: tumor necrosis factor alpha-related apoptosis inducing ligand

TNF: tumor necrosis factor

Treg: lymphocyte T régulateur

TIL : tumor infiltrating lymphocytes

TAM : tumor associated macrophages

TGFβ: transforming growth factor beta

U

UV : ultraviolets

V

V-onc : oncogène viral

VEGF: vascular endothelial growth factor

INTRODUCTION

Introduction

Le cancer est la cause principale de décès dans le monde, avec environ 12,7 millions de cas affectant les deux sexes. Ce nombre devrait atteindre 21 millions d'ici 2030 ("OMS | Cancer," n.d.).

Tout au long du processus de développement des tumeurs, le système immunitaire interagit avec les cellules cancéreuses, afin d'éviter leur progression vers des métastases. Cette interaction, très complexe, est maintenant classée comme caractéristique du cancer du fait qu'elle peut à la fois inhiber et améliorer la croissance tumorale (Hanahan and Weinberg, 2011), et se traduit soit par une éradication de la tumeur soit par son évvasion (Becker et al., 2013).

Un proto-oncogène est un gène présent normalement dans le génome de la cellule humaine qui stimule la croissance, mais qui, suite à une mutation, une amplification ou une translocation, peut devenir un gène transformant que l'on appelle oncogène. L'expression de cet oncogène peut favoriser la survenue d'une variété de cancers.

À l'inverse, les gènes suppresseurs de tumeurs limitent les divisions cellulaires et stoppent la progression d'un cancer, l'inactivation de ces gènes peut contribuer à la transformation maligne d'une cellule, parmi ces gènes il ya le gène *P53*.(Jeanteur et al., 1990). Plus de 50 % des tumeurs humaines portent des mutations du gène *P53*, ces mutations sont encore fréquemment trouvées dans les cancers humains les plus courants (Napoli and Flores, 2017). La molécule *p53* correspond à un facteur de transcription, suppresseur de tumeurs, interagissant avec des gènes cibles pour exercer un contrôle sur le cycle cellulaire. Les mutations du gène *P53* présentent un risque à la cellule de se transformer en cellule cancéreuse(Hainaut and Wiman, 2007).

La réaction de polymérisation en chaîne (PCR, *polymerase chaine reaction*), représente une méthode de biologie moléculaire très utilisée, vu sa rapidité, sa sensibilité et sa spécificité. Elle consiste à utiliser, de manière répétitive, le pouvoir de l'ADN polymérase, celui de synthétiser un brin complémentaire d'ADN à partir d'une petite séquence d'ADN spécifique qu'on appelle amorce (primer en anglais).

Une amorce est une séquence complémentaire à une région située au début de l'ADN que l'on veut amplifier. Elle doit être choisie avec beaucoup d'attention pour que l'efficacité de la PCR soit optimale (Mathys et al., 2007).

INTRODUCTION

Pour notre part, notre objectif consistait à la conception, avec spécificité des amorces encadrant le gène P53.

CHAPITRE 1

Revue de la littérature

1. Cancer
2. P53
3. PCR
4. Problématique et objectifs

CHAPITRE 1

1. Revue de la littérature

1.1 Cancer

1.1.1 Généralités

1.1.1.1 Définition

Le cancer est une maladie complexe pouvant affecter n'importe quelles parties de l'organisme, c'est une déficience dans le contrôle de la division cellulaire, caractérisée par une prolifération anarchique et non-régulée des cellules saines. En conséquence, cette prolifération conduit à la destruction du tissu ciblé, et se propage pour envahir des parties adjacentes de l'organisme, puis essaimer dans d'autres organes, et conduit à la mort de l'individu ("Cancer Today | UICC," n.d.)

Les cellules cancéreuses proviennent d'un même clone, sont formées à partir de la transformation par mutation et/ou instabilité génétique, épigénétique ou moléculaire d'une cellule normale et saine (Vogelstein and Kinzler, 2004). Les nouvelles cellules résultantes forment une tumeur maligne (un néoplasme), ou se propagent à travers le corps, pour former des métastases (Vainio and Hietanen, 2003).

1.1.1.2 Epidémiologie

Le cancer représente la première cause de mortalité dans le monde, affectant les personnes de tous âges. En 2012, l'OMS avait signalé 8,2 millions de décès dans le monde (Ferlay et al., 2019). En 2030, il est prévu que le nombre de décès par cancer dans le monde s'élève à 13,1 millions. Le Centre international de recherche sur le cancer (CIRC) estime que, l'Asie et l'Afrique ont une proportion la plus élevée de décès par cancer (7,3% et 57,3% respectivement) (Ferlay et al., 2019). En Algérie, l'incidence du cancer est en augmentation continue, il y a eu 50.000 nouveaux cas de cancer et pas moins de 20.000 décès en 2019.

Chapitre 1. Revue de littérature

1.1.1.3 Facteurs déclencheurs du cancer

Le cancer est une maladie multifactorielle, sa fréquence augmente avec l'âge et la durée d'exposition aux agents mutagènes (cancérogènes). Les 4 facteurs principaux de risque dans le monde sont le tabagisme, la consommation d'alcool, une mauvaise alimentation et la sédentarité.

Les cancérogènes sont divisés en quatre catégories :

- Les cancérogènes physiques, comme les rayonnements ultraviolets (UV) et les radiations ionisantes.
- Les cancérogènes chimiques, comme l'amiante, les composants de la fumée du tabac, l'aflatoxine (contaminant des denrées alimentaires) ou l'arsenic (polluant de l'eau de boisson).
- Les cancérogènes biologiques, comme des infections dues à certains virus le papillomavirus humain (HPV), le virus de l'hépatite B, et le virus de l'hépatite C, bactéries ou parasites (Plummer et al., 2016).
- Le vieillissement est un autre facteur fondamental dans l'apparition du cancer. On observe en effet une augmentation spectaculaire de l'incidence avec l'âge, probablement due à l'accumulation des mutations non réparées tout au long de la vie, conjuguée à une inefficacité du système de réparation ("OMS | Cancer," n.d.).

Les cancérogènes provoquent des anomalies génomiques qui affectent principalement trois types de gènes : les oncogènes, les gènes suppresseurs de tumeur et les Gènes contrôlant l'intégrité du génome (care takers) (Hanahan and Weinberg 2000)(Hanahan and Weinberg, 2011).

1.1.1.4 Caractéristiques de la cellule cancéreuse

La cellule cancéreuse a des caractéristiques qui peuvent la différencier d'une cellule saine. Ces caractéristiques sont la conséquence des altérations génétiques acquises par les cellules tumorales au cours du processus de tumorigénèse, et par leur interaction avec les cellules stromales (endothéliales ou immunitaires), conférant aux cellules des capacités accrues de prolifération et de survie.

Les propriétés majeures des cellules cancéreuses, sont communes à tous types de tumeurs, elles ont été décrites par Hanahan et Weinberg 2000 puis par Douglas (Hanahan and Weinberg, 2011).

Chapitre 1. Revue de littérature

➤ **Instabilité génétique**

Par petites mutations géniques, altérations du nombre de chromosomes, translocation chromosomique, ou amplification de gènes (Lengauer et al., 1998). Les cellules cancéreuses possèdent aussi des modifications épigénétiques (méthylation de l'ADN, modifications des histones) (Berdasco and Esteller, 2010).

➤ **Insensibilité aux signaux antiprolifératifs et résistance à la mort cellulaire**

Par inactivation des gènes suppresseurs de tumeur (*PRb P53*), en agissant sur le récepteur du TGF β (Vogelstein et al., 2000) (Markowitz et al., 1995), ou par une diminution de l'expression de protéines pro-apoptotiques (par l'intermédiaire des protéines membre de la famille Bcl-2) (Woude and Klein, 2011) (*Advances in Immunology*, 1997).

➤ **Indépendance vis-à-vis des signaux prolifératifs**

Elles stimulent leur croissance de manière autocrine, en exprimant des récepteurs adaptés, qui régulent des facteurs de croissance ou TGF β (Jiang et al., 2001).

➤ **prolifération illimitée (perte de la sénescence)**

Les cellules tumorales sont immortalisées, et peuvent se répliquer en continu (Wyllie et al., 1980), notamment en dérégulant et en réactivant l'expression de l'enzyme télomérase (Bryan and Cech, 1999).

➤ **Dérégulation du métabolisme énergétique cellulaire**

Les cellules cancéreuses doivent déréguler leur métabolisme énergétique pour pouvoir croître et se proliférer, le métabolisme spécifique des cellules cancéreuses consiste à prendre leur énergie en dégradant du glucose de façon anaérobie, au lieu de la respiration cellulaire, ce qu'on appelle effet « Warburg ». Cet effet a pour conséquence une consommation accrue de glucose par les tumeurs (Warburg et al., 1927).

➤ **Inflammation pro-tumorale**

L'inflammation peut favoriser la tumorigenèse, en effet, l'inflammation chronique, induite par les maladies auto-immunes ou par l'obésité, augmente le risque de cancer. Et aussi, le recrutement des cellules immunitaires au niveau de la tumeur, telles que les macrophages de type TAM (Tumor-Associated Macrophages) et les cellules myéloïdes suppressives (MDSC, MyeloidDerived Suppressor Cells), permet de créer un microenvironnement tumoral inflammatoire favorable pour l'angiogenèse, la croissance tumorale et la propagation métastatique. Elle peut augmenter aussi l'instabilité génétique (Grivennikov et al., 2010).

➤ **Capacité à induire l'angiogenèse**

L'angiogenèse permet de développer des vaisseaux sanguins, qui alimentent la tumeur en oxygène, nutriments, énergie et facteurs de croissance. Les tumeurs activent leur angiogenèse par la production du VEGF (vascular endothelial growth factor) (Hanahan and Folkman, 1996).

Chapitre 1. Revue de littérature

➤ Capacité d'invasion métastatique

Les cellules tumorales sont capables d'envahir d'autres tissus de l'organisme, où les nutriments et l'espace ne sont pas limités (Christofori and Semb, 1999).

➤ Echappement au système immunitaire

Par l'augmentation de la résistance aux effets cytotoxiques de l'immunité, ou la diminution de la reconnaissance des cellules tumorales par les cellules immunitaires par exemple (Vesely et al., 2011).

1.1.1.5 Cancérogenèse

Le développement d'un cancer, implique divers changements structuraux dus à des atteintes du génome, et/ou des perturbations de signaux cellulaires et moléculaires. La cancérogenèse est un processus complexe qui repose sur trois étapes: l'initiation, la promotion et la progression (Foulds, 1954).

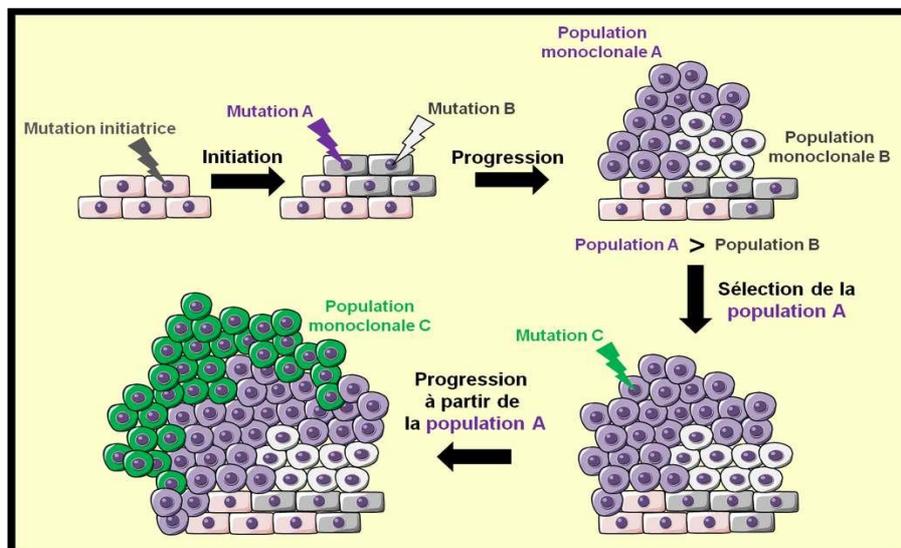


Figure 1.1. Sélection clonale et progression tumorale(Ségala, n.d.).

➤ Initiation

Cette phase est caractérisée par la survenue d'une mutation génétique irréversible, causée par un agent cancérogène (virus, agents chimiques, radiations, etc.) ("A New, Quantitative, Approach to the Study of the Stages of Chemical Carcinogenesis in the Mouse's Skin," n.d.)

La cellule peut devenir cancéreuse grâce à une ou plusieurs mutations, qui altèrent les fonctions des gènes suppresseurs de tumeurs, la cellule dans ce cas présente des anomalies de réparation de l'ADN, une perte du contrôle de la multiplication cellulaire ou une résistance à l'apoptose, ce qui conduit à la formation d'une cellule dite « initiée ».

Chapitre 1. Revue de littérature

La cellule initiée n'est pas une cellule néoplasique, mais a fait son premier pas vers cet état (Rashid, 2017).

➤ **Promotion**

Cette phase correspond à la prolifération des populations cellulaires clonales à partir de cellules initiées, sous l'action prolongée d'agents promoteurs tumoraux, leur efficacité dépend de leur concentration dans le tissu cible (Samoszuk, 1997). Cela aboutit à la formation de lésions précancéreuses. Ce phénomène est réversible par apoptose.

➤ **Progression**

La progression est responsable de la transformation maligne des cellules précancéreuses (Klaunig et al., 2000) (Williams, 2001). Un phénotype néoplasique est acquis par des mécanismes génétiques et épigénétiques (Dulić, 2002), la prolifération cellulaire devient indépendante de la présence du stimulus. Cette phase est irréversible, et instable génétiquement, avec une croissance plus rapide, et des changements dans les caractéristiques biochimiques, métaboliques et morphologiques des cellules (Dixon and Koprass, 2004), les cellules acquièrent des capacités d'invasion locorégionale puis métastatique. La dissémination métastatique nécessite l'intravasation de cellules tumorales et leur survie dans la circulation sanguine ou lymphatique, puis l'extravasation dans un tissu et le développement d'une tumeur secondaire (Chambers et al., 2002) .

Chapitre 1. Revue de littérature

1.1.2 Immunité anti-tumorale

1.1.2.1 Immunosurveillance

Le concept selon lequel le système immunitaire peut reconnaître et éliminer les cellules cancéreuses est appelé immunosurveillance ("Revisiting immunosurveillance and immunostimulation: Implications for cancer immunotherapy," n.d.) (Ferradini et al., 1993).

En 2001, ce concept a été démontré par l'équipe de Schreiber dans des modèles animaux, qui a observé l'apparition spontanée de néoplasmes chez des souris immunocompétentes ou immunodéprimées, ils ont constaté que les souris immunocompétentes n'ont pas développé de tumeurs, alors que les souris RAG2^{-/-}, déficientes en lymphocytes T et B, développent des tumeurs malignes pulmonaires et coliques dans environ 50% des cas. De plus, les souris RAG2^{-/-} STAT1^{-/-}, déficientes en lymphocytes T et B et insensibles à l'IFN γ , développent des néoplasmes dans 80% des cas (Shankaran et al., 2001). Cette étude a introduit le concept d'immunoediting (Shankaran et al., 2001). Depuis, de nombreuses études ont montré l'implication, de la réponse immunitaire innée et adaptative dans la protection contre l'apparition de tumeurs malignes. Des travaux récents ont démontré que les mutations accumulées par les tumeurs au cours du processus de transformation peuvent générer des néo-antigènes qui peuvent être détectés naturellement et efficacement ciblés par les cellules T ("A natural cytotoxic T cell response in a spontaneously regressing human melanoma targets a neoantigen resulting from a somatic point mutation. - PubMed - NCBI," n.d.)

1.1.2.2 Immunoédition (*Immunoediting*)

En 2002, la théorie de « l'immuno-édition » a été proposée (Dunn et al., 2002), qui explique que des cellules tumorales mutées sont sélectionnées positivement par le système immunitaire, mais cela se termine par un échappement de l'immunosurveillance. Ce concept a été avancé par Robert Schreiber sous le nom de la théorie des « 3E » comprenant **3 phases : Elimination, Equilibre et Echappement** ("The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. - PubMed - NCBI," n.d.), la phase d'élimination des cellules tumorales par le système immunitaire, la phase d'équilibre entre la progression tumorale et la réponse immunitaire et la phase d'échappement où la tumeur s'échappe et se développe par plusieurs mécanismes (Schreiber et al., 2011).

Chapitre 1. Revue de littérature

➤ Elimination tumorale

L'élimination est une phase de l'immunoediting du cancer, où les deux systèmes immunitaires inné et adaptatif permettent de détecter et de détruire les tumeurs précoces avant qu'elles ne deviennent cliniquement visibles. On peut résumer ce processus d'élimination en quatre étapes (Figure 2).

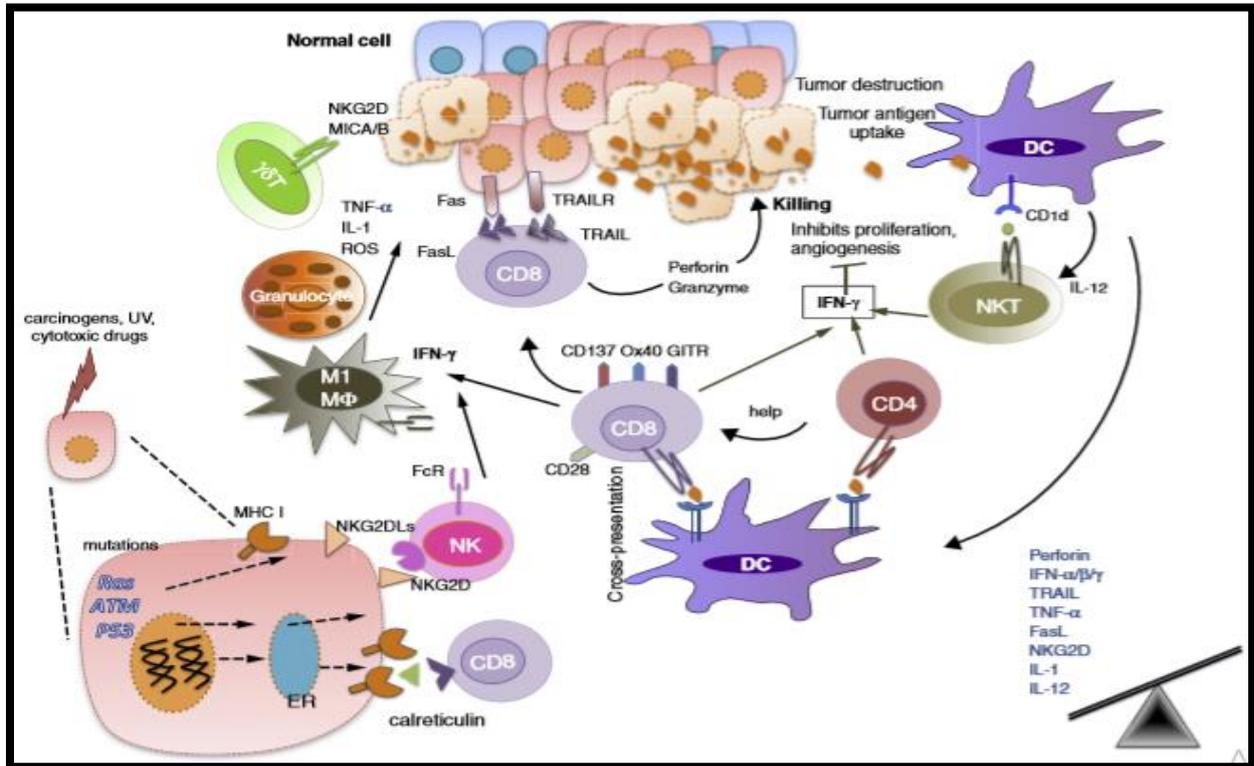


Figure 1.2. phase d'élimination (Mittal et al., 2014).

Une cellule cancéreuse primaire avec une taille importante, se vascularise et arrive à franchir le tissu adjacent causant des lésions de celui-ci, ce qui induit la production d'intermédiaires inflammatoires (Hanahan and Folkman, 1996). Cela recrute plusieurs cellules comme les cellules NK, les lymphocytes T, et $T\gamma\delta$ (Girardi et al., 2001). Ces dernières reconnaissent les antigènes tumoraux présents à la surface des cellules tumorales, et produisent de l' $IFN\gamma$ (Smyth et al., 2001).

Les antigènes présentés par les molécules du CMH de classe I, sont reconnus par les cellules effectrices $CD8+$ et les cellules NK. Les CD8 peuvent également coprésenter les antigènes tumoraux aux lymphocytes T, y compris les cellules NKT (antigènes glycolipidiques présentés via CD1d). Ces cellules effectrices activées libèrent $IFN\gamma$ qui peut effectuer des effets anti-tumoraux en inhibant la prolifération des cellules tumorales et l'angiogénèse. Les lymphocytes T $CD8+$ peuvent induire l'apoptose des cellules tumorales en interagissant avec les récepteurs Fas et TRAIL.

Chapitre 1. Revue de littérature

sur les cellules tumorales, ou en sécrétant les perforines et granzymes. Les cellules T effectrices expriment des molécules de co-stimulation telles que CD28, CD137, GITR, OX40 qui améliorent leur prolifération et survie. Les cellules T $\gamma\delta$ peuvent également reconnaître et tuer les tumeurs en exprimant des ligands NKG2D (MICA / B chez les humains). Les cellules immunitaires innées telles que les macrophages (M1) et les granulocytes contribuent également à l'immunité anti-tumorale en sécrétant TNF- α IL-1, l'IL-12 et ERO. Dans la phase d'élimination, l'équilibre vers une immunité anti-tumorale est dû à une augmentation de l'expression d'antigènes tumoraux, du CMH de classe I, des récepteurs Fas et TRAIL sur les cellules tumorales, des perforines et granzymes, IFN- $\alpha/\beta/\gamma$, IL-1, l'IL-12, et du TNF α dans le microenvironnement tumoral (Mittal et al., 2014).

➤ **Equilibre**

La phase d'équilibre débute lorsque certaines cellules tumorales parviennent à survivre à la phase initiale d'élimination, par différents processus d'adaptation, le système immunitaire maintient la tumeur dans un état de dormance fonctionnelle. Certaines cellules tumorales subissent des modifications génétiques et épigénétiques, et en raison de la pression constante immunitaire, les cellules tumorales arrivent à résister à la reconnaissance immunitaire (Perte de l'antigène ou des défauts de présentation de l'antigène) et induisent l'immunosuppression (PDL1), c'est donc un équilibre entre la réponse anti tumorale (IL-12, IFN- γ) Et la progression tumorale (IL-10, IL-23) (Mittal et al., 2014).

➤ **Échappement**

Les mutations génétiques qui caractérisent les cellules tumorales, peuvent mener les cellules à échapper de la reconnaissance par le système immunitaire, conduisant à un cancer détectable. Cela correspond à la perte d'expression de molécules du CMH ou de molécules de co-stimulation, ou à l'expression de ligands inhibiteurs de la réponse immunitaire. De nombreux mécanismes participent à l'échappement tumoral et à l'établissement d'un environnement immunosuppresseur, qui peut passer par la production d'IL-10 et de TGF- β qui sont des cytokines immunosuppressives à large spectre, ou par le recrutement de cellules telles que les Tregs, les MDSC (« Myeloid-derived suppressor cells »), les macrophages de type M2 et les neutrophiles de type N2, caractérisés par leurs capacités immunosuppressives ("VEGF targets the tumour cell. - PubMed - NCBI," n.d.). Les cellules tumorales peuvent inhiber la fonction des cellules dendritiques par des cytokines inhibitrices de la maturation des cellules

Chapitre 1. Revue de littérature

dendritiques ou à des dérivés lipidiques qui perturbent leur migration vers les ganglions lymphatiques.

Aussi, les lymphocytes T régulateurs sont souvent recrutés au site tumoral où ils suppriment l'immunité anti tumorale, les LTreg expriment le CD25 et le facteur de transcription Foxp3, ayant la capacité d'inhiber la fonction de la plupart des cellules du système immunitaire, ils sécrètent aussi l'IL-10, le TGF β qui sont inhibiteurs (Terabe and Berzofsky, 2004). Leur recrutement au site tumoral dépend de la production de TGF β , ou de chimiokines dans le microenvironnement tumoral. Le cyclophosphamide pourrait éliminer ces cellules et ainsi augmenter la réponse immunitaire anti tumorale (Byrne et al., 2011).

Les lymphocytes Th17 sont une population de cellules T CD4 produisant de l'IL-17 et exprimant le facteur de transcription RORc. Ces cellules sont induites après stimulation par l'IL-6 et le TGF β , deux cytokines fortement produites au site tumoral. L'IL-17 a la propriété d'induire la production de VEGF et ainsi de favoriser l'angiogenèse. (Bruchard et al., 2013)

Les tumeurs ont la capacité de recruter des macrophages au site tumoral. Les macrophages tumoraux exercent des fonctions immunosuppressives et peuvent inhiber l'immunité anti tumorale par la production de TGF β , d'IL-10 et de PGE2. Ces macrophages induisent des réponses immunitaires Th2 et limitent ainsi la réponse immunitaire anti tumorale, Ils favorisent également la néoangiogenèse par la sécrétion du facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF) (Sica et al., 2008).

Les MDSC sont une population de précurseurs myéloïdes bloqués à un stade immature de différenciation, ces cellules s'accumulent au cours de l'évolution des tumeurs, elles sont induites lorsque des précurseurs myéloïdes communs sont stimulés par des facteurs solubles et des microvésicules tumorales, ces cellules ont la capacité d'inhiber la réponse immunitaire T CD4 et CD8 par différents mécanismes immunosuppresseurs (Łuksza et al., 2017).

Chapitre 1. Revue de littérature

1.1.3 Stratégies activatrices de l'immunité anti-tumorale

- **Vaccination**

Les vaccins thérapeutiques anticancéreux, incitent le système immunitaire à attaquer les cellules cancéreuses déjà présentes dans le corps, à empêcher le cancer de se développer, et à prévenir son réapparition. Les vaccins thérapeutiques anticancéreux peuvent être faits de cellules cancéreuses, de parties de cellules cancéreuses ou d'antigènes. Dans le cancer du col de l'utérus, qui est le plus souvent causé par le virus du papillome humain de type 16 (HPV16), *Welters et al* ont développé une méthode de vaccination thérapeutique, où ils synthétisent de longs peptides imitant les principales protéines oncogènes du HPV16, qui entraînent une régression médiée par les lymphocytes T des cellules cancéreuses induites par le HPV16. La combinaison de ce vaccin avec la chimiothérapie, a aidé à renforcer les réponses immunitaires des patients contre le cancer ("Vaccination against HPV-16 Oncoproteins for Vulvar Intraepithelial Neoplasia | NEJM," n.d.).

Ronnie H. Fang et al ont développés des Nanoparticules recouvertes de membrane de cellules cancéreuses (CCNP), pour la vaccination anti-cancéreuse. Ces chercheurs ont réussi à créer des nanoparticules polymères biodégradables, avec une membrane de cellules cancéreuses, qui permettent aux antigènes associés à la tumeur liés à la membrane, ainsi qu'aux adjuvants immunologiques, d'être efficacement délivrés aux cellules professionnelles présentant l'antigène, pour favoriser les réponses immunitaires anticancéreuses (Kroll et al., 2017).

Récemment, l'activation du stimulateur des gènes de l'interféron (STING), a montré un grand potentiel pour renforcer l'immunité anti tumorale, par l'induction d'une variété de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires, y compris les IFN de type I. Un certain nombre d'agonistes STING naturels et synthétiques ont été découverts ou développés, les dinucléotides cycliques cytosoliques exogènes et endogènes (CDN) sont les ligands du récepteur STING, ils ont été reformulés avec des vaccins anticancéreux et avec une stimulation des lignées granulocytes-macrophages (GM-CSF) appelés STINGVAX, qui ont démontré une efficacité anti tumorale in-vivo médiée par une activation accrue des cellules dendritiques et des LT CD8 spécifique à l'antigène tumoral. Lorsqu'il est combiné avec un blocage spécifique de PD-1, STINGVAX induit une régression des tumeurs qui ne répondent pas au blocage de PD-1 seul (Fu et al., 2015).

Chapitre 1. Revue de littérature

En plus d'un vaccin anticancéreux, le mouvement cellulaire peut être l'une des approches potentielles *ex-vivo* pour stimuler les activités et la survie des cellules immunitaires pendant un cancer solide. C'est ce que **Mourad Aribi, Zeyneb Hadjidj, Rabia Messali** ont démontré et pour la première fois que la stagnation cellulaire est fortement impliquée dans l'apoptose des cellules périphériques NK et la production de TNF- α , ainsi que dans la transition vers un Foxp3 induit par un phénotype régulateur. Le mouvement cellulaire régule les niveaux d'expression de p53 et ERK dans les cellules NK stimulées par IL-2 (Hadjidj et al., 2020).

- **Virus oncolytiques**

Les virus oncolytiques sont capables de se répliquer sélectivement dans les cellules cancéreuses, et de les tuer sans endommager les tissus normaux. Les virus oncolytiques peuvent être des virus génétiquement modifiés ou d'origine naturelle, qui ont la capacité d'induire l'immunité spécifique aux tumeurs et la mort des cellules cancéreuses (Fukuhara et al., 2016). Les cellules cancéreuses présentent des déficiences qui les rendent plus sensibles aux infections virales que les cellules normales. Cependant, le génie génétique a été utilisé dans de nombreux virus oncolytiques pour affaiblir davantage la capacité du virus à infecter et à se répliquer dans les tissus normaux. Le virus oncolytique Talimogene laherparepvec (T-vec), qui est un virus de l'herpès simplex de type 1 de deuxième génération (HSV-1), avec des suppressions dans deux gènes viraux et l'ajout de facteur stimulant les colonies de granulocytes-macrophages (GM-CSF), est maintenant autorisé pour une utilisation contre le mélanome. T-vec infecte et se réplique spécifiquement dans les cellules tumorales humaines, et il est associé à une réduction significative de la croissance tumorale dans un certain nombre de modèles *in vivo* (Liu et al., 2003). L'ajout du gène GM-CSF humain ou de souris signifie que le T-vec peut attirer et faire mûrir les CPA, conduisant à une présentation accrue des antigènes tumoraux dans le microenvironnement tumoral (Kaufman and Bines, 2010). Dans un essai de phase III, des patients atteints de mélanome de stade III et IV, l'injection intralésionnelle de T-vec avait un bon taux de réponse, qui était supérieur à celui observé dans le bras de l'essai ayant reçu du GM-CSF uniquement (Andtbacka et al., 2015).

Chapitre 1. Revue de littérature

- **Transfert de cellules adoptives (ACT) et récepteur des cellules T chimériques**

ACT consiste à utiliser le transfert adoptif de cellules immunitaires cultivés *ex vivo* qui sont capables de répondre à une tumeur, ou à un antigène tumoral spécifique. L'ACT nécessite l'isolement des lymphocytes des patients, une culture *in vitro* et une réinjection dans le patient. Classiquement, ces lymphocytes sont isolés de la tumeur du patient, et cette technique s'est révélée prometteuse en clinique (Hinrichs and Rosenberg, 2014) (Chandran et al., 2015). Des études ont montré que de nombreux lymphocytes infiltrant les tumeurs (TIL), reconnaissent les néo-antigènes (Robbins et al., 2013), et plus récemment le transfert autologue de lymphocytes T spécifiques à ces antigènes a donné des réponses cliniques durables (Prickett et al., 2016). Cependant, l'ACT n'est pas toujours un succès et malgré la persistance de cellules T transférées, les études sur le mélanome isolant les CD8 +, TIL ont montré peu d'effet clinique (Chandran et al., 2015). Il est possible que cela soit lié aux effets suppressifs de l'environnement tumoral, ou peut-être au phénotype des cellules après manipulation des cellules *in vitro*, avant le transfert adoptif. D'autres, ont étudié l'utilisation de cellules T génétiquement modifiées exprimant un récepteur d'antigène chimérique (CAR) spécifique d'un antigène tumoral. Les lymphocytes T CAR sont conçus pour contourner les problèmes de reconnaissance des peptides des antigènes tumoraux, en complexe avec les molécules du CMH. La génération ultérieure de cellules T CAR a utilisé différentes molécules costimulatrices. Par exemple, 4-1BB s'est avéré plus efficace que CD28 pour l'expansion des cellules CD8 cytotoxiques (Zhang et al., 2007). Cela s'est avéré être un équilibre entre, l'induction de réponses suffisantes pour éliminer le cancer sans provoquer de toxicité (Srivastava and Riddell, 2018).

- **Immunothérapie**

- **Agonistes contre les récepteurs co-stimulants**

Les récepteurs costimulateurs sont exprimés par les cellules T pendant l'activation, et se lient aux contre-récepteurs qui sont exprimés par les CPA. Ils fournissent des signaux qui agissent en synergie avec les signaux TCR, pour favoriser l'expansion des cellules T, la survie et la fonction effectrice. Des anticorps agonistes dirigés contre des molécules costimulatrices, tels que 4-1BB (CD137), OX40 (CD134), CD27, le gène lié à la famille des récepteurs du facteur de nécrose tumorale induit par les glucocorticoïdes (TNFR) (GITR), ICOS et CD28, ont été développés pour une utilisation comme thérapies contre le cancer. Par exemple, OX40 est exprimé sur les cellules CD4 et CD8 lors de l'amorçage spécifique de l'antigène et les interactions avec

Chapitre 1. Revue de littérature

son ligand naturel OX40L favorisent la survie et l'expansion des cellules(Linch et al., 2015). Un autre récepteur costimulateur est le CD27, qui est exprimé sur de nombreuses cellules T, y compris les cellules T naïves, et a un effet anti-tumoral (Thomas et al., 2014).

➤ **Blocage des points de contrôle**

Il agit en bloquant les voies inhibitrices de la réponse immunitaire, et conduisant à une activation générale des cellules immunitaires. Les inhibiteurs de point de contrôle, tels que les anticorps anti-PD-1 et anti-CTLA-4, se sont avérés avoir de bons effets thérapeutiques dans de nombreuses tumeurs, conduisant à une survie durable significative, ainsi un certain nombre d'entre eux sont actuellement approuvés pour une utilisation clinique (**Tableau 1.1**).

Tableau 1.1. Liste des inhibiteurs de point de contrôle approuvés (Cook et al., 2018).

Nom	Cible	Compagnie	Indications approuvées
Pembrolizumab	PD-1	Merck(MSD)	Mélanome inopérable ou métastatique. Cancer du poumon métastatique avec expression de PD-L1.
Nivolumab	PD-1	Bristol-Myers Squibb	Mélanome inopérable ou métastatique. Cancer du poumon métastatique. Carcinome rénal avancé. Lymphome hodgkinien classique.
Ipilimumab	CTLA-4	Bristol-Myers Squibb	Mélanome inopérable ou métastatique.
Atezolizumab	PD-L1	Roche Genentech	Carcinome urothelial métastatique. Cancer du poumon métastatique.
Avelumab	PD-L1	Merck Serono Pfizer	Carcinome urothelial avancé ou métastatique
Durvalumab	PD-L1	AstraZeneca	Carcinome urothelial avancé ou métastatique

L'antigène 4 associé aux lymphocytes T cytotoxiques (CTLA-4) est un récepteur inhibiteur des lymphocytes T, qui antagonise de manière compétitive l'interaction costimulatoire entre le ligand CD28 et B7. L'expression de CTLA-4 est régulée à la hausse sur les cellules T, après l'activation et agit comme une réaction régulatrice pour atténuer l'activité de la cellule T activée. Les anticorps anti-CTLA-4, tels que l'ipilimumab et le trémélimumab, agissent pour bloquer cette action et conduire à une activation persistante des lymphocytes T. Il a également été démontré que les anticorps anti-CTLA-4, élargissent la réponse immunitaire et appauvrissent les lymphocytes T régulateurs (Treg) résidant dans les tumeurs (Kvistborg et al., 2014).

Chapitre 1. Revue de littérature

L'une des principales façons dont les tumeurs semblent éviter la surveillance immunitaire, est la régulation positive de PD-1 à la surface des cellules tumorales. Cela peut se produire en réponse à la pression immunitaire, en particulier en présence d'IFN γ , dans un processus connu sous le nom de «résistance acquise». La signalisation PD-1 / PD-L1 est également ciblée avec succès, par des anticorps monoclonaux (Wang et al., 2018).

➤ Inhibition des cellules T régulatrices

Les Treg sont un sous-type de cellules CD4, jouent un rôle dans la suppression des réponses immunitaires, le maintien de la tolérance immunitaire et la prévention de l'auto-immunité. Dans le cancer, l'infiltration des Treg dans le microenvironnement tumoral, a été associée à un mauvais pronostic et à de mauvaises réponses à l'immunothérapie. Dans les modèles animaux, il a été démontré que l'élimination des Treg améliore les réponses immunitaires anti-tumorales bien qu'elle soit également associée à une augmentation de l'auto-immunité (Takeuchi and Nishikawa, 2016).

Le CTLA-4 est fortement exprimé sur les Tregs, et le traitement avec l'anticorps anti-CTLA-4 dans les études murines, s'est avéré épuiser les Tregs par un mécanisme qui dépend des macrophages résidents des tissus. Cependant, il a également été démontré qu'une thérapie tumorale améliorée médiée par l'anticorps anti-CTLA-4, dépend de l'interaction avec les Tregs et les effecteurs T afin d'obtenir une protection complète contre les tumeurs (Simpson et al., 2013).

➤ Contrôle du microenvironnement tumoral

En plus des Tregs, d'autres facteurs du microenvironnement tumoral contribuent à la suppression des réponses immunitaires. Les cellules suppressives dérivées des myéloïdes (MDSC) proviennent d'une lignée myéloïde, et se développent comme une population hétérogène qui est influencée par des médiateurs pro-inflammatoires produits à la fois par des cellules tumorales et normales. Les MDSC activés possèdent une activité suppressive, qui favorise la tolérance immunitaire et améliore la croissance tumorale (Parker et al., 2015). De nombreuses stratégies ont été étudiées dans des études précliniques, pour cibler les MDSC, notamment en ciblant leurs mécanismes de suppression et en bloquant leur différenciation et leur développement. Seul un petit nombre ont atteint des études cliniques, où ils ont montré une certaine efficacité dans la réduction du nombre et de la fonction des MDSC et ont été associés à une amélioration des réponses immunitaires (Weed et al., 2015).

Chapitre 1. Revue de littérature

L'indoléamine 2,3-dioxygénase (IDO), est une enzyme qui est importante dans la dégradation du tryptophane pendant le métabolisme cellulaire. Il joue un rôle dans la progression du cancer, la génération d'une tolérance immunitaire, provoque une apoptose accrue des lymphocytes T par l'épuisement du tryptophane et favorise la différenciation des lymphocytes T CD4 en Tregs (Munn and Mellor, 2016). L'IDO peut également être induit en réponse à une inflammation. Il existe des preuves que l'IDO augmente dans les tumeurs, et qu'une expression IDO plus élevée a été associée à un pronostic moins favorable (Liu et al., 2016). Le développement d'inhibiteurs IDO a donc été étudié et des études cliniques ont commencé. Les données préliminaires suggèrent que les inhibiteurs IDO, l'indoximod et l'épacadostat, sont sûrs et bien tolérés, avec quelques signes de maladie stable. La combinaison des inhibiteurs IDO et du blocage des points de contrôle est actuellement en cours en clinique (Beatty et al., 2017).

Chapitre 1. Revue de littérature

1.2 P53

P53, également connu sous le nom de TP53 ou protéine tumorale (Mehdipour, 2015). On avait supposé qu'il existait auparavant comme cible du virus SV40, une souche qui induisait le développement de tumeurs. Bien qu'il soit initialement présumé être un oncogène, son caractère de gène suppresseur de tumeur a été révélé en 1989. En 1993, la protéine p53 a été élue molécule de l'année par le magazine Science.

1.2.1 Généralités

1.2.1.1 Définition

P53 est un gène qui code pour une protéine qui régule le cycle cellulaire, et fonctionne donc comme suppresseur de tumeur. Son rôle principal, est le control du cycle cellulaire en interagissant avec des dizaines de gènes (Rallapalli et al., 1999). Son nom reflète sa masse moléculaire, car il se trouve dans la fraction de 53 kilodaltons des protéines cellulaires.

1.2.1.2 Structure

Le gène *P53* humain est situé sur le bras court du chromosome 17 (17p13.1), constitué de 11 exons et code un ARNm de 2,8Kb, la protéine traduite compte 393 acides aminés et un poids moléculaire de 53KDA, sa forme homotetramérique induit l'expression de plusieurs gènes impliqués dans différentes réponses cellulaire, la protéine présente 5 domaines fonctionnellement distincts :un domaine de transactivation N-Ter(TAD), un domaine riche en proline (PRD), un domaine de liaison à l'ADN (DBD), un domaine de tetramérisation (4D) et un domaine régulateur (C-T domaine) (**Figure 1.3**).

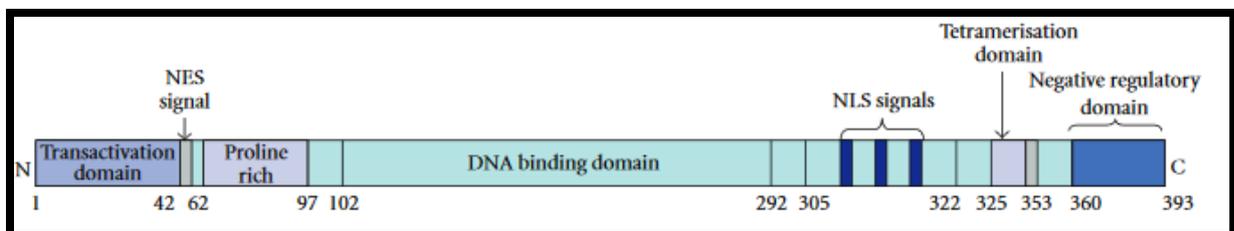


Figure 1.3. Structure du gène p53 (Varna et al., 2011).

Chapitre 1. Revue de littérature

1.2.1.3 Rôle

Les gènes cibles du P53, sont des régulateurs des voies de signalisation conduisant à l'arrêt du cycle cellulaire, phénomène réversible qui permet la réparation de l'ADN (en G1 et en G2), ou bien irréversible quand il s'agit de régulation d'apoptose ou de sénescence. Les gènes impliqués dans la capacité de p53 à contrôler le cycle cellulaire sont, p21WAF1, GADD45 et 14-3-3 σ (Shen and White, 2001). p21 entraîne l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1, et prévient l'entrée en phase S tandis que GADD45 et 14-3-3 σ contrôlent la transition G2/M. L'apoptose est sous la dépendance de la transcription des gènes cibles Bax, CD95 (Fas/APO-1), DR5, Ei24/PIG8, Noxa, PERP, Pidd, p53AIP1 et PUMA codant soit pour des protéines de surface cellulaire (DR5, CD95 et PERP), soit pour des protéines mitochondriales (Bax, Noxa, PUMA et p53AIP1) (Nakano and Vousden, 2001), soit pour des protéines cytoplasmiques (PIG8 et Pidd). P53 induit la répression en outre de facteurs anti apoptotiques tels que Bcl-2, Bcl-Xl et IAP (Figure 1.4).

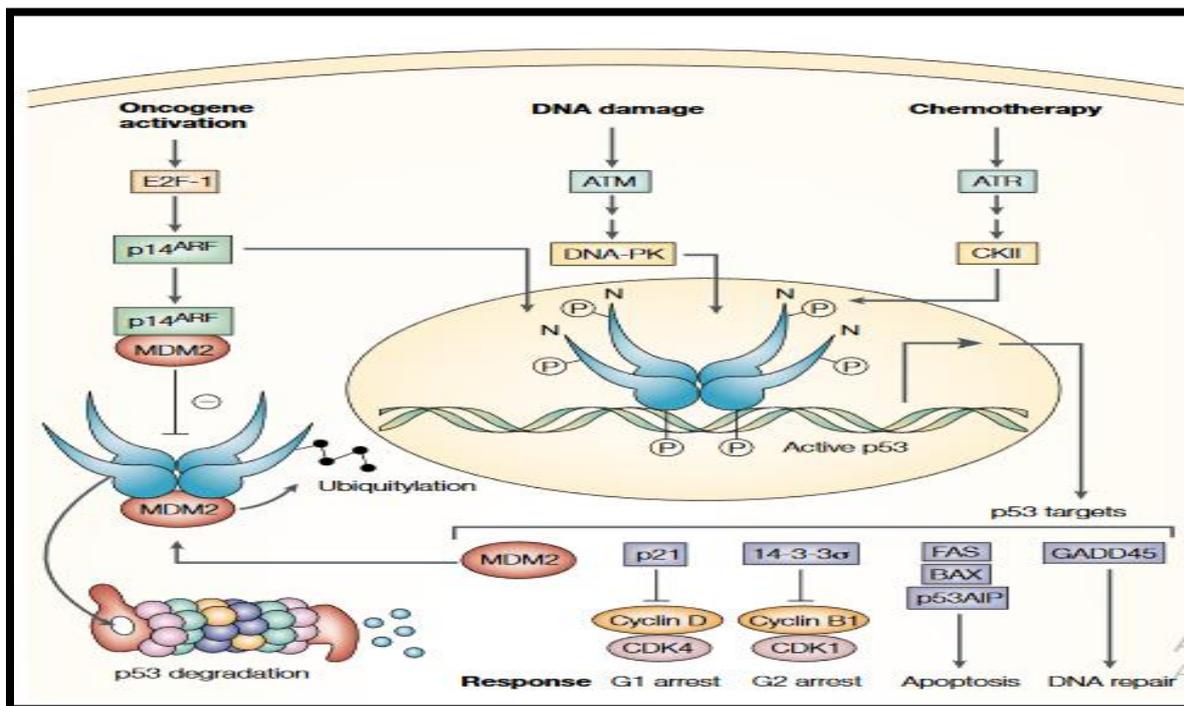


Figure 1.4. Rôle de la protéine p53 avec ses différentes voies d'activation, d'inhibition et ses gènes cible d'après Bullock et Fersht (Bullock and Fersht, 2001).

Chapitre 1. Revue de littérature

1.2.1.4 Régulation

La protéine p53 a une durée de vie courte, elle est régulée en grande partie par la modulation de sa stabilité protéique, la plupart de ses mécanismes cellulaires anti-tumorales sont cytotoxiques et nécessitent une régulation en absence de stress. Sa régulation est contrôlée par une boucle d'autorégulation inhibitrice impliquant MDM2, et une ligase de la famille des E3 ubiquitine. MDM2 (murine double minute 2) est en effet une cible transcriptionnelle de p53 qui est libérée en même temps que p53, elle représente son principal inhibiteur et agit de deux façons : d'une part en obstruant le domaine de transactivation et en empêchant ainsi p53 de recruter des co-activateurs tels que p300, et d'autre part à travers son activité ubiquitine ligase, en conjuguant de nombreux résidus ubiquitine sur le domaine C-terminal de p53, grâce à son domaine RING C-terminal et induisant ainsi sa dégradation par le protéasome (Bargonetti and Manfredi, 2002).

MDM4 (aussi appelé MDMX) est un autre inhibiteur spécifique de p53 c'est un homologue structural de MDM2, mais son domaine RING n'a pas d'activité E3 ligase fonctionnelle, Contrairement à MDM2, il ne contrôle pas la stabilité de p53 mais agit principalement comme un inhibiteur de l'activité transcriptionnelle de p53. A noter que MDM2 et MDM4 peuvent avoir des rôles dans la tumorigenèse indépendamment de p53. Par exemple, MDM2 peut ubiquitinyler et dégrader des régulateurs du cycle cellulaire (RB, p21, et FOXO3A) ou de la transition épithélio-mésenchymateuse (Ecadhérine). De plus, MDM2 peut jouer un rôle dans la suppression de l'apoptose, en augmentant la traduction du gène anti-apoptotique XIAP (Haupt et al., 1997).

1.2.1.5 Activation

Lors d'un stress cellulaire, p53 va être phosphoryler par des kinases induites par le stress au niveau des sérines et des thréonines sur le domaine de transactivation (sérine 15, thréonine 18 et sérine 20). Ceci va induire un détachement de la liaison de p53 à MDM2, le p53 libre va s'accumuler et former des tétramères. La tétramérisation comble les sites d'exportation nucléaire permettant à la p53 qui s'accumule de rester à l'intérieur du noyau. La phosphorylation du domaine de transactivation favorise aussi l'interaction avec des histones acetyl transférase comme p300, ceci conduit à l'acetylation des lysines au niveau du domaine C-terminal qui favorise la stabilisation de p53, et augmente la fixation spécifique aux ADN des gènes cibles (Figure 1.5) (Toledo and Wahl, 2006).

Chapitre 1. Revue de littérature

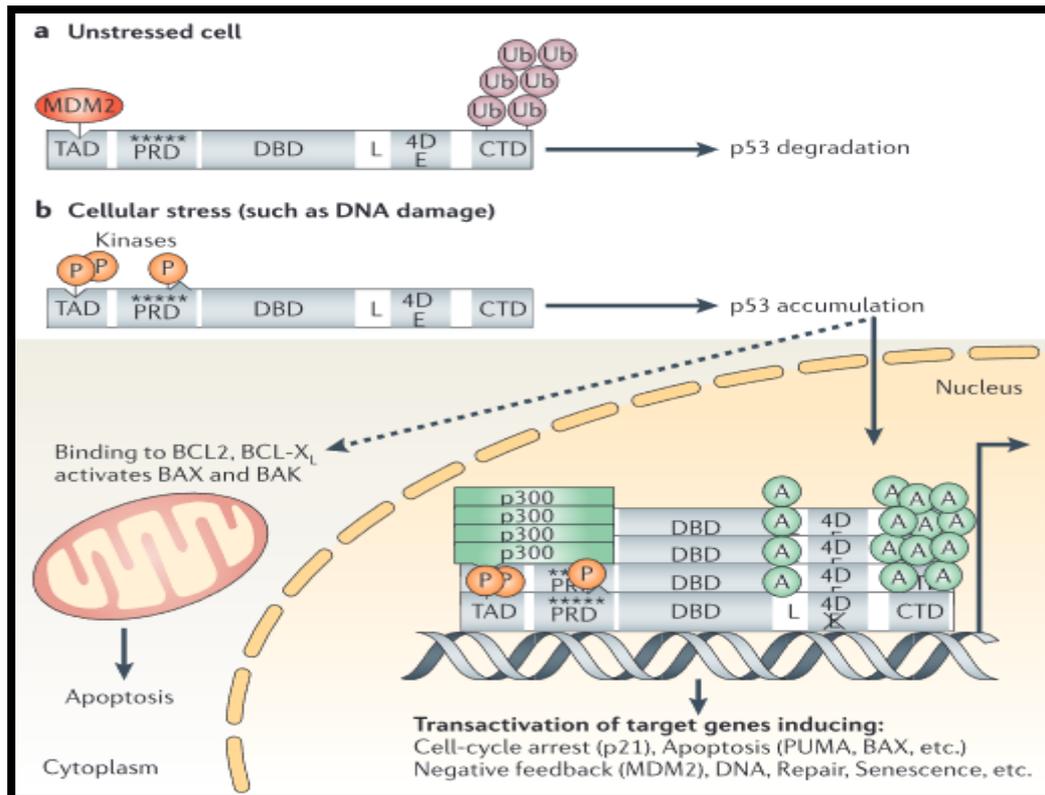


Figure 1.5. Modèle d'activation de p53(Toledo and Wahl, 2006).

1.2.1.6 Fonctions non-transcriptionnelles

Lors d'un stress cellulaire, p53 s'accumule dans le cytoplasme ou dans la mitochondrie, ceci conduit à une activation directe de Bax et/ou Bak sans passer par leur transcription. En effet, la fixation de p53 à Bak au niveau de la membrane mitochondriale externe, catalyse l'activation de Bak et en conséquence le cytochrome c est libéré dans le cytoplasme. En même temps, p53 peut libérer Bak de son complexe inhibiteur avec Mcl-1 (protéine de la famille de Bcl-2 qui maintient Bak inactif). En cas de stress, p53 peut aussi interagir directement avec Bad, en favorisant l'accumulation de p53 dans le cytoplasme et dans la mitochondrie, facilitant ainsi son interaction avec Bax ou Bak. MDM2 peut aussi conjuguer un unique résidu ubiquitine à p53 qui, au lieu de conduire à sa dégradation comme en cas de poly-ubiquitylation, induit dans ce cas son transport vers le cytoplasme et la mitochondrie, favorisant ainsi les fonctions transcription-indépendantes de p53 cytoplasmique et mitochondriale (Speidel, 2010) (Figure 1.6).

Chapitre 1. Revue de littérature

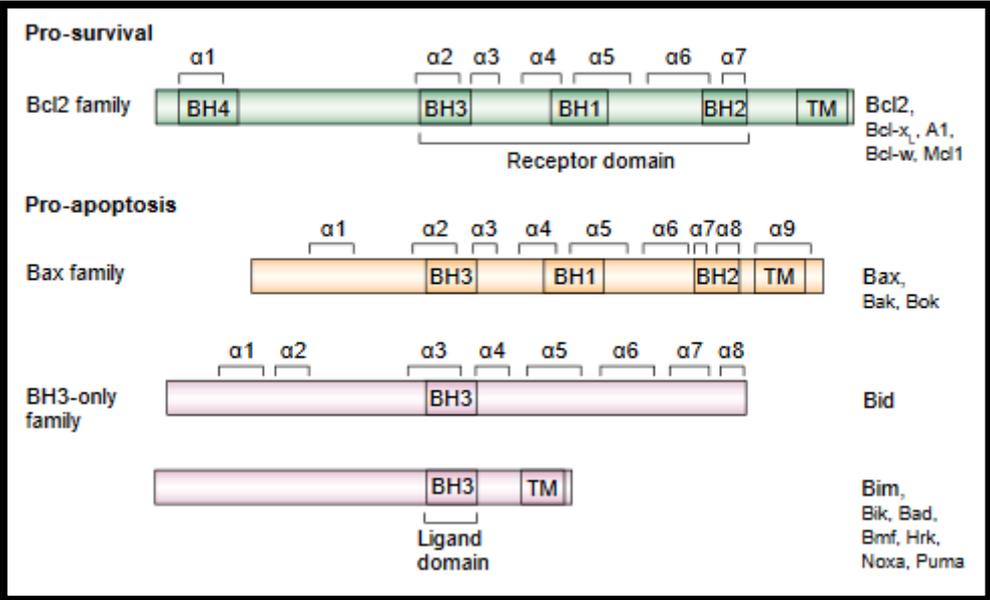


Figure 1.6. Les différents membres de la famille Bcl-2(Cory and Adams, 2002).

Chapitre 1. Revue de littérature

1.2.2 P53 et réponses anti-tumorales

Plus de 50 % des tumeurs humaines portent des mutations du gène *P53*, ces mutations sont encore fréquemment trouvées dans les cancers humains les plus courants. Les tumeurs déficientes en p53 sont caractérisées par une perte de la différenciation cellulaire, avec une instabilité génétique et un potentiel invasif accru (Song et al., 2007). P53 est un détecteur du stress cellulaire induisant, un arrêt du cycle cellulaire, transitoire (pour la réparation des dommages à l'ADN) ou permanent (sénescence), et/ou une réponse apoptotique.

les signaux activant p53 sont diverses : dommages d'ADN, activation d'oncogènes, stress réplicatif, hyperprolifération, hypoxie, stress oxydatif, érosion des télomères, dysfonctionnement des ribosomes, changements métaboliques et manque de nutriments. Suite à la détection de ces signaux, p53 est principalement phosphorylée sur la sérine 15 par des kinases ATM et ATR. La phosphorylation de p53 sur la sérine 20 empêche son interaction avec son ubiquitine ligase MDM2 (Speidel, 2015).

Parmi les mécanismes de suppression tumorale dépendant de p53 en réponse aux stress :

- **Contrôle du cycle cellulaire** : ce qui permet à la cellule de réparer son génome avant de poursuivre sa division, et de limiter la transmission de mutations délétères. Ce mécanisme est médié par la transactivation par p53 du gène p21 qui code pour un inhibiteur de kinases dépendantes des cyclines (les CDK), qui assure un point de contrôle (checkpoint) du cycle cellulaire pour le passage G1/S. L'induction de p21 entraîne la répression de gènes du cycle cellulaire codant notamment pour des protéines du « cell division cycle » (CDC2, CDC25), des « checkpoint kinases » (CHK1) et des cyclines (cyclinA2, cyclinB1). Cela suggère que le p53 représente une redondance puisque il peut induire plusieurs gènes cibles impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire ainsi que d'autres réponses.

p53 peut induire aussi un arrêt du cycle en G2/M en perturbant les fonctions des cyclines B1 et CDC2 *via* la répression de CDC25C et la transactivation de 14-3-3 σ (Bieging et al., 2014).

- **Réparation de l'ADN** : En plus de l'induction de l'arrêt du cycle pour la réparation de l'ADN en réponse aux stress génotoxiques (DNA Damage Response ou DDR), le gardien du génome p53 joue un rôle actif dans le maintien de l'intégrité génomique. Car il stimule différents mécanismes de réparation, dont la réparation par excision de nucléotide (Nucleotide Excision Repair ou NER), la réparation par excision de base (Base Excision Repair ou BER). p53 régule aussi la duplication du centrosome (Kruiswijk et al., 2015a).

Chapitre 1. Revue de littérature

- **Sénescence** : La sénescence a été initialement décrite dans les fibroblastes humains normaux, c'est une forme d'arrêt définitif du cycle cellulaire. Cette réponse cellulaire est à double tranchant pour l'organisme, car elle intervient dans les mécanismes de suppression tumorale (bénéfique) et de vieillissement cellulaire (délétère). Elle est induite en réponse à différents stress, notamment le dysfonctionnement des télomères, les dommages à l'ADN non télomériques, les signaux mitotiques excessifs (dont ceux produits par les oncogènes) ainsi que la perturbation de l'organisation chromatinienne. p53 induit la sénescence mais permet la survie et le fonctionnement de la cellule, et cela *via* la transactivation du gène p21, qui dans ce contexte contribue plutôt à la sénescence des cellules. En effet, un arrêt du cycle cellulaire prolongé médié par p21, conduit à l'activation de l'inhibiteur des CDK p16/INK4A et l'activation conséquente de RB, déclenchant la sénescence (Warfel and El-Deiry, 2013).

p53 peut induire des enzymes, des cytokines et des chimiokines, responsables d'une réponse immunitaire innée qui cible les cellules tumorales, et ceci *via* les sécrétions cellulaires associées à la sénescence (Senescence Associated Secretory Phenotype ou SASP). Ces facteurs sécrétés sous l'induction de p53 peuvent également promouvoir la prolifération et l'invasion, ce qui est surprenant au vu du rôle de suppresseur de tumeur de p53 (Childs et al., 2014).

- **Apoptose** : En réponse à des signaux intra et extra-cellulaires, les cellules peuvent enclencher un programme de mort cellulaire programmée dépendant des caspases appelé apoptose. La voie extrinsèque est initiée par la liaison de ligands à leurs récepteurs (Death Receptors ou DRs), comme FAS par exemple, entraînant la mort de la cellule par activation de la caspase 8. La voie intrinsèque conduit à la perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie (Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization ou MOMP), qui relâche le cytochrome C dans le cytoplasme, activant ainsi en cascade des caspases, qui sont également activées par la voie extrinsèque. La voie MOMP est activée par les protéines proapoptotiques BAX et BAK qui forment des pores dans la mitochondrie. Elle est régulée par les protéines anti-apoptotiques BCL2 et BCL-XL, qui inactivent BAX et BAK.

P53 active la transcription de plusieurs gènes pro-apoptotiques de la famille des protéines BCL2 dont BAX, NOXA (ou PMAIP1) et PUMA (ou BBC3).

Parmi la grande famille des gènes pro-apoptotiques activés par p53, on note également APAF1, PIG3, P53AIP1, PIDD, SIVA, TIGAR et la famille des miR34.

La protéine p53 peut également induire l'apoptose indépendamment de son action nucléaire de facteur de transcription, en se liant directement, dans le cytoplasme et

Chapitre 1. Revue de littérature

la mitochondrie à plusieurs protéines pro- et anti-apoptotiques (Vaseva and Moll, 2009).

- **Nécrose** : caractérisée par une libération de contenu cellulaire provoquant une réponse inflammatoire dans le tissu environnant. Plusieurs mécanismes de mort cellulaire par nécrose ont été décrits : nécroptose, parthanatose, pyroptose et ferroptose. p53 a été impliquée dans certaines de ces voies même si les mécanismes ne sont pas encore complètement compris. En l'absence de BAX et BAK, p53 peut induire la transcription de la protéine lysosomale cathepsine Q en réponse aux dommages à l'ADN et provoquer la nécrose de la cellule. La p53 mitochondriale interagit avec la cyclophiline D responsable de la réponse nécrotique. De plus, en réponse aux dommages induits par les dérivés réactifs de l'oxygène (Reactive Oxygen Species ou ROS), p53 active la protéine PARP1 pouvant causer la parthanatose, une forme de mort cellulaire induite par les poly(ADP) riboses. Enfin, p53 peut sensibiliser les cellules à la ferroptose (une forme de nécrose dépendante du fer intracellulaire) (Ying and Padanilam, 2016) (Sarosiek, 2018).
- **Autophagie** : Lors d'un manque de nutriments, la cellule dégrade ses propres composants *via* la machinerie lysosomale. Ce processus d'auto-dégradation permet à la cellule de se débarrasser des organites endommagés (englobés dans un autophagosome), et à générer des intermédiaires métaboliques l'aidant à survivre. En effet, c'est un processus de survie et d'homéostasie, mais qui peut devenir un effecteur de la mort cellulaire. L'hypothèse est que l'autophagie inhibe les premiers stades du développement tumoral (en inhibant la formation des ROS, les dommages de l'ADN et l'inflammation), mais favorise la progression tumorale aux stades plus tardifs (survie et homéostasie des cellules cancéreuses). P53 peut activer l'autophagie en induisant un grand nombre de gènes cibles comme DRAM1, ULK1 et cathepsine D (White, 2016).
- **Régulation du métabolisme cellulaire**: les cellules cancéreuses sont caractérisées par une dérégulation métabolique « effet Warburg ». Cette propriété oncogénique essentielle pour la prolifération des cellules cancéreuses est contrecarrée par p53 qui régule le métabolisme énergétique, en diminuant les niveaux de la glycolyse et favorisant la respiration mitochondriale. En effet, p53 dérégule les premières étapes de la glycolyse, en inhibant les transporteurs de glucose GLUT1 et GLUT4, *via* la répression transcriptionnelle, et GLUT3, *via* l'inhibition de NF- κ B, ainsi que les étapes ultérieures de la glycolyse. Le p53 peut également promouvoir l'oxydation des acides gras, une fonction activée par le manque de folate et qui peut conduire à une réponse apoptotique (Liu et al., 2019).

Chapitre 1. Revue de littérature

- **Barrière à l'invasion et l'angiogenèse** : p53 limite la motilité et l'invasion des cellules primaires des cellules cancéreuses, inhibant ainsi la dissémination métastatique. De plus, p53 bloque la transition épithéliomésenchymateuse (EMT), importante pour la formation de métastases, en modulant l'expression des familles de facteurs de transcription SNAIL et TWIST. Le rôle de p53 dans la formation d'un microenvironnement anti-tumoral s'inscrit dans le cadre de ses fonctions cellulaires non-autonomes (dépendantes des cellules avoisinantes). p53 inhibe le recrutement de vaisseaux sanguins au foyer tumoral. Elle transactive des gènes comme TSP1 qui code pour un inhibiteur de l'angiogenèse (la thrombospondine 1) (Bieging et al., 2014).
- **Action sur les cellules souches** : Par ailleurs, p53 peut aussi contribuer à la suppression tumorale par l'inhibition des caractéristiques des cellules souches. En effet, le rôle de p53 dans le blocage de la reprogrammation des iPS (induced Pluripotent Stem cells) et des caractéristiques pluripotentes des cellules souches cancéreuses a été montré, notamment par l'induction de p21 et la répression de nestine (Kruiswijk et al., 2015b) (Bieging et al., 2014).

Ces différentes réponses anti-tumorales de p53 sont résumés dans la figure ci-dessous (Figure 1.7).

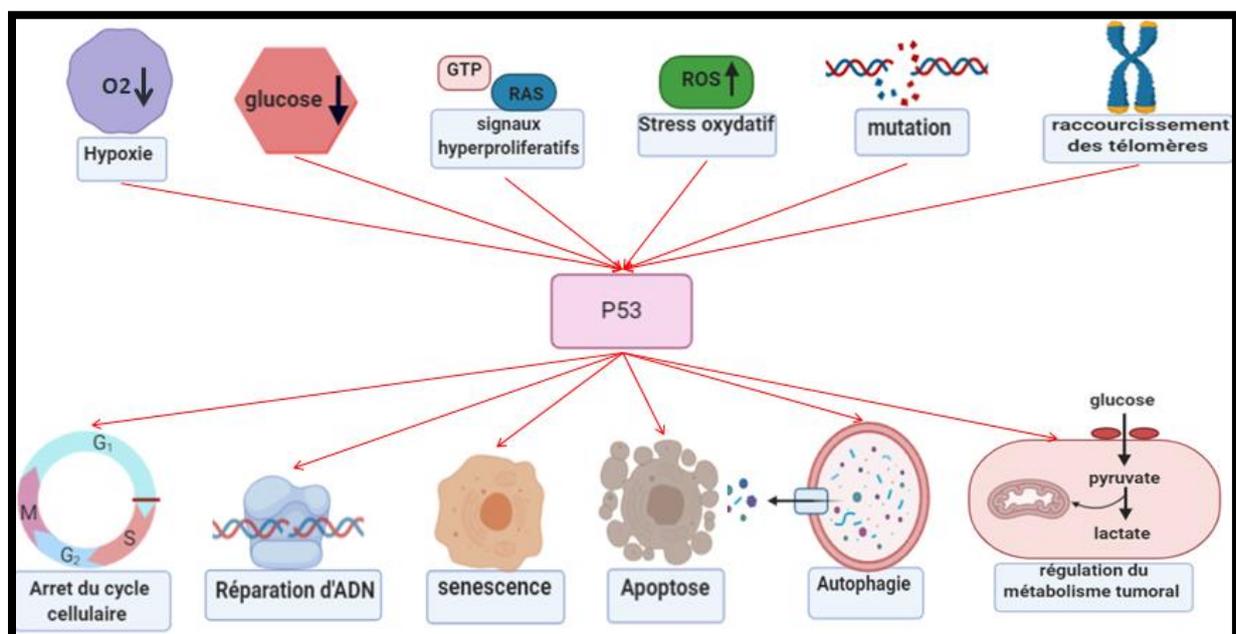


Figure 1.7. Différentes réponses anti-tumorales de p53 (adaptée d'après Bieging et al., 2014).

Chapitre 1. Revue de littérature

1.2.3 P53 et cancer

Les mutations de p53 sont les altérations les plus fréquentes dans les cancers humains. Leur incidence dépend du type et du stade de la tumeur (Petitjean et al., 2007).

Dans 10 % des cancers, l'inactivation de p53 est la conséquence d'une amplification du gène codant pour MDM2. MDM4 est amplifié ou surexprimé dans 10 à 20 % des cancers. ARF, inhibiteur de MDM2 peut aussi être inactivé en particulier lors de mutations/délétions du gène CDKN2A dont il est un des transcrits. Aussi, des facteurs exogènes tels qu'une infection virale, peuvent contribuer à l'inactivation fonctionnelle de p53, le cas du papilloma virus humain qui ubiquitinye l'activité de la ligase E3 du p53, et qui le déstabilise en ciblant MDM4 pendant qu'une autre protéine, E1B55KD inactive p53 en supprimant son activité transcriptionnelle.

D'une autre part, dans la majorité des cas (75%), les modifications de l'activité de p53 sont dues à des mutations. En effet, l'échange d'un seul acide aminé peut conduire à un changement conformationnel de P53 qui la rend inapte à se lier à son élément de réponse sur l'ADN et à transcrire ses gènes cible (Wang and El-Deiry, 2008).

La plupart des mutations du gène *P53* sont faux-sens (entraînant l'expression d'une protéine mutée dont la fonction est altérée), plutôt que des délétions (entraînant la perte du suppresseur de tumeur). Cette particularité suggère un avantage biologique de ces mutations pour le développement du cancer. Les mutations les plus fréquentes (environ 86%), appelées « hotspot » points chauds, sont présentes dans la séquence du gène P53 codant pour les résidus de 125 à 300 du domaine de liaison à l'ADN (DBD) (Kim et al., 2015).

Les neuf mutations du gène P53 les plus fréquentes dans les cancers humains : R175H, Y220C, G245S, R248Q, R248W, R249S, R273H, R273C et R282W sont localisées au niveau de sept résidus « hotspots » du domaine de liaison à l'ADN (DNA Binding Domain ou DBD) de p53 (Figure 1.8). La position de ses résidus au niveau du domaine de liaison à l'ADN, explique l'impact de leurs mutations sur la fonction de ce facteur de transcription.

Chapitre 1. Revue de littérature

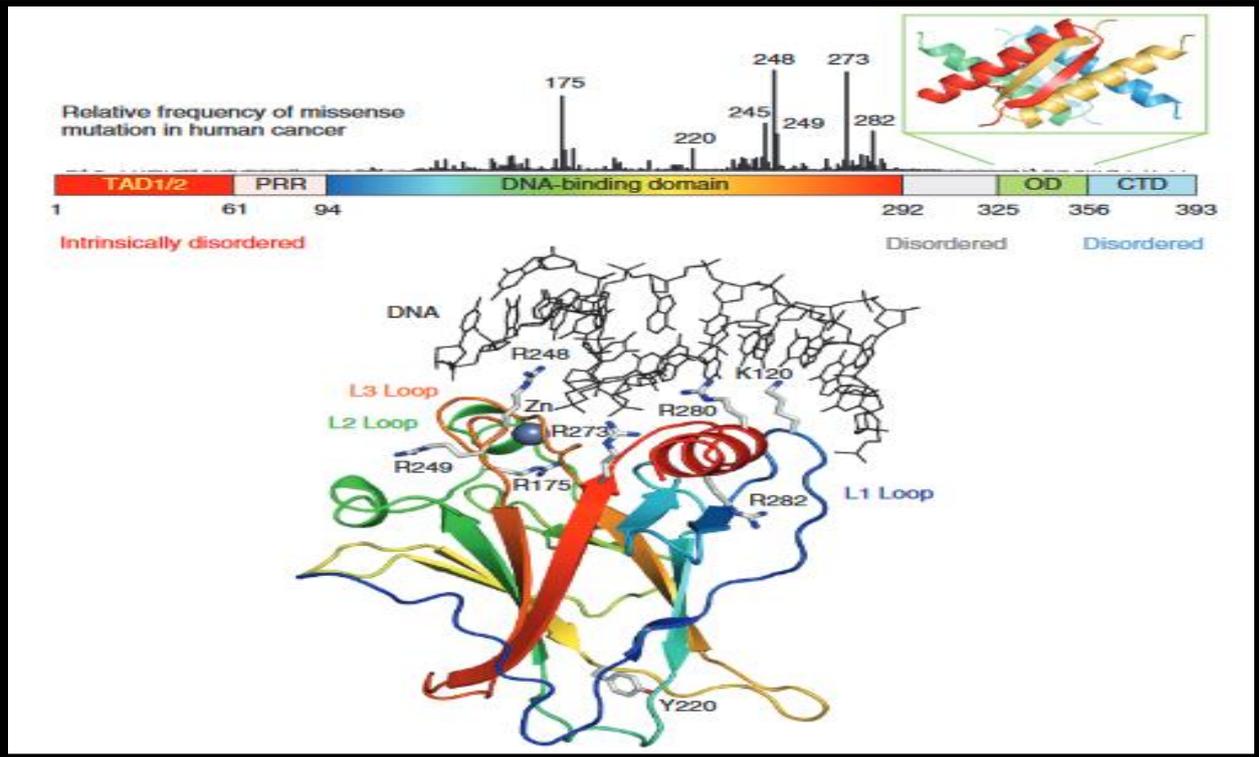


Figure 1.8. Schéma de la structure de la protéine p53 (hotspots) (Joerger and Fersht, 2010).

Chapitre 1. Revue de littérature

1.2.4 P53 en thérapeutique anti-cancéreuse

Le gène suppresseur de tumeur *P53*, maître régulateur de diverses voies cellulaires, est fréquemment altéré dans divers cancers, en thérapeutique anti-p53 on vise à surexprimer le p53 ou à l'inhiber par plusieurs méthodes (Toledo et al., 2007).

- **Thérapie génique pour p53**

Cette thérapie se fait par réintroduction ou bien surexpression de la protéine p53 dans les cellules tumorales, par différents vecteurs, (adénovirus, rétrovirus et plasmides des DNA nus). Le transfert génique de p53 par adénovirus a été efficace *in vitro* et *in vivo* chez l'animal. Une utilisation combinée de ce type de vecteur avec la chimio-radiothérapie semble donner de bons résultats pour les cancers de la tête et du cou.

- **Immunothérapie anti-p53**

Il a été établi que certains patients cancéreux fabriquaient des anticorps anti p53, et d'autres patients cancéreux fabriquaient des lymphocytes T anti p53. Donc p53 pourrait être un excellent candidat comme antigène tumoral cible, grâce à une réponse immunitaire naturelle anti p53 chez les patients atteints de cancer, en utilisant des peptides dérivés de p53. Ainsi, certaines études de phase I et II sont en cours chez des patients atteints de cancer colorectal ainsi que le cancer bronchique.

- **Peptides de p53**

Certains peptides synthétiques correspondant à des fragments de séquence de p53, ont été démontrés comme étant efficaces pour stabiliser p53 ou de le restaurer. Certains peptides peuvent augmenter la capacité de liaison du p53 à l'ADN. Certains autres peptides empêchent la liaison de MDM2 à p53 et ainsi protègent p53 de la dégradation par le protéasome. Malgré l'efficacité, la spécificité et l'absence de toxicité de cette stratégie, la difficulté rencontrée est leur introduction dans les cellules tumorales et le coût de leur production.

- **Nutlins**

Vassilev et ses collègues ont identifié un groupe de petites molécules qui ciblent l'interaction MDM2-p53 appelés Nutlins (dérivés imidazolés), ils se lient spécifiquement à MDM2 et le dissocient de p53, protégeant ainsi p53 de la dégradation et induisant ainsi les fonctions de p53. Les Nutlins occupent la place des trois résidus du domaine de transactivation de p53 (Phe 19, Trp 23 et Leu 26), et dissocient p53 par fixation compétitive. Des études *in vitro* et *in vivo* chez l'animal ont démontré des effets anti-tumoraux importants des Nutlins sans effets secondaires. La question qui se pose est pourquoi des agents tels que les Nutlins ne provoquent pas d'effets secondaires en tuant les cellules normales? Une des explications avancées est que les Nutlins pourraient cibler spécifiquement les cellules cancéreuses du fait de l'altération de leurs

Chapitre 1. Revue de littérature

voies de signalisation. L'autre hypothèse avancée est que les Nutlins activeraient p53 uniquement de façon partielle du fait de la dissociation limitée de MDM2. Aussi, la plus forte toxicité de la délétion de MDM2 s'expliquerait car la délétion entraîne une perte totale des autres fonctions de MDM2, incluant son rôle dans la régulation d'autres protéines et voies de signalisation. De plus, il a été démontré que les Nutlins agissaient en synergie avec le TRAIL (tumor necrosis factor alpha-related apoptosis inducing ligand) dans les leucémies myéloïdes aiguës. La protection de p53 des ses inhibiteurs est une voie prometteuse dans le traitement des tumeurs avec p53 altéré.

- **Inhibiteurs de méthyl transférase**

Ces produits visent à stabiliser l'expression de p14/ARF qui est un inhibiteur de MDM2, contribuant ainsi à stabiliser p53. Des essais cliniques sont en cours.

- **CP-31398**

CP-31398, un styrylquinazoline, est une molécule ayant *in vitro* la propriété de stabiliser un épitope de p53 appartenant au domaine de liaison à l'ADN. Ses propriétés conduisent à modifier la conformation mutée de p53, en conformation sauvage en restaurant les fonctions de p53 sauvage *in vitro* et, en bloquant sa dégradation.

- **PRIMA-1**

le rôle de PRIMA-1 est de restaurer la conformation sauvage du p53 mutée en régulant les gènes cibles de p53 tels que p21, MDM2 et Bax. PRIMA-1 induit l'apoptose de façon dépendante de l'expression de p53 mutée. Le mode d'action exact de ce composé n'est pas connu mais il semble que les produits de conversion de PRIMA-1 modifient la protéine p53 mutée en se liant à ses groupes thiols au niveau du domaine de liaison à l'ADN dans les cellules tumorales.

- **Ellipticine**

L'ellipticine est un agent anticancéreux puissant, isolé à partir de l'arbre Australien de la famille des Apocynaceae il y a près de 50 ans. L'ellipticine inhibe la croissance tumorale en intercalant l'ADN, en inhibant l'activité de la topo isomérase II et en générant des radicaux libres. Son mode d'action précis n'a néanmoins pas encore été élucidé. Le mode d'action de l'ellipticine semble passer par la transformation de la conformation p53 mutée en p53 sauvage, induisant ainsi une apoptose.

- **Nanoparticule avec ARNm synthétique qui code pour le p53**

une plate-forme de nanoparticules (NP) sensible à l'oxydoréduction est conçue pour une distribution efficace d'ARN messenger synthétique codant p53 (ARNm). Les NP synthétiques p53-ARNm, retardent considérablement la croissance des cellules altérées en p53. La restauration des suppresseurs de tumeurs par la stratégie d'administration de l'ARNm synthétique NP pourrait être combinée avec d'autres thérapies pour le traitement combinatoire puissant du cancer (Kong et al., 2019).

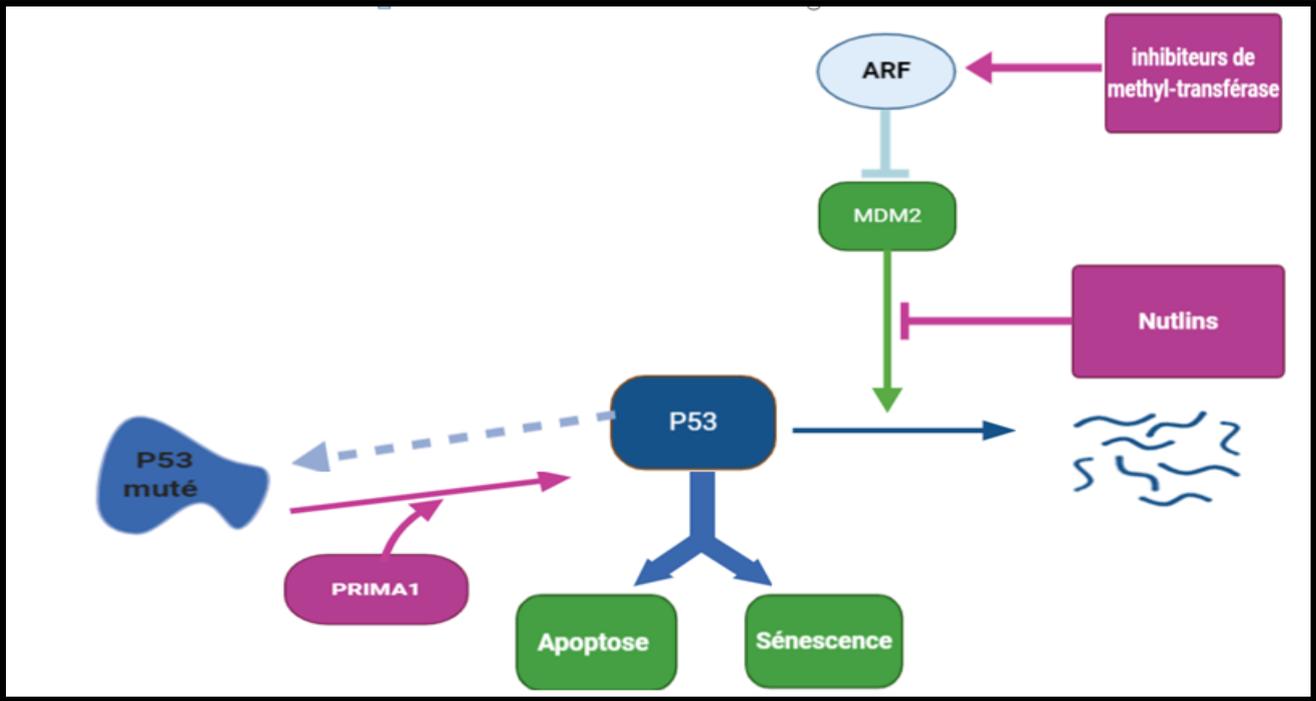


Figure 1.9. Quelques stratégies activatrices du p53 en thérapeutique anti-cancéreuse.

Chapitre 1. Revue de littérature

1.3 PCR

Le but de la PCR est de reproduire partiellement *in vitro* le mécanisme de réplication naturel de l'ADN, et d'obtenir des millions de copies d'une séquence d'ADN d'intérêt.

1.3.1 Généralités

1.3.1.1 Définition

La PCR est une méthode de biologie moléculaire pour amplification *in-vitro*, elle sert à amplifier n'importe quelle région génomique (ADN ou ARN), elle permet aussi de détecter la présence des virus et de mesurer la charge virale (VIH, Hépatite). A condition de connaître la séquence pour synthétiser des amorces spécifiques.

1.3.1.2 Acteurs

- ADN à amplifier.
- 2 amorces spécifiques (une identique à l'extrémité 5' et l'autre complémentaire à l'extrémité 3' du gène).
- ADNp (ADN polymérase ou TAKp).
- 4 désoxyribonucléases (dGTP, dATP, dTTP, dCTP).

1.3.1.3 Principe

La technique se base sur le principe suivant:

- Connaître d'abord les fragments (20 nucléotides) qui encadrent la séquence d'ADN à amplifier.
- Synthèse d'amorces oligonucléotidiques complémentaires à ces fragments.
- L'ADN polymérase commence la synthèse des brins complémentaires grâce aux amorces et le nombre de copies de la séquence d'ADN est doublé pour chaque réplication.

1.3.1.4 Etapes

- Etape 1 « dénaturation »: l'ADN à amplifier est chauffé jusqu'à 90°, pendant 30 secondes à une minute, pour séparer ses deux brins.
- Etape 2 « hybridation » : Le tube est refroidi à environ 50°C (température calculée en fonction de la séquence des amorces). Cette température va permettre l'hybridation des deux brins d'ADN, avec les deux amorces grâce au principe d'appariement.

Chapitre 1. Revue de littérature

- Etape 3 « polymérisation et élongation » : Synthèse des brins complémentaires par la Taq polymérase à 72° pendant 1min.

Les trois étapes forment un cycle. La PCR se fait entre 30 et 40 cycles. (Figure1.10).

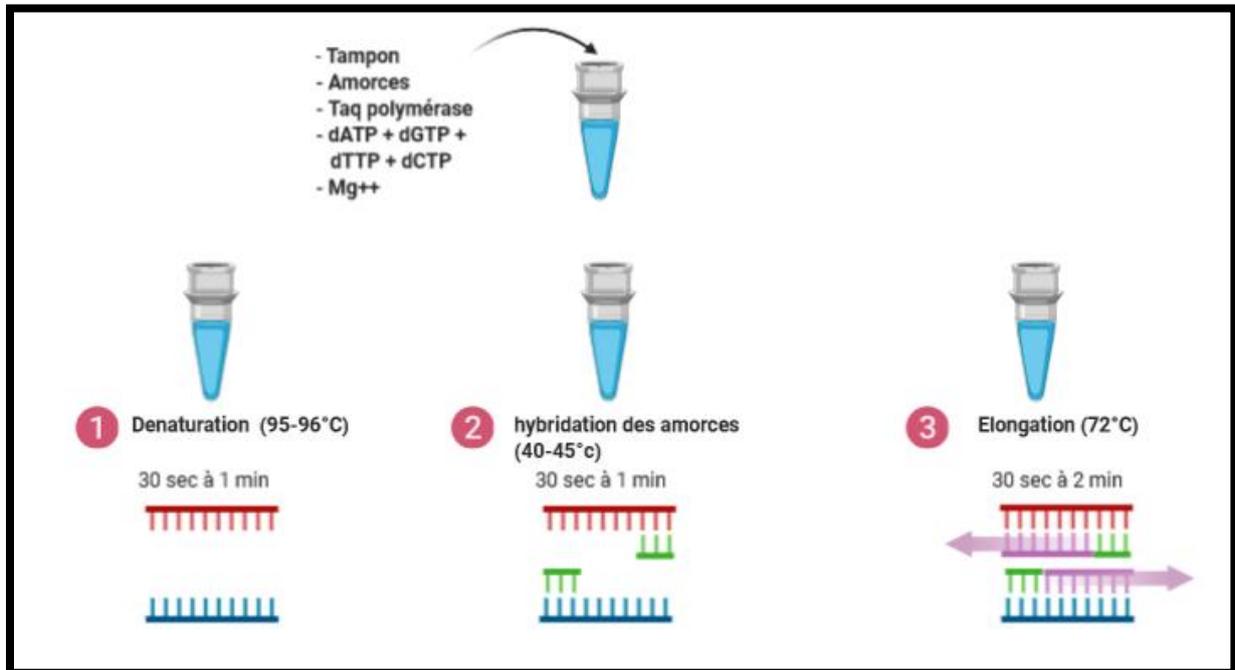


Figure 1.10. Principe de la PCR.

Le nombre de copies de la séquence à amplifier dépend du nombre de cycles à réaliser. À chaque cycle, le nombre de copies est multiplié par deux, on aura alors un nombre égal à 2^n après n cycles. Concernant la troisième étape de chaque cycle, des durées de plusieurs minutes peuvent être nécessaires pour des fragments plus longs, surtout les fragments riches en G et C (Tableau1.2).

Tableau 1.2. Exemples de cycles PCR en fonction des fragments.

Nombre de copies de la cible	Nombre de cycles
105	25 à 30
104	30 à 35
102 à 103	35 à 40
1 à 102	40 à 45

Chapitre 1. Revue de littérature

1.3.2 Amorces

1.3.2.1 Définition

Les amorces sont des courtes séquences oligonucléotidiques d'ADN monocaténaire, utilisées lors des PCR pour initier l'amplification.

Les amorces utilisées ont une longueur de 16-30 nucléotides ce qui demande une température d'hybridation raisonnable élevée. L'extrémité 3' de l'amorce devrait être riche en base G et C pour une meilleure hybridation.

1.3.2.2 Caractéristiques d'une bonne paire d'amorces

- elles doivent être spécifiques à la région qu'on veut amplifier.
- longueur entre 20 et 25 nucléotides.
- 40% en CG surtout dans la région 3' (pour augmenter la stabilité puisqu'ils ont 3 liaisons d'hydrogène).
- Pas de complémentarité entre l'amorce sens et anti-sens.
- Pas de complémentarité dans chacune des amorces.
- La température de fusion entre 52° et 58° (Lorenz, 2012).

Chapitre 1. Revue de littérature

1.3.3 Banques et bases de données

1.3.3.1 Banque de données

La banque de données est un ensemble de données relatives à un domaine, elles sont organisées par un traitement informatique et accessibles en ligne et à distance.

Elles sont stockées sous forme d'un fichier formaté et comprennent 2 types :

- généralistes (données hétérogènes)
- spécialisées (données homogènes)

1.3.3.2 Base de données

La base de données est un ensemble de relations entre les données, gérées à l'aide d'un système de gestion.

Parmi les bases de données les plus utilisées :

- NCBI
- EMBL
- PDB
- SCOP

Chapitre 1. Revue de littérature

1.4 Problématique et objectif

1.4.1 Problématique

Le gène suppresseur de tumeur p53, maître régulateur de diverses voies cellulaires, est fréquemment altéré dans divers cancers. En thérapeutique on vise à surexprimer le p53 ou à l'inhiber par plusieurs méthodes. Dans cette optique nous avons conçu des amorces spécifiques qui encadrent le gène du P53.

1.4.2 Objectif

Conception d'amorces spécifiques qui encadrent le gène du P53 qui est associé à plusieurs types de cancer.

1.4.3 But

Utiliser les amorces obtenues dans des opérations d'amplification d'ADN du gène *P53*, dans le contexte de la recherche en immunologie et le diagnostic moléculaire des cancers.

CHAPITRE 2

2.1 Matériel et méthodes

2.2 Résultats

2.3 Confirmation des résultats

Chapitre 2. Matériels et méthodes

2.1 Matériel et méthodes

2.1.1 La séquence du gène *P53*

- Nous avons importé la séquence du gène *P53* de la base de données Ensembl « www.ensembl.org », en introduisant le nom du gène et la nature de l'espèce (humaine) (**Figure 2.1**).

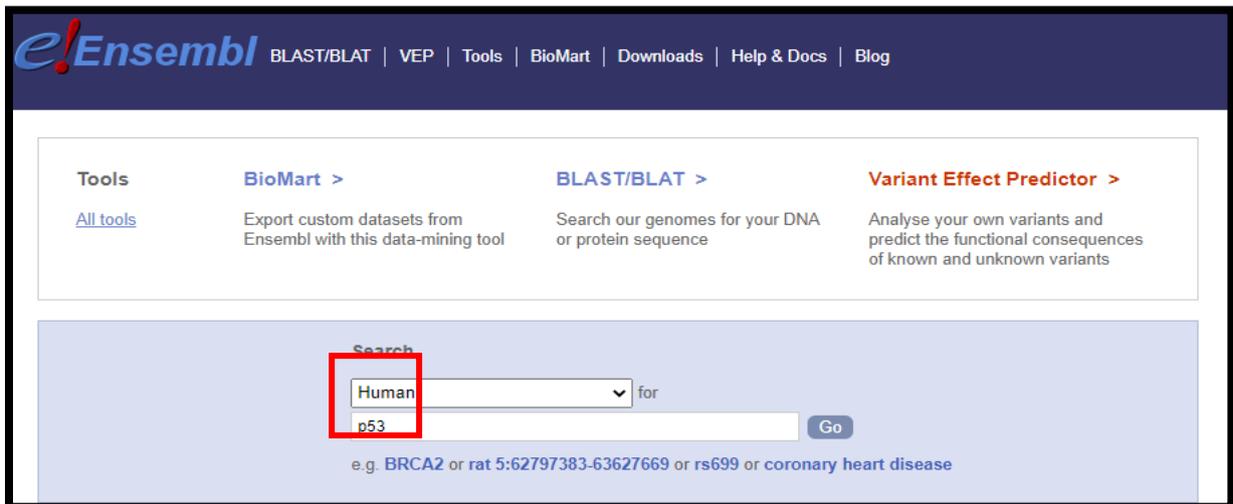


Figure 2.1. Plateforme de la base de données Ensembl.

- La séquence du gène *P53* est subdivisée en exons (caractères en rouge) et en introns (caractères en noir) (**Figure 2.2**).

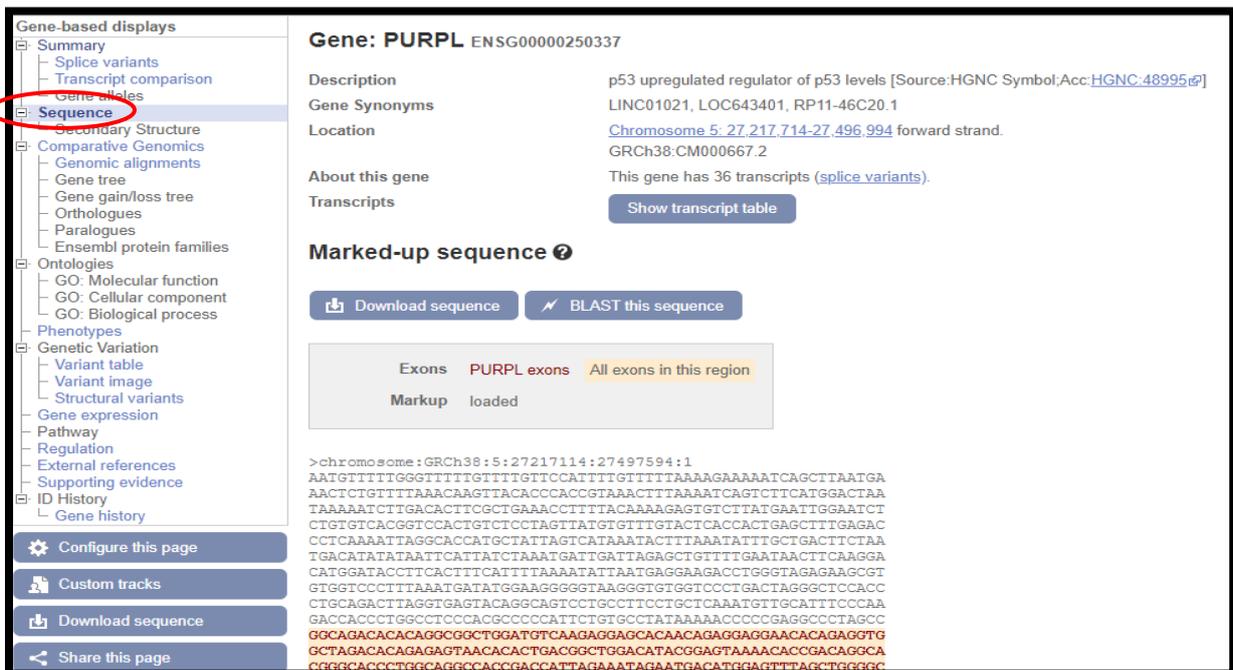


Figure 2.2. La séquence du gène *P53* sur la plateforme Ensembl.

Chapitre 2. Matériels et méthodes

- Nous avons copié et collé la séquence dans un document Word, et nous avons choisi et encadré l'exon 13 (**Figure 2.3**).



```
TGGAGATGGGTGTTAGGGTCCAGTGGGTGCTACTGTCCAGGGGGGCTTCTGGGGCCACCA
GCCTGTCAGCTCATCAACCAGGCTGAAGGTGCAAGCAGGAGCCCTTGCCTTGCCCAAG
GATCCAGACAGCTATGAAGCCACCAGCCTTCCTGACCTCAAGACCACCTTTTTTTTTTC
TCTTTCTTACTAGGGAATGCCAAACACTCTCCCAGGAGATCCAGACCCGCCTCTTTCAG
AGACTTTTAACTTAAACATCTGTCCCTACCCAGCAGGCAAACCTAGAGCTCCTGAAGCTCA
GTCCCTGTCCCTTGCCTCTGTAGACAGGTACCTTGATGAGCTTCTTTTTTTTTTTTTTAA
TTTTTTTTTATTTTAGGCTTTATTGGGGCATAATTGATCCCCAAAATTCATACATTCA
AGGTATGCAGTGTGATGATTTGATATGGGGGTATATTGTGAAACCATTACCACAATCAAA
TTAATCAGCACGTCCATCATCACACACAGTTACCATTTGTGTGTGTGCACGTGTGTTCAC
CTACGACGAGGACACTTGGACCTACTCTGCAGATCTCAAGTAAACAGAAAATCTCCCTTT
TTGACAACCATCTCCACCCTTTCAATCCCAACCTTTTCCCTAGATTATGTCCCTAGCTCT
GTTTTTATTTCTGCTGTGCTGCTTCAGATCCATTCTGACTCTGCCAAAACCTTCTTTGTG
AGCTGATAGATTGCTGGATTGAGAATTACAGCTGGGCGCGGTGGCTCACGCCTGTAATCC
CAACACTGTGGGAGGCCAAGGCCGGCGGATCACTTGAGGTCAGGAGTTGGAGACCAGCCT
GACCAACAAGATGAAACCCCATCTCTACTAAAATACAAAATAGCTGGGCATGGTGGTG
```

Figure 2.3. La séquence encadrée du gène *P53* prise depuis la base de données Ensembl.

2.1.2 Conception d'amorces

La conception des amorces est une étape primordiale pour déterminer la spécificité, la sensibilité et la robustesse d'une réaction de PCR.

Dans la base de données du National Center for Biotechnology Information (NCBI) « <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> » on trouve l'outil **Primer BLAST** qui nous permet une conception d'amorces spécifiques de la séquence qu'on veut amplifier (**Figure 2.4**).

Chapitre 2. Matériels et méthodes

➤ Puis nous avons cliqué sur le bouton "Get Primers" pour voir les résultats (Figure 2.6).

The image shows the 'Primer Pair Specificity Checking Parameters' interface. The 'Database' dropdown is set to 'Genomes for selected organisms (primary reference assembly only)'. The 'Organism' field is 'Homo sapiens'. The 'Get Primers' button is highlighted with a red box. Below the parameters, the 'Input PCR template' is 'Ic|Query_1' with a range of '1 - 1140'. A message states: 'Your PCR template is highly similar to the following sequence(s) from the search database. To increase the chance of finding specific primers, please review the list below and select all sequences (within the given sequence ranges) that are intended or allowed targets.' A table shows search results with columns: Accession, Title, Identity, Alignment length, Seq. start, and Seq. stop. The first result is 'NC_000005.11' with a title 'Homo sapiens chromosome 5, GRCh38.p13 Primary Assembly', 100% identity, and alignment length of 1140. A red arrow points to the 'Submit' button below the table.

Primer Pair Specificity Checking Parameters

Specificity check Enable search for primer pairs specific to the intended PCR template

Search mode Automatic

Database Genomes for selected organisms (primary reference assembly only)

Exclusion Exclude predicted Refseq transcripts (accession with XM, XR prefix) Exclude uncultured/environmental sample sequences

Organism Homo sapiens

Entrez query (optional)

Primer specificity stringency Primer must have at least 2 total mismatches to unintended targets, including at least 2 mismatches within the last 5 bps at the 3' end. Ignore targets that have 6 or more mismatches to the primer.

Max target size 4000

Allow splice variants Allow primer to amplify mRNA splice variants (requires refseq mRNA sequence as PCR template input)

Get Primers Show results in a new window Use new graphic view

Input PCR template Ic|Query_1
Range 1 - 1140

Your PCR template is highly similar to the following sequence(s) from the search database. To increase the chance of finding specific primers, please review the list below and select all sequences (within the given sequence ranges) that are intended or allowed targets.

Select: All None Selected: 0

Accession	Title	Identity	Alignment length	Seq. start	Seq. stop
<input type="checkbox"/> NC_000005.11	Homo sapiens chromosome 5, GRCh38.p13 Primary Assembly	100%	1140	27217474	27218613

Submit Show results in a new window

Figure 2.6. Changements de quelques paramètres (Primer BLAST).

CHAPITRE 3

3.1 Résultats

3.2 Confirmation des résultats

Chapitre 3. Résultats

3.1 Résultats

3.1.1 Les caractéristiques d'une bonne paire d'amorces

- Les amorces doivent contenir de 20 à 25 nucléotides, car, plus l'amorce est longue moins l'hybridation est optimale.
- La teneur en GC doit avoisiner les 40%.
- Les températures d'hybridation de l'amorce sens et anti-sens doivent être équivalentes des unes aux autres. Pendant la réalisation de la PCR, la température d'hybridation est stable à une seule valeur.
- Tous les produits aspécifiques résultants appartenant à l'amorce souhaitée doivent contenir plus de 1000 paire de bases, alors que celle des produits spécifiques doit être inférieure à 1000pb.

3.1.2 Résultats de la conception d'amorces pour le gène *P53*

Les résultats obtenus à partir de ce processus sont présentés ci-dessous (**Figure 2.7**)

Primer pair 1

	Sequence (5'→3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	GTCAGCTCATCAACCAGGCT	Plus	20	65	84	60.04	55.00	4.00	3.00
Reverse primer	TCTGAAGCAGCACAGCAGAA	Minus	20	688	669	59.89	50.00	4.00	0.00
Product length	624								

Products on potentially unintended templates
>NC_000017.11 Homo sapiens chromosome 17, GRCh38.p13 Primary Assembly

product length = 624
Features flanking this product:
[11837 bp at 5' side: sodium/potassium-transporting ATPase subunit beta-2 isofo...](#)
[2854 bp at 3' side: cellular tumor antigen p53 isoform a](#)

```
Forward primer 1 GTCAGCTCATCAACCAGGCT 20
Template 7667554 ..... 7667535

Reverse primer 1 TCTGAAGCAGCACAGCAGAA 20
Template 7666931 ..... 7666950
```

product length = 3670
Features associated with this product:
[cck-ATPase-binding-effector-protein-1 isoform v1](#)

Figure 2.7. Résultat de Primer BLAST.

3.1.3 Interprétation des résultats

En utilisant Primer BLAST, nous avons obtenu 10 paires d'amorces spécifiques du gène *P53*.

J'ai choisi la paire d'**amorces 1** grâce à la présence des critères suivants :

- La longueur du produit est de 624 pb (paire de bases), donc c'est un produit spécifique au gène *P53*.
- La longueur de l'amorce sens 5'GTCAGCTCATCAACCAGGCT3' et de l'amorce anti-sens 5'TCTGAAGCAGCACAGCAGAA3', ne dépasse pas 25 nucléotides.
- La température de fusion, est presque similaire, 60°C pour l'amorce sens et 59°C pour l'amorce anti-sens.

Chapitre 3. Résultats

- L'amorce sens et anti-sens ont un bon pourcentage en CG, 55% pour l'amorce sens et 50% pour l'anti-sens.
- L'autocomplementarité des ces amorces est de 4 ce qui est bon pour éviter la structure d'épingle à cheveux (**Tableau 3.1**).

Tableau 3.1. Critères de notre paire d'amorces.

Critères d'une bonne amorce	Taux optimal	Notre amorce
Température de fusion	52 à 60 °C	Directe 60 °C Inverse 59 °C
Longueur de nucléotides	15 à 30 nucléotides	Directe 20 nucléotides Inverse 20 nucléotides
Teneur en CG	40 à 60 %	Directe 55 % Inverse 50 %
Amorce spécifique	Moins de 1000 pb (paires de bases)	624 pb (paires de bases)
Produits aspécifiques	Plus de 1000pb (paires de bases)	Plus de 1000pb (paires de bases)

3.2. Confirmation des résultats

Pour confirmer les résultats nous avons utilisé une « PCR In Silico », *via* le site <https://genome.ucsc.edu/>, qui nous a donné un seul résultat indiquant l'emplacement de notre produit spécifique sur le chromosome 17, ce qui confirme la fiabilité et la spécificité de la paire d'amorces que nous avons conçue (**Figure 2.8**).

```
UCSC In-Silico PCR

>chr17:7666931-7667554 624bp GTCAGCTCATCAACCAGGCT TCTGAAGCAGCACAGCAGAA
GTCAGCTCATCAACCAGGCTgaaggtgcaagcaggagccccttgcccttgc
ccaaggatcccagacagctatgaagccaccagccttcctgacctcaaga
ccaccttttttttctctttcttactagggaatgccaacactctcccc
aggagatccagaccgcctctttcagagacttttaacttaaacatctgtc
cctac↓cagcaggcaactagagctcctgaagctcagtccttgccttgc
ctctgtagacaggtcaccttgatgagcttcttttttttttttaatttt
ttttattttaggctttattggggcataattgatccccaaaattgcata
cattcaaggatgacagtgatgattgatatgggggtatattgtgaaac
cattaccacaatcaaattaatcagcacgtccatcatcacacacagttacc
atgtgtgtgtgacgtgtgttcacctacgacgaggacacttggacctc
ctctgcagatctcaagtaaacagaaaatctccctttttgacaaccatcct
ccaccctttcaatccaaccttttcttagattatgtccctagctctgttt
ttatTTCTGCTGTGCTTCAGA
```

Figure 2.8. Confirmation des résultats PCR in Silico.

Discussion

Le cancer est la cause principale de décès dans le monde, le système immunitaire interagit avec le développement des tumeurs, afin d'éviter leur progression vers des métastases. Cette interaction se traduit soit par une éradication de la tumeur soit par son évvasion (Becker et al., 2013).

Les gènes suppresseurs de tumeurs limitent les divisions cellulaires et empêchent le développement d'un cancer ,l'inactivation de ces gènes peut contribuer à la transformation maligne d'une cellule(Jeanteur et al., 1990).

Plus de 50 % des cancers humains portent des mutations du gène suppresseur de tumeurs *P53* (Napoli and Flores, 2017). *P53* est un gène suppresseur de tumeur, qui interagit avec certains gènes pour exercer un contrôle sur le cycle cellulaire. Les mutations de *P53* présentent un risque que la cellule se transforme en cellule cancéreuse(Hainaut and Wiman, 2007).

La réaction de polymérisation en chaîne PCR représente une méthode de biologie moléculaire, rapide, sensible et spécifique pour la mise en évidence des modifications qui peuvent être présentes dans le gène *P53* muté, cependant une PCR fiable nécessite de bonnes amorces.

Nous concevons une bonne paire d'amorces pour le gène *P53* en utilisant des outils bioinformatiques notamment « Primer BLAST », nous avons obtenu les séquences d'amorces suivantes : amorce sens 5'GTCAGCTCATCAACCAGGCT3' et amorce anti-sens 5''TCTGAAGCAGCACAGCAGAA 3' spécifiques du gène *P53*, cette paire d'amorces est utilisée afin d'évaluer les différents changements au niveau du gène suppresseur de tumeur *P53* au cour d'un cancer.

En général, une conception d'amorces spécifique et une réalisation d'une PCR fiable approfondissent notre compréhension de l'intervention du gène *P53* lors d'un cancer.

Conclusion et perspectives

La conception avec spécificité des amorces encadrant le gène *P53*, afin de pouvoir réaliser par la suite une amplification optimale par PCR, pourrait faire plus tard l'objet d'une recherche en immunologie et en diagnostic moléculaire des cancers.

References

A

- A natural cytotoxic T cell response in a spontaneously regressing human melanoma targets a neoantigen resulting from a somatic point mutation. - PubMed - NCBI [WWW Document], n.d. URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10064075> (accessed 5.14.20).
- A New, Quantitative, Approach to the Study of the Stages of Chemical Carcinogenesis in the Mouse's Skin [WWW Document], n.d. URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2007527/> (accessed 5.14.20).
- Advances in Immunology, 1997. . Academic Press.
- Andtbacka, R.H.I., Kaufman, H.L., Collichio, F., Amatruda, T., Senzer, N., Chesney, J., Delman, K.A., Spitler, L.E., Puzanov, I., Agarwala, S.S., Milhem, M., Cranmer, L., Curti, B., Lewis, K., Ross, M., Guthrie, T., Linette, G.P., Daniels, G.A., Harrington, K., Middleton, M.R., Miller, W.H., Zager, J.S., Ye, Y., Yao, B., Li, A., Doleman, S., VanderWalde, A., Gansert, J., Coffin, R.S., 2015. Talimogene Laherparepvec Improves Durable Response Rate in Patients With Advanced Melanoma. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 33, 2780–2788. <https://doi.org/10.1200/JCO.2014.58.3377>

B

- Bargonetti, J., Manfredi, J.J., 2002. Multiple roles of the tumor suppressor p53: *Curr. Opin. Oncol.* 14, 86–91. <https://doi.org/10.1097/00001622-200201000-00015>
- Beatty, G.L., O'Dwyer, P.J., Clark, J., Shi, J.G., Bowman, K.J., Scherle, P.A., Newton, R.C., Schaub, R., Maleski, J., Leopold, L., Gajewski, T.F., 2017. First-in-Human Phase I Study of the Oral Inhibitor of Indoleamine 2,3-Dioxygenase-1 Epacadostat (INCBO24360) in Patients with Advanced Solid Malignancies. *Clin. Cancer Res.* 23, 3269–3276. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-2272>
- Becker, J.C., Andersen, M.H., Schrama, D., thor Straten, P., 2013. Immune-suppressive properties of the tumor microenvironment. *Cancer Immunol. Immunother.* 62, 1137–1148. <https://doi.org/10.1007/s00262-013-1434-6>
- Berdasco, M., Esteller, M., 2010. Aberrant epigenetic landscape in cancer: how cellular identity goes awry. *Dev. Cell* 19, 698–711. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2010.10.005>
- Biegging, K.T., Mello, S.S., Attardi, L.D., 2014. Unravelling mechanisms of p53-mediated tumour suppression. *Nat. Rev. Cancer* 14, 359–370. <https://doi.org/10.1038/nrc3711>
- Bruchard, M., Mignot, G., Derangère, V., Chalmin, F., Chevriaux, A., Végran, F., Boireau, W., Simon, B., Ryffel, B., Connat, J.L., Kanellopoulos, J., Martin, F., Rébé, C., Apetoh, L., Ghiringhelli, F., 2013. Chemotherapy-triggered cathepsin B release in myeloid-derived suppressor cells activates the Nlrp3 inflammasome and promotes tumor growth. *Nat. Med.* 19, 57–64. <https://doi.org/10.1038/nm.2999>
- Bryan, T.M., Cech, T.R., 1999. Telomerase and the maintenance of chromosome ends. *Curr. Opin. Cell Biol.* 11, 318–324. [https://doi.org/10.1016/S0955-0674\(99\)80043-X](https://doi.org/10.1016/S0955-0674(99)80043-X)
- Bullock, A.N., Fersht, A.R., 2001. Rescuing the function of mutant p53. *Nat. Rev. Cancer* 1, 68–76. <https://doi.org/10.1038/35094077>
- Byrne, W.L., Mills, K.H., Lederer, J.A., O'Sullivan, G.C., 2011. Targeting Regulatory T cells in Cancer. *Cancer Res.* 71, 6915–6920. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-1156>

C

- Cancer Today | UICC [WWW Document], n.d. URL <https://www.uicc.org/resources/cancer-today-info#> (accessed 5.13.20).
- Chambers, A.F., Groom, A.C., MacDonald, I.C., 2002. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat. Rev. Cancer* 2, 563–572. <https://doi.org/10.1038/nrc865>
- Chandran, S.S., Paria, B.C., Srivastava, A.K., Rothermel, L.D., Stephens, D.J., Dudley, M.E., Somerville, R., Wunderlich, J.R., Sherry, R.M., Yang, J.C., Rosenberg, S.A., Kammula, U.S., 2015. Persistence of CTL Clones Targeting Melanocyte Differentiation Antigens Was Insufficient to Mediate Significant Melanoma Regression in Humans. *Clin. Cancer Res.* 21, 534–543. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-2208>
- Childs, B.G., Baker, D.J., Kirkland, J.L., Campisi, J., Deursen, J.M., 2014. Senescence and apoptosis: dueling or complementary cell fates? *EMBO Rep.* 15, 1139–1153. <https://doi.org/10.15252/embr.201439245>
- Christofori, G., Semb, H., 1999. The role of the cell-adhesion molecule E-cadherin as a tumour-suppressor gene. *Trends Biochem. Sci.* 24, 73–76. [https://doi.org/10.1016/s0968-0004\(98\)01343-7](https://doi.org/10.1016/s0968-0004(98)01343-7)
- Cook, K., Durrant, L., Brentville, V., 2018. Current Strategies to Enhance Anti-Tumour Immunity. *Biomedicines* 6, 37. <https://doi.org/10.3390/biomedicines6020037>
- Cory, S., Adams, J.M., 2002. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat. Rev. Cancer* 2, 647–656. <https://doi.org/10.1038/nrc883>
- Dixon, K., Kopras, E., 2004. Genetic alterations and DNA repair in human carcinogenesis. *Semin. Cancer Biol., Modern Criteria to Identify Human Carcinogens* 14, 441–448. <https://doi.org/10.1016/j.semcan.2004.06.007>

D

- Dulić, V., 2002. Cycline E et cancer, une histoire de destruction. *médecine/sciences* 18, 282–284. <https://doi.org/10.1051/medsci/2002183282>
- Dunn, G.P., Bruce, A.T., Ikeda, H., Old, L.J., Schreiber, R.D., 2002. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat. Immunol.* 3, 991–998. <https://doi.org/10.1038/ni1102-991>

F

- Ferlay, J., Colombet, M., Soerjomataram, I., Mathers, C., Parkin, D.M., Piñeros, M., Znaor, A., Bray, F., 2019. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *Int. J. Cancer* 144, 1941–1953. <https://doi.org/10.1002/ijc.31937>
- Ferradini, L., Mackensen, A., Genevée, C., Bosq, J., Duvillard, P., Avril, M.F., Hercend, T., 1993. Analysis of T cell receptor variability in tumor-infiltrating lymphocytes from a human regressive melanoma. Evidence for in situ T cell clonal expansion. *J. Clin. Invest.* 91, 1183–1190. <https://doi.org/10.1172/JCI116278>
- Foulds, L., 1954. The experimental study of tumor progression: a review. *Cancer Res.* 14, 327–339.
- Fu, J., Kanne, D.B., Leong, M., Glickman, L.H., McWhirter, S.M., Lemmens, E., Mechette, K., Leong, J.J., Lauer, P., Liu, W., Sivick, K.E., Zeng, Q., Soares, K.C., Zheng, L., Portnoy, D.A., Woodward, J.J., Pardoll, D.M., Dubensky, T.W., Kim, Y., 2015. STING agonist formulated cancer vaccines can cure established tumors resistant to PD-1 blockade. *Sci. Transl. Med.* 7, 283ra52-283ra52. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaa4306>
- Fukuhara, H., Ino, Y., Todo, T., 2016. Oncolytic virus therapy: A new era of cancer treatment at dawn. *Cancer Sci.* 107, 1373–1379. <https://doi.org/10.1111/cas.13027>

G

- Girardi, M., Oppenheim, D.E., Steele, C.R., Lewis, J.M., Glusac, E., Filler, R., Hobby, P., Sutton, B., Tigelaar, R.E., Hayday, A.C., 2001. Regulation of cutaneous malignancy by gammadelta T cells. *Science* 294, 605–609. <https://doi.org/10.1126/science.1063916>
- Grivennikov, S.I., Greten, F.R., Karin, M., 2010. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* 140, 883–899. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.025>

H

- Hadjidj, Z., Messali, R., Aribi, M., 2020. Lack of cell movement impairs survival of peripheral blood IL-2-stimulated natural killer cells originating from solid cancer and promotes red blood cells to induce their switch toward a regulatory phenotype. *Immunol. Lett.* 221, 6–17. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2020.02.002>
- Hainaut, P., Wiman, K.G. (Eds.), 2007. 25 years of P53 research, First edition 2005, reprinted 2007. ed. Springer, Dordrecht.
- Hanahan, D., Folkman, J., 1996. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 86, 353–364. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80108-7](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80108-7)
- Hanahan, D., Weinberg, R.A., 2011. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 144, 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Haupt, Y., Maya, R., Kazaz, A., Oren, M., 1997. Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature* 387, 296–299. <https://doi.org/10.1038/387296a0>
- Hinrichs, C.S., Rosenberg, S.A., 2014. Exploiting the curative potential of adoptive T-cell therapy for cancer. *Immunol. Rev.* 257, 56–71. <https://doi.org/10.1111/imr.12132>

J

- Jeanteur, Ph., Theillet, C., Pujol, H., 1990. Oncogènes, anti-oncogènes et leurs altérations dans les tumeurs humaines. *Rev. Médecine Interne* 11, 216–220. [https://doi.org/10.1016/S0248-8663\(10\)80005-0](https://doi.org/10.1016/S0248-8663(10)80005-0)
- Jiang, W.G., Matsumoto, K., Nakamura, T., 2001. Growth Factors and their Receptors in Cancer Metastasis. Springer Science & Business Media.
- Joerger, A.C., Fersht, A.R., 2010. The Tumor Suppressor p53: From Structures to Drug Discovery. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2, a000919–a000919. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000919>

K

- Kaufman, H.L., Bines, S.D., 2010. OPTIM trial: a Phase III trial of an oncolytic herpes virus encoding GM-CSF for unresectable stage III or IV melanoma. *Future Oncol. Lond. Engl.* 6, 941–949. <https://doi.org/10.2217/fon.10.66>
- Kim, M.P., Zhang, Y., Lozano, G., 2015. Mutant p53: Multiple Mechanisms Define Biologic Activity in Cancer. *Front. Oncol.* 5. <https://doi.org/10.3389/fonc.2015.00249>
- Klaunig, J.E., Kamendulis, L.M., Xu, Y., 2000. Epigenetic mechanisms of chemical carcinogenesis. *Hum. Exp. Toxicol.* 19, 543–555. <https://doi.org/10.1191/096032700701546442>
- Kong, N., Tao, W., Ling, X., Wang, J., Xiao, Y., Shi, S., Ji, X., Shajii, A., Gan, S.T., Kim, N.Y., Duda, D.G., Xie, T., Farokhzad, O.C., Shi, J., 2019. Synthetic mRNA nanoparticle-mediated restoration of p53 tumor suppressor sensitizes p53-deficient cancers to mTOR inhibition. *Sci. Transl. Med.* 11, eaaw1565. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaw1565>
- Kroll, A.V., Fang, R.H., Jiang, Y., Zhou, J., Wei, X., Yu, C.L., Gao, J., Luk, B.T., Dehaini, D., Gao, W., Zhang, L., 2017. Nanoparticulate Delivery of Cancer Cell Membrane Elicits Multiantigenic Antitumor Immunity. *Adv. Mater.* 29, 1703969. <https://doi.org/10.1002/adma.201703969>

- Kruiswijk, F., Labuschagne, C.F., Vousden, K.H., 2015a. p53 in survival, death and metabolic health: a lifeguard with a licence to kill. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 16, 393–405. <https://doi.org/10.1038/nrm4007>
- Kruiswijk, F., Labuschagne, C.F., Vousden, K.H., 2015b. p53 in survival, death and metabolic health: a lifeguard with a licence to kill. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 16, 393–405. <https://doi.org/10.1038/nrm4007>
- Kvistborg, P., Philips, D., Kelderman, S., Hageman, L., Ottensmeier, C., Joseph-Pietras, D., Welters, M.J.P., van der Burg, S., Kapiteijn, E., Michielin, O., Romano, E., Linnemann, C., Speiser, D., Blank, C., Haanen, J.B., Schumacher, T.N., 2014. Anti-CTLA-4 therapy broadens the melanoma-reactive CD8+ T cell response. *Sci. Transl. Med.* 6, 254ra128-254ra128. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3008918>

L

- Lengauer, C., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., 1998. Genetic instabilities in human cancers. *Nature* 396, 643–649. <https://doi.org/10.1038/25292>
- Linch, S.N., McNamara, M.J., Redmond, W.L., 2015. OX40 Agonists and Combination Immunotherapy: Putting the Pedal to the Metal. *Front. Oncol.* 5. <https://doi.org/10.3389/fonc.2015.00034>
- Liu, B.L., Robinson, M., Han, Z.-Q., Branston, R.H., English, C., Reay, P., McGrath, Y., Thomas, S.K., Thornton, M., Bullock, P., Love, C.A., Coffin, R.S., 2003. ICP34.5 deleted herpes simplex virus with enhanced oncolytic, immune stimulating, and anti-tumour properties. *Gene Ther.* 10, 292–303. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3301885>
- Liu, H., Shen, Z., Wang, Z., Wang, X., Zhang, H., Qin, J., Qin, X., Xu, J., Sun, Y., 2016. Increased expression of IDO associates with poor postoperative clinical outcome of patients with gastric adenocarcinoma. *Sci. Rep.* 6, 21319. <https://doi.org/10.1038/srep21319>
- Liu, J., Zhang, C., Hu, W., Feng, Z., 2019. Tumor suppressor p53 and metabolism. *J. Mol. Cell Biol.* 11, 284–292. <https://doi.org/10.1093/jmcb/mjy070>
- Lorenz, T.C., 2012. Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies. *J. Vis. Exp.* 3998. <https://doi.org/10.3791/3998>
- Łuksza, M., Riaz, N., Makarov, V., Balachandran, V.P., Hellmann, M.D., Solovyov, A., Rizvi, N.A., Merghoub, T., Levine, A.J., Chan, T.A., Wolchok, J.D., Greenbaum, B.D., 2017. A neoantigen fitness model predicts tumour response to checkpoint blockade immunotherapy. *Nature* 551, 517–520. <https://doi.org/10.1038/nature24473>

M

- Markowitz, S., Wang, J., Myeroff, L., Parsons, R., Sun, L., Lutterbaugh, J., Fan, R., Zborowska, E., Kinzler, K., Vogelstein, B., et al., 1995. Inactivation of the type II TGF-beta receptor in colon cancer cells with microsatellite instability. *Science* 268, 1336–1338. <https://doi.org/10.1126/science.7761852>
- Mathys, V., Lefèvre, P., Fontaine, V., Dehem, M., Donnio, P.Y., Février, F., Le Coustumier, A., Bifani, P., 2007. La PCR en temps réel : principe et application en infectiologie. *Antibiotiques* 9, 205–211. [https://doi.org/10.1016/S1294-5501\(07\)91380-1](https://doi.org/10.1016/S1294-5501(07)91380-1)
- Mehdipour, P., 2015. *Epigenetics Territory and Cancer*. Springer.
- Mittal, D., Gubin, M.M., Schreiber, R.D., Smyth, M.J., 2014. New insights into cancer immunoediting and its three component phases—elimination, equilibrium and escape. *Curr. Opin. Immunol.* 27, 16–25. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2014.01.004>
- Munn, D.H., Mellor, A.L., 2016. IDO in the Tumor Microenvironment: Inflammation, Counter-Regulation, and Tolerance. *Trends Immunol.* 37, 193–207. <https://doi.org/10.1016/j.it.2016.01.002>

N

Nakano, K., Vousden, K.H., 2001. PUMA, a Novel Proapoptotic Gene, Is Induced by p53. *Mol. Cell* 7, 683–694. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(01\)00214-3](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(01)00214-3)

Napoli, M., Flores, E.R., 2017. The p53 family orchestrates the regulation of metabolism: physiological regulation and implications for cancer therapy. *Br. J. Cancer* 116, 149–155. <https://doi.org/10.1038/bjc.2016.384>

O

OMS | Cancer [WWW Document], n.d. . WHO. URL <http://www.who.int/topics/cancer/fr/> (accessed 5.11.20).

P

Parker, K.H., Beury, D.W., Ostrand-Rosenberg, S., 2015. Myeloid-Derived Suppressor Cells, in: *Advances in Cancer Research*. Elsevier, pp. 95–139. <https://doi.org/10.1016/bs.acr.2015.04.002>

Petitjean, A., Mathe, E., Kato, S., Ishioka, C., Tavtigian, S.V., Hainaut, P., Olivier, M., 2007. Impact of mutant p53 functional properties on *TP53* mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC TP53 database. *Hum. Mutat.* 28, 622–629. <https://doi.org/10.1002/humu.20495>

Plummer, M., de Martel, C., Vignat, J., Ferlay, J., Bray, F., Franceschi, S., 2016. Global burden of cancers attributable to infections in 2012: a synthetic analysis. *Lancet Glob. Health* 4, e609–e616. [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(16\)30143-7](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(16)30143-7)

Prickett, T.D., Crystal, J.S., Cohen, C.J., Pasetto, A., Parkhurst, M.R., Gartner, J.J., Yao, X., Wang, R., Gros, A., Li, Y.F., El-Gamil, M., Trebska-McGowan, K., Rosenberg, S.A., Robbins, P.F., 2016. Durable Complete Response from Metastatic Melanoma after Transfer of Autologous T Cells Recognizing 10 Mutated Tumor Antigens. *Cancer Immunol. Res.* 4, 669–678. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-15-0215>

R

Rallapalli, R., Strachan, G., Cho, B., Mercer, W.E., Hall, D.J., 1999. A Novel MDMX Transcript Expressed in a Variety of Transformed Cell Lines Encodes a Truncated Protein with Potent p53 Repressive Activity. *J. Biol. Chem.* 274, 8299–8308. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.12.8299>

Rashid, S., 2017. *Cancer and Chemoprevention: An Overview*. Springer.

Revisiting immunosurveillance and immunostimulation: Implications for cancer immunotherapy [WWW Document], n.d. URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC549049/> (accessed 5.14.20).

Robbins, P.F., Lu, Y.-C., El-Gamil, M., Li, Y.F., Gross, C., Gartner, J., Lin, J.C., Teer, J.K., Clifton, P., Tycksen, E., Samuels, Y., Rosenberg, S.A., 2013. Mining exomic sequencing data to identify mutated antigens recognized by adoptively transferred tumor-reactive T cells. *Nat. Med.* 19, 747–752. <https://doi.org/10.1038/nm.3161>

S

Samoszuk, M., 1997. Eosinophils and human cancer. *Histol. Histopathol.*

Sarosiek, K., 2018. p53: Jack of all (cell death) trades, master of all. *Sci. Transl. Med.* 10. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aar7526>

- Schreiber, R.D., Old, L.J., Smyth, M.J., 2011. Cancer Immunoediting: Integrating Immunity's Roles in Cancer Suppression and Promotion. *Science* 331, 1565–1570. <https://doi.org/10.1126/science.1203486>
- Ségala, G., n.d. *Cancer : les mécanismes biologiques* 48.
- Shankaran, V., Ikeda, H., Bruce, A.T., White, J.M., Swanson, P.E., Old, L.J., Schreiber, R.D., 2001. IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* 410, 1107–1111. <https://doi.org/10.1038/35074122>
- Shen, Y., White, E., 2001. p53-Dependent apoptosis pathways, in: *Advances in Cancer Research*. Elsevier, pp. 55–84. [https://doi.org/10.1016/S0065-230X\(01\)82002-9](https://doi.org/10.1016/S0065-230X(01)82002-9)
- Sica, A., Allavena, P., Mantovani, A., 2008. Cancer related inflammation: the macrophage connection. *Cancer Lett.* 267, 204–215. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2008.03.028>
- Simpson, T.R., Li, F., Montalvo-Ortiz, W., Sepulveda, M.A., Bergerhoff, K., Arce, F., Roddie, C., Henry, J.Y., Yagita, H., Wolchok, J.D., Peggs, K.S., Ravetch, J.V., Allison, J.P., Quezada, S.A., 2013. Fc-dependent depletion of tumor-infiltrating regulatory T cells co-defines the efficacy of anti-CTLA-4 therapy against melanoma. *J. Exp. Med.* 210, 1695–1710. <https://doi.org/10.1084/jem.20130579>
- Smyth, M.J., Godfrey, D.I., Trapani, J.A., 2001. A fresh look at tumor immunosurveillance and immunotherapy. *Nat. Immunol.* 2, 293–299. <https://doi.org/10.1038/86297>
- Song, H., Hollstein, M., Xu, Y., 2007. p53 gain-of-function cancer mutants induce genetic instability by inactivating ATM. *Nat. Cell Biol.* 9, 573–580. <https://doi.org/10.1038/ncb1571>
- Speidel, D., 2015. The role of DNA damage responses in p53 biology. *Arch. Toxicol.* 89, 501–517. <https://doi.org/10.1007/s00204-015-1459-z>
- Speidel, D., 2010. Transcription-independent p53 apoptosis: an alternative route to death. *Trends Cell Biol.* 20, 14–24. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2009.10.002>
- Srivastava, S., Riddell, S.R., 2018. Chimeric Antigen Receptor T Cell Therapy: Challenges to Bench-to-Bedside Efficacy. *J. Immunol.* 200, 459–468. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1701155>

T

- Takeuchi, Y., Nishikawa, H., 2016. Roles of regulatory T cells in cancer immunity. *Int. Immunol.* 28, 401–409. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxw025>
- Terabe, M., Berzofsky, J.A., 2004. Immunoregulatory T cells in tumor immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 16, 157–162. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2004.01.010>
- The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. - PubMed - NCBI [WWW Document], n.d. URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15308095> (accessed 5.14.20).
- Thomas, L.J., He, L.-Z., Marsh, H., Keler, T., 2014. Targeting human CD27 with an agonist antibody stimulates T-cell activation and antitumor immunity. *Oncotarget* 3, e27255. <https://doi.org/10.4161/onci.27255>
- Toledo, F., Bluteau, O., Simeonova, I., 2007. Réactivation de p53 dans les tumeurs : une stratégie antitumorale prometteuse. *médecine/sciences* 23, 565–567. <https://doi.org/10.1051/medsci/20072367565>
- Toledo, F., Wahl, G.M., 2006. Regulating the p53 pathway: in vitro hypotheses, in vivo veritas. *Nat. Rev. Cancer* 6, 909–923. <https://doi.org/10.1038/nrc2012>

V

- Vaccination against HPV-16 Oncoproteins for Vulvar Intraepithelial Neoplasia | NEJM [WWW Document], n.d. URL <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa0810097> (accessed 5.14.20).
- Vainio, H.U., Hietanen, E.K., 2003. *Mechanisms in Carcinogenesis and Cancer Prevention*. Springer Science & Business Media.

- Varna, M., Bousquet, G., Plassa, L.-F., Bertheau, P., Janin, A., 2011. TP53 Status and Response to Treatment in Breast Cancers. *J. Biomed. Biotechnol.* 2011, 1–9.
<https://doi.org/10.1155/2011/284584>
- Vaseva, A.V., Moll, U.M., 2009. The mitochondrial p53 pathway. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* 1787, 414–420. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2008.10.005>
- VEGF targets the tumour cell. - PubMed - NCBI [WWW Document], n.d. URL
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24263190> (accessed 5.14.20).
- Vesely, M.D., Kershaw, M.H., Schreiber, R.D., Smyth, M.J., 2011. Natural innate and adaptive immunity to cancer. *Annu. Rev. Immunol.* 29, 235–271. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-031210-101324>
- Vogelstein, B., Kinzler, K.W., 2004. Cancer genes and the pathways they control. *Nat. Med.* 10, 789–799. <https://doi.org/10.1038/nm1087>
- Vogelstein, B., Lane, D., Levine, A.J., 2000. Surfing the p53 network. *Nature* 408, 307–310.
<https://doi.org/10.1038/35042675>

W

- Wang, B., Zhang, W., Jankovic, V., Golubov, J., Poon, P., Oswald, E.M., Gurer, C., Wei, J., Ramos, I., Wu, Q., Waite, J., Ni, M., Adler, C., Wei, Y., Macdonald, L., Rowlands, T., Brydges, S., Siao, J., Poueymirou, W., MacDonald, D., Yancopoulos, G.D., Sleeman, M.A., Murphy, A.J., Skokos, D., 2018. **Combination cancer immunotherapy targeting PD-1 and GITR can rescue CD8⁺ T cell dysfunction and maintain memory phenotype**. *Sci. Immunol.* 3, eaat7061.
<https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aat7061>
- Wang, W., El-Deiry, W.S., 2008. Restoration of p53 to limit tumor growth: *Curr. Opin. Oncol.* 20, 90–96. <https://doi.org/10.1097/CCO.0b013e3282f31d6f>
- Warburg, O., Wind, F., Negelein, E., 1927. THE METABOLISM OF TUMORS IN THE BODY. *J. Gen. Physiol.* 8, 519–530.
- Warfel, N.A., El-Deiry, W.S., 2013. p21WAF1 and tumorigenesis: 20 years after. *Curr. Opin. Oncol.* 25, 52–58. <https://doi.org/10.1097/CCO.0b013e32835b639e>
- Weed, D.T., Vella, J.L., Reis, I.M., De la fuente, A.C., Gomez, C., Sargi, Z., Nazarian, R., Califano, J., Borrello, I., Serafini, P., 2015. Tadalafil Reduces Myeloid-Derived Suppressor Cells and Regulatory T Cells and Promotes Tumor Immunity in Patients with Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Clin. Cancer Res.* 21, 39–48. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-1711>
- White, E., 2016. Autophagy and p53. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 6, a026120.
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a026120>
- Williams, G.M., 2001. Mechanisms of chemical carcinogenesis and application to human cancer risk assessment. *Toxicology* 166, 3–10. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(01\)00442-5](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(01)00442-5)
- Woude, G.F.V., Klein, G., 2011. *Advances in Cancer Research*. Academic Press.
- Wyllie, A.H., Kerr, J.F.R., Currie, A.R., 1980. Cell Death: The Significance of Apoptosis, in: *International Review of Cytology*. Elsevier, pp. 251–306. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(08\)62312-8](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(08)62312-8)
- Ying, Y., Padanilam, B.J., 2016. Regulation of necrotic cell death: p53, PARP1 and cyclophilin D-overlapping pathways of regulated necrosis? *Cell. Mol. Life Sci.* 73, 2309–2324.
<https://doi.org/10.1007/s00018-016-2202-5>

Z

- Zhang, H., Snyder, K.M., Suhoski, M.M., Maus, M.V., Kapoor, V., June, C.H., Mackall, C.L., 2007. 4-1BB is superior to CD28 costimulation for generating CD8⁺ cytotoxic lymphocytes for adoptive immunotherapy. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 179, 4910–4918.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.7.4910>