



**Mécanismes de résistance à l'apoptose induite par
TRAIL dans les cellules cancéreuses : restauration de la
sensibilité à TRAIL par la chimiothérapie
conventionnelle ou par un polyphénol, la quercétine**

Guillaume Jacquemin

► **To cite this version:**

Guillaume Jacquemin. Mécanismes de résistance à l'apoptose induite par TRAIL dans les cellules cancéreuses : restauration de la sensibilité à TRAIL par la chimiothérapie conventionnelle ou par un polyphénol, la quercétine. Sciences agricoles. Université de Bourgogne, 2010. Français. NNT : 2010DIJOS044 . tel-00597412

HAL Id: tel-00597412

<https://theses.hal.science/tel-00597412>

Submitted on 31 May 2011

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

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

Université de Bourgogne, UMR 866
Ecole doctorale Environnement-Santé-STIC

Année 2010

N° attribué par la bibliothèque

THÈSE

Présentée pour l'obtention du titre de

Docteur de l'Université de Bourgogne

Discipline : SCIENCES DE LA VIE

Spécialité : Biochimie, Biologie Cellulaire et Moléculaire

Présentée et soutenue publiquement par

Guillaume JACQUEMIN

Le 14 décembre 2010

**Mécanismes de résistance à l'apoptose induite par TRAIL
dans les cellules cancéreuses : Restauration de la sensibilité
à TRAIL par la chimiothérapie conventionnelle ou par un
polyphénol, la quercétine.**

Membres du jury :

Dr. Laurence BRESSON-BEPOLDIN

Rapporteur

Dr. Philippe JUIN

Rapporteur

Dr. Thierry GUILLAUMEUX

Examineur externe

Pr. Norbert LATRUFFE

Examineur interne

Pr. Ali BETTAIEB

Examineur interne

Dr. Olivier MICHEAU

Directeur de thèse

" Nos vérités sont provisoires : battues en brèche par les vérités de demain, elles s'embroussaillent de tant de faits contradictoires que le dernier mot du savoir est le doute."

Jean-henri Fabre

Souvenirs entomologiques (1900)

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury qui m'ont fait l'honneur de juger ce travail de thèse, malgré leurs emplois du temps très chargés:

Laurence BRESSON-BEPOLDIN, Chargé de Recherche CNRS à l'unité INSERM U916 « Validation et Identification de Nouvelles Cibles en Oncologie », à l'institut Bergonié de Bordeaux.

Philippe JUIN, Directeur de Recherche à l'institut de Recherche Thérapeutique de l'Université de Nantes, au sein de l'unité INSERM / UMR892.

Thierry GUILLAUMEUX, Maître de conférence à l'unité INSERM U917 « Microenvironnement et Cancer » de la Faculté de Médecine de Rennes.

Ali BETTAIEB, Professeur au Laboratoire d'immunologie et d'immunothérapie des cancers de l'EPHE, au Centre de Recherche INSERM U866.

Norbert LATRUFFE, Professeur au Centre de Recherche INSERM U866 « Acides gras : Biochimie métabolique et nutritionnelle » de Dijon.

Mes remerciements s'adressent à tous les donateurs de la Ligue Nationale Contre le Cancer, qui permettent de faire avancer la recherche, et sans qui le financement et donc la réalisation de cette thèse n'auraient pas été possibles.

Je tiens à remercier tout particulièrement mon directeur de thèse, Olivier MICHEAU, qui m'a permis de découvrir l'univers de la recherche et de confirmer mon intérêt pour la science. Merci pour ta disponibilité, ton enthousiasme et tes nombreux conseils. Je te suis très reconnaissant de m'avoir accordé ta confiance, de m'avoir toujours laissé prendre des initiatives et de m'avoir laissé une certaine part d'indépendance dans mon travail. Je garde un très bon souvenir de ces quelques années dans l'équipe.

Aux anciens et aux actuels membres de la « *Micheau team* », un gigantesque MERCI !!! Je suis conscient de la chance d'être tombé sur des personnes comme vous. Votre soutien et la bonne ambiance permanente ont fait de cette thèse une période plus qu'agréable. Que de bons souvenirs!

Delphine, merci pour ta bonne humeur, ton sourire et tous tes conseils lors de mes débuts de thésard. Ca me fait toujours bizarre d'imaginer une jurassienne en Australie!

Aurélië, notre meusienne, merci aussi pour ta bonne humeur, ta serviabilité et ton sens de l'humour. Merci de m'avoir appris à faire du milieu complet en milieu STERILE, c'était mon 1^{er} apprentissage de chercheur! Tu nous manques beaucoup depuis ton départ... je te souhaite plein de bonheur avec ta petite famille!

Alexouille, le plongeur aquatique mal rasé. Ah ces satanées bouteilles de plongée qui bloquaient l'entrée de ton appart... tu nous as bien fait rire avec cette histoire! En tout cas merci pour ta jovialité et ton sens de la déconne. J'ai vite appris qu'il ne fallait pas te défier avec un bac de glace! Merci aussi d'avoir toujours été à l'écoute et prêt à aider.

Nij, c'est le moment pour moi de te dire toute l'amitié et l'affection que j'ai pour toi. Tu connais mon côté ordonné et psychorigide, donc pour t'énervier je vais classer tes qualités par ordre alphabétique: Authentique, communicative, drôle, dynamique, franche, généreuse, gracieuse, hilarante, humaine, indomptable, intelligente, joviale, ouverte, sensible, spontanée. Avec des défauts aussi et ton caractère

bien trempé, ce qui te donne une personnalité inimitable! J'espère qu'on aura l'occasion de venir te voir chez les kangourous.

Lisa, our Italian girl, thank you for being my office neighbour. Maybe I was not enough talkative for you, but it was a great pleasure to work with you! You're a very kind and generous person. Thank you and I wish you all the best with your husband!

Sarah, our kiwi from New Zealand. The best sentence to describe her is "Sarah is great!". Thank you so much for being so kind, nice, generous. Thank you for your helpful English lessons. You are pretty coooooool!

Sans oublier Elise, toujours enthousiaste et de bonne humeur. Et enfin Aymeric, notre nouvelle recrue. Nous n'avons pas eu le temps de bien nous connaître, fin de thèse oblige, mais je te souhaite tout le meilleur pour la suite.

Merci à tous mes collègues et amis du labo avec qui j'ai partagé ces 4 années.

Je commence bien sûr par Chiquette, que j'ai la chance de connaître depuis nos débuts à la fac. Je dis bien la chance parce qu'on n'en trouvera pas 2 comme toi! Jean-Marc et lise ont fait du bon boulot! On ne s'ennuie jamais quand une chiquette est dans les parages, tu répands la joie de vivre autour de toi. Et c'est pas grave si tu chantes faux! J'espère qu'on ne perdra pas le contact par la suite!

Malikouette (ou Malikacaouette), ma copine de pause thé. Tu débordes de gentillesse et de générosité, c'est un vrai plaisir de te connaître. J'apprécie beaucoup ton ouverture d'esprit et ton sens de l'humour. Merci d'avoir souvent fait ma vaisselle et mes capuccinos. J'espère que tu me feras découvrir le Bangladesh un jour. Bon courage pour la fin de ta thèse.

Merci à Leslie, ma copine de bureau, la fille la plus curieuse de la planète! Tu sais que c'est un vilain défaut? Mais je te rassure tu as plein d'autres qualités! Plein de bonheur pour la suite.

Merci à Jessy "quartier de pomme" (qui d'ailleurs s'est exilée dans la grosse pomme), à Arthur le déjanté (ça va me manquer nos concours de pulls rayés) et à Jean le gringalet;

Merci à Nona "Georgia on my mind", toujours agréable et souriante, à Guillaume "Wetchetchtein" pour son humour au 10° degré, à David le déconneur perpétuel ("Relax, take it eaaaasy!"), à Anne-Laure J la gourmande, à Anne-Laure R la déjantée, à Seb, Adonis, PEP, Marion, Jérôme(s). Merci à Aziza, mon agréable voisine d'ordi, et Naïma.

Merci à Nathalie Drouin pour son aide en Q-PCR et pour nos moments de relâchement intellectuel à la cafet. Merci à Brice (que j'ai battu *in extremis* dans la course à la paternité), à Romain (le représentant en charolais), à Laurent (le Jean Roucas du labo) et Anne.

Je tiens également à remercier les membres de l'EPHE pour leur gentillesse, notamment Ali, Amandine (même si tu veux jamais faire ma vaisselle!), Nathalie, Cindy, Catherine, Myriam, Rahamata, Stéphanie et Cédric.

Merci à toute l'équipe Avenir avec qui nous avons partagé le box, en particulier Mélanie (tu veux un palmito Mélaaanie?), grégoire, Fannette, Cédric et Valentin.

Je tiens à remercier Arlette et Annabelle pour la cytométrie (et pour nos discussions à la cafet), mais aussi Lydie, Annie, Jean-claude le bricoleur et André le roi du tupperware.

Un grand merci à Alexandrine, pour sa disponibilité et ses compétences.

Enfin, comment remercier la personne la plus importante à mon cœur tout en conservant la pudeur nécessaire? Je suis bien incapable d'exprimer ici la force de ce que je ressens pour toi. Je ne peux que remercier le hasard qui nous a fait nous rencontrer (je crois que tu appelles ça le Destin ?). Et tout récemment la naissance de notre petit Lilian, que demander de plus.

Je clos enfin ces remerciements en remerciant du fond du cœur mes chers parents qui m'ont toujours encouragé et soutenu durant ces (longues) études.

RESUMÉ

Mécanismes de résistance à l'apoptose induite par TRAIL dans les cellules cancéreuses : Restauration de la sensibilité à TRAIL par la chimiothérapie conventionnelle ou par un polyphénol, la quercétine.

TRAIL (*TNF-related apoptosis inducing ligand*) est une protéine du système immunitaire appartenant à la famille du TNF (*Tumor necrosis factor*). L'intérêt de TRAIL en thérapie anti-cancéreuse réside dans sa capacité à induire la mort par apoptose des cellules tumorales, sans exercer de toxicité envers les cellules saines. Le principal frein à l'utilisation de TRAIL est la survenue de mécanismes de résistance à TRAIL dans certaines tumeurs. Mon travail de thèse a consisté à étudier ces mécanismes de résistance à TRAIL et à élaborer des stratégies visant à les contourner.

Dans un premier temps, mon intérêt s'est porté sur le récepteur antagoniste TRAIL-R4, qui est capable de fixer TRAIL sans engager de signal de mort. Nous avons montré pour la première fois que TRAIL-R4 est à l'origine de l'induction de voies de signalisation intracellulaires de survie et de prolifération dans le modèle HeLa de carcinome du col de l'utérus. Ces cellules résistantes peuvent néanmoins être sensibilisées à l'action de TRAIL par un pré-traitement chimiothérapeutique conventionnel (cisplatine, étoposide ou 5-FU). Cette sensibilisation ne fait pas intervenir la voie mitochondriale de l'apoptose, mais passe par une augmentation du recrutement et de l'activation de la caspase-8 au sein du complexe initiateur de mort (DISC).

Dans un deuxième temps, mon travail s'est focalisé sur des lymphomes B non-Hodgkiniens particulièrement agressifs, les lignées VAL et RL. La résistance à TRAIL de ces lymphomes est due à un blocage de la voie mitochondriale de l'apoptose, notamment en raison de l'expression des protéines anti-apoptotiques Bcl-2, Mcl-1 et survivine. Mon objectif a été d'élaborer une stratégie thérapeutique visant à contourner cette résistance. Dans ce contexte, nous avons évalué l'efficacité d'un composé polyphénolique issu des plantes, la quercétine. Nos résultats montrent que la combinaison de la quercétine et de TRAIL permet de tuer de façon synergique les lymphomes VAL et RL. Le mécanisme moléculaire de cette synergie comprend l'activation de la voie mitochondriale de l'apoptose, ainsi que l'inhibition de Mcl-1 et de la survivine.

L'ensemble de ce travail est rassurant quant à l'utilisation de la cytokine TRAIL en thérapie anti-tumorale, dans le cadre d'une thérapie combinée.

Mots clefs : Cancer, apoptose, récepteurs de mort, TRAIL, polyphénol, quercétine, chimiothérapie, lymphome, Mcl-1, survivine.

ABSTRACT

Mechanisms of resistance to TRAIL-induced apoptosis in cancer cells: Restoration of the sensitivity to TRAIL by standard chemotherapy or by quercetin, a polyphenolic compound.

The TNF-family member TRAIL (*TNF-related apoptosis inducing ligand*) is a cytokine involved in immune anti-tumour surveillance. TRAIL is one of the most promising agents currently under investigation, as it exhibits efficient anti-cancer cytotoxicity with limited side effects on healthy cells. The problem in current cancer therapy is that some cancer cells are already resistant, or can become resistant to TRAIL-induced cell death. The aim of my thesis was to study the mechanisms of resistance to TRAIL, and to find a way to bypass it.

First, we were interested in the TRAIL-R4 antagonistic receptor, which is known to bind TRAIL without inducing a death signal. We have demonstrated for the first time that TRAIL-R4 is able to induce intracellular signalling that mediates cell survival and proliferation in the cervical carcinoma HeLa cell line. However, these resistant cells could be sensitized to TRAIL by a pretreatment with standard chemotherapy (cisplatin, etoposide or 5-FU). This chemo-sensitization does not require the mitochondrial loop of apoptosis, but is accompanied by an enhancement of caspase-8 recruitment and activation within the death-inducing signalling complex (DISC).

Next, our interest focused on aggressive non Hodgkin B-lymphomas. These lymphomas are highly resistant to TRAIL because of a defect in the mitochondrial pathway of apoptosis, and through the expression of Bcl-2, Mcl-1 and survivin antiapoptotic proteins. My objective was to elucidate a strategy to restore TRAIL-sensitivity in these lymphomas. In this context, we assessed the use of quercetin, a polyphenolic compound derived from plants. Our results showed that the combination of TRAIL with quercetin efficiently killed these lymphomas in a synergistic fashion. The molecular mechanisms of the synergy include the activation of the mitochondrial pathway, and the inhibition of Mcl-1 and survivin.

Taken together, these results are promising for the future use of TRAIL as a combined therapy against cancer.

Keywords : Cancer, apoptosis, death receptors, TRAIL, polyphenol, quercetin, chemotherapy, lymphoma, survivin, Mcl-1.

SOMMAIRE

SOMMAIRE	7
Liste des figures	10
Liste des tableaux	11
Liste des abréviations	12
PRÉAMBULE	14
I - Cancer: État des lieux	15
II - Apoptose et cancer	17
INTRODUCTION	19
I - TRAIL : Une arme contre le cancer	20
I.1 - TRAIL et ses récepteurs : structure et expression	20
I.1.a - La superfamille du TNF	20
I.1.b - Récepteurs de mort et récepteurs antagonistes de TRAIL	20
I.1.c - L'ostéoprotégérine : un récepteur leurre soluble controversé	23
I.1.d - Expression tissulaire de TRAIL et de ses récepteurs	25
I.2 - Fonctions biologiques de TRAIL	26
I.2.a - TRAIL et immunité anti-tumorale	26
I.2.b - TRAIL et auto-immunité	28
I.2.c - TRAIL et maladies infectieuses	29
I.2.d - TRAIL et homéostasie du système immunitaire	30
I.3 - La signalisation apoptotique induite par TRAIL	32
I.3.a - Voie extrinsèque : La voie des récepteurs de mort	32
I.3.b - Voie intrinsèque : La boucle d'amplification mitochondriale	36
I.4 - Mécanismes de régulation de la voie TRAIL	38
I.4.a - Régulation de la voie extrinsèque	38
I.4.b - Régulation de la voie intrinsèque	42
I.4.c - Voies de « survie » induites par TRAIL	47
I.5 - Utilisation en monothérapie : TRAIL face à ses limites	50
I.5.a - Formes recombinantes de TRAIL	50
I.5.b - Anticorps agonistes	52
I.5.c - Autres formulations	53
II - Comment restaurer et optimiser la sensibilité à TRAIL?	55
II.1 - Sensibilisation à TRAIL par la radiothérapie	55
II.2 - Combinaison de TRAIL avec des agents chimiothérapeutiques classiques	56
II.2.a - Les agents alkylants	56
II.2.b - Les anti-métabolites	59
II.2.c - Les inhibiteurs de topoisomérases	63
II.2.d - Les agents intercalants	66
II.2.e - Les anti-mitotiques	67
II.3 - Autres composés anti-cancéreux combinés à TRAIL	70

II.3.a - Les polyphénols: des alliés polyvalents du système TRAIL	70
II.3.b - Autres molécules	72
CADRE & BUT DU TRAVAIL	74
RESULTATS	78
I - Découverte d'une nouvelle propriété du récepteur antagoniste TRAIL-R4 : L'activation d'une signalisation de survie et de croissance.	79
<i>Article I : TRAIL-R4 promotes tumor growth and resistance to apoptosis through the deregulation of Akt and c-Fos in HeLa cells.</i>	79
II - Chimiothérapie combinée à TRAIL : Une stratégie efficace pour vaincre les cellules tumorales exprimant TRAIL-R4.	115
<i>Article II : Chemotherapy overcomes TRAIL-R4-mediated TRAIL resistance at the DISC level.</i>	115
III - Combinaison de TRAIL et d'un composé anti-cancéreux issu des plantes : la quercétine	125
<i>Article III : Mcl-1 and survivin downregulation by quercetin restores TRAIL-induced apoptosis in Non-Hodgkin Lymphoma B-Cells.</i>	125
DISCUSSION ET PERSPECTIVES	155
TRAIL-R4 : un régulateur de la voie TRAIL plutôt qu'un récepteur leurre	158
Expression de TRAIL-R4 dans les tumeurs : La chimiothérapie en renfort de TRAIL	163
Lymphomes multi-résistants à TRAIL : La solution quercétine.	164
CONCLUSION GENERALE	173
ANNEXES	176
ANNEXE I	177
ANNEXE II	178
ANNEXE III	198
Curriculum Vitae	208
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	210

Liste des figures

<u>Figure 1</u> : Caractéristiques morphologiques comparatives de l'apoptose et de la nécrose.	16
<u>Figure 2</u> : Structure tridimensionnelle d'un trimère de TRAIL.	22
<u>Figure 3</u> : Représentation schématique des différents récepteurs de TRAIL chez l'Homme.	22
<u>Figure 4</u> : Représentation schématique de la signalisation apoptotique par TRAIL.	31
<u>Figure 5</u> : Analyse bioinformatique des sites potentiels de modifications post-traductionnelles de TRAIL-R1 et TRAIL-R2.	35
<u>Figure 6</u> : Modèle de régulation de la signalisation apoptotique de TRAIL par les récepteurs antagonistes TRAIL-R3 et TRAIL-R4.	39
<u>Figure 7</u> : Classification des protéines de la famille Bcl-2 en fonction de leur structure.	41
<u>Figure 8</u> : Spécificité des interactions entre les membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 et les membres pro-apoptotiques "Bax-like".	43
<u>Figure 9</u> : Spécificité des interactions entre les membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 et les membres pro-apoptotiques "BH3-only".	43
<u>Figure 10</u> : Structure schématique des principales IAP humaines, XIAP, c-IAP1 et c-IAP2	45
<u>Figure 11</u> : Structure chimique du cisplatine et de l'oxaliplatine	57
<u>Figure 12</u> : Structure chimique du 5-fluorouracile (5-FU) et de la gemcitabine	60
<u>Figure 13</u> : Structure chimique de l'étoposide, de l'irinotecan et du topotecan.	62
<u>Figure 14</u> : Structure chimique de la doxorubicine et de l'actinomycine D.	65
<u>Figure 15</u> : Structure chimique du paclitaxel et de la vincristine.	68
<u>Figure 16</u> : Schématisation des modes d'action des polyphénols sur la signalisation par TRAIL.	71
<u>Figure 17</u> : Modèle de la voie pro-apoptotique RASSF1A/MAP1.	105
<u>Figure 18</u> : Expression de RASSF1A et MAP1 dans les lignées HeLa exprimant TRAIL-R4.	107
<u>Figure 19</u> : Surexpression exogène de RASSF1A dans les lignées HeLa exprimant TRAIL-R4.	109
<u>Figure 20</u> : Inhibition de RASSF1A par interférence à ARN.	109
<u>Figure 21</u> : Analyse par puces à ADN affymetrix de l'expression des gènes dans les lignées SW480 exprimant de façon stable TRAIL-R4 (SW-TRAIL-R4) ou un vecteur vide (SW-Ctl).	111
<u>Figure 22</u> : Représentation schématique des différents récepteurs de TRAIL chimériques mis au point dans notre laboratoire.	113
<u>Figure 23</u> : Structure chimique de la quercétine (3,3',4',5,7-pentahydroxyflavone).	126
<u>Figure 24</u> : Schéma simplifié résumant l'action de TRAIL-R4 sur l'induction de voies de signalisation intracellulaires de survie et de prolifération dans le modèle cellulaire HeLa.	157
<u>Figure 25</u> : Sites de prédiction des modifications post-traductionnelles de TRAIL-R4.	159
<u>Figure 26</u> : Analyse du profil de migration de TRAIL-R4 en gel SDS-PAGE après traitement par la tunicamycine	159
<u>Figure 27</u> : Schématisation de l'efficacité d'un traitement combiné TRAIL + chimiothérapie à induire l'apoptose dans les cellules cancéreuses, en fonction de l'expression de TRAIL-R4, c-FLIP et/ou Bcl-2.	162
<u>Figure 28</u> : Schéma simplifié montrant le mode d'action de la quercétine dans la sensibilisation à TRAIL des lymphomes B non-Hodgkiniens.	166

Liste des tableaux

Tableau 1: Principaux ligands et récepteurs de la superfamille du TNF. _____ 21

Tableau 2: Anticorps agonistes monoclonaux dirigés contre TRAIL-R1 ou TRAIL-R2, en cours d'évaluation clinique. _____ 51

Liste des abréviations

A

ADCC :	<i>Antibody-dependent cellular cytotoxicity</i>
ADN :	<i>Acide désoxyribonucléique</i>
AICD :	<i>Activation-induced cell death</i>
Akt :	<i>Activated protein kinase</i>
Apaf-1 :	<i>Apoptotic protease activating factor</i>
ARN :	<i>Acide ribonucléique</i>
ARNm :	<i>Acide ribonucléique messenger</i>
ASM:	<i>Acide sphingomyelinase</i>

B

Bad :	<i>Bcl-2 antagonist of cell death</i>
Bak :	<i>Bcl-2 antagonist killer 1</i>
Bax :	<i>Bcl-2 associated x protein</i>
BCG :	<i>Bacillus Calmette-Guérin</i>
Bcl-2 :	<i>B-cell lymphoma 2</i>
Bcl-XL :	<i>Bcl-2-related gene X, long isoform</i>
BH :	<i>Bcl-2 Homology</i>
Bid :	<i>BH3-interacting domain death agonist</i>
Bik :	<i>Bcl-2-interacting killer</i>
Bim :	<i>Bcl-2-interacting mediator of cell death</i>
BIR :	<i>Baculovirus IAP Repeat</i>
BMF :	<i>Bcl-2-modifying factor</i>
Bok :	<i>Bcl-2-related ovarian killer</i>

C

c-FLIP _{L/S/R} :	<i>Cellular Flice inhibitory protein Long/Short/Raji</i>
CARD :	<i>Caspase-recruitment domain</i>
CDDP :	<i>Cisplatine</i>
CHOP :	<i>C/EBP-homologous protein</i>
COX :	<i>Cyclooxygenase</i>
CRD :	<i>Cystein-rich domain</i>
CUL3 :	<i>Cullin-3</i>

D

ATP :	<i>Adénosine triphosphate</i>
DcR :	<i>Decoy Receptor</i>
DD :	<i>Death Domain</i>
DED :	<i>Death Effector Domain</i>
DIABLO :	<i>Direct IAP binding protein with low pI</i>
DISC :	<i>Death-Inducing Signaling Complex</i>
DR :	<i>Death Receptor</i>

E

ECD :	<i>Extracellular domain</i>
ERK :	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>

F

5-FU :	<i>5-Fluorouracile</i>
FADD :	<i>Fas-Associated Death Domain</i>
c-Fos :	<i>Cellular FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog</i>

G

GPI :	<i>Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol</i>
GSK-3:	<i>Glycogen synthase kinase-3</i>

H

HDAC :	<i>Histone-déacétylases</i>
HPV :	<i>Human Papilloma virus</i>
HRK :	<i>Harakiri</i>

I

IAP :	<i>Inhibitors of Apoptosis Protein</i>
ICD:	<i>Intracellular domain</i>
IFN :	<i>Interféron</i>

Ig : Immunoglobuline
 IKDC : *IFN γ -producing Killer Dendritic Cells*
 I κ B : *Inhibitor of NF- κ B*
 IKK : *Inhibitor of κ B kinase*
 IL : Interleukine
 ISRE : *IFN-stimulated Response Element*

J

JNK : *c-Jun N-terminal Kinase*

L

LAM : Leucémie Aigue Myéloïde
 LNH: Lymphome non-Hodgkinien
 LPS : Lipo-Polysaccharide

M

MAP1 : *Modulator of Apoptosis Protein 1*
 MAPK : *Mitogen-Activated Protein Kinase*
 Mcl-1 : *Myeloid cell leukemia 1*
 MDM2 : *Mouse double minute 2*
 MULE : *Mcl-1 Ubiquitin Ligase E3*

N

NEMO : *NF-kappa-B essential modifier*
 NF- κ B : *Nuclear factor Kappa-B*
 NK : *Natural Killer*

O

OPG : Ostéoprotégérine

P

PI3K : *Phosphoinositide triphosphate kinase*
 PIP2 : *Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate*

PIP3 : *Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate*
 PKC : Protein Kinase C
 PLAD : *Pre-Ligand assembly domain*
 Puma : *P53-Upregulated Modulator of apoptosis*

R

RANK : *Receptor Activator of NF- κ B*
 RANKL : *Receptor Activator of NF- κ B Ligand*
 RASSF1A: *Ras Associated domain Family protein 1A*
 RIP : *Receptor Interacting Protein*
 ROS: *Reactive oxygen species*
 RT-PCR : *Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction*

S

Smac : *Second mitochondrial activator of caspases*

T

TCR : *T-cell receptor*
 TNF : *Tumor Necrosis Factor*
 TNF-R : *TNF Receptor*
 TRADD : *TNF receptor-associated death domain*
 TRAF2: *TNF receptor-associated factor-2*
 TRAIL : *TNF Related Apoptosis Inducing Ligand*
 TRAIL-R : *TRAIL Receptor*

V

VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine
 VP16 : Étoposide

PRÉAMBULE

I - Cancer: État des lieux

En France comme dans le monde, la lutte contre le cancer est plus que jamais un enjeu majeur en terme de santé publique. Les données publiées pour la période 1980-2005 montrent que l'incidence des cancers en France est en forte augmentation (Belot et al., 2008). Les cancers les plus fréquents chez l'homme sont les cancers de la prostate, du poumon et du côlon-rectum, tandis que chez la femme, le cancer du sein se place devant les cancers du côlon-rectum et du poumon. Par ailleurs, la mortalité a également augmenté sur cette période, mais si l'on intègre la progression démographique, la probabilité de mourir d'un cancer a diminué, notamment en raison des progrès dans le dépistage et le traitement de certains cancers. Face à ce problème majeur de santé publique, un plan gouvernemental a été mis en place en 2003 : **le plan cancer**. L'objectif de ce plan est de faire de la lutte contre le cancer une priorité nationale. Une liste de 70 mesures a été planifiée et regroupe plusieurs aspects, dont la prévention, le dépistage, les soins et surtout la recherche contre le cancer. Pour se donner les moyens d'agir efficacement, ce plan a prévu la mise en place de sept « cancéropôles », dont l'objectif est de donner un élan à la recherche française et à l'innovation thérapeutique en cancérologie. Notre équipe de recherche fait partie du cancéropôle grand-Est et s'intègre donc à cette démarche nationale.

Le cancer se caractérise par une multiplication anarchique de cellules qui échappent aux mécanismes normaux de régulation et de différenciation. Ces cellules sont capables d'envahir le tissu normal avoisinant, puis de migrer à distance pour former des métastases. Cette perte de l'homéostasie entraîne des complications aiguës et une insuffisance progressive des organes vitaux, qui devient létale en l'absence d'un traitement efficace. Les causes du cancer proviennent d'altérations génétiques dues à des facteurs héréditaires ou environnementaux. Une des caractéristiques des cellules cancéreuses est leur résistance à la mort cellulaire programmée, ou apoptose. Ce défaut de réponse à l'apoptose permet aux cellules malignes de contourner la surveillance immunitaire anti-tumorale, mais est aussi responsable de la résistance aux traitements anti-cancéreux actuels.

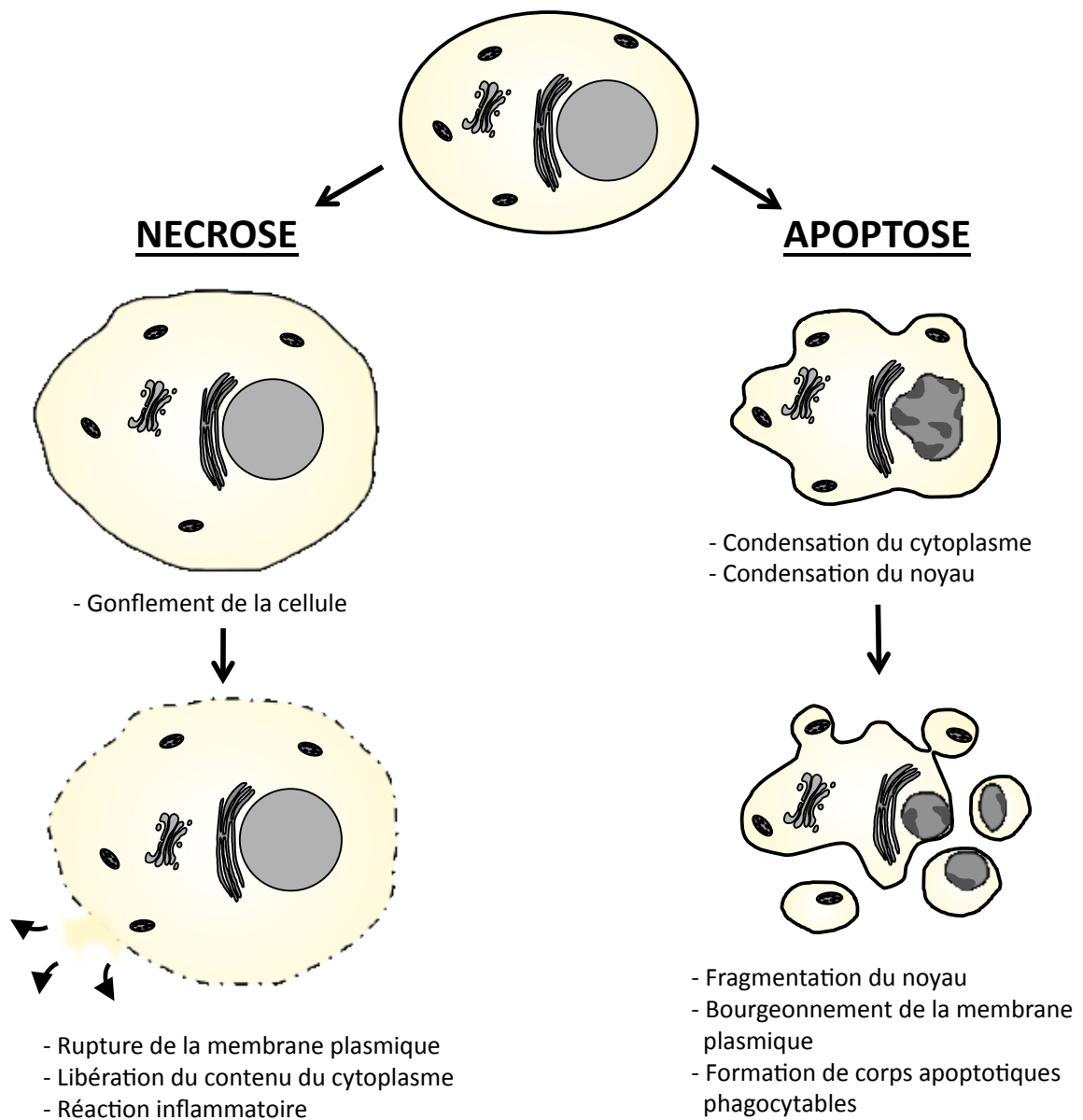


Figure 1: Caractéristiques morphologiques comparatives de l'apoptose et de la nécrose.

II - Apoptose et cancer

L'apoptose, ou mort cellulaire programmée, est un processus physiologique essentiel au maintien de l'homéostasie de l'organisme. L'apoptose permet l'élimination des cellules endommagées, anormales ou potentiellement dangereuses. Au niveau moléculaire, les protéines effectrices majeures de l'apoptose sont des protéases à cystéines activées en cascade, appelées caspases. Contrairement à la nécrose, l'apoptose est qualifiée de mort « propre » car l'intégrité de la membrane plasmique est maintenue et le contenu cellulaire n'est pas relargué, évitant ainsi une inflammation locale (**Figure 1**). Morphologiquement, une cellule en apoptose présente une condensation de la chromatine et du cytoplasme, ainsi qu'un bourgeonnement de la membrane plasmique. Il en résulte la formation de petits corps apoptotiques qui seront rapidement phagocytés par les macrophages ou les cellules dendritiques. L'apoptose est déclenchée par différents stimuli, tels que des cytokines ou des dommages à l'ADN. En fonction du stimulus, deux voies apoptotiques peuvent être engagées : la voie mitochondriale (voie intrinsèque) ou la voie des récepteurs de mort (voie extrinsèque). Des anomalies dans la régulation de ces voies de signalisation apoptotiques conduisent à des pathologies diverses, dont le cancer.

De nombreux agents chimiothérapeutiques utilisés pour le traitement des cancers déclenchent l'apoptose des cellules tumorales en activant la voie mitochondriale, *via* le suppresseur de tumeur p53. Malheureusement, la protéine p53 est mutée dans près de 50 % des tumeurs, ce qui conduit à des résistances aux traitements. D'autres stratégies thérapeutiques doivent donc être envisagées. Dans cette optique, l'activation de la voie extrinsèque de l'apoptose semble une solution appropriée.

La voie des récepteurs de mort, ou voie extrinsèque, permet d'induire l'apoptose des cellules cancéreuses indépendamment de p53. La transduction du signal apoptotique par les récepteurs de mort fait intervenir différents ligands de la superfamille du TNF, dont les principaux sont le TNF- α , FasL et TRAIL. Parmi ces ligands, TRAIL est le seul qui présente un réel intérêt thérapeutique puisqu'il induit efficacement la mort de la plupart des cellules tumorales sans détruire les cellules saines, et que par conséquent son administration est bien tolérée chez l'Homme. Toutefois, certaines cellules tumorales échappent à l'action cytotoxique de TRAIL en développant des mécanismes de résistance à l'apoptose. L'identification des voies de signalisation impliquées dans cette résistance est essentielle à l'utilisation optimale de TRAIL.

en thérapie anti-cancéreuse. Dans ce manuscrit, nous nous intéresserons notamment aux récepteurs antagonistes de TRAIL, TRAIL-R3 et TRAIL-R4, qui inhibent l'initiation de l'apoptose induite par le ligand. La première partie de ma thèse a consisté à étudier les voies de signalisation anti-apoptotiques induites par le récepteur antagoniste TRAIL-R4, ce qui n'avait jamais été décrit auparavant.

En raison de l'apparition de résistances aux traitements, l'utilisation d'un seul composé anti-cancéreux n'est en général pas suffisante pour obtenir une rémission complète ou une réponse clinique à long terme. Ce phénomène survient également dans le cas d'une monothérapie par TRAIL. La solution consiste alors à combiner plusieurs composés ayant des mécanismes d'action différents, de façon à obtenir un effet synergique et éviter la survenue de cellules résistantes. Ainsi, une résistance à TRAIL peut être contournée en combinant TRAIL avec la radiothérapie ou la chimiothérapie.

Dans cette optique, mon travail de thèse a consisté à trouver des combinaisons thérapeutiques efficaces basées sur l'utilisation de TRAIL. Dans un premier temps, nous avons voulu savoir si des molécules utilisées en chimiothérapie standard étaient capables de restaurer la sensibilité à TRAIL de cellules résistantes exprimant le récepteur antagoniste TRAIL-R4. Enfin, nous nous sommes intéressés à un type de lymphomes agressifs très résistants à TRAIL, les lymphomes B non-Hodgkiniens. Ces lymphomes présentent un défaut d'activation de la voie mitochondriale de l'apoptose. Pour restaurer leur sensibilité à TRAIL, nous avons évalué l'efficacité d'un composé naturel issu des plantes, la quercétine. Ce travail, qui a fait l'objet de la troisième partie de ma thèse, ouvre des perspectives intéressantes quant à l'utilisation clinique de TRAIL dans ce type de cancer.

INTRODUCTION

I - TRAIL : Une arme contre le cancer

I.1 - TRAIL et ses récepteurs : structure et expression

I.1.a - La superfamille du TNF

Depuis la découverte dans les années 80 des deux premières cytokines cytotoxiques, la lymphotoxine (rebaptisée TNF- β) (Aggarwal et al., 1984) et le *Tumor Necrosis Factor- α* (TNF- α) (Aggarwal et al., 1985), de nombreuses protéines homologues ont été identifiées. Ces cytokines ont été regroupées dans la superfamille du TNF, qui comprend une vingtaine de ligands et plus de 30 récepteurs intervenant dans divers processus cellulaires tels que la survie, la prolifération, l'inflammation ou la mort par apoptose (Grivennikov et al., 2006) (**Tableau 1**). Parmi les membres de la superfamille du TNF, le ligand TRAIL fut initialement identifié en 1995 sur la base de son homologie de séquence avec le domaine extracellulaire de FasL et du TNF (Wiley et al., 1995). TRAIL est une protéine transmembranaire de type II, c'est-à-dire une protéine dont l'extrémité C-terminale est exposée à l'extérieur de la cellule. Cependant, le clivage de la partie extracellulaire de TRAIL par des protéases à cystéine permet la libération d'une forme soluble et fonctionnelle de TRAIL. Le ligand TRAIL présente une activité biologique optimale sous forme homotrimérique, dont la stabilité est tributaire de la présence d'un atome de zinc, ce qui le différencie des autres ligands de la famille du TNF (Bodmer et al., 2000; Hymowitz et al., 2000) (**Figure 2**).

I.1.b - Récepteurs de mort et récepteurs antagonistes de TRAIL

Chez l'Homme, TRAIL interagit au niveau membranaire avec quatre récepteurs distincts, à savoir **TRAIL-R1** (DR4, *Death Receptor 4*/TNFRSF10A) (Pan et al., 1997b), **TRAIL-R2** (DR5, *Death Receptor 5*/TNFRSF10B) (Chaudhary et al., 1997; MacFarlane et al., 1997; Schneider et al., 1997a; Walczak et al., 1997), **TRAIL-R3** (DcR1, *Decoy Receptor 1*/TNFRSF10C) (Degli-Esposti et al., 1997b; MacFarlane et al., 1997; Pan et al., 1997a; Schneider et al., 1997a) et **TRAIL-R4** (DcR2, *Decoy Receptor 2*/TNFRSF10D) (Degli-Esposti et al., 1997a; Marsters et al., 1997). Comme tous les récepteurs de la famille du TNF, les récepteurs de TRAIL sont caractérisés par la présence de domaines riches en cystéines dans leur partie extracellulaire (*Cystein-Rich Domain*, CRD) (**Figure 3**). Ces domaines

Tableau 1: Principaux ligands et récepteurs de la superfamille du TNF.

Ligands		Récepteurs *	
<i>Nomenclature officielle</i>	<i>Nom usuel</i>	<i>Nomenclature officielle</i>	<i>Nom usuel</i>
TNFSF1	LT α / TNF β	TNFRSF1A	TNFR1
		TNFRSF1B	TNFR2
		TNFRSF3	LT β R
		TNFRSF14	HveA
TNFSF2	TNF α	TNFRSF1A	TNFR1
		TNFRSF1B	TNFR2
TNFSF3	LT β	TNFRSF3	LT β R
TNFSF4	OX40L	TNFRSF4	OX40
TNFSF5	CD40L	TNFRSF5	CD40
TNFSF6	CD95L/FasL	TNFRSF6	CD95 / Fas
		TNFRSF6B	DcR3
TNFSF7	CD27L	TNFRSF7	CD27
TNFSF8	CD30L	TNFRSF8	CD30
TNFSF9	4-1BBL	TNFRSF9	4-1BB
TNFSF10	TRAIL	TNFRSF10A	TRAIL-R1/DR4
		TNFRSF10B	TRAIL-R2/DR5
		TNFRSF10C	TRAIL-R3/DcR1
		TNFRSF10D	TRAIL-R4/DcR2
TNFSF11	RANKL	TNFRSF11A	RANK
		TNFRSF11B	OPG
TNFSF12	TWEAK	TNFRSF12A	FN14
TNFSF13	APRIL	TNFRSF13B	TACI
		TNFRSF17	BCMA
TNFSF13B	BAFF	TNFRSF13B	TACI
		TNFRSF17	BCMA
		TNFRSF13C	BAFFR
TNFSF14	LIGHT	TNFRSF3	LT β R
		TNFRSF6B	DcR3
		TNFRSF14	HveA
TNFSF15	VEGI / TL1A	TNFRSF25	DR3
		TNFRSF6B	DcR3
TNFSF18	GITRL	TNFRSF18	GITR
X	EDA-A1, EDA-A2	TNFRSF27	XEDAR
		X	EDAR
X	NGF	X	NGFR

* Liste non exhaustive

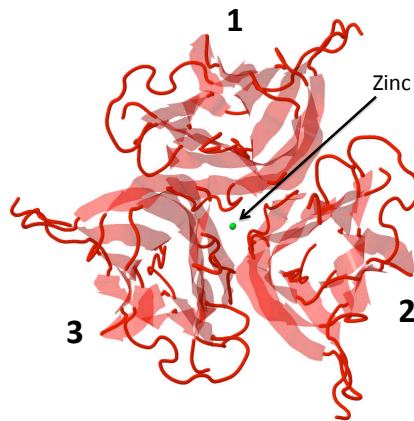


Figure 2: Structure tridimensionnelle d'un trimère de TRAIL.

L'atome de Zinc au centre du complexe permet la stabilisation du trimère. Les monomères sont numérotés de 1 à 3.

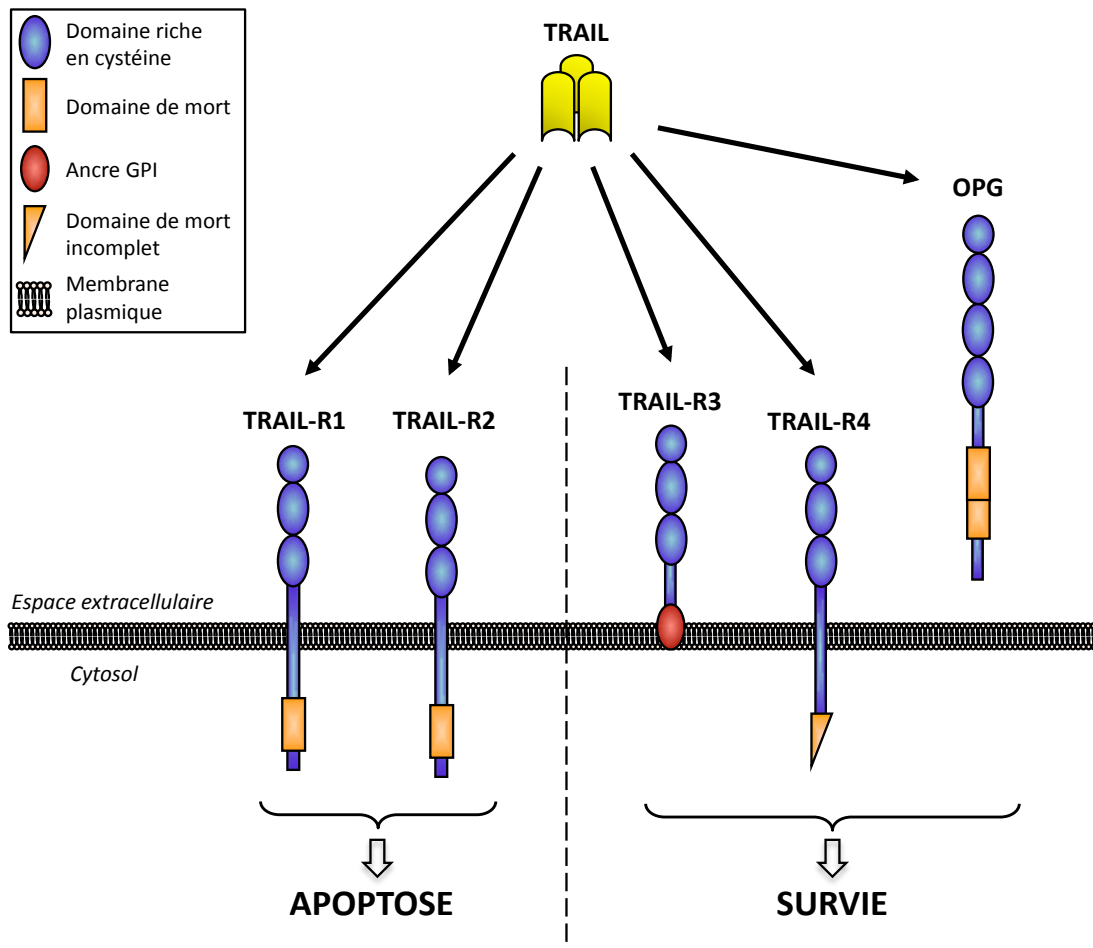


Figure 3: Représentation schématique des différents récepteurs de TRAIL chez l'Homme.

Les récepteurs agonistes TRAIL-R1 et TRAIL-R2 contiennent un domaine de mort intracellulaire capable d'engager une signalisation apoptotique, contrairement aux récepteurs antagonistes TRAIL-R3, TRAIL-R4 et OPG (ostéoprotégérine).

contribuent à la structure tridimensionnelle des récepteurs et à la spécificité vis-à-vis de leur ligand. Les récepteurs TRAIL-R1 et TRAIL-R2 sont appelés récepteurs de mort, ou récepteurs agonistes de TRAIL, puisqu'ils engagent une signalisation apoptotique après stimulation par TRAIL. Cette propriété est due à la présence dans leur partie intracellulaire d'un Domaine de Mort (DD) qui permet la formation du complexe initiateur de l'apoptose, ou DISC (*Death-Inducing Signaling Complex*). D'autre part, deux isoformes de TRAIL-R2 ont été identifiées : un isoforme court (TRAIL-R2_s) et un isoforme long (TRAIL-R2_L) (Wang and Jeng, 2000). Malheureusement, aucune étude n'a encore précisé si ces deux variants de TRAIL-R2 ont un rôle différent, complémentaire ou redondant.

A l'inverse, les récepteurs TRAIL-R3 et TRAIL-R4 sont incapables d'induire un signal apoptotique en raison de l'absence d'un DD fonctionnel, et sont ainsi qualifiés de récepteurs leurres, ou récepteurs antagonistes de TRAIL. Le récepteur TRAIL-R3 est dépourvu de domaine intracellulaire et est ancré à la membrane par le biais d'une ancre GPI, tandis que TRAIL-R4 possède un domaine de mort tronqué et non fonctionnel. Ces différences structurelles leur confèrent des modes d'actions différents, mais encore peu connus (*cf. Introduction, Chapitre I.4.a*).

Contrairement au système TRAIL/TRAIL-R chez l'Homme, la souris ne possède qu'un seul récepteur agoniste, baptisé mDR5, qui est homologue à TRAIL-R1 et TRAIL-R2 (Wu et al., 1999). Des récepteurs antagonistes murins ont également été caractérisés, mDcR1 et mDcR2. Deux isoformes de mDcR2 ont été identifiées, une forme transmembranaire (mDcR2_L) et une forme sécrétée (mDcR2_s) (Schneider et al., 2003). Ces récepteurs antagonistes n'ont pas encore été étudiés en détail, mais des travaux en cours dans notre laboratoire, conduits par la post-doctorante Sarah Shirley, confirment que mDR5 et mDcR2_L sont fonctionnels chez la souris.

I.1.c - L'ostéoprotégérine : un récepteur leurre soluble controversé

L'ostéoprotégérine (OPG/TNFRSF11B) a été identifiée à la fin des années 1990 comme étant un nouveau membre de la superfamille du TNF (Simonet et al., 1997; Yasuda et al., 1998). Ce récepteur est sécrété sous forme soluble et joue un rôle majeur dans l'inhibition des cellules responsables de la résorption osseuse, les ostéoclastes. Les souris nullizygotes OPG^{-/-}

souffrent d'une ostéoporose sévère qui peut être corrigée par l'injection intraveineuse d'OPG recombinante (Bucay et al., 1998; Min et al., 2000). L'augmentation de la densité osseuse par l'OPG est due à la régulation négative du système RANK/RANKL. Le récepteur RANK (*Receptor Activator of Nuclear factor κ B*) appartient à la superfamille du TNF et joue un rôle dans l'ostéoclastogenèse après activation par son ligand RANKL. En présence de l'OPG, cette dernière va séquestrer RANKL et empêcher sa fixation sur son récepteur RANK. Les pré-ostéoclastes ne se différencient pas et la formation osseuse est favorisée. L'OPG est donc considérée comme étant un récepteur leurre du système RANK/RANKL.

Cependant on a également attribué à l'OPG un rôle de récepteur leurre de TRAIL (Emery et al., 1998). Plusieurs études *in vitro* ont montré que la présence de l'OPG dans le microenvironnement tumoral conduisait à la résistance des cellules cancéreuses à l'apoptose induite par TRAIL (Holen et al., 2002; Shipman and Croucher, 2003; Neville-Webbe et al., 2004; Nyambo et al., 2004; Holen et al., 2005; Locklin et al., 2007; Rachner et al., 2009), ce qui a été confirmé *in vivo* chez la souris (Zinonos et al., 2010). Pourtant son rôle dans la signalisation par TRAIL est très controversé pour plusieurs raisons. Dans un premier temps, l'existence d'une interaction TRAIL-OPG significative a été décrite *in vitro* (Emery et al., 1998), mais d'autres études ont montré que cette affinité était faible à des températures physiologiques, comparé aux autres récepteurs de TRAIL (Truneh et al., 2000). De plus, la résistance à TRAIL causée par l'OPG peut être contournée en ajoutant le ligand RANKL en excès dans le milieu de culture (Holen et al., 2002; Shipman and Croucher, 2003), ce qui suggère que l'OPG possède une meilleure constante d'association avec RANKL qu'avec TRAIL. Plus récemment, une autre équipe a contredit ces résultats en montrant que l'affinité TRAIL-OPG était comparable à l'affinité RANKL-OPG (Vitovski et al., 2007). L'interaction TRAIL-OPG jouerait potentiellement un rôle dans la régulation de la différenciation et de la survie des ostéoclastes matures (Zauli et al., 2004; Zauli et al., 2008). Quoiqu'il en soit, la capacité de TRAIL à se fixer sur l'OPG et donc à lever l'inhibition de RANK est discutable, puisqu'aucun changement de densité osseuse n'a été observé dans un modèle murin TRAIL^{-/-}, tandis que la quantité de précurseurs des ostéoclastes est resté inchangée, tout comme leur processus de différenciation (Sedger et al., 2002).

Finalement, l'importance de l'OPG dans les signalisations par TRAIL et par RANKL doit encore être clarifiée, notamment en prenant en compte les concentrations respectives des deux

ligands et leur localisation *in vivo* (Lamoureux et al., 2010). Pour ces raisons, nous n'évoquerons pas le cas de l'ostéoprotégérine dans la suite de ce manuscrit.

I.1.d - Expression tissulaire de TRAIL et de ses récepteurs

L'analyse de la distribution des récepteurs de TRAIL a montré qu'ils sont exprimés de façon ubiquitaire, ce qui suggère que la plupart des tissus ou cellules représente une cible potentielle pour ce ligand (Spierings et al., 2004). Les récepteurs agonistes TRAIL-R1 et TRAIL-R2 sont fréquemment exprimés à la surface des cellules cancéreuses. En revanche, l'expression des récepteurs antagonistes au niveau de la membrane plasmique a été peu étudiée, mais a par exemple été montrée dans le cas de certaines leucémies myéloïdes primaires (Riccioni et al., 2005). En collaboration avec le Pr. Philippe Saas (INSERM U645, Besançon), notre équipe a confirmé la présence des récepteurs antagonistes à la surface de certains types de leucémie aiguë myéloblastique (**Annexe IA**).

Contrairement aux récepteurs, l'expression du ligand TRAIL est restreinte à certaines cellules du système immunitaires ayant reçu un stimulus donné. TRAIL est notamment exprimé à la surface des monocytes et des macrophages suite à une stimulation par le LPS et l'IFN- β (Halaas et al., 2000; Ehrlich et al., 2003). De la même façon, l'IFN- γ stimule l'expression de TRAIL sur les monocytes, les cellules dendritiques et les cellules NK (Natural Killer) (Fanger et al., 1999; Griffith et al., 1999), tandis que les interleukines IL-2 et IL-15 induisent l'expression de TRAIL préférentiellement à la surface des cellules NK (Kayagaki et al., 1999b). Les expériences conduites dans notre laboratoire ont également montré la capacité de l'IL-2 à stimuler l'expression de TRAIL sur les cellules NK (**Annexe IB**). Le ligand TRAIL a également été détecté sur une population de cellules immunitaires récemment décrites, les cellules dendritiques « tueuses », ou cellules IKDC (Chan et al., 2006; Taieb et al., 2006). La stimulation du récepteur des cellules T (TCR) des lymphocytes T CD4 et CD8, combinée à la stimulation par des interférons, induit également l'expression de TRAIL au niveau membranaire (Kayagaki et al., 1999a). Les sous-populations de lymphocytes Th2 différenciées *in vitro* peuvent également exprimer TRAIL, tandis que les lymphocytes Th1 expriment préférentiellement FasL (Zhang et al., 2003b). Enfin, dans certains cas, l'expression membranaire de TRAIL peut être constitutive, comme cela a été montré dans une sous-population de cellules NK chez la souris, en raison d'une production autocrine d'IFN- γ (Takeda et al., 2001).

I.2 - Fonctions biologiques de TRAIL

La conservation du système TRAIL au cours de l'évolution des vertébrés est la première indication nous suggérant l'utilité de TRAIL dans l'organisme. Cette observation indique que, même si cette cytokine n'est pas essentielle, elle procure sans doute un avantage évolutif non négligeable. La principale stratégie pour évaluer la fonction physiologique d'une protéine est l'invalidation au niveau génique, ou *knockout*. Les modèles *knockout* TRAIL^{-/-} ou mDR5^{-/-} réalisés chez la souris sont viables et ne présentent pas de problème de développement particulier (Cretney et al., 2002; Sedger et al., 2002; Diehl et al., 2004). Dans ces modèles murins, TRAIL ne jouerait donc pas de rôle biologique majeur dans des conditions non pathologiques. D'autre part, le fait que TRAIL soit exprimé spécifiquement dans certaines cellules immunitaires activées suggère un rôle dans la réponse immunitaire et/ou dans l'homéostasie du système immunitaire. De plus, l'existence de plusieurs récepteurs de TRAIL structurellement différents reflète la complexité potentielle de cette voie de signalisation. Cette complexité est encore mal connue mais peut se traduire par les différentes fonctions de TRAIL identifiées jusqu'à présent. Dans ce chapitre, nous détaillerons l'état des connaissances actuelles sur les rôles de TRAIL, dans des conditions physiologiques ou pathologiques.

I.2.a - TRAIL et immunité anti-tumorale

La fonction de TRAIL la mieux décrite est sans conteste son rôle dans la surveillance anti-tumorale. Aussi bien *in vitro* que *in vivo*, l'ajout de TRAIL exogène induit la mort des cellules tumorales, sans affecter les cellules saines, ce qui fait de cette cytokine une arme anti-cancéreuse très prometteuse (Ashkenazi et al., 1999; Walczak et al., 1999). La sélectivité de TRAIL envers les cellules tumorales est encore peu comprise, mais pourrait être due à certaines oncoprotéines activées au cours de la transformation, comme c-Myc (Ricci et al., 2004) ou Ras (Nesterov et al., 2004; Wang et al., 2005b). La surexpression de ces oncogènes est ainsi capable d'augmenter la sensibilité à TRAIL lors de la tumorigénèse, mais la participation de ce phénomène dans la sélectivité tumorale de TRAIL devra être précisée.

Le rôle de TRAIL dans la surveillance anti-tumorale a été confirmé dans plusieurs modèles murins. Ces études montrent que l'absence de TRAIL ou de ses récepteurs favorise l'apparition ou la croissance de tumeurs expérimentales ou spontanées (Cretney et al., 2002;

Sedger et al., 2002; Takeda et al., 2002; Zerafa et al., 2005; Finnberg et al., 2008). L'absence de TRAIL favorise par exemple le développement de fibrosarcomes chimiquement induits chez la souris (Cretney et al., 2002). Par ailleurs, l'ablation génétique d'un seul allèle du gène *mDR5* est suffisante pour enclencher une lymphomagenèse expérimentale, qui consiste à faire exprimer l'oncogène Myc dans les lymphocytes B de la souris (Finnberg et al., 2008).

TRAIL jouerait également un rôle anti-métastatique chez la souris (Takeda et al., 2001; Cretney et al., 2002). La survenue de métastases de lymphomes et de carcinomes de la peau augmente significativement chez les souris *mDR5*^{-/-} (Finnberg et al., 2008; Grosse-Wilde et al., 2008). De même, chez l'humain, l'analyse de plus de 300 échantillons de tumeur du sein a révélé une corrélation entre la dérégulation de TRAIL et la survenue de métastases au niveau cérébral (Bos et al., 2009). La propriété anti-métastatique de TRAIL serait due au fait que des cellules cancéreuses résistantes à TRAIL deviennent sensibles à ce ligand lors d'une perte d'adhésion cellulaire. Une explication possible de ce phénomène serait la capacité de certaines molécules d'adhésion cellulaire à induire une signalisation anti-apoptotique (Grosse-Wilde et al., 2008).

L'activité anti-tumorale de TRAIL est régie par différents types de cellules des systèmes immunitaires inné et adaptatif. Chez la souris, les **cellules NK** hépatiques exprimant TRAIL jouent un rôle essentiel dans la suppression de différents types de métastases expérimentales (Smyth et al., 2001a; Takeda et al., 2001), et dans la protection contre les fibrosarcomes induits par le méthylcholanthrène (Smyth et al., 2000; Smyth et al., 2001b). L'implication des **lymphocytes T** au cours de la défense anti-tumorale a été démontrée dans des expériences de réaction du greffon contre la tumeur (Schmaltz et al., 2002; Tateishi et al., 2006). Dans ces expériences, l'expression de TRAIL sur les cellules T du donneur est requise pour la réaction contre la tumeur. L'importance des **neutrophiles** est également bien documentée *in vitro* (Cassatella, 2006; Simons et al., 2007). Les neutrophiles activés par des interférons exercent une activité anti-cancéreuse en produisant et en sécrétant TRAIL dans le milieu de culture (Koga et al., 2004; Tecchio et al., 2004). Des résultats similaires ont été obtenus après stimulation des neutrophiles par le Bacillus Calmette-Guerin (BCG) (Ludwig et al., 2004; Kemp et al., 2005).

Malgré les preuves expérimentales indéniables de l'action de TRAIL contre les tumeurs expérimentales et les métastases, la capacité du TRAIL endogène à contrôler l'initiation et la croissance tumorale est nuancée par quelques études contradictoires. Par exemple, dans

certaines modèles de souris mDR5^{-/-}, l'absence du récepteur agoniste de TRAIL ne favorise pas le développement spontané de tumeurs (Yue et al., 2005), et n'influence pas non plus l'apparition de cancers de la peau chimiquement induits (Grosse-Wilde et al., 2008). Cependant, ces différences peuvent s'expliquer par l'hétérogénéité des fonds génétiques entre les modèles murins utilisés, ainsi que par le type tissulaire étudié et le protocole d'induction des tumeurs.

1.2.b - TRAIL et auto-immunité

Les maladies auto-immunes, dont les causes sont encore mal connues, sont la conséquence d'une reconnaissance anormale des antigènes du soi par le système immunitaire. Le rôle de TRAIL dans ces pathologies a été observé chez la souris en utilisant des anticorps neutralisants TRAIL ou des souris TRAIL^{-/-}. L'analyse phénotypique de souris déficientes pour TRAIL a révélé un défaut dans la sélection négative des thymocytes (Lamhamedi-Cherradi et al., 2003b). La sélection négative est un processus essentiel à l'établissement et au maintien de la tolérance immunitaire. Le défaut de sélection négative dans ces modèles murins conduit donc à l'augmentation de la sensibilité à développer des maladies auto-immunes, telles que le diabète (Lamhamedi-Cherradi et al., 2003a) ou certains types d'arthrite (Lamhamedi-Cherradi et al., 2003b). D'autre part, l'expression de TRAIL conduit à l'atténuation de l'auto-immunité dans des modèles de sclérose multiple (Hilliard et al., 2001), d'encéphalomyélite (Cretney et al., 2005), de thyroïdite auto-immune (Wang et al., 2005a), d'arthrite rhumatoïde (Song et al., 2000) ou de diabète (Mi et al., 2003). Les mécanismes proposés pour expliquer la fonction de TRAIL dans ces processus concernent l'inhibition de la production d'anticorps et de cytokines, réduisant ainsi l'inflammation auto-immune et la prolifération des cellules T auto-réactives. A l'inverse, il est intéressant de noter que certaines études ont constaté un rôle opposé de TRAIL dans ces phénomènes. Ces travaux ont montré que TRAIL pouvait accélérer des maladies auto-immunes telles que le lupus érythémateux (Rus et al., 2007; Nguyen et al., 2009) ou l'encéphalomyélite (Aktas et al., 2005).

Finalement, la fonction exacte de TRAIL dans l'auto-immunité reste à clarifier puisque les souris déficientes pour TRAIL, bien que sujettes aux maladies auto-immunes induites expérimentalement, ne présentent pas de signes d'auto-immunité spontanée (Cretney et al., 2003).

I.2.c - TRAIL et maladies infectieuses

Nous venons de voir dans le début de ce manuscrit que TRAIL joue un rôle non négligeable dans le système immunitaire. Par conséquent, l'implication de TRAIL au cours des processus de défense de l'organisme face à des pathogènes n'est pas surprenante. Une étude menée en 1999 a montré que des fibroblastes résistants à TRAIL devenaient sensibles à cette cytokine après avoir été infectés par le cytomégalovirus humain (Sedger et al., 1999). Cette sensibilisation à TRAIL a été attribuée à la surexpression de TRAIL-R1 et TRAIL-R2 sur les cellules infectées. Ainsi, dans ce modèle, le ligand TRAIL serait capable de tuer sélectivement les cellules infectées par le virus, tout en épargnant les cellules saines. Une autre équipe a précisé l'importance de TRAIL dans la réponse antivirale par les cellules NK, lesquelles interviennent dans la réponse précoce à l'infection (Sato et al., 2001). Les cellules infectées par un cardiovirus produisent en masse des interférons (IFN- α et - β) qui vont stimuler l'expression de TRAIL sur les cellules NK. En effet, les auteurs ont identifié la présence d'un élément de réponse aux interférons (*IFN-stimulated response element*, ou ISRE) au sein du promoteur de TRAIL. *In vitro*, ce mécanisme déclenche la mort induite par TRAIL des cellules infectées. Les résultats obtenus *in vivo* ont montré que le blocage du ligand TRAIL exprimé par les cellules NK augmente significativement le titre viral et conduit à la mort prématurée des souris infectées (Sato et al., 2001). De la même façon, les souris invalidées pour TRAIL sont plus sensibles au virus de la grippe que les souris de type sauvage (Brincks et al., 2008). L'administration de cellules T CD8⁺ exprimant TRAIL dans les souris TRAIL^{-/-} permet de les protéger contre une dose létale de virus, tandis que les cellules T CD8⁺ n'exprimant pas le ligand sont inefficaces. Ces travaux soulignent la fonction de TRAIL au cours de la réponse antivirale.

Paradoxalement, hormis cette capacité à éliminer les cellules infectées par des pathogènes, TRAIL pourrait dans certains cas induire des phénomènes d'immunosuppression, propices à la progression de l'infection. De nombreux virus sont capables d'induire une immunosuppression dans l'organisme hôte, mais les mécanismes moléculaires impliqués restent mal connus. Une des explications proposées suggère que TRAIL serait responsable de la suppression de la réponse immunitaire antivirale. Au cours de cette étude, les auteurs ont montré que lors d'une infection par le virus de la rougeole, TRAIL est exprimé sur les cellules dendritiques dérivées des monocytes (Vidalain et al., 2000). Ces dernières vont ensuite déclencher la mort induite par TRAIL des cellules T activées, inhibant ainsi la réponse

antivirale (Vidalain et al., 2001). D'autres équipes ont montré que la fixation du virus de l'immunodéficience humaine (VIH-1) sur les lymphocytes T CD4⁺ provoquait la surexpression de TRAIL-R2, ce qui pourrait expliquer leur sensibilité à TRAIL et l'immunosuppression qui en résulte (Lichtner et al., 2004; Herbeuval et al., 2005a; Herbeuval et al., 2005b; Herbeuval et al., 2006). L'infection par le VIH-1 peut également induire la surexpression de TRAIL-R1 par les cellules T CD4⁺, qui deviennent ainsi sensibles à la mort induite par les cellules dendritiques plasmacytoïdes (Stary et al., 2009).

Les expériences menées sur des modèles de souris transgéniques ont permis de préciser le rôle du système TRAIL lors des infections virales. Les souris mDR5^{-/-} infectées par le cytomégalo virus murin présentent une meilleure réponse antivirale que les souris de type sauvage (Diehl et al., 2004). De la même façon, les souris TRAIL^{-/-} sont plus résistantes à une infection par la bactérie *Listeria* (Zheng et al., 2004). Dans un modèle de méningite bactérienne, la durée de vie des monocytes et des granulocytes est prolongée dans les souris TRAIL^{-/-}, comparé aux souris TRAIL^{+/+} (Hoffmann et al., 2007). Le ligand TRAIL endogène limite donc la durée de vie de ces cellules immunitaires. Cependant, le cas de la méningite est particulier puisque l'absence de TRAIL ne permet pas une amélioration de l'état des souris. En effet, les granulocytes dont la durée de vie est prolongée provoquent des dommages neuronaux et une aggravation des symptômes.

Globalement, ces observations soutiennent l'hypothèse selon laquelle TRAIL serait capable de restreindre la réponse immunitaire, réduisant ainsi la défense de l'organisme face à un agent infectieux. Il est cependant nécessaire d'interpréter avec réserve les résultats obtenus chez la souris puisque les différences entre les systèmes TRAIL murin et humain sont encore mal définies.

1.2.d - TRAIL et homéostasie du système immunitaire

L'influence de TRAIL au cours des processus d'auto-immunité suggère que cette cytokine est capable d'exercer une activité régulatrice sur les cellules immunitaires. Même si aucune différence significative du nombre de lymphocytes B ou T, de macrophages, de cellules dendritiques ou de cellules NK n'a été observé chez les souris TRAIL^{-/-} (Diehl et al., 2004), les souris âgées sont sujettes à des syndromes lymphoprolifératifs (Zerafa et al., 2005). L'importance de TRAIL dans la sélection thymique est encore discutée puisque des études

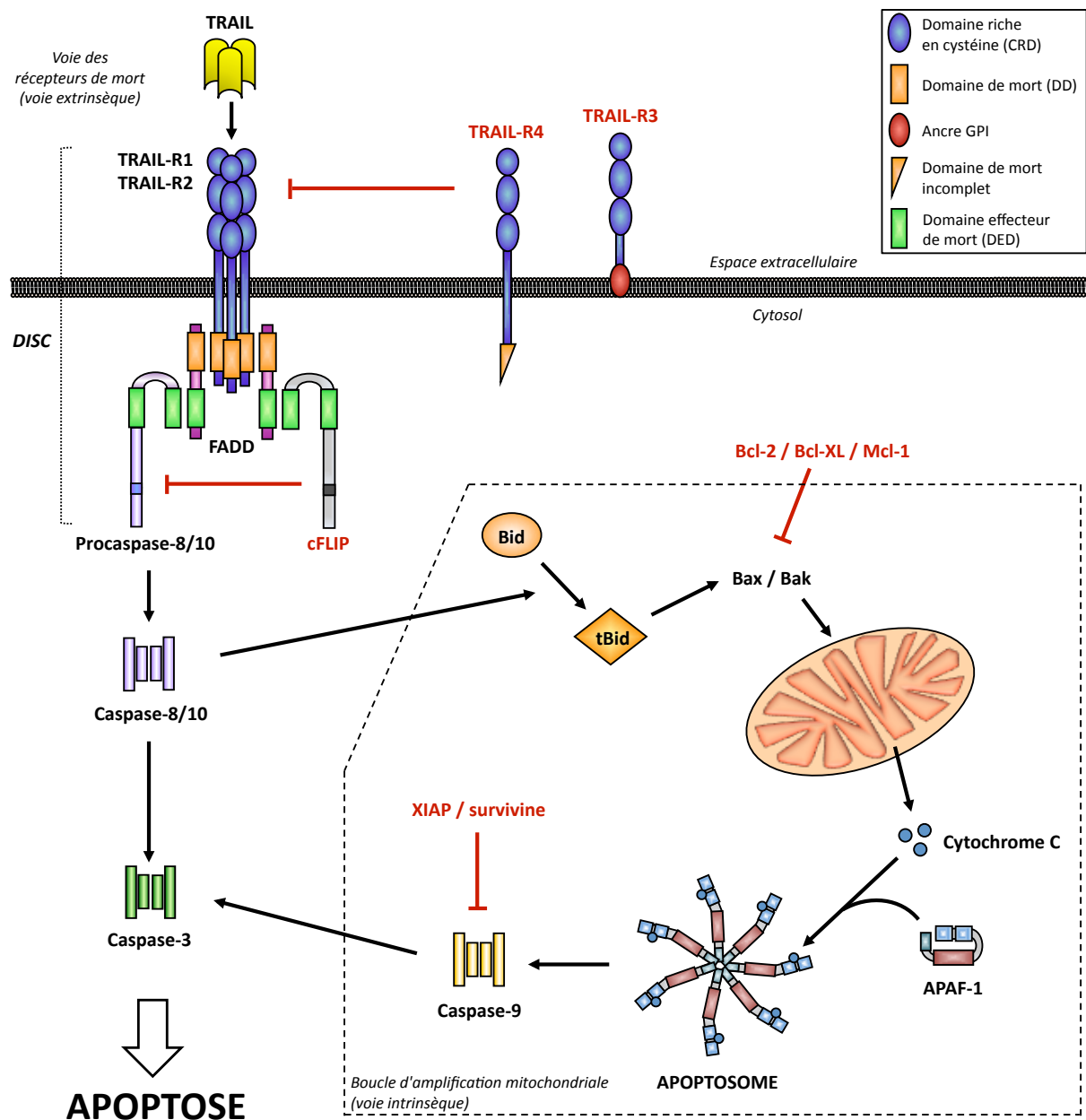


Figure 4: Représentation schématique de la signalisation apoptotique par TRAIL.

Voie extrinsèque : la fixation de TRAIL sur les récepteurs agonistes TRAIL-R1 et/ou TRAIL-R2 induit leur homo- ou hétéro-trimérisation, puis le recrutement de l'adaptateur FADD au niveau de leurs domaines de mort. Les caspases initiatrices sont ensuite recrutées *via* les domaines effecteurs de mort, et vont conduire à l'activation des caspases effectrices, principalement la caspase-3.

Voie intrinsèque : La voie mitochondriale est déclenchée par les caspases initiatrices *via* la protéine Bid, qui conduit à l'activation des protéines Bax et Bak. Ceci entraîne la perméabilisation de la mitochondrie, permettant le relargage dans le cytosol du cytochrome c mitochondrial et la formation d'un complexe appelé apoptosome. La caspase-9 est activée au sein de ce complexe et active à son tour les caspases effectrices.

contradictoires ont été publiées. Dans un cas, l'invalidation de TRAIL a conduit à une hypertrophie thymique, probablement due à un défaut d'apoptose dans le thymus (Lamhamedi-Cherradi et al., 2003b). Dans l'autre cas, la sélection négative des thymocytes ne semble pas altérée par l'absence de TRAIL (Cretney et al., 2003). Quoiqu'il en soit, TRAIL serait capable de moduler d'autres processus participant à l'homéostasie du système immunitaire, comme par exemple l'élimination des neutrophiles sénescents (Lum et al., 2005), ce qui participe au renouvellement des cellules immunitaires. Enfin, TRAIL joue un rôle dans l'AICD (*Activation-Induced Cell Death*) des lymphocytes T, un processus qui intervient dans l'homéostasie et la tolérance immunitaire périphérique (Janssen et al., 2005). Une étude récente a aussi montré que TRAIL agissait en coopération avec FasL dans le contrôle de l'apoptose des lymphocytes périphériques, puisque des souris double-déficientes pour FasL et TRAIL développent des syndromes lymphoprolifératifs extrêmes (Sedger et al., 2010).

I.3 - La signalisation apoptotique induite par TRAIL

I.3.a - Voie extrinsèque : La voie des récepteurs de mort

La fixation de TRAIL sur ses récepteurs agonistes est à l'origine de la transduction d'un signal apoptotique dans la cellule (**Figure 4**). Les mécanismes moléculaires de la signalisation apoptotique par TRAIL sont maintenant bien décrits, et sont assez proches de la signalisation par FasL.

Tout comme les autres membres de la famille du TNF, le ligand TRAIL est une protéine présente sous forme homotrimérique. Sa fixation au niveau des domaines extracellulaires riches en cystéines (CRD) de TRAIL-R1 et TRAIL-R2 conduit à la trimérisation de ses derniers. TRAIL-R1 et TRAIL-R2 sont capables de former soit des homotrimères, soit des hétérotrimères (TRAIL-R1/TRAIL-R2). La conformation tridimensionnelle de ce complexe est bien connue, TRAIL ayant déjà été cristallographié en association avec la partie extracellulaire de TRAIL-R2 (Hymowitz et al., 1999; Mongkolsapaya et al., 1999). Cette modélisation a permis de visualiser l'interaction du ligand avec 3 monomères de TRAIL-R2, au niveau des domaines CRD2 et CRD3 des récepteurs. Cependant, certaines études indiquent que les récepteurs de la famille du TNF sont capables de se pré-assembler en l'absence du

ligand. Cette oligomérisation s'effectue au niveau du domaine PLAD (*Pre-Ligand Assembly Domain*) présent au sein des domaines CRD. La formation des complexes indépendamment du ligand fut d'abord décrite pour Fas (Papoff et al., 1999; Siegel et al., 2000), TNF-R1 et TNF-R2 (Chan et al., 2000; Chan, 2007), puis pour TRAIL-R1 et TRAIL-R2 (Clancy et al., 2005). Le rôle du PLAD serait de favoriser la formation d'oligomères de plus grande taille en présence du ligand (Wassenaar et al., 2008), mais l'importance de ce phénomène dans la signalisation par TRAIL n'est pas encore clairement avérée.

La trimérisation des récepteurs après fixation de TRAIL est l'évènement qui va permettre la transduction du signal à l'intérieur de la cellule (**Figure 4**). La partie intracellulaire des récepteurs ainsi agrégés va adopter une conformation permettant le recrutement de la protéine adaptatrice FADD au niveau des domaines de mort (DD) de TRAIL-R1 et TRAIL-R2 (Schneider et al., 1997b). Cette interaction est homotypique puisque FADD possède lui-même un DD qui va s'associer à celui des récepteurs de TRAIL. En plus de son DD, FADD contient également un domaine effecteur de mort (*Death Effector Domain*, DED) qui va à son tour interagir avec le domaine DED présent sur les procaspases initiateuses -8 et -10. Le complexe macro-moléculaire ainsi formé est appelé DISC (*Death-Inducing Signalling Complex*). Les caspases initiateuses sont activées par auto-clivage au sein du DISC, et activent à leur tour les caspases effectrices, principalement la caspase-3, conduisant à la mort de la cellule par apoptose (Merino et al., 2007).

Le DISC est identique chez la souris, hormis le fait qu'il n'existe qu'un seul récepteur agoniste et que la caspase-8 est la seule caspase initiateuse recrutée au niveau du DISC chez cette espèce. Il n'existe en effet pas d'homologue de la **caspase-10** chez la souris. Cette observation suggère un rôle redondant des caspase-8 et -10 chez l'Homme, d'autant que ces deux caspases sont recrutées et clivées dans le DISC selon la même cinétique. De plus, il semblerait que l'une puisse se substituer à l'autre, puisque la transfection transitoire de la caspase-10 permet de restaurer la sensibilité de cellules déficientes en caspase-8 (Kischkel et al., 2001; Wang et al., 2001; Milhas et al., 2005). Cependant, des études complémentaires sont nécessaires pour évaluer l'importance de la caspase-10 dans le DISC, et l'hypothèse d'un rôle distinct par rapport à la caspase-8 n'est pas exclue.

Par ailleurs, des travaux récents ont permis de mettre en avant des paramètres importants pour un assemblage correct du DISC. Il s'agit de différentes **modifications post-traductionnelles** nécessaires à l'initiation de la signalisation par TRAIL. C'est le cas pour les récepteurs de mort TRAIL-R1 et TRAIL-R2, qui peuvent être glycosylés ou palmitoylés. La possibilité d'une glycosylation des récepteurs de mort avait tout d'abord été suggérée en 2007 par Wagner *et coll.* (Wagner et al., 2007). En comparant les profils d'expression génique de 119 lignées cancéreuses, les auteurs ont relevé une corrélation entre la sensibilité à TRAIL et une expression élevée d'enzymes de glycosylation telles que GALNT14 ou GALNT3. L'inhibition de ces enzymes était responsable d'une résistance à l'apoptose induite par TRAIL. A l'inverse, la surexpression de GALNT14 dans des cellules résistantes permettait de restaurer la sensibilité à TRAIL, en favorisant la formation du DISC (Wagner et al., 2007). Dans cette étude, les analyses biochimiques ont montré que TRAIL-R2 pouvait être *O*-glycosylé (liaison sur un résidu sérine ou thréonine) au niveau de son domaine extracellulaire. Ces modifications post-traductionnelles semblent spécifiques de la voie TRAIL, puisque les sites de glycosylation identifiés sont également présents sur TRAIL-R1, mais ne sont pas retrouvés sur Fas ou le TNF-R1. La *O*-glycosylation des récepteurs agonistes de TRAIL semble nécessaire à leur oligomérisation en présence du ligand (Wagner et al., 2007). De ce fait, le statut de glycosylation de TRAIL-R1 et TRAIL-R2 pourrait servir de bio-marqueur pour la sensibilité à TRAIL en oncologie.

D'autres types de modifications ont été décrites, notamment la N-glycosylation (liaison sur un résidu asparagine) de TRAIL-R1 (Yoshida et al., 2007). De façon intéressante, le récepteur TRAIL-R2 ne possède pas ce site de N-glycosylation, ce qui suggère que ces deux récepteurs de mort sont régulés différemment et pourrait donc avoir des rôles distincts. Toutefois, ce point reste encore à éclaircir. Enfin, un triplet de cystéine présent sur la partie intracellulaire de TRAIL-R1, mais absent de TRAIL-R2, est constitutivement palmitoylé (Rossin et al., 2009). Cette modification post-traductionnelle semble nécessaire à la transduction du signal apoptotique par TRAIL-R1. La palmitoylation de TRAIL-R1 serait impliqué dans la trimérisation de ce récepteur en l'absence du ligand, probablement en favorisant la relocalisation de TRAIL-R1 au sein des radeaux lipidiques (Rossin et al., 2009). Dans cette étude, les récepteurs TRAIL-R1 et TRAIL-R2 sont presque exclusivement localisés dans les radeaux lipidiques, de façon constitutive, tandis que la mutation du triplet de cystéines C261-3 de TRAIL-R1 entraîne la relocalisation de ce récepteur hors des radeaux lipidiques. Pourtant, plusieurs études ont montré que les récepteurs de TRAIL, bien que localisés dans les

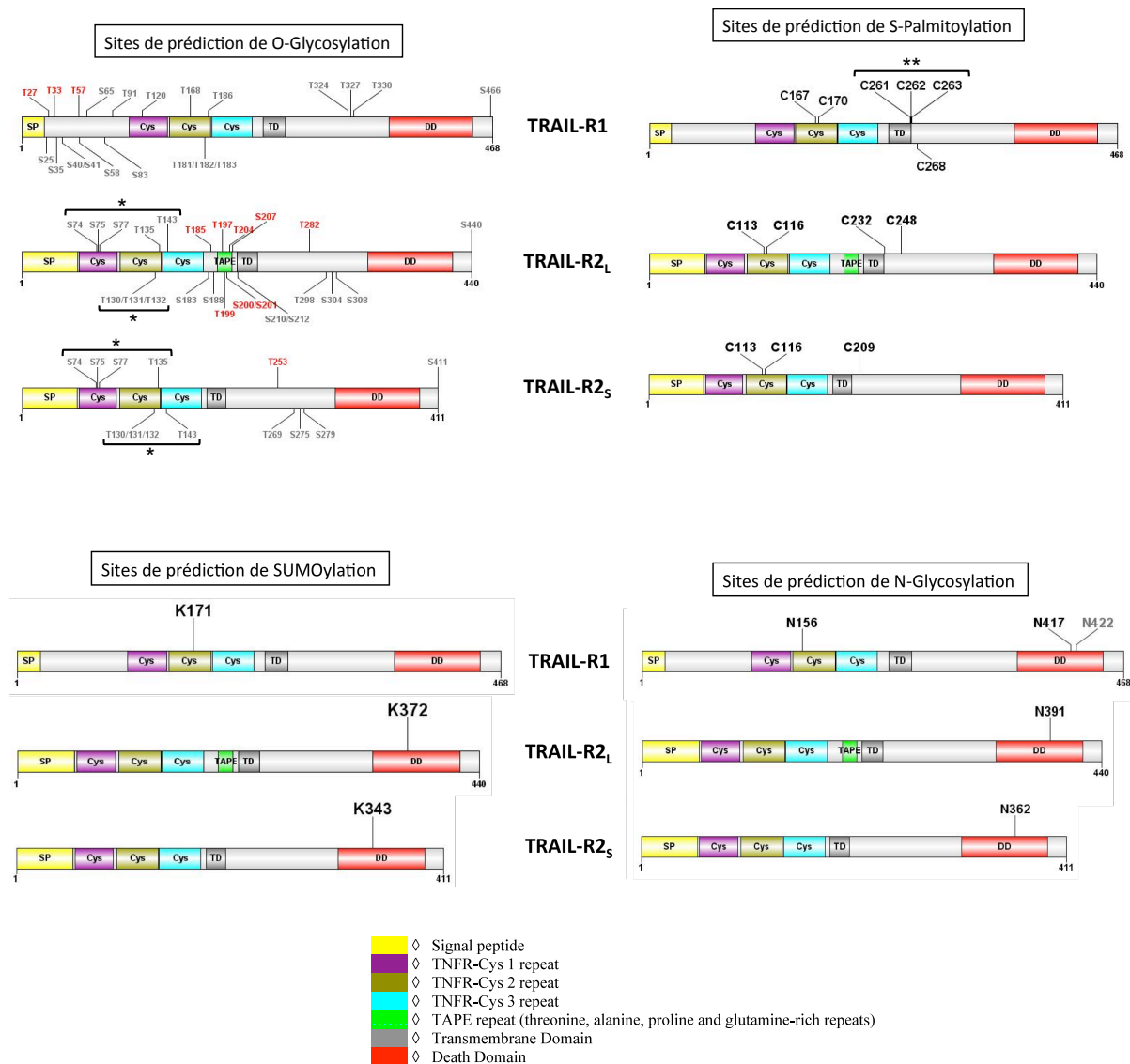


Figure 5: Analyse bioinformatique des sites potentiels de modifications post-traductionnelles de TRAIL-R1 et TRAIL-R2.

L'analyse bioinformatique des séquences de chaque récepteur a été réalisée à l'aide des programmes NetNGlyc (N-Glycosylation), NetOGlyc 3.1 (O-Glycosylation, les scores de prédiction élevés sont figurés en rouge), CSS Palm 2.0 (S-Palmitoylation) et SUMOsp 2.0 (SUMOylation).

* Sites confirmés par (Wagner et al., 2007)

** Sites confirmés par (Rossin et al., 2009)

radeaux lipidiques après stimulation par TRAIL, ne sont pas exprimés de façon constitutive dans ces microdomaines. Les expériences faites dans notre laboratoire vont dans le sens de cette hypothèse, mais les différences observées pourraient être dues aux lignées utilisées, ou encore aux techniques d'isolation des radeaux lipidiques.

Il existe sans aucun doute d'autres modifications post-traductionnelles des récepteurs de mort, comme l'indiquent les analyses bioinformatiques des séquences de TRAIL-R1 et TRAIL-R2 (**Figure 5**). En plus des glycosylations et des palmitoylations, d'autres types de modifications sont certainement impliquées, telles que l'ubiquitylation, la SUMOylation, l'acétylation ou la phosphorylation, mais ces modifications putatives n'ont pas encore été vérifiées expérimentalement.

Un autre évènement post-traductionnel, identifié récemment, serait nécessaire à l'activation complète de la caspase-8 au sein du DISC (Jin et al., 2009). Cette étude a montré que cette caspase est polyubiquitylée en réponse à TRAIL, par une enzyme ubiquitine-ligase recrutée dans le DISC, la Cullin-3 (CUL3). Une deuxième enzyme, la déubiquitinase A20, peut également s'associer au DISC pour contrebalancer ce processus en supprimant les résidus ubiquitine de la caspase-8. Enfin, une troisième protéine présente dans le DISC, la protéine p62, va se fixer sur les caspases-8 polyubiquitylées et entraîner leur translocation vers le cytoplasme. Ces caspases vont alors former des agrégats riches en ubiquitine, au sein desquels elles seront totalement activées par clivage (Jin et al., 2009). Ce mécanisme nouvellement décrit serait primordial pour l'initiation de l'apoptose induite par TRAIL.

1.3.b - Voie intrinsèque : La boucle d'amplification mitochondriale

Comme nous venons de le voir, l'activation des récepteurs de mort par TRAIL engage la voie extrinsèque, durant laquelle les caspases effectrices sont directement clivées par les caspases initiatrices. Toutefois, une seconde voie de signalisation intervient parallèlement à la voie extrinsèque. Cette voie secondaire est qualifiée de voie intrinsèque, ou voie mitochondriale de l'apoptose. Le lien entre les voies intrinsèque et extrinsèque est établi par la protéine Bid (*BH3-interacting domain death agonist*), qui est clivée par la caspase-8 dans le cytoplasme (**Figure 4**). La forme active de **Bid** (tBid) va déclencher le changement conformationnel des membres pro-apoptotiques Bax et Bak, qui vont à leur tour enclencher la perméabilisation de

la membrane mitochondriale externe (Billen et al., 2008). Une deuxième protéine homologue à Bid, appelée **Bim** (*Bcl-2-interacting mediator of cell death*), est également capable d'activer Bax et Bak de façon directe (Kim et al., 2006). Différents facteurs pro-apoptotiques vont ainsi être relargués dans le cytoplasme par les pores formés dans la membrane de la mitochondrie. C'est le cas du cytochrome c, qui va s'associer à la protéine Apaf-1 et à la caspase-9 pour former un complexe cytoplasmique appelé **apoptosome (Figure 4)**. L'apoptosome catalyse l'activation de la caspase-9, laquelle va activer à son tour les caspases effectrices. De cette façon, la voie mitochondriale de l'apoptose constitue une sorte de boucle d'amplification du signal de mort induit par TRAIL. En fonction de l'importance de cette voie intrinsèque, deux « types » de cellules ont été décrits. Les cellules sont dites de type I lorsque la voie extrinsèque est suffisante pour activer les caspases effectrices, et de type II lorsque la boucle d'amplification mitochondriale est requise pour induire l'apoptose (Scaffidi et al., 1998). Notons tout de même que la voie mitochondriale est également activée dans les cellules de type I, mais le blocage de cette voie n'aura pas d'effet sur la sensibilité à TRAIL. Toutefois, cette notion de type I/type II reste une notion très théorique, puisque les paramètres de régulation de la voie TRAIL sont en réalité plus complexes qu'il n'y paraît. Par exemple, des cellules résistantes à TRAIL par l'expression de Bcl-2 (type II) deviennent sensibles si l'on augmente la dose de TRAIL. Ces cellules de type II deviennent alors des cellules de type I en fonction du ratio entre la concentration de TRAIL et la quantité de Bcl-2 exprimée (Rudner et al., 2005). Le même phénomène est observé en forçant l'agrégation des récepteurs de TRAIL par liaison covalente (Berg et al., 2007).

I.4 - Mécanismes de régulation de la voie TRAIL

Nous venons de voir que l'activation des récepteurs de mort par TRAIL peut induire les voies de signalisation intrinsèque et/ou extrinsèque. Etant donné la capacité de TRAIL à induire la mort cellulaire, il est évident que cette signalisation doit être très finement régulée pour maintenir l'homéostasie de l'organisme. Des dysfonctionnements dans ces mécanismes de régulation sont à l'origine d'une résistance à TRAIL, ce qui peut poser des problèmes quant à l'utilisation de cette cytokine en thérapie anti-cancéreuse. Nous détaillerons dans cette partie les moyens de régulation de la voie TRAIL aux différents niveaux de la voie de signalisation.

I.4.a - Régulation de la voie extrinsèque

La voie des récepteurs de mort est déclenchée en amont par la formation du complexe initiateur de l'apoptose (DISC). La voie TRAIL peut être régulée à ce niveau en interférant avec la formation du DISC pour prévenir l'activation des caspases initiateurs. C'est le cas de la protéine anti-apoptotique **c-FLIP** (également appelé CFLAR, *CASP8 and FADD-like apoptosis regulator*), qui possède des similarités structurales avec les caspases initiateurs (Irmeler et al., 1997). En effet, c-FLIP possède un domaine DED qui permet son interaction avec FADD, mais ne possède pas le domaine catalytique des caspases-8 et -10. De cette façon, c-FLIP va jouer un rôle de dominant négatif en entrant en compétition avec les caspases initiateurs pour l'association au DISC. Ce système est en réalité plus complexe, puisque trois isoformes de c-FLIP sont présentes chez l'Homme, deux isoformes courts (c-FLIP_S et c-FLIP_R) et un isoforme long (c-FLIP_L). Tandis que le rôle anti-apoptotique des isoformes courts est bien attesté, c-FLIP_L possède dans certaines conditions une activité pro-apoptotique, qui dépend du ratio entre c-FLIP_L et la caspase-8 (Bagnoli et al., 2010). Lorsque c-FLIP_L est fortement exprimé, celui-ci joue un rôle de dominant négatif des caspases initiateurs. En revanche, à des concentrations plus faibles, c-FLIP_L favorise le clivage de la procaspase-8 au sein du DISC, ainsi que d'autres substrats à proximité du DISC, tels que RIP1 (*receptor-interacting protein*) (Micheau et al., 2002). Notons que l'inhibition de l'apoptose par c-FLIP n'est pas spécifique de la voie TRAIL, mais concerne également le récepteur de mort Fas, dont le DISC dépend de FADD.

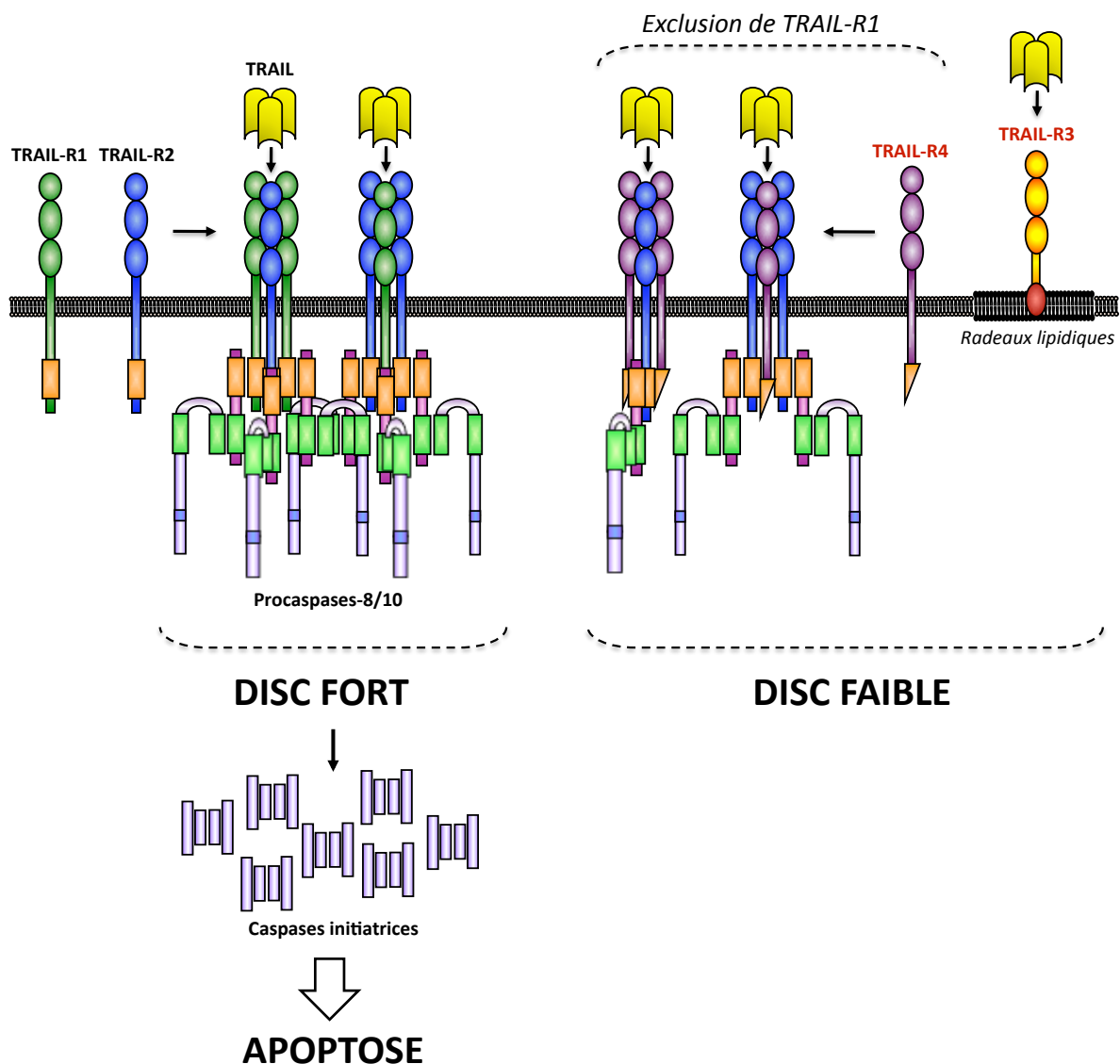


Figure 6: Modèle de régulation de la signalisation apoptotique de TRAIL par les récepteurs antagonistes TRAIL-R3 et TRAIL-R4.

TRAIL-R3 inhibe la formation du DISC en séquestrant le ligand TRAIL au sein de radeaux lipidiques membranaires (effet de titration du ligand).

TRAIL-R4 agit en s'associant avec TRAIL-R2 au sein du DISC et en excluant TRAIL-R1 de ce complexe. TRAIL-R4 ne possédant pas de domaine de mort fonctionnel, la quantité de caspases initiatrices recrutées dans le DISC est trop faible pour induire l'activation de ces dernières.

Un autre moyen de régulation de la voie TRAIL au niveau du DISC est l'expression des **récepteurs antagonistes TRAIL-R3 et TRAIL-R4** à la membrane plasmique. La fonction antagoniste de ces récepteurs sur la voie TRAIL est maintenant clairement établie, à la fois par des expériences de surexpression et d'inactivation par des ARN interférents ou par des anticorps neutralisants (Merino et al., 2007). Ces deux récepteurs fixent TRAIL sans pouvoir recruter l'adaptateur FADD, en raison de l'absence d'un domaine de mort fonctionnel. De ce fait, la propriété anti-apoptotique de TRAIL-R3 et TRAIL-R4 a été attribuée dans un premier temps à un simple effet de titration du ligand. Cependant, les travaux conduits dans notre équipe ont révélé un mode d'action différentiel de TRAIL-R3 et TRAIL-R4 (Merino et al., 2006) (**Figure 6**) :

Le **récepteur TRAIL-R3**, qui ne possède pas de partie intracellulaire, est ancré à la membrane plasmique par une ancre GPI. Ce récepteur antagoniste est localisé au niveau de structures membranaires enrichies en sphingolipides et en cholestérol, connues sous le nom de radeaux lipidiques. Au sein de ces structures lipidiques, TRAIL-R3 va « séquestrer » TRAIL et va ainsi entrer en compétition avec TRAIL-R1 et TRAIL-R2 pour la fixation du ligand. Les récepteurs agonistes disposent ainsi d'une plus faible quantité de TRAIL pour former le DISC, empêchant ainsi l'initiation de la voie TRAIL (**Figure 6**).

Le **récepteur TRAIL-R4** agit de façon plus complexe, puisqu'il inhibe l'activation de la caspase-8 sans empêcher la formation du DISC de TRAIL. En effet, après l'ajout de TRAIL exogène, TRAIL-R4 interagit directement avec TRAIL-R2 et permet la formation d'un complexe DISC dans lequel TRAIL-R1 est exclu, mais dans lequel FADD et les caspases initiateurs sont toujours recrutés (Merino et al., 2006) (**Figure 6**). Cependant, les caspases ne sont pas activées dans ce DISC particulier, même si le mécanisme en jeu reste à éclaircir. Il est très probable que la structure originale de TRAIL-R4, avec un domaine de mort tronqué, soit responsable de l'absence d'activation de la caspase-8. Une autre étude a confirmé l'interaction spécifique de TRAIL-R4 avec TRAIL-R2, mais cette fois-ci indépendamment du ligand, *via* le domaine PLAD (Clancy et al., 2005) (*cf. Introduction, Chapitre I.3.a*). Cette différence pourrait être due à la production autocrine de TRAIL par la lignée Jurkat utilisée dans cette étude. De plus, des anticorps agonistes dirigés spécifiquement contre TRAIL-R2 sont capables d'induire la mort de cellules exprimant TRAIL-R4, ce qui implique que TRAIL-R2 ne soit pas pré-associé avec TRAIL-R4. Quoiqu'il en soit, TRAIL-R4 joue un rôle de régulateur négatif de TRAIL-R2. Enfin, nous verrons dans ce manuscrit que le récepteur

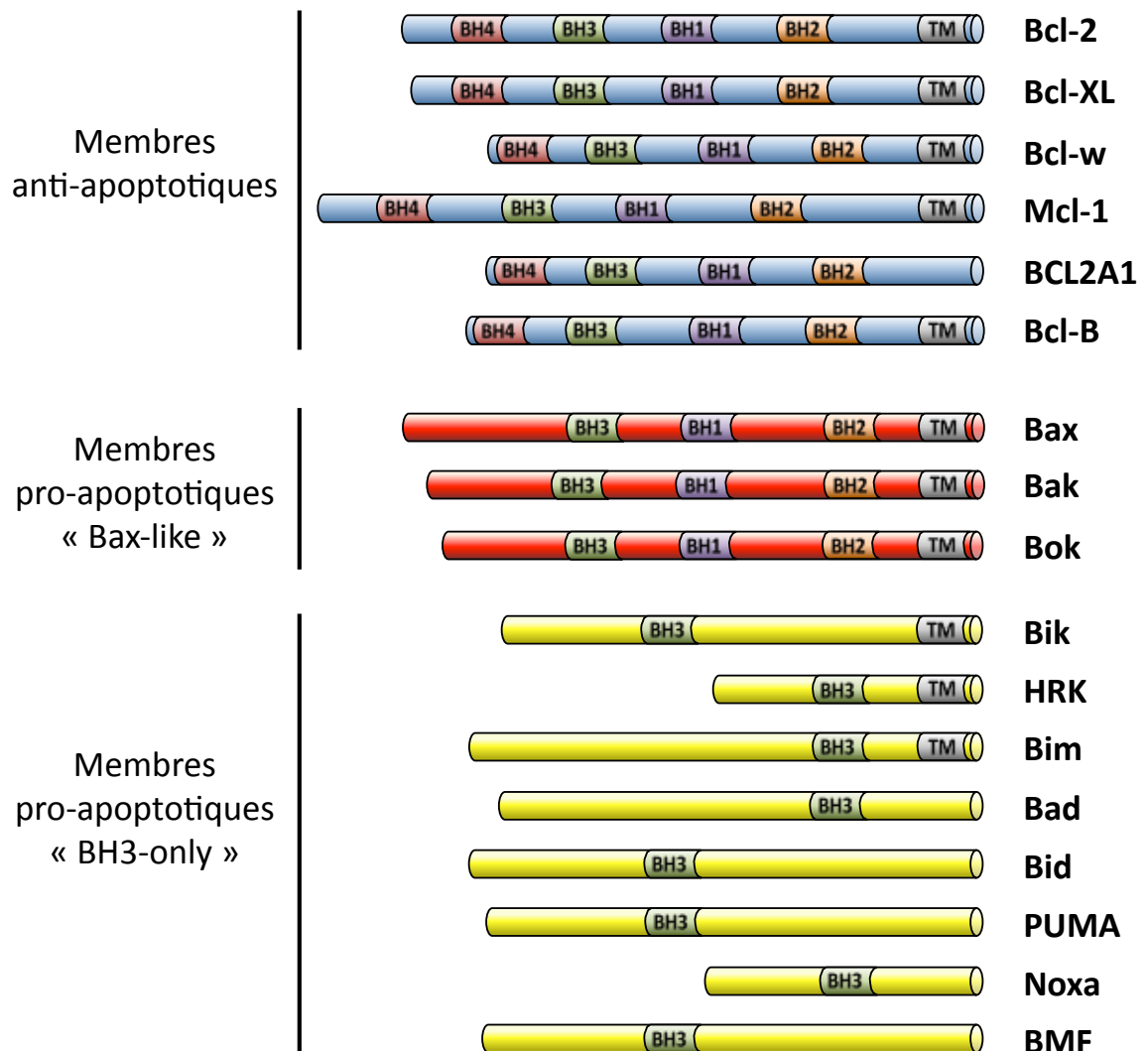


Figure 7: Classification des protéines de la famille Bcl-2 en fonction de leur structure.

antagoniste TRAIL-R4 n'est pas vraiment un récepteur leurre, mais plutôt un "régulateur" de la voie TRAIL, puisqu'il est également capable d'induire des voies de survies intracellulaires. Cet aspect a constitué une partie de mon travail de thèse (*cf. Résultats, Chapitre I*).

Le niveau d'expression des récepteurs agonistes à la membrane plasmique est un autre facteur déterminant de la sensibilité à TRAIL. L'expression membranaire peut être inhibée par un défaut d'adressage des récepteurs, ou par l'inhibition de la transcription des gènes, notamment par hyperméthylation des promoteurs de TRAIL-R1 et TRAIL-R2 (Jin et al., 2004; Horak et al., 2005). L'expression de ces deux récepteurs est également régulée par des facteurs de transcription tels que p53 (Takimoto and El-Deiry, 2000; Liu et al., 2004), NF-κB (Sheikh et al., 1998; Chen et al., 2003) ou CHOP (*C/EBP-homologous protein*) (Yamaguchi and Wang, 2004; Shiraishi et al., 2005). Différentes mutations géniques peuvent aussi conduire à l'absence d'expression de TRAIL-R1 et TRAIL-R2. Pour résumer, la capacité de TRAIL à induire l'activation des caspases initiatrices dépend des ratios entre la quantité de c-FLIP, de récepteurs antagonistes et de récepteurs agonistes exprimés par la cellule. Sans oublier les modifications post-traductionnelles des récepteurs évoquées dans le *chapitre I.3.a*, qui conditionnent également le déclenchement en cascade des caspases.

I.4.b - Régulation de la voie intrinsèque

L'activation de la voie mitochondriale est majoritairement contrôlée par les **protéines de la famille Bcl-2** (*B cell CLL/lymphoma-2*) (**Figure 7**). Cette famille comprend à la fois des membres pro-apoptotiques et des membres anti-apoptotiques, leur point commun étant la présence d'un ou plusieurs domaines BH (*Bcl-2 homology domains*). Ce sont les jeux d'interactions entre ces différentes protéines qui vont dicter la survie ou la mort de la cellule *via* la mitochondrie. Les protéines de la famille Bcl-2 ont été réparties en 3 groupes : les membres anti-apoptotiques, les membres pro-apoptotiques « Bax-like » et les membres pro-apoptotiques « BH3-only » (Chipuk et al., 2010) (**Figure 7**).

Les **membres pro-apoptotiques « Bax-like »** sont des protéines dites effectrices, en raison de leur capacité à déclencher directement la perméabilisation de la mitochondrie. Les membres de ce groupe, les protéines **Bax** (*Bcl-2-associated x protein*) et **Bak** (*Bcl-2 antagonist killer 1*), possèdent 3 motifs BH (BH1, BH2, BH3) ainsi qu'un motif présentant

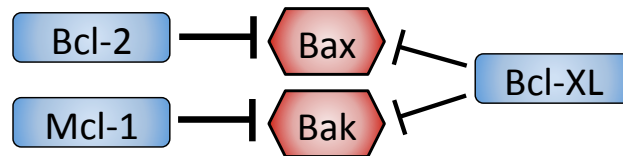


Figure 8: Spécificité des interactions entre les membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 et les membres pro-apoptotiques "Bax-like".

Bcl-2 interagit préférentiellement avec Bax, tandis que Mcl-1 interagit plutôt avec Bak. Bcl-XL est capable d'interagir à la fois avec Bax et Bak.

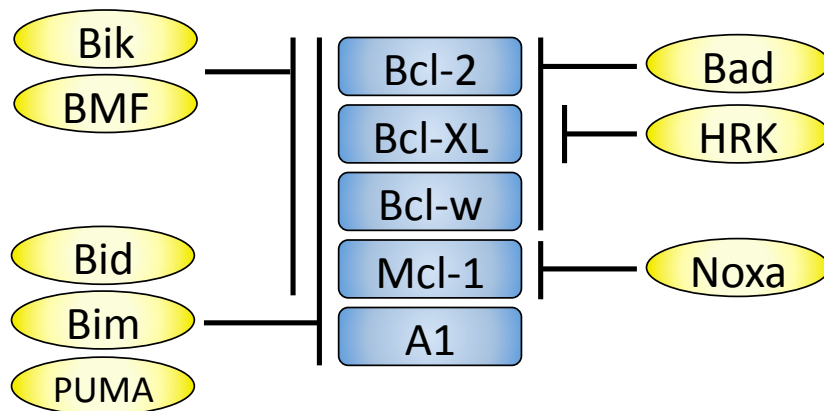


Figure 9: Spécificité des interactions entre les membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 et les membres pro-apoptotiques "BH3-only".

une homologie partielle avec le domaine BH4 (Shimizu et al., 2000; Chipuk et al., 2010). La protéine Bax est présente dans le cytoplasme sous forme monomérique inactive. Après activation, Bax va changer de conformation, ce qui va permettre son insertion dans la membrane externe mitochondriale et son homo-oligomérisation pour former des pores. Les facteurs pro-apoptotiques présents dans l'espace intermembranaire mitochondrial vont ainsi être relargués vers le cytoplasme à travers ces pores. C'est le cas du cytochrome c, qui va conduire à la formation de l'apoptosome au sein duquel la caspase-9 sera activée. A la différence de Bax, les monomères de Bak sont constitutivement présents au niveau de la membrane externe mitochondriale. L'homo-oligomérisation de Bak entraîne la formation de pores et la perméabilisation de la mitochondrie, de la même façon que pour Bax. Une autre protéine « Bax-like », la protéine **Bok** (*Bcl-2-related ovarian killer*), a été identifiée sur la base de son homologie de séquence avec Bax et Bak, mais le rôle et le fonctionnement de cette protéine dans l'activation de la voie intrinsèque n'ont pas encore été précisés.

L'activation de Bax et Bak est inhibée par les **membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2**, qui possèdent également 4 domaines BH (BH1, BH2, BH3 et BH4). Chez l'Homme, les 6 membres connus sont **Bcl-2**, **Bcl-XL** (*Bcl-2-related gene X, long isoform*), **Mcl-1** (*myeloid cell leukemia 1*), **Bcl-w**, **Bcl-B** et la protéine **A1**. Ces protéines sont présentes soit dans le cytosol, soit enchâssées sur la membrane externe mitochondriale. Leur rôle est de prévenir l'activation de Bax et de Bak par interaction directe. En particulier, Bcl-2 présente une forte affinité pour Bax, tandis que Mcl-1 interagit préférentiellement avec Bak (Willis et al., 2005; Dunkle et al., 2010; Gillissen et al., 2010). A l'inverse, Bcl-XL peut interagir aussi bien avec Bax et Bak, mais avec une affinité plus faible que Bcl-2 ou Mcl-1 (**Figure 8**).

Les **membres pro-apoptotiques « BH3-only »** possèdent un seul domaine BH. Chez l'Homme, 8 protéines « BH3-only » ont été identifiées : **Bid**, **Bim**, **Bad** (*Bcl-2 antagonist of cell death*), **Bik** (*Bcl-2-interacting killer*), **BMF** (*Bcl-2-modifying factor*), **HRK** (*Harakiri*), **Noxa** et **PUMA** (*p53-upregulated modulator of apoptosis*). Ces protéines interagissent de manière spécifique avec certains membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2, levant ainsi l'inhibition de Bax et Bak. Les profils d'interactions des « BH3-only » avec les membres anti-apoptotiques sont schématisés dans la **Figure 9**. Ces protéines activent donc Bax et Bak de manière indirecte, à l'exception de Bid et Bim, qui sont capables d'induire directement le changement conformationnel de Bax et Bak (*cf. Introduction, Chapitre I.3.b*).

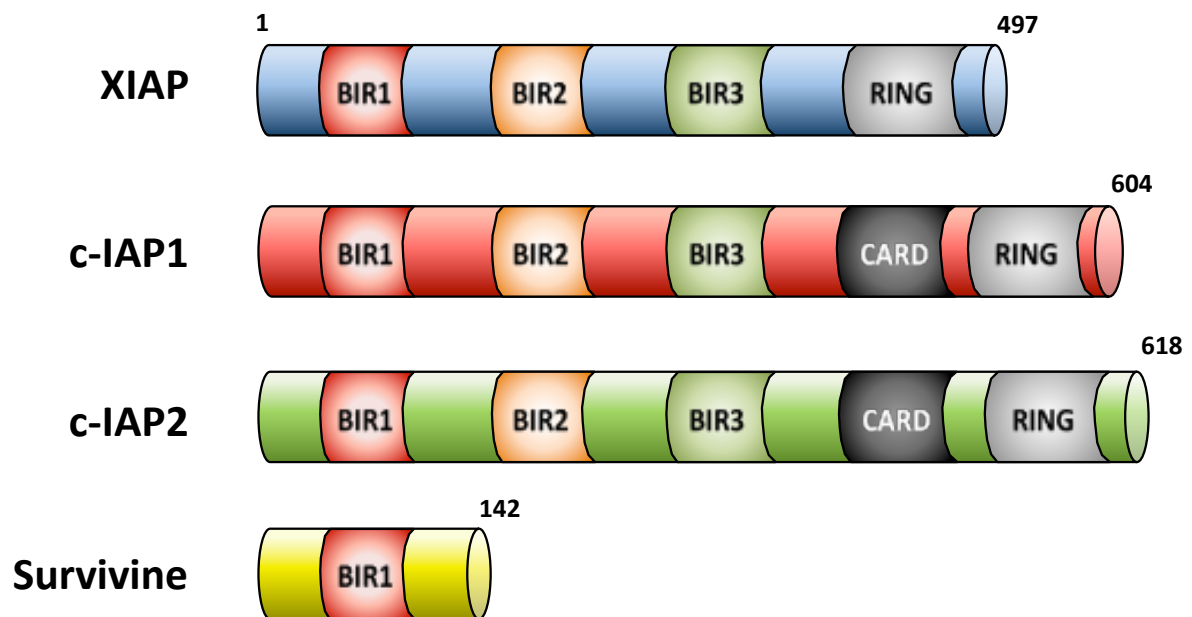


Figure 10: Structure schématique des principales IAP humaines, XIAP, c-IAP1 et c-IAP2

Les protéines de la famille IAP contiennent de 1 à 4 domaines BIR (Baculovirus IAP repeat), et peuvent contenir un domaine CARD (Caspase activating recruitment domain). Ces domaines permettent l'interaction avec certaines protéines impliquées dans l'apoptose et la signalisation cellulaire, dont les caspases. Le domaine RING possède une activité E3 ubiquitine ligase qui permet l'ubiquitinylation et la dégradation de partenaires protéiques, dont les caspases, par le protéasome.

Lors du processus de perméabilisation mitochondriale, outre le cytochrome c, d'autres facteurs pro-apoptotiques sont relargués dans le cytoplasme. En particulier, les protéines **Smac/DIABLO** et **Omi/HtrA2** vont exercer une activité apoptotique en inhibant les protéines de la **famille des IAP** (*Inhibitor of apoptosis proteins*), dont l'expression est élevée dans un certain nombre de tumeurs. Les IAP, dont les principaux membres sont XIAP, cIAP1, cIAP2 et la survivine (**Figure 10**), sont à l'origine d'une résistance à l'apoptose induite par TRAIL (Ng and Bonavida, 2002; Nakao et al., 2006; Ndozangue-Touriguine et al., 2008; Connolly et al., 2009; Gill et al., 2009). Les IAP agissent en inhibant l'activation des caspases initiateurs et effectrices, via leurs domaines BIR (*Baculoviral IAP repeat*). Cette propriété a été bien démontrée dans le cas de **XIAP**, qui est capable de se fixer directement sur les caspases-9, -3 et -7 (Chai et al., 2001; Huang et al., 2001; Riedl et al., 2001). Contrairement à XIAP, les protéines **cIAP1** et **cIAP2** seraient capables de fixer les caspases mais sans entraver directement leur activation (Eckelman and Salvesen, 2006). La fonction anti-apoptotique de cIAP1 et cIAP2 est en fait probablement conférée de façon indirecte par leur activité ubiquitine ligase sur différents substrats, par exemple NEMO (*NF-kappa-B essential modifier*, ou IKK γ), RIP1 (*Receptor interacting protein*) ou l'adaptateur moléculaire TRAF2 (*TNF receptor-associated factor-2*). Enfin, l'activité anti-apoptotique de la **survivine** a également été largement démontrée, même si son mécanisme d'action n'est pas encore clairement défini (Romagnoli et al., 2008). Plusieurs modes d'action ont été proposés, tels que la stabilisation de Bcl-2 par phosphorylation *via* la kinase Aurora B (Vogel et al., 2007), ou l'inhibition directe des caspases effectrices (Shin et al., 2001), bien que les données les plus récentes excluent la possibilité d'une interaction directe entre la survivine et les caspases (Altieri, 2010). L'action anti-apoptotique de la survivine se situerait plus probablement au niveau post-mitochondrial, par l'intermédiaire d'autres membres de la famille IAP. En effet, la formation d'un complexe survivine/XIAP protégerait ce dernier de sa dégradation par le protéasome (Dohi et al., 2004b). Une interaction de la survivine avec Smac/DIABLO a aussi été décrite, ce qui lèverait l'inhibition des IAP après l'activation mitochondriale (Song et al., 2003b). Pour aller plus loin, une proportion de survivine située dans l'espace intermembranaire mitochondrial permettrait la séquestration de Smac/DIABLO et empêcherait son relargage de la mitochondrie (Dohi et al., 2004a; Ceballos-Cancino et al., 2007). De part leur capacité à inhiber les caspases de façon directe ou indirecte, les protéines de la famille des IAP peuvent ainsi réguler à la fois la voie intrinsèque et extrinsèque.

I.4.c - Voies de « survie » induites par TRAIL

Hormis son rôle évident dans l'induction de l'apoptose, TRAIL est également capable d'induire une signalisation non-apoptotique, notamment la prolifération, la migration et surtout la survie des cellules. L'activation de ces voies par TRAIL est notamment observée dans les cellules qui sont résistantes à l'apoptose induite par TRAIL. Les principales voies de "survie" induites par TRAIL sont les voies NF- κ B (*nuclear factor κ B*), MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) et PI3K/Akt (phosphoinositide triphosphate kinase/Akt).

NF- κ B:

Les facteurs de transcription de la famille **NF- κ B** participent à de nombreux processus cellulaires, tels que l'inflammation, la survie, la différenciation ou la prolifération (Karin et al., 2002). Entre autre, NF- κ B peut activer la transcription des gènes codant les protéines anti-apoptotiques c-FLIP, XIAP, Bcl-2 ou Bcl-XL, entravant ainsi la sensibilité à TRAIL. L'activation de la voie NF- κ B après un traitement par TRAIL a été décrite dans de nombreuses études. Par exemple, l'induction de NF- κ B par TRAIL favorise la prolifération de cellules leucémiques primaires (Ehrhardt et al., 2003), ou encore la migration, et donc le caractère invasif, de cholangiocarcinomes résistants à TRAIL (Ishimura et al., 2006). L'activation de NF- κ B par TRAIL n'est pas forcément spécifique aux cellules résistantes à cette cytokine, puisque ce mécanisme a également été observé dans des cellules sensibles à TRAIL, comme la lignée leucémique Jurkat (Zauli et al., 2005).

Les récepteurs TRAIL-R1, TRAIL-R2 ou TRAIL-R4 sont tous capables d'induire NF- κ B, comme l'ont montré les expériences de surexpression de ces récepteurs (Chaudhary et al., 1997; Degli-Esposti et al., 1997a; Schneider et al., 1997b; Harper et al., 2001). En revanche, ceci n'a jamais été décrit pour TRAIL-R3, suggérant que la présence d'un domaine intracellulaire est nécessaire à l'activation de voies de survie. Dans le cas de TRAIL-R1 et TRAIL-R2, le recrutement de la protéine p62 au sein du DISC (*cf Introduction, Chapitre I.3.a*) est un mécanisme permettant d'expliquer comment les récepteurs de TRAIL activent la voie NF- κ B. En effet, p62 est capable d'induire NF- κ B par le biais de la protéine TRAF6 (Moscat et al., 2007). Concernant le récepteur antagoniste TRAIL-R4, le mécanisme d'induction de NF- κ B reste à préciser en raison de l'absence d'un domaine de mort fonctionnel.

En 2005, une équipe a montré que TRAIL pouvait induire la formation d'un complexe intracellulaire responsable de l'activation de NF- κ B (Varfolomeev et al., 2005). Ce complexe secondaire est constitué par FADD, TRADD (*TNF receptor-associated death domain*) et par les caspases initiatrices -8 et -10, séparément des récepteurs et du ligand. Le recrutement au sein de ce complexe de TRAF2, RIP1 et NEMO va conduire à la dégradation de l'inhibiteur de NF- κ B, à savoir I κ B (*inhibitor of NF- κ B*). Cependant, l'existence du complexe secondaire nécessite d'être confirmée et son importance physiologique devra être précisée.

Enfin, deux modèles d'activation de NF- κ B par c-FLIP ont été proposés. Dans le premier cas, c-FLIP est clivé par la caspase-8 dans le DISC de TRAIL pour donner un fragment de 43 kDa. Ce fragment serait capable de recruter TRAF2 et RIP1, conduisant à l'activation de NF- κ B (Kataoka and Tschopp, 2004). Dans le deuxième cas, le clivage de c-FLIP par la caspase-8 génère un fragment de 22 kDa, capable d'interagir directement avec NEMO et donc d'activer NF- κ B (Golks et al., 2006). Des études supplémentaires sont nécessaires pour définir plus précisément la pertinence des fragments de clivage de c-FLIP.

MAPK:

Tout comme NF- κ B, les voies de signalisation par les MAP kinases (MAPK) jouent des rôles clefs dans des processus variés tels que l'apoptose, la prolifération, la différenciation ou la mobilité cellulaire. Chez les mammifères, les principales voies MAPK sont les voies ERK1/2 (*extracellular signal-regulated kinase*), JNK (*JUN N-terminal kinase*) et p38. Sans entrer dans les détails de ces voies complexes, la signalisation par les MAPK consiste en une série d'étapes de phosphorylations dirigées successivement par une MAPK kinase kinase (MAP3K), puis par une MAPK kinase (MAP2K) et une MAPK. Plusieurs études ont montré que l'induction par TRAIL des voies MAPK pouvait être à l'origine de la survie et de la prolifération cellulaire (Lin et al., 2000; Secchiero et al., 2003; Morel et al., 2005). Le mécanisme par lequel TRAIL active les MAPK n'est pas encore clarifié, mais certaines pistes ont été avancées. Une équipe a notamment montré que l'expression de c-FLIP_L est nécessaire à l'activation de la voie ERK1/2 par TRAIL dans des cellules de gliome (Vilimanovich and Bumbasirevic, 2008). Le complexe secondaire précédemment évoqué serait également responsable de l'activation de cette voie, ce qui suggère une possible implication de RIP1 pour l'activation des MAPK par TRAIL (Varfolomeev et al., 2005). Enfin, une équipe a montré récemment que les MAPK pouvaient être activées par le biais du clivage de la kinase Mst1 par les caspases effectrices (Song and Lee, 2008). Les MAPK peuvent donc être

activées dans les cellules sensibles à TRAIL, de façon indirecte, c'est à dire en aval de la signalisation par TRAIL. Toutes ces observations sont à prendre avec précaution tant qu'aucun mécanisme commun n'aura été confirmé par des équipes indépendantes. De plus, le fait que l'activation des MAPK supprime l'effet apoptotique de TRAIL est encore discuté car plusieurs études contradictoires ont été publiées sur ce sujet (Johnstone et al., 2008).

PI3K/Akt:

La voie PI3K/Akt est activée en réponse à différents signaux extracellulaires, comme par exemple des cytokines, des facteurs de croissance, l'insuline ou des protéines de la matrice extracellulaire. La kinase PI3K régule un large spectre de fonctions biologiques, dont l'apoptose, le métabolisme du glucose, la croissance et le cycle cellulaire. La voie PI3K/Akt est capable d'inhiber l'apoptose en inhibant différents acteurs de l'apoptose, parmi lesquels Bax, Bad et Bim (Liu et al., 2009), ou encore en activant des protéines anti-apoptotiques telles que XIAP (Dan et al., 2004). Cette voie peut également réguler, entre autres, les facteurs de transcription de la famille NF- κ B et le suppresseur de tumeur p53. Différents récepteurs membranaires sont capables d'activer la PI3K, en particulier ceux possédant une activité tyrosine kinase. Une fois activés, ces récepteurs recrutent la PI3K au niveau de la membrane plasmique. La PI3K va alors phosphoryler des lipides membranaires particuliers, les PIP2 (*phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate*), pour générer des PIP3 (*phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate*). La protéine Akt va ensuite être recrutée au niveau des PIP3 où elle sera activée par phosphorylation. La voie PI3K/Akt est une voie décrite comme étant un événement important pour la survie et la prolifération des cellules cancéreuses (Manning and Cantley, 2007). La cytokine TRAIL est capable d'induire rapidement l'activation de cette voie dans différents types cellulaires (Secchiero et al., 2003; Zauli et al., 2005). De la même façon, dans un modèle d'arthrite rhumatoïde, TRAIL déclenche la prolifération des fibroblastes synoviocytaires en activant la voie PI3K/Akt (Morel et al., 2005).

Les travaux conduits dans notre laboratoire ont montré que le récepteur antagoniste TRAIL-R4 est également capable d'activer la voie de survie Akt, dans le modèle cellulaire HeLa de carcinome de col de l'utérus. De façon surprenante, cette activation est constitutive, c'est-à-dire qu'elle est indépendante de la fixation du ligand TRAIL. Ce récepteur leurre possède donc la capacité d'induire une signalisation intracellulaire de survie, parallèlement à son rôle anti-apoptotique au niveau du DISC. Ces travaux novateurs ont fait l'objet de la première partie de ma thèse (*cf. Résultats, Chapitre I*).

Finalement, la capacité de TRAIL à activer des voies de survie pourrait expliquer pourquoi, dans certains cas, TRAIL favorise la croissance tumorale et la formation de métastases (Trauzold et al., 2006). La compréhension de ces phénomènes est donc cruciale pour adapter l'utilisation de TRAIL à ces cellules résistantes, notamment en utilisant des inhibiteurs de ces voies de survie (Engelman, 2009).

I.5 - Utilisation en monothérapie : TRAIL face à ses limites

L'implication de TRAIL au cours de l'immunité anti-tumorale a fait de cette cytokine une candidate intéressante en thérapie anti-tumorale. TRAIL a fait l'objet de nombreuses études précliniques qui ont démontré son potentiel anti-cancéreux et ont conduit à son évaluation clinique chez l'Homme. Nous détaillerons dans cette partie les différents outils développés pour activer la signalisation par TRAIL, notamment les versions recombinantes de TRAIL et les anticorps agonistes, ainsi que les limites de leur utilisation en monothérapie.

I.5.a - Formes recombinantes de TRAIL

Versions « taggées » de TRAIL:

Afin de faciliter leur purification, les premières versions de TRAIL contenaient une séquence exogène appelée « tag ». Le tag permet également de favoriser l'oligomérisation de ces ligands et donc leur activité biologique. Les différents « tags » utilisés sont les queues polyhistidines (Pitti et al., 1996), les résidus leucines zipper (Walczak et al., 1999) et isoleucine zipper (Ganten et al., 2006). Un autre variant contient un tag appelé FLAG qui doit être agrégé par des anticorps anti-FLAG pour exercer son activité pro-apoptotique (Schneider, 2000).

Malheureusement, tout comme FasL ou le TNF, ces formes taggées de TRAIL se sont révélées toxiques, notamment envers les cellules hépatiques. Le haut degré d'oligomérisation de ces ligands « taggés » est peut être la cause de cette toxicité. Une autre explication possible de la toxicité de ces ligands pourrait être la quantité de zinc contenue dans les préparations, qui conditionne le degré d'oligomérisation de TRAIL (Lawrence et al., 2001).

Tableau 2: Anticorps agonistes monoclonaux dirigés contre TRAIL-R1 ou TRAIL-R2, en cours d'évaluation clinique.

Anticorps	Spécificité	Compagnie	Remarques	Références
Mapatumumab (HGS-ETR1)	TRAIL-R1	Human Genome Sciences	Induit l'apoptose dans de nombreux types de cellules cancéreuses. Inhibe la croissance de tumeurs humaines xénogreffées dans des modèles animaux. Essais cliniques de phase I/II. Absence de toxicité. Effet anti-tumoral observé chez certains patients.	(Pukac et al., 2005; Tolcher et al., 2007; Hotte et al., 2008; Moretto and Hotte, 2009)
Lexatumumab (HGS-ETR2)	TRAIL-R2	Human Genome Sciences	Essais cliniques de phase I. Peut être administré sans effets secondaires notoires. Stabilisation de la maladie dans 32 % des cas.	(Plummer et al., 2007)
HGS-TR2J	TRAIL-R2	Human Genome Sciences	Essais cliniques suspendus volontairement.	(Mahalingam et al., 2009)
TRA-8	TRAIL-R2	Sankyo	Induit l'apoptose des cellules cancéreuses primaires sans toxicité contre les hépatocytes normaux. Phase I d'essai clinique.	(Ichikawa et al., 2001)
Conatumumab (AMG-655)	TRAIL-R2	Amgen	Induit l'apoptose de diverses lignées cancéreuses. Phase I d'essai clinique. Demi-vie de 10 jours. Activité anti-tumorale observée chez les patients.	(Rosevear et al., 2010)
LBY135	TRAIL-R2	Novartis	Bonne activité anti-cancéreuse <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> . Phase I d'essai clinique en cours.	(Natoni et al., 2007)
Apomab	TRAIL-R2	Genentech	Phase I d'essai clinique. Demi-vie de 15 à 20 jours. Essais cliniques de phase II en cours	(Zinonos et al., 2009)

Versions « non taggées » de TRAIL:

Pour s'affranchir de la présence des « tags », une version « non-tagagée » de TRAIL a été générée, baptisée TRAIL.0 (ou Apo2L.0). Le TRAIL.0 contient un atome de zinc qui permet de stabiliser les trimères biologiquement actifs du ligand. La toxicité systémique du TRAIL.0 a été évaluée chez le macaque et le chimpanzé car le système TRAIL chez le singe est très proche de celui de l'Homme. Ces études n'ont pas révélé de toxicité suite à l'administration intraveineuse de TRAIL (Ashkenazi et al., 1999; Kelley et al., 2001). La demi-vie du TRAIL.0 chez les primates est située entre 21 et 31 minutes, avant d'être éliminé principalement par les reins.

Afin d'optimiser l'efficacité de TRAIL dans les cellules qui expriment les récepteurs antagonistes TRAIL-R3 ou TRAIL-R4, d'autres ligands « non taggés » ont été produits. Ces ligands portent des mutations ponctuelles qui augmentent leur spécificité vis-à-vis de TRAIL-R1 ou de TRAIL-R2, et diminuent leur affinité pour les récepteurs antagonistes (Kelley et al., 2005; MacFarlane et al., 2005; van der Sloot et al., 2006). A l'heure actuelle, peu de données sont disponibles concernant ces ligands modifiés. Des études précliniques et cliniques seront donc requises pour démontrer les avantages de ces constructions par rapport au TRAIL recombinant classique.

1.5.b - Anticorps agonistes

Une autre stratégie pour activer la signalisation par TRAIL est l'utilisation d'anticorps agonistes dirigés contre les récepteurs de TRAIL (**Tableau 2**). Ces anticorps sont capables d'engager la signalisation de TRAIL de la même façon que le ligand, en agrégeant les récepteurs à la membrane. L'avantage de cette approche est de pouvoir cibler spécifiquement TRAIL-R1 ou TRAIL-R2, sans engager les récepteurs antagonistes TRAIL-R3 et TRAIL-R4. D'autre part, la demi-vie de ces anticorps est beaucoup plus élevée que celle du TRAIL recombinant soluble. Certains anticorps, en particulier les IgG1, ont également le potentiel de stimuler la reconnaissance et la phagocytose des cellules tumorales par le système immunitaire inné (*antibody-dependent cellular cytotoxicity*, ou ADCC), accentuant la réponse anti-tumorale (Presta, 2002). Ainsi, leur forte affinité envers les récepteurs de TRAIL, leur spécificité et leur biodisponibilité font de ces anticorps agonistes des outils prometteurs pour une utilisation thérapeutique. Des anticorps monoclonaux ont par ailleurs déjà fait leurs preuves en thérapie anti-cancéreuse, comme le Rituximab (anti-CD20) contre les lymphomes

B non-Hodgkiniens, ou le Traztuzumab (HerceptineTM, anti-HER2-Neu) contre les cancers du sein métastatiques.

Actuellement, 7 anticorps monoclonaux dirigé contre TRAIL-R1 ou TRAIL-R2 sont en cours d'essai clinique de phase I/II (**Tableau 2**).

Globalement, les résultats indiquent que les anticorps administrés sont bien tolérés par l'organisme, que leur demi-vie est satisfaisante (plusieurs jours) et qu'ils présentent une activité anti-tumorale chez certains patients. L'anticorps le plus étudié pour l'instant est le Mapatumumab, développé par la compagnie Human Genome Sciences et dirigé contre TRAIL-R1. Deux études de phase I, conduites chez des patients atteints de tumeurs solides avancées, ont montré l'absence de toxicité de cet anticorps (Tolcher et al., 2007; Hotte et al., 2008). Des essais cliniques de phase II ont par la suite été réalisés chez des malades atteints de lymphomes B non-Hodgkiniens (Moretto and Hotte, 2009). Parmi les 40 patients, une régression tumorale a été observée chez 3 patients (dont une rémission complète) et une stabilisation de la maladie dans 30 % des cas. D'autres études de phase II sur des patients atteints de cancer du poumon non à petites cellules ou de cancer colorectal ont montré, dans les meilleurs des cas, uniquement une stabilisation de la maladie (environ 30 % des cas) (Moretto and Hotte, 2009).

1.5.c - Autres formulations

Malgré des essais cliniques encourageants, l'utilisation du TRAIL recombinant en clinique est compromise par sa demi-vie courte et par le fait que les récepteurs de TRAIL soient exprimés sur les cellules saines, pouvant ainsi engendrer des effets secondaires non désirés. Des chercheurs ont donc mis au point des formulations capables de cibler directement le site tumoral. Une protéine de fusion a ainsi été générée en assemblant la séquence de TRAIL avec le fragment variable d'un anticorps dirigé contre le marqueur tumoral CD19 (Stieglmaier et al., 2008). Ce ligand, appelé scFvCD19:sTRAIL, est capable de se fixer spécifiquement sur les cellules CD19-positives et d'induire leur mort par apoptose. L'efficacité préclinique du scFvCD19:sTRAIL a été validée sur des cellules leucémiques dérivées de patients, tandis que les cellules sanguines saines ne sont pas affectées.

Une seconde stratégie consiste à prolonger la biodisponibilité du TRAIL recombinant, en utilisant une formulation basée sur l'utilisation de nanoparticules. Chez le rat, l'administration de TRAIL encapsulé dans des nanoparticules constituées de sérumalbumine humaine, permet de multiplier par 9 la biodisponibilité de TRAIL, tout en préservant l'activité biologique du ligand (Kim et al., 2010). Une heure après injection des nanoparticules, la distribution de TRAIL au niveau de la tumeur est alors 14 fois supérieure par rapport au ligand injecté seul. Un autre moyen pour stabiliser le ligand est l'utilisation d'acide hyaluronique qui, en se complexant avec TRAIL, conduit à la formation de nanocomplexes injectables (Na et al., 2008). Cette formulation permet de prolonger la biodisponibilité de TRAIL chez le rat pendant près de 5 jours, contre 12 heures avec le ligand seul. Enfin, des nanoparticules composées de polyéthylène glycol et d'albumine dans lesquelles un ADN plasmidique codant TRAIL a été introduit ont donné des résultats intéressants *in vivo* (Lu et al., 2006). Cette dernière technique serait notamment applicable pour le traitement des gliomes, les nanoparticules utilisées pouvant efficacement traverser la barrière hémato-encéphalique.

Quelle que soit la formulation de TRAIL utilisée, le problème majeur des monothérapies est la présence systématique d'une proportion de cellules résistantes au traitement. De ce fait, la solution pour augmenter l'efficacité du traitement est de combiner TRAIL avec un autre agent anticancéreux. Les thérapies combinées agissent de façon synergique et réduisent significativement le nombre de cellules résistantes. Les différentes combinaisons employées sont l'objet du chapitre suivant.

II - Comment restaurer et optimiser la sensibilité à TRAIL?

Comme nous venons de le voir, les essais cliniques réalisés sur des patients malades ont montré que TRAIL ou les anticorps agonistes des récepteurs de TRAIL peuvent être administré sans effets secondaires délétères. Cependant, l'efficacité anti-tumorale de ces molécules n'est pas satisfaisante, puisqu'on assiste dans la plupart des cas à une stabilisation de la maladie plutôt qu'à une rémission de la tumeur. La stratégie consistant à combiner TRAIL ou les anticorps agonistes avec d'autres agents anti-cancéreux est en revanche très prometteuse. Ce type de thérapie permet de sensibiliser à TRAIL des cellules cancéreuses initialement résistantes à TRAIL, évitant ainsi la récurrence de la maladie. Ce chapitre passe en revue quelques unes des nombreuses stratégies combinatoires par TRAIL rapportées jusqu'ici.

II.1 - Sensibilisation à TRAIL par la radiothérapie

Certaines cellules cancéreuses sont résistantes à TRAIL en raison d'un défaut d'expression de TRAIL-R1 et TRAIL-R2. Ces deux récepteurs sont sous le contrôle de p53, un facteur de transcription activé consécutivement à des dommages à l'ADN. Par conséquent, de part leur capacité à endommager l'ADN, les radiations électromagnétiques peuvent potentiellement stimuler l'expression des récepteurs de TRAIL dans ces cellules résistantes. Cette hypothèse a été vérifiée dans de nombreux types de cellules cancéreuses, où la radiothérapie sensibilise les cellules à TRAIL en augmentant l'expression de TRAIL-R1 et/ou TRAIL-R2 (Di Pietro et al., 2001; Marini et al., 2005; Maduro et al., 2008; Hori et al., 2010). Par ailleurs, cet effet combiné de TRAIL et de la radiothérapie ne porte pas atteinte aux cellules non-cancéreuses. La stimulation de l'expression des récepteurs de TRAIL par les radiations ionisantes n'est cependant pas toujours observée lors de la synergie du traitement combiné. D'autres mécanismes d'actions sont alors impliqués, comme par exemple l'accélération de la formation du DISC par TRAIL, rapportée dans la lignée leucémique Jurkat (Verbrugge et al., 2008). Dans ce cas, le recrutement des caspases initiatrices -8 et -10 intervient beaucoup plus rapidement et l'activation de la voie extrinsèque est alors suffisante pour induire l'apoptose, indépendamment de la voie intrinsèque. Cependant, dans d'autres modèles cellulaires, la voie intrinsèque semble nécessaire à l'efficacité du traitement. En effet, la protéine p53 est connue

pour être un activateur de la voie mitochondriale de l'apoptose. En utilisant un modèle tumoral de prostate chez la souris, une équipe a montré que les radiations induisent l'expression de Bax et Bak *via* p53, ce qui participe à la sensibilisation à TRAIL de la tumeur (Shankar et al., 2004). Une étude préclinique sur des cellules de gliome a confirmé que la voie mitochondriale est parfois nécessaire à l'effet synergique de la radiothérapie et de TRAIL (Nagane et al., 2007). Par ailleurs, des expériences menées sur des carcinomes déficients pour Bax ont montré que ces cellules étaient résistantes au traitement combiné, mais que la ré-expression exogène de Bax permettait de restaurer la réponse au traitement (Wendt et al., 2005). Enfin, de la même façon que pour TRAIL, les radiations sont capables d'augmenter l'efficacité des anticorps agonistes Mapatumumab et Lexatumumab (Marini et al., 2006; Marini et al., 2009). L'utilisation des radiations combinées à TRAIL représente donc une stratégie pertinente dans le cadre d'une thérapie personnalisée des patients dont les tumeurs expriment le facteur de transcription p53. Des essais cliniques devront être conduits pour vérifier l'efficacité et l'absence d'effets secondaires de ce traitement.

II.2 - Combinaison de TRAIL avec des agents chimiothérapeutiques classiques

La chimiothérapie classique utilise différents composés, qui sont classés en fonction de leur mode d'action : les agents alkylants, les anti-métabolites, les intercalants, les anti-mitotiques ou encore les inhibiteurs de topoisomérases. Les agents chimiothérapeutiques activent des voies de signalisation intracellulaires qui conduisent à la mort de la cellule, notamment en activant la voie mitochondriale de l'apoptose. La chimiothérapie est donc potentiellement intéressante pour sensibiliser les cellules qui sont résistantes à TRAIL, à savoir les cellules dont la voie extrinsèque n'est pas suffisante pour induire l'apoptose. Dans cette partie, nous passerons en revue les différentes combinaisons thérapeutiques alliant TRAIL à des agents chimiothérapeutiques standards, ainsi que les mécanismes d'action proposés.

II.2.a - Les agents alkylants

Cette classe pharmacologique regroupe des composés capables de créer des liaisons covalentes au niveau des acides nucléiques, empêchant ainsi la réplication et la transcription

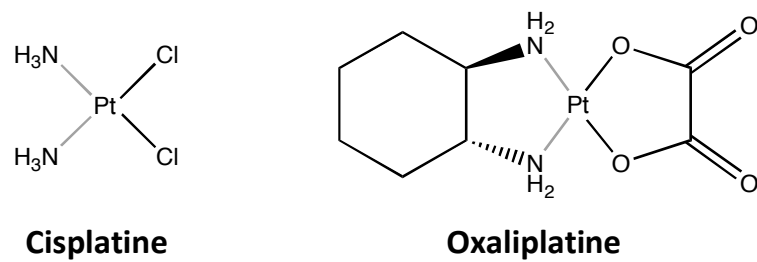


Figure 11: Structure chimique du cisplatine et de l'oxaliplatine

de l'ADN. La division cellulaire n'est plus possible et l'ADN ne peut pas être réparé, ce qui conduit au déclenchement de l'apoptose. Les principaux agents alkylants sont le cisplatine, l'oxaliplatine et le cyclophosphamide. Ce dernier n'a pour l'instant pas été testé en combinaison avec TRAIL.

Le **cisplatine (Figure 11)** est un complexe organométallique à base de platine qui est couramment utilisé en chimiothérapie anti-cancéreuse. Le cisplatine favorise l'induction de l'apoptose par TRAIL en augmentant l'expression de TRAIL-R1 et/ou TRAIL-R2 dans plusieurs types de carcinomes (Lacour et al., 2003; Kondo et al., 2006). Néanmoins, le mécanisme de sensibilisation peut également intervenir indépendamment d'une régulation des récepteurs de TRAIL. Par exemple, le cisplatine est capable de sensibiliser différentes cellules primaires de mélanome en inhibant la protéine c-FLIP (Song et al., 2003a). Le cisplatine peut également sensibiliser les cellules cancéreuses à TRAIL en activant la boucle mitochondriale de l'apoptose. En effet, l'expression ectopique de Bcl-2 dans des cellules de cancer œsophagien abolit totalement l'effet synergique du traitement combiné (Tsai et al., 2006). D'autre part, une dérégulation de l'expression de Bcl-2 est parfois observée lors du traitement, ce qui peut expliquer l'activation de la mitochondrie (Liu et al., 2006). Une observation intéressante est que le statut de p53 ne semble pas déterminant pour l'efficacité du cisplatine lorsqu'il est combiné à TRAIL (Shin et al., 2002; Woods et al., 2008). Le cisplatine est également capable de favoriser l'induction de l'apoptose par les anticorps agonistes des récepteurs de TRAIL (Belyanskaya et al., 2007). L'effet combiné du Lexatumumab et du cisplatine permet, par exemple, de tuer différentes lignées de cancers solides en augmentant à la fois l'expression de TRAIL-R2 et de Bax, ce qui s'accompagne par une activation de la voie mitochondriale (Wu and Kakehi, 2009). Par ailleurs, un essai clinique de phase I a montré que la combinaison du Mapatumumab avec le cisplatine et la gemcitabine est bien tolérée (Mom et al., 2009). Parmi les 49 patients atteints de tumeurs solides avancées, une réponse anti-tumorale partielle a été obtenue dans 20 cas et une stabilisation dans 25 cas.

L'**oxaliplatine (Figure 11)** est un sel de platine structuellement différent du cisplatine, ce qui lui confère des propriétés anti-cancéreuses distinctes. En effet, les cellules qui sont devenues résistantes au cisplatine restent sensibles à l'oxaliplatine. Quelques études ont rapporté l'effet synergique de la combinaison de l'oxaliplatine avec TRAIL et le mécanisme associé. Par exemple, dans plusieurs lignées de cancers gastriques, le traitement par l'oxaliplatine induit la redistribution de TRAIL-R1 et TRAIL-R2 au sein de radeaux lipidiques, facilitant ainsi

l'induction de l'apoptose par TRAIL (Xu et al., 2009). Tout comme le cisplatine, l'oxaliplatine est capable d'inhiber c-FLIP pour sensibiliser les cellules à TRAIL (Galligan et al., 2005). Dans cette étude, le statut de p53 (sauvage, muté ou invalidé) n'influence pas l'efficacité du traitement combiné. Néanmoins, des résultats contradictoires ont été publiés quant à l'influence de p53 sur le traitement. En effet, nous avons montré, en collaboration avec une équipe lyonnaise, que l'oxaliplatine sensibilise efficacement à TRAIL des carcinomes coliques dont le gène p53 est muté, tandis que les cellules exprimant le gène p53 de type sauvage répondent mal au traitement (Toscano et al., 2008). L'explication résiderait dans le fait que dans les cellules p53^{+/+}, l'oxaliplatine active p53 qui induit à son tour l'expression du récepteur antagoniste TRAIL-R3 et inhibe la formation du DISC de TRAIL. Le statut de p53 devra donc être pris en considération dans le cadre de l'évaluation clinique de ce traitement.

Durant ma thèse, j'ai également participé à un travail décrivant un nouveau mécanisme de synergie entre l'oxaliplatine et TRAIL, en collaboration avec l'équipe de Jean-Christophe Saurin, à l'INSERM U865 de Lyon. Ces travaux, présentés en **Annexe II**, ont été conduits par la doctorante Zyneb El Fajoui et ont été soumis à publication. Ce travail montre qu'un prétraitement par l'oxaliplatine permet de sensibiliser des cellules de cancer colorectal résistantes à TRAIL. L'effet synergique requiert l'activation de la voie mitochondriale puisque l'inhibition de Bak, de Bax ou de la caspase-9, tout comme la surexpression de Bcl-XL, bloque la synergie. Cette activation mitochondriale par l'oxaliplatine est dépendante de la voie JNK et se traduit par la phosphorylation de Bcl-XL. La forme phosphorylée de Bcl-XL n'est plus capable de séquestrer Bax et la résistance induite par Bcl-XL est ainsi levée. Ma contribution à ce travail a consisté, entre autres, à générer des vecteurs plasmidiques de Bcl-XL mutés au niveau des sites de phosphorylation, et à surexprimer ces mutants de façon stable dans différentes lignées cancéreuses.

II.2.b - Les anti-métabolites

Les anti-métabolites sont des composés qui, de par leur structure, interfèrent avec la synthèse des bases puriques et pyrimidiques qui composent les acides nucléiques. Le 5-fluorouracile (5-FU), le méthotrexate et la gemcitabine appartiennent à cette classe médicamenteuse (**Figure 12**).

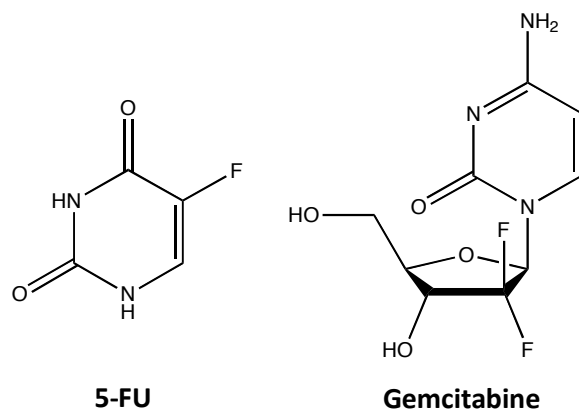


Figure 12: Structure chimique du 5-fluorouracile (5-FU) et de la gemcitabine

Le **5-FU** est un analogue de l'uracile qui agit par inhibition de la thymidylate synthase, une enzyme essentielle à la biosynthèse de l'ADN. Le traitement de lignées cancéreuses coliques par une dose subtoxique de 5-FU permet de sensibiliser efficacement ces cellules à l'apoptose induite par TRAIL, quel que soit le statut du suppresseur de tumeur p53 (Galligan et al., 2005). Dans cette étude, le mécanisme de sensibilisation repose sur l'inhibition de c-FLIP_L, tandis que la quantité de récepteurs de TRAIL exprimés à la membrane n'est pas modifiée par le traitement. L'inhibition de c-FLIP par le 5-FU a également été rapportée dans des lignées de carcinomes hépatiques et de colon, ce qui favorise le recrutement et l'activation de la caspase-8 dans le DISC de TRAIL (Lacour et al., 2003; Ganten et al., 2004). Dans un modèle *in vitro* de cancer prostatique et colique, une autre équipe a montré l'importance de la voie mitochondriale dépendante de Bax, mais pas de Bak, lors du traitement combiné (von Haefen et al., 2004). Par ailleurs, une étude réalisée sur des cellules primaires a montré qu'un traitement associant le 5-FU et TRAIL n'exerce pas de toxicité sur des hépatocytes sains, ce qui n'est pas le cas d'un traitement cisplatine/TRAIL (Meurette et al., 2006).

La **gemcitabine** (2',2'-difluorodeoxycytidine) est un analogue de la désoxycytidine très utilisé dans le traitement du cancer de la vessie. Ce composé agit de façon synergique avec TRAIL dans différents modèles *in vitro*. Des cellules de cancer prostatique résistantes à la combinaison de TRAIL avec le cisplatine, l'étoposide, le paclitaxel, ou même les radiations, peuvent être sensibilisées à TRAIL par la gemcitabine (Zisman et al., 2001). Les mécanismes moléculaires impliqués dans cette synergie sont encore mal connus, mais on observe généralement au cours du traitement une activation de la voie mitochondriale (Liu et al., 2001). Une amplification mitochondriale est également observée dans lignée d'adénocarcinome pulmonaire A549, tout comme une induction de l'expression de p53 et TRAIL-R2 (Seol et al., 2007). Enfin, les essais cliniques de phase I ont montré qu'un traitement associant la gemcitabine au mapatumumab est bien toléré chez les patients (Mom et al., 2009).

Contrairement au 5-FU, les seules études publiées sur l'association du **méthotrexate** et de TRAIL ont montré l'absence d'efficacité de cette combinaison thérapeutique, en l'occurrence sur des cancers osseux (Evdokiou et al., 2002; Sun et al., 2007) et des cancers du sein (Keane et al., 1999).

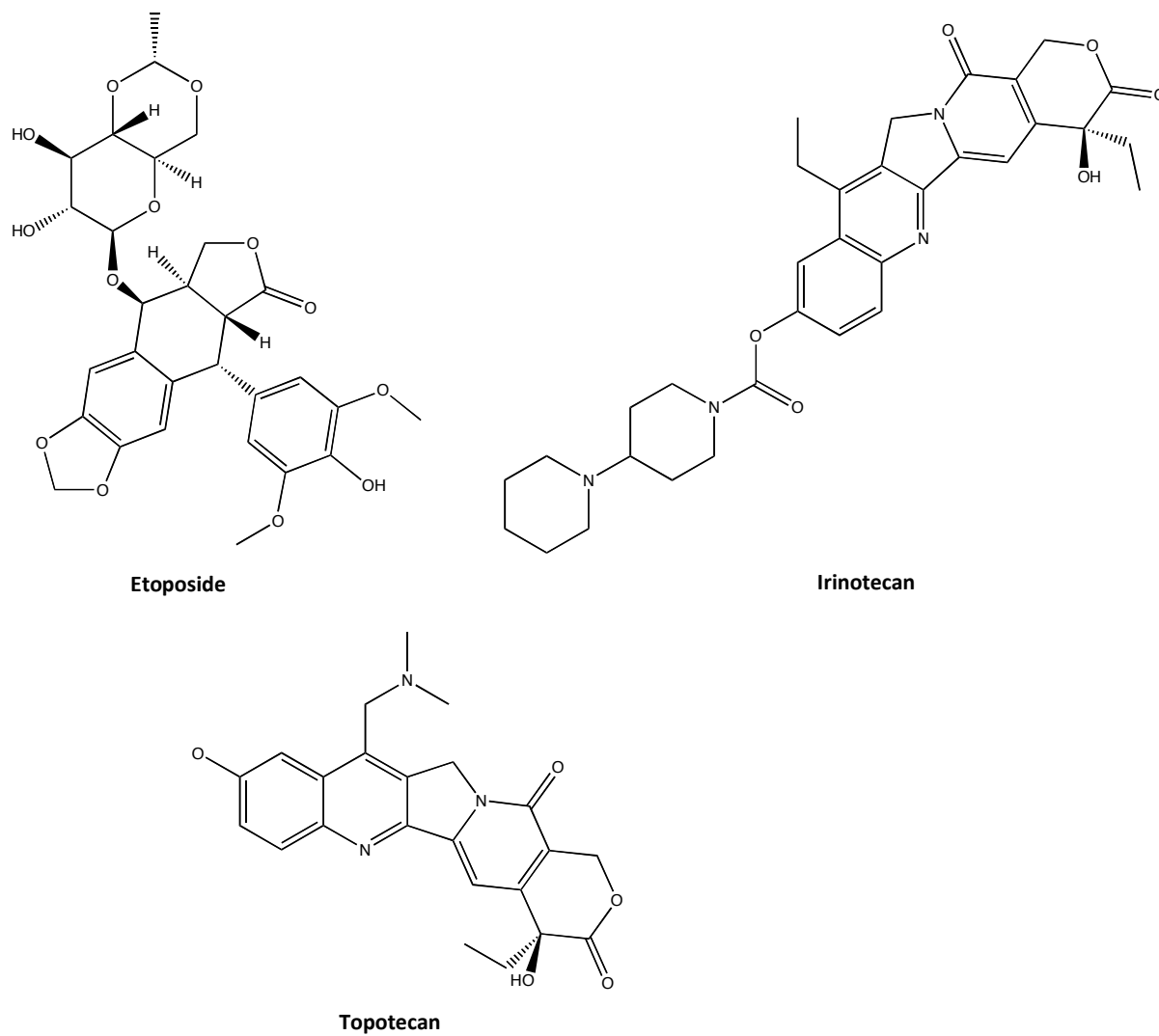


Figure 13: Structure chimique de l'étoposide, de l'irinotecan et du topotecan.

II.2.c - Les inhibiteurs de topoisomérases

Les topoisomérases sont des enzymes indispensables au « déroulement » de l'ADN, une étape nécessaire avant la transcription ou la réplication. L'inhibition de ces enzymes provoque des cassures de l'ADN et induit principalement la mort des cellules en phase S. Plusieurs inhibiteurs de topoisomérases sont couramment utilisés en chimiothérapie, dont l'étoposide, l'irinotecan et le topotécan (**Figure 13**).

L'**étoposide** (dont l'abréviation usuelle est VP-16) est un alcaloïde dont les indications en thérapie anti-cancéreuse sont nombreuses, et dont le mode d'action repose sur l'inhibition de la topoisomérase II. Des cellules cancéreuses résistantes à TRAIL peuvent être rendue sensibles au ligand après un traitement par l'étoposide. Par exemple, des traitements répétés par des doses subtoxiques de TRAIL induisent une résistance à l'apoptose en raison de la perte d'expression de TRAIL-R1 et TRAIL-R2 à la membrane, ou encore par l'induction de c-FLIP (Yoshida et al., 2009). Cette résistance à TRAIL peut être contournée efficacement en combinant TRAIL avec l'étoposide. Les mécanismes moléculaires proposés sont variés et dépendent probablement de plusieurs facteurs tels que le type de cancer ou la lignée cellulaire utilisée.

La sensibilisation à TRAIL de la lignée de carcinome prostatique PC-3 par l'étoposide est accompagnée d'une inhibition de NF- κ B, mais aussi d'une augmentation de l'expression de TRAIL-R2 *via* l'inhibition du répresseur transcriptionnel YY1 (*Ying Yang 1*) (Baritaki et al., 2007). Dans plusieurs lignées de cancer du sein, les deux récepteurs agonistes TRAIL-R1 et TRAIL-R2 sont induits par un mécanisme dépendant de NF- κ B (Gibson et al., 2000). De la même façon, le facteur de transcription NF- κ B est nécessaire à l'induction de l'expression de TRAIL-R1 induite par l'étoposide dans les cellules de colon HT29 (Mendoza et al., 2008). Par ailleurs, l'étoposide diminue l'expression de c-FLIP dans des lignées d'ostéosarcomes, alors que dans les cellules saines, qui sont résistantes au traitement combiné, c'est l'effet inverse qui est observé (Van Valen et al., 2003).

L'implication de la mitochondrie au cours de la sensibilisation par l'étoposide a été démontrée en utilisant des cellules HeLa de cancer du col de l'utérus déficientes pour Bid. Tandis que les cellules HeLa de type sauvage répondent efficacement à la combinaison de TRAIL avec l'étoposide, les cellules HeLa-Bid^{-/-} sont résistantes à ce traitement (Kohler et

al., 2008). L'induction de l'expression de Bax par l'étoposide a par ailleurs été rapportée lors du traitement combiné (Miao et al., 2003).

La voie des MAPK peut également jouer un rôle dans la synergie, puisque l'utilisation de dominant-négatifs des protéines JNK interfère avec l'efficacité du traitement dans des lignées de mésothéliome (Vivo et al., 2003).

Les expériences *in vivo* menées sur des souris xénogreffées avec des cellules humaines de cancer de la prostate ont montré que le traitement séquentiel par l'étoposide puis par TRAIL permet la régression complète de la tumeur (Shankar et al., 2005). En plus de l'induction de l'apoptose, une inhibition de l'angiogenèse tumorale a été observée. Le traitement séquentiel est également efficace sur des souris portant des xénogreffes humaines de cancer du sein (Singh et al., 2003).

L'**irinotecan** est un inhibiteur de la topoisomérase I indiqué contre les cancers colorectaux avancés. Plusieurs études précliniques ont rapporté l'action synergique de cette molécule avec TRAIL sur des cellules cancéreuses. Une équipe a montré sur des cellules cancéreuses coliques que l'effet synergique était accompagné de l'inhibition de c-FLIP, indépendamment de p53, et que l'expression des récepteurs de TRAIL n'était pas modifiée (Galligan et al., 2005). A l'inverse, dans un modèle de carcinome colique HCT116 Bax^{-/-}, la synergie intervient indépendamment de la mitochondrie en stimulant l'expression de TRAIL-R2 par p53 (Wang and El-Deiry, 2003). *In vivo*, le traitement combiné TRAIL-Irinotecan élimine les xénogreffes tumorales coliques ainsi que les métastases hépatiques associées, quel que soit le statut de p53 (Ravi et al., 2004). Les auteurs ont montré que le mécanisme de sensibilisation à TRAIL par l'Irinotecan diffère selon le statut de p53. Dans les tumeurs p53^{+/+}, l'Irinotecan induit l'expression de PUMA et Noxa *via* p53, tandis que dans les cellules p53^{-/-}, l'Irinotecan diminue l'expression de Bcl-XL et XIAP en inhibant la voie JAK2-STAT3. Cet agent chimiothérapeutique peut donc induire une voie de signalisation indépendante de p53, ce qui est particulièrement intéressant en thérapie anti-cancéreuse puisque presque 50 % des tumeurs présentent un défaut dans la signalisation par p53.

Le **topotécan** est un agent chimiothérapeutique utilisé contre les cancers de l'ovaire, du poumon ou de l'utérus. Ce composé induit des cassures monobrin de l'ADN en inhibant la topoisomérase I. L'action synergique du topotécan combiné à TRAIL a été démontrée sur plusieurs types cellulaires de cancers humains, mais le mécanisme moléculaire qui entre en jeu n'est pas encore clarifié. Dans la lignée DU145 de cancer de la prostate, le topotécan

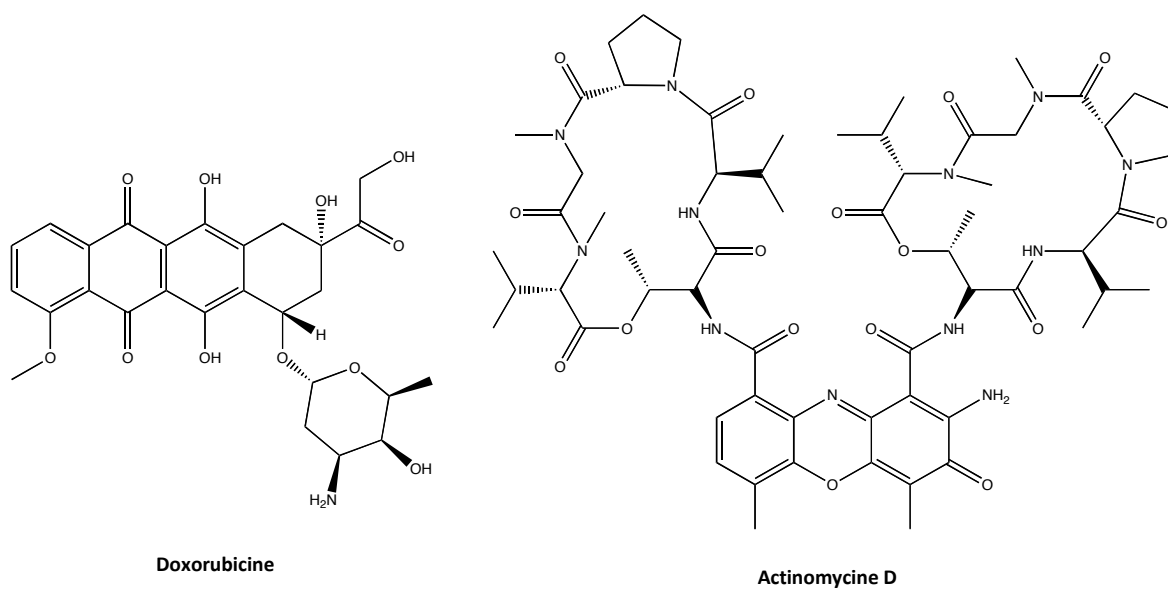


Figure 14: Structure chimique de la doxorubicine et de l'actinomycine D.

stimule l'expression de TRAIL-R1 et TRAIL-R2, tandis que l'expression de la survivine est inhibée (Griffith and Kemp, 2003). Toutefois, cette étude ne précise pas si ces événements moléculaires sont à l'origine de la sensibilisation de ces cellules à TRAIL. Dans différentes lignées de gliomes humains, le topotécan augmente l'expression de TRAIL-R2 et diminue celle de TRAIL-R4, *via* p53 (Rohn et al., 2001). Cependant, ce processus n'est pas responsable de l'effet synergique observé puisque l'introduction d'un dominant-négatif de p53 n'influe pas sur la réponse au traitement. La synergie du traitement repose plus probablement sur l'activation de la mitochondrie qui conduit au relargage du cytochrome c dans le cytoplasme.

II.2.d - Les agents intercalants

Les agents intercalants exercent leur effet cytotoxique en se fixant rapidement entre les deux brins d'ADN, bloquant ainsi la synthèse de l'ADN et de l'ARN. C'est le cas de la doxorubicine et de l'actinomycine D (**Figure 14**).

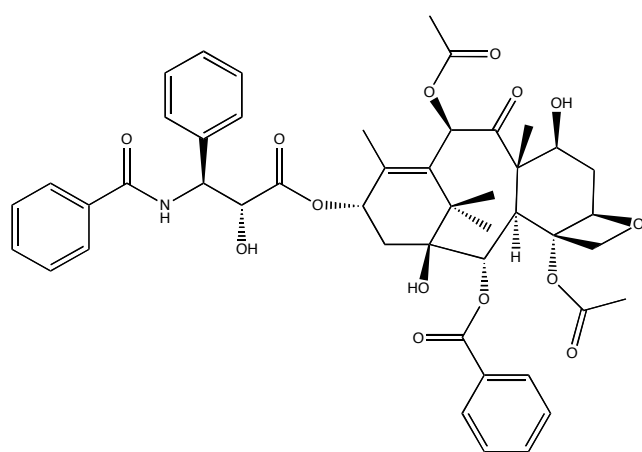
La **doxorubicine** (Adriamycine™) est un intercalant indiqué dans de nombreux types de cancers. Son efficacité en combinaison avec TRAIL a été démontrée *in vivo* dans un modèle murin de sarcomes de tissus mous humains (Wang et al., 2010). Un pré-traitement par la doxorubicine permet de sensibiliser les cellules de prostate DU145 et LNCaP à la mort induite par TRAIL, ce qui est accompagné d'une inhibition de l'isoforme court de c-FLIP (Kelly et al., 2002). Dans ces cellules, les niveaux protéiques de TRAIL-R1, TRAIL-R2, Bax, Bcl-2 ou Bcl-XL restent inchangés. Dans la lignée d'ostéosarcome U2OS, le traitement n'inhibe pas c-FLIP, ni les récepteurs de TRAIL, mais s'accompagne de l'inhibition de XIAP, ce qui est responsable d'une levée de la résistance à TRAIL (Mirandola et al., 2006). A l'inverse, l'expression des récepteurs TRAIL-R1 et TRAIL-R2 est induite par la doxorubicine dans plusieurs lignées de carcinomes rénaux, ce qui n'est pas observé dans des cellules de reins saines (Wu et al., 2003). Comme la majorité des drogues chimiothérapeutiques testées, la doxorubicine est capable d'augmenter la sensibilité à TRAIL en stimulant la voie mitochondriale de l'apoptose (Vaculova et al., 2010). Par ailleurs, un mécanisme original a été décrit dans des cellules leucémiques, où la doxorubicine active une acide sphingomyélinase (ASM) qui entraîne la formation de plateformes membranaires enrichies en céramides (Dumitru et al., 2007). Après l'ajout de TRAIL, ces plateformes permettent

l'agrégation de TRAIL-R2 et l'induction synergique de l'apoptose. La voie JNK pourrait également intervenir dans le processus de sensibilisation par la doxorubicine, puisque l'expression d'un dominant-négatif de JNK bloque la synergie dans les cellules tumorales mammaires MCF-7 (Li et al., 2006). Enfin, une étude a montré que la doxorubicine pouvait potentiellement restreindre l'action de TRAIL dans certaines lignées, en induisant l'expression du récepteur antagoniste TRAIL-R3 par le biais de p53 (Ruiz de Almodovar et al., 2004). Cette observation suggère de prendre en compte le statut de p53 préalablement à l'utilisation de ce traitement combiné.

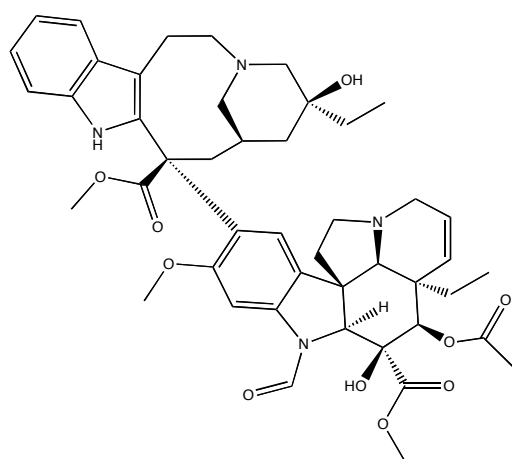
L'**actinomycine D** est un composé aromatique comportant deux chaînes polypeptidiques identiques, dont la structure plane permet une intercalation au niveau de séquences spécifiques de l'ADN. *In vivo*, la co-administration de TRAIL et de l'actinomycine D chez la souris entraîne la suppression de tumeurs métastatiques du foie (Ishii et al., 2007). Plusieurs mécanismes pouvant expliquer l'action synergique de ces composés ont été rapportés. L'inhibition de c-FLIP lors du co-traitement a été observée dans des cellules cancéreuses de colon (Hernandez et al., 2001) et des leucémies primaires (Olsson et al., 2001), mais aucune preuve n'est apportée quant à l'importance de cette régulation dans l'obtention de l'effet synergique. L'inhibition de c-FLIP n'est d'ailleurs pas surprenante car l'actinomycine D est connue pour être un puissant inhibiteur de la transcription, ce qui a pour conséquence la diminution des taux de protéines à demie-vie courte, telles que c-FLIP. L'inhibition de XIAP par des doses subtoxiques d'actinomycine D a également été rapportée dans des carcinomes prostatiques, ce qui est associé à une sensibilisation à TRAIL (Ng et al., 2002). Enfin, une étude sur des lignées de neuroblastomes a montré que l'actinomycine D peut agir sur des voies indépendantes des caspases par le biais d'une augmentation de l'expression de AIF (Wang et al., 2007).

II.2.e - Les anti-mitotiques

Cette classe d'agents chimiothérapeutiques agit spécifiquement par blocage de la division cellulaire en perturbant le fuseau mitotique. La vincristine et le paclitaxel sont deux anti-mitotiques courants en thérapie anti-tumorale (**Figure 15**).



Paclitaxel



Vincristine

Figure 15: Structure chimique du paclitaxel et de la vincristine.

Le **paclitaxel** (TaxolTM) et le docétaxel (taxotèreTM), isolés à l'origine à partir de l'écorce d'if, stimulent l'assemblage des microtubules et empêchent leur dépolymérisation. Ce phénomène inhibe la réorganisation dynamique normale du réseau de microtubules, ce qui est indispensable au cours de l'interphase ou de la mitose. Un prétraitement par ces composés favorise l'apoptose induite par TRAIL dans des cellules de cancer prostatique, ce qui s'accompagne d'une stimulation de la voie mitochondriale (Nimmanapalli et al., 2001). Les niveaux protéiques de TRAIL-R1 et TRAIL-R2 sont également augmentés, ce qui n'est pas le cas de TRAIL-R3 ou TRAIL-R4. La surexpression exogène de Bcl-2 dans des lignées de cancer du poumon neutralise la synergie, soulignant le rôle important de la boucle d'amplification mitochondriale (Abou El Hassan et al., 2004; Nguyen et al., 2006). Une autre étude a mis en avant l'effet du paclitaxel sur l'inhibition d'Akt *via* la formation de céramides dans des cellules de cancer du rein, ce qui n'est pas observé dans les cellules saines (Asakuma et al., 2003). Enfin, cette combinaison a également été testée avec succès dans un modèle *in vivo* de glioblastome, ce qui précise son potentiel thérapeutique (Dorsey et al., 2009).

La **vincristine** (OncovinTM) est un alcaloïde qui entraîne un arrêt en métaphase de la division cellulaire, par fixation sur la tubuline intracellulaire du fuseau. Peu d'études ont étudié son association avec TRAIL. Une synergie a notamment été observée dans des cellules malignes du sein (Singh et al., 2003) et de la prostate (Shankar et al., 2005; Baritaki et al., 2007). L'expression des récepteurs TRAIL-R1 et TRAIL-R2 est augmentée lors du traitement, mais le mécanisme de sensibilisation n'a pas été exploré plus en détail.

Dans l'ensemble, et quel que soit la drogue chimiothérapeutique utilisée, les mécanismes que nous venons de décrire sont très variés et ne permettent pas de mettre en avant un mécanisme universel de sensibilisation à TRAIL. L'effet au niveau moléculaire dépend en effet de nombreux paramètres, tels que le contexte cellulaire (cellules de type I ou II), les lignées utilisées, ainsi que les conditions de traitement.

II.3 - Autres composés anti-cancéreux combinés à TRAIL

II.3.a - Les polyphénols: des alliés polyvalents du système TRAIL

Depuis quelques années, on constate un intérêt grandissant pour les composés naturels pour traiter diverses pathologies. Certains composés végétaux ont déjà fait leurs preuves en tant que drogues chimiothérapeutiques. C'est le cas des taxanes, ces molécules extraites de l'écorce du conifère *Taxus brevifolia* il y a plus de 40 ans, et dont le TaxolTM et le TaxotèreTM sont toujours les produits phares. Plus récemment, une autre classe de composés naturels suscite l'intérêt des chercheurs : les polyphénols.

Les polyphénols sont produits par les plantes où ils jouent un rôle dans les mécanismes de défense contre les pathogènes ou les radiations UV. Ces molécules sont également des pigments qui donnent leurs couleurs aux plantes. Dans notre alimentation, les polyphénols sont présents dans les fruits et les légumes, mais aussi dans le vin, le thé ou le café. L'apport alimentaire de ces composés aurait des effets bénéfiques dans la prévention de pathologies diverses, telles que les maladies neurodégénératives, cardiovasculaires, l'ostéoporose ou le cancer. Des compléments alimentaires enrichis en polyphénols sont d'ores et déjà en vente dans le commerce. L'activité biologique des polyphénols est principalement attribuée à leurs propriétés antioxydantes, de par leur structure chimique et la présence de groupements hydroxyles réactifs.

En plus de leur action préventive, les polyphénols ont également un potentiel thérapeutique intéressant. A de fortes concentrations, ils sont capables d'induire l'apoptose de cellules cancéreuses, mais de telles concentrations sont peu compatibles avec une application clinique. En revanche, des études précliniques ont montré que leur utilisation à des doses subtoxiques permettait de sensibiliser des cellules tumorales résistantes à TRAIL. Depuis 2002, de nombreuses publications ont rapporté l'effet synergique de TRAIL en association avec différentes classes de polyphénols. Ce type de traitement combiné agit efficacement contre les cellules tumorales sans affecter les cellules saines, ce qui en fait une stratégie thérapeutique prometteuse.

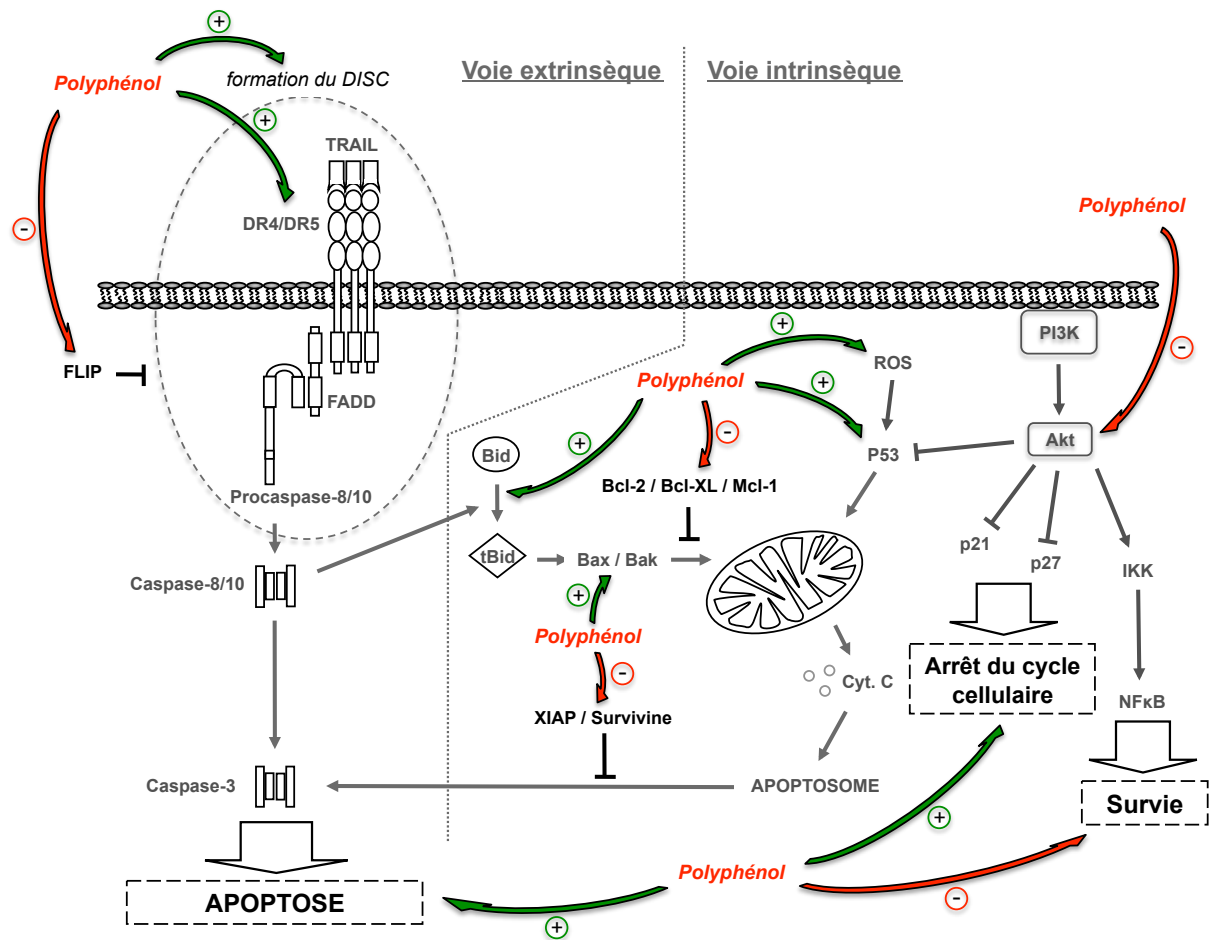


Figure 16 : Schématisation des modes d'action des polyphénols sur la signalisation par TRAIL.

Les polyphénols sont capables de moduler à la fois la voie intrinsèque et la voie extrinsèque, mais aussi des suppresseurs de tumeur tels que p53 ou des protéines de survie telles que Akt. Les cibles moléculaires des polyphénols varient en fonction de la structure des composés polyphénoliques et du type cellulaire. Ce schéma reprend uniquement les cibles principales rapportées jusqu'à présent.

La combinaison de TRAIL avec les polyphénols a fait l'objet d'une revue rédigée durant ma thèse, présentée en **Annexe III**, et publiée début 2010 dans le journal *Cellular and Molecular Life Sciences* (Jacquemin et al., 2010).

Cette publication reprend de façon exhaustive les différents types de polyphénols qui ont été testés en association avec TRAIL, et les mécanismes responsables de la synergie y sont détaillés et discutés. Pour résumer, la littérature actuelle ne permet pas de faire ressortir un mode d'action unique. En effet, le mécanisme de sensibilisation à TRAIL varie probablement en fonction de la lignée utilisée, du contexte cellulaire, de la structure du polyphénol et des conditions de traitement. Le polyphénol est capable d'agir au niveau de la voie intrinsèque et/ou extrinsèque pour contourner la résistance à TRAIL, en modulant des régulateurs clefs de l'apoptose tels que les récepteurs de TRAIL, c-FLIP, les protéines des familles Bcl-2 ou IAP, divers facteurs de transcription, ou encore des voies de survie tels Akt ou les MAPK (**Figure 16**). Cette polyvalence explique comment ces composés sont capables de contourner différents types de résistance à TRAIL, comme par exemple un blocage de la voie extrinsèque, de la voie intrinsèque, ou l'activation de voies de survie. Dans la plupart des cas, le suppresseur de tumeur p53 n'est pas requis pour l'obtention de l'effet synergique.

Les études précliniques préliminaires sont donc très encourageantes quant à l'utilisation combinée des polyphénols et de TRAIL dans le cadre des futurs protocoles thérapeutiques. Après la confirmation *in vivo* de ces résultats, des essais cliniques permettront de savoir si cette combinaison représente une stratégie réaliste et efficace en thérapie anti-tumorale.

II.3.b - Autres molécules

Les histone-déacétylases (HDAC) sont des enzymes qui enlèvent un groupement acétyle sur les lysines conservées des queues amino-terminales des histones. La perte de charge qui en résulte augmente l'accessibilité à l'ADN en réduisant sa compaction et favorise la transcription. Plusieurs études précliniques ont montré que les **inhibiteurs des HDAC** agissent de façon synergique avec TRAIL par différents mécanismes, dont la stimulation de la voie mitochondriale, l'inhibition de XIAP (Rosato et al., 2003), l'augmentation de l'expression de TRAIL-R1 et TRAIL-R2 (Singh et al., 2005), l'inhibition de c-FLIP (Lagneaux et al., 2007), ou encore l'inhibition des protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 (Zhang et al., 2003a; Guo et al., 2004). La combinaison de TRAIL avec des inhibiteurs des HDAC semble donc être une stratégie pertinente.

L'utilisation d'**inhibiteurs du protéasome** avec TRAIL a donné de bons résultats précliniques dans de très nombreuses études et sur une grande variété de cancers solides ou hématologiques. Initialement, le but de cette stratégie était d'empêcher l'activation de NF- κ B en inhibant la dégradation de I κ B par le protéasome. En réalité, le spectre d'action de ces inhibiteurs est beaucoup plus large et peut agir à différents niveaux des voies intrinsèque et extrinsèque. C'est le cas du Bortezomib, un des inhibiteurs du protéasome les plus utilisés, dont l'action synergique avec TRAIL a été largement démontrée (Kruyt, 2008).

Dans le cadre d'une thérapie personnalisée, l'utilisation de **peptides mimétiques** est une autre stratégie très pertinente. Par exemple, une tumeur présentant une forte expression de Bcl-2 pourra être traitée par TRAIL en présence d'un peptide **BH3-mimétique**, dont la fonction est d'agir comme antagoniste de Bcl-2 en occupant ses sites actifs. Le BH3-mimétique le plus connu est l'ABT-737, capable d'inhiber à la fois Bcl-2 et Bcl-XL. Les premières études publiées sur la combinaison de TRAIL avec l'ABT-737 ont été concluantes, notamment sur des cellules de cancer pancréatique (Huang and Sinicrope, 2008). Un autre peptide BH3-mimétique, le peptide S1, cible Mcl-1 en plus de Bcl-2 et Bcl-XL, ce qui permettrait d'éradiquer des tumeurs exprimant simultanément ces 3 protéines (Zhang et al., 2010).

De la même façon, des peptides mimétiques des protéines IAP ont été développés sur la base de la séquence peptidique de Smac, le principal inhibiteur des IAP. Ces **Smac-mimétiques** agissent de façon synergique avec TRAIL dans plusieurs types de cancer (Bockbrader et al., 2005; Karikari et al., 2007; Dai et al., 2009).

Enfin, il est possible de combiner TRAIL avec des **anticorps dirigés contre des marqueurs tumoraux**. Par exemple, la combinaison de TRAIL avec le Rituximab (anticorps anti-CD20, un marqueur de certains lymphomes) a été évaluée en phase I d'essai clinique sur des patients atteints de lymphomes non-Hodgkiniens (Ashkenazi et al., 2008). Le traitement combiné n'est pas toxique et parmi les 5 patients traités, 2 ont eu une rémission complète de la tumeur et 2 autres ont vu une stabilisation de la maladie. Une autre stratégie basée sur l'utilisation d'anticorps vise à stimuler le système immunitaire en ciblant les **molécules de costimulation** présentes sur les cellules présentatrices d'antigène. Des essais concluants ont été conduits *in vivo* chez la souris, en utilisant un anticorps agoniste anti-TRAIL-R2 combiné à des anticorps anti-CD40 et anti-CD137 (Uno et al., 2006). Une régression tumorale complète a été obtenue dans ce modèle, *via* l'activation de lymphocytes T spécifiques de la tumeur.

CADRE & BUT DU TRAVAIL

Ces dernières années, de grands progrès ont été faits tant en matière de traitement que de détection et de prévention du cancer, comme en attestent les statistiques de la mortalité sur la période 1980-2005 (Belot et al., 2008). Pourtant, le cancer reste la première cause de mortalité en France, devant les maladies cardiovasculaires et les accidents corporels. Les thérapies anti-cancéreuses actuelles sont basées sur l'exérèse chirurgicale, la chimiothérapie, la radiothérapie, et plus récemment l'immunothérapie. Malgré des progrès significatifs, ces thérapies restent relativement inefficaces contre les stades avancés métastatiques, ou contre certains types de cancers. De plus, les effets secondaires provoqués par ces traitements sont très invalidants pour les patients. Par conséquent, la recherche de nouveaux traitements est primordiale pour offrir aux patients une thérapie plus efficace et moins éprouvante. Les pistes explorées sont nombreuses et se focalisent sur des molécules capables de restaurer des processus altérés dans les cellules cancéreuses, tels que la mort cellulaire par apoptose. Parmi ces molécules, la cytokine TRAIL semble très prometteuse, de par sa capacité à induire l'apoptose des cellules malignes tout en épargnant les cellules saines.

De très nombreuses études précliniques ont démontré l'efficacité anti-cancéreuse de TRAIL. De plus, cette protéine est bien tolérée par l'organisme après injection intraveineuse chez l'Homme. Néanmoins, les essais cliniques montrent que cette cytokine, lorsqu'elle est utilisée en monothérapie, n'induit pas un effet anti-tumoral satisfaisant pour une future utilisation clinique. L'utilisation de TRAIL nécessite donc d'être optimisée pour une future application clinique. Deux questions importantes se posent alors :

1. Quels sont les mécanismes de résistance des cellules cancéreuses à l'apoptose induite par TRAIL ?

Nous venons de voir dans le chapitre I.4 que la signalisation apoptotique par TRAIL est régulée à différents niveaux par une « balance » entre protéines pro- et anti-apoptotiques. Des déséquilibres dans cette régulation sont à l'origine d'une résistance à TRAIL. Il est important de décrypter ces mécanismes de résistance afin de pouvoir les contourner. Notre équipe s'est intéressée à deux inhibiteurs de la voie TRAIL encore peu étudiés, les récepteurs antagonistes TRAIL-R3 et TRAIL-R4. Ces récepteurs fixent le ligand TRAIL mais n'engagent pas de signal de mort en raison de l'absence d'un domaine de mort intracellulaire. TRAIL-R3, qui ne possède pas de partie intracellulaire, agit en titrant le ligand dans les radeaux lipidiques, alors

que TRAIL-R4 interfère avec l'activation des caspases initiatrices en excluant TRAIL-R1 du DISC (Merino et al., 2006). Nous nous sommes alors intéressé plus précisément au récepteur antagoniste TRAIL-R4, car ce dernier possède un domaine intracellulaire qui contient un domaine de mort tronqué. Cette particularité n'est peut-être pas le fruit du hasard, d'autant plus que l'expression transitoire de TRAIL-R4 entraîne une activation du facteur de transcription NF- κ B (Degli-Esposti et al., 1997a). Nous nous sommes alors demandé si TRAIL-R4 était capable d'activer des voies de signalisation de survie dans les cellules cancéreuses, *via* ce domaine intracellulaire. Cette étude novatrice, initiée par Najoua Lalaoui, a fait l'objet d'une partie de ma thèse (Partie Résultats, Chapitre I, Article I).

2. Comment restaurer la sensibilité de cellules cancéreuses résistantes à TRAIL ?

Nous avons vu que les cellules cancéreuses sont capables de résister à TRAIL par différents moyens. Il est cependant possible de rétablir cette sensibilité à TRAIL par différents moyens tels que la chimiothérapie ou la radiothérapie (*cf. Introduction, Chapitre II*). Durant ma thèse, deux points ont été abordés :

- Cas de cellules résistantes à TRAIL en raison de l'expression du récepteur antagoniste TRAIL-R4 : sensibilisation par la chimiothérapie.

L'expression de TRAIL-R4 inhibe l'apoptose induite par TRAIL. Malheureusement, la littérature actuelle ne permet pas de dire s'il est possible de re-sensibiliser ces cellules à TRAIL, par exemple en combinant TRAIL à une chimiothérapie classique. C'est donc ce que nous avons tenté de déterminer, en utilisant des modèles cellulaires cancéreux exprimant TRAIL-R4 de façon exogène. Ces travaux précurseurs auxquels j'ai participé ont été initiés par Alexandre Morizot et Delphine Mérino, et font l'objet de la seconde partie de ma thèse (Partie Résultats, Chapitre II, Article II).

- Cas de lymphomes B non-Hodgkiniens exprimant Bcl-2 de façon constitutive : sensibilisation par un polyphénol, la quercétine.

La partie principale de ma thèse a consisté à trouver un moyen pour rétablir la sensibilité à TRAIL de deux lignées de lymphomes B non-Hodgkiniens, un cancer en forte expansion

depuis les 20 dernières années. Ces deux lignées, appelées VAL et RL, sont très fortement résistantes à TRAIL en raison de l'expression constitutive de Bcl-2, mais également de Mcl-1, de la survivine et de TRAIL-R4. Le défi était donc d'élaborer une stratégie thérapeutique visant à contourner la résistance provoquée par l'expression de ces protéines anti-apoptotiques. Ainsi, nous nous sommes intéressés à des composés naturels très en vogue ces dernières années, les polyphénols (Jacquemin et al., 2010). Ces anti-oxydants présents dans les végétaux possèdent une activité préventive et/ou curative contre le cancer. En particulier, la quercétine est une molécule polyphénolique intéressante qui peut être administrée par voie intraveineuse sans effets secondaires majeurs, comme l'attestent les phases préliminaires d'essais cliniques (Ferry et al., 1996). La combinaison de TRAIL avec la quercétine n'avait encore jamais été testée sur ce type de lymphomes, et les résultats obtenus au cours de ma thèse font ressortir un mécanisme d'action original. Ce travail est présenté dans la troisième partie de ce manuscrit (Partie Résultats, Chapitre III, Article III).

RESULTATS

I - Découverte d'une nouvelle propriété du récepteur antagoniste TRAIL-R4 : L'activation d'une signalisation de survie et de croissance.

Article I: TRAIL-R4 promotes tumor growth and resistance to apoptosis through the deregulation of Akt and c-Fos in HeLa cells.

*Najoua Lalaoui, **Guillaume Jacquemin**, Aymeric Morlé, Delphine Mérino, Elisabetta Iessi, Maelle Saunier, Alexandre Morizot, Christiane Mougin, Bruno Robert, Jean Luc Prétet, Eric Solary, Nathalie Droin and Olivier Micheau.*

Article en préparation

Contexte et résumé du travail :

Notre équipe a démontré en 2006 que le récepteur antagoniste TRAIL-R4 est capable d'inhiber spécifiquement l'apoptose induite par TRAIL en formant un hétérocomplexe avec TRAIL-R2 (Merino, 2006). Ce DISC, qui ne contient pas TRAIL-R1, n'est plus capable d'activer efficacement la caspase-8. Cependant, plusieurs indices, notamment des changements morphologiques et de prolifération, nous ont suggéré que ce mode d'action n'était pas le seul mécanisme en jeu lors de l'inhibition par TRAIL-R4 de l'apoptose induite par TRAIL. Dans ce chapitre, nous allons décrire une nouvelle propriété de TRAIL-R4 qui concerne la régulation de voies de signalisation intracellulaires, indépendamment de la fixation de TRAIL sur TRAIL-R4.

Ces travaux ont été initiés après une observation intéressante dans le modèle cellulaire HeLa de carcinome de col de l'utérus. Lorsque TRAIL-R4 est exprimé de manière ectopique stable dans ces cellules, nous observons un changement morphologique constitutif. Les cellules exprimant TRAIL-R4 apparaissent plus petites, moins adhérentes, de forme plus ronde, et leur indice de prolifération est plus élevé que dans les cellules transfectées par un vecteur vide. Ce changement phénotypique suggère que la présence de TRAIL-R4 agit sur des voies de

signalisation impliquées notamment dans la croissance cellulaire. Ce phénomène a été confirmé *in vivo* chez des souris athymiques *nude*, dans lesquelles les cellules exprimant TRAIL-R4 ou le vecteur vide ont été implantées en sous-cutané. Les résultats montrent que la croissance des tumeurs exprimant TRAIL-R4 est beaucoup plus rapide que celle des tumeurs contrôle, ce qui indique que TRAIL-R4 constitue un facteur pronostique défavorable.

Nous avons donc exploré diverses voies de signalisation susceptibles d'être affectées par TRAIL-R4, telles que les voies NF- κ B, MAPK ou Akt. En effet, l'expression de TRAIL-R4 induit une activité transcriptionnelle constitutive des facteurs de transcription CHOP, c-Jun et NF- κ B. A l'inverse, l'activité transcriptionnelle du facteur de transcription Elk-1 est inhibée par TRAIL-R4. La forme active phosphorylée de la kinase Akt est également fortement induite dans les cellules HeLa-TRAIL-R4, indépendamment d'un traitement par TRAIL. Cette kinase est impliquée dans l'effet prolifératif de TRAIL-R4 car son inhibition par le LY294002 ou la Wortmannine diminue la prolifération des cellules HeLa-TRAIL-R4. L'inhibition de la PI3K par RNAi permet également de rétablir très significativement l'apoptose induite par TRAIL, ce qui souligne l'importance de l'activation de Akt par TRAIL-R4 dans la résistance à TRAIL des cellules HeLa-TRAIL-R4.

Les cellules de la lignée HeLa sont porteuses du virus du papillome humain HPV18 (*Human Papilloma virus*), connu pour interférer avec la voie des récepteurs de mort. De façon surprenante, nous avons constaté que l'expression des oncoprotéines virales E6 était réprimée dans les cellules exprimant TRAIL-R4, en raison de l'inhibition de l'expression du facteur transcriptionnel c-Fos. Les protéines E6 étant responsables de la dégradation de p53 *via* le protéasome, nous observons également une accumulation de p53 dans les cellules HeLa-TRAIL-R4. Cependant p53 est dans ce cas non fonctionnel en raison de l'expression simultanée de son inhibiteur MDM2. L'utilisation d'inhibiteurs de MDM2, tels que les chalcones, permet de rétablir significativement l'apoptose dans ces lignées.

La conclusion de cette étude est que, parallèlement à l'inhibition du DISC de TRAIL, le récepteur antagoniste TRAIL-R4 est capable d'induire des voies de signalisation de survie et de prolifération. Les événements majeurs observés sont l'activation constitutive de la kinase Akt, ainsi que la répression du facteur de transcription c-Fos et l'accumulation de la protéine p53 non fonctionnelle. Ces voies de signalisation sont régulées par TRAIL-R4 indépendamment du ligand TRAIL, ce qui fait donc de TRAIL-R4 un facteur de résistance à d'autres composés tels que la chimiothérapie, comme nous allons le voir dans le chapitre II. Cette étude est la première à décrire en détail l'action d'un récepteur antagoniste de TRAIL sur

la transduction de signaux de survie et de prolifération intracellulaires. Ce travail propose également de nouvelles stratégies thérapeutiques pour contourner la résistance à TRAIL par TRAIL-R4, par exemple en utilisant des inhibiteurs de la voie PI3K/Akt ou des inhibiteurs de MDM2.

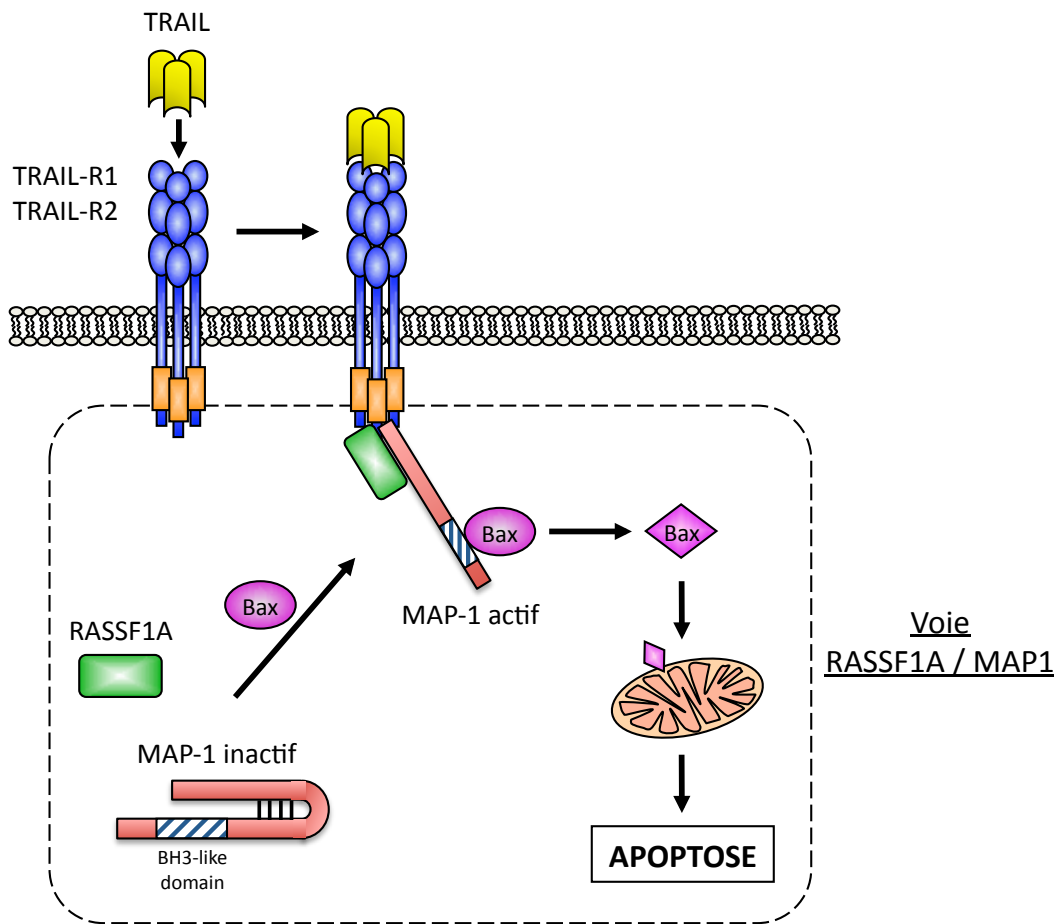


Figure 17: Modèle de la voie pro-apoptotique RASSF1A/MAP1.

TRAIL induit le recrutement puis l'association de RASSF1A et MAP1 au sein du DISC. Ceci permet l'activation de MAP1 par changement conformationnel, puis la fixation de Bax sur le domaine "BH3-like" de MAP1. Le changement conformationnel de Bax permet son insertion dans la membrane mitochondriale, ce qui conduit en autres au relargage du cytochrome c puis à l'apoptose.

Investigations en cours :

Ce travail sur le rôle de TRAIL-R4 dans l'induction d'une signalisation anti-apoptotique et de prolifération sera soumis à publication très prochainement. Quelques points restent cependant à éclaircir avant la soumission de cet article :

1. Le récepteur antagoniste TRAIL-R4 induit-il des voies de signalisation intracellulaires dans d'autres types de cellules cancéreuses?

La lignée HeLa est un modèle particulier en raison de la présence des transcrits des oncoprotéines virales HPV18 E6. Afin de vérifier si les mécanismes moléculaires décrits précédemment sont spécifiques à cette lignée, nous avons analysé d'autres types de cellules cancéreuses, à savoir la lignée leucémique Jurkat et la lignée de carcinome colique SW480. Nous avons donc exprimé TRAIL-R4 de façon stable dans ces deux lignées afin de constater d'éventuels changements phénotypiques ou moléculaires. Nos résultats préliminaires indiquent que le facteur de transcription c-Fos est également dérégulé par TRAIL-R4 dans les lignées Jurkat et SW480. En revanche, l'activation de la kinase Akt dans les cellules HeLa-TRAIL-R4 n'a pas été retrouvée dans d'autres lignées. Cette observation corrobore le fait que la transfection de TRAIL-R4 dans ces lignées ne modifie pas leur morphologie ou leur indice de prolifération comme dans le cas des cellules HeLa. La signalisation induite par TRAIL-R4 que nous avons décrite dans les cellules HeLa est donc spécifique de cette lignée, même si des mécanismes communs, *via* c-Fos, sont retrouvés dans d'autres lignées. Il sera donc intéressant de découvrir quel est ce mécanisme d'action universel de TRAIL-R4, quelle que soit la lignée utilisée, pour comprendre comment ce récepteur antagoniste module la survie et la prolifération des cellules.

2. Existe-t-il d'autres voies de signalisation régulées par TRAIL-R4?

Au cours de ma thèse, une part significative de mon travail a consisté à étudier une autre voie de signalisation régulée consécutivement à la surexpression de TRAIL-R4 dans les cellules HeLa. Il s'agit de la voie pro-apoptotique RASSF1A / MAP1 (**Figure 17**). Le gène *RASSF1A* (*Ras-association domain family 1, isoform A*) est considéré comme un gène suppresseur de tumeur car son expression est fréquemment inhibée par hyperméthylation de son promoteur lors des étapes précoces de la cancérogenèse (Pfeifer and Dammann, 2005). De plus, son

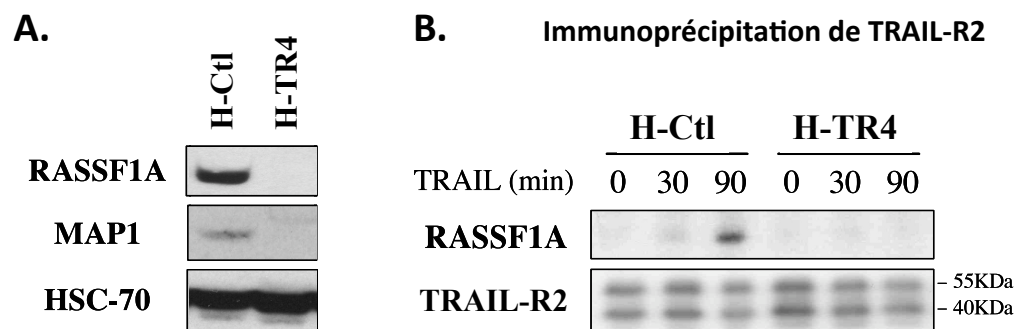


Figure 18: Expression de RASSF1A et MAP1 dans les lignées HeLa exprimant TRAIL-R4.

A. Analyse par immunoempreinte de l'expression endogène de RASSF1A et MAP1 dans les cellules HeLa exprimant TRAIL-R4 (H-TR4) ou le vecteur vide (H-Ctl).

B. Immunoprécipitation du DISC de TRAIL à l'aide d'un anticorps anti-TRAIL-R2 après stimulation par TRAIL (5 µg/mL) selon la cinétique indiquée.

inactivation chez la souris *RASSF1A*^{-/-} entraîne une susceptibilité accrue aux tumeurs spontanées ou chimiquement induites (Tommasi et al., 2005). *RASSF1A* régule les deux mécanismes les plus fréquemment altérés dans le cancer, l'apoptose et le cycle cellulaire, en interagissant avec un grand nombre de partenaires protéiques (Vos et al., 2000; Shivakumar et al., 2002; Agathangelou et al., 2005). L'existence d'un lien entre *RASSF1A*, Bax et les récepteurs de mort de TRAIL a été rapportée en 2005 (Baksh et al., 2005). La stimulation par TRAIL induit le recrutement de *RASSF1A* et de la protéine MAP1 au niveau du DISC (**Figure 17**). L'activation de MAP1 conduit à son interaction avec Bax et à l'activation de la voie intrinsèque, tandis qu'en l'absence de *RASSF1A*, MAP1 adopte une conformation fermée inaccessible à Bax (Tan et al., 2001). Ainsi, le dysfonctionnement de la voie *RASSF1A*/MAP1 dans certaines cellules tumorales pourrait participer à la résistance à l'apoptose induite par TRAIL.

Nous avons donc analysé l'expression de *RASSF1A* et MAP1 dans nos cellules HeLa exprimant ou non TRAIL-R4. Les résultats montrent que ces deux protéines sont présentes de façon endogène dans les populations de type sauvage ou contrôle, mais que leur expression a disparu dans les cellules exprimant TRAIL-R4 (**Figure 18A**). De ce fait, l'analyse du DISC par immunoprécipitation montre que *RASSF1A* n'est plus recruté au niveau des récepteurs de mort dans les cellules HeLa-TRAIL-R4 (**Figure 18B**).

Afin de déterminer l'importance de cette voie dans la résistance à TRAIL par TRAIL-R4, nous avons cherché dans un premier temps à éteindre l'expression de *RASSF1A* dans les populations contrôles. Les résultats montrent que l'inhibition de *RASSF1A* diminue la sensibilité à TRAIL, ce qui signifie que *RASSF1A* est impliqué dans le déclenchement de l'apoptose par TRAIL (**Figure 20B**). Nous avons ensuite tenté de rétablir cette voie dans les populations HeLa-TRAIL-R4 en surexprimant *RASSF1A* et MAP-1 de façon stable. Cependant la co-expression de *RASSF1A* et MAP1 s'est révélée impossible, car la surexpression de MAP1 est à elle seule létale pour nos cellules. Par ailleurs, la surexpression de *RASSF1A* dans les cellules HeLa-TRAIL-R4 (**Figure 19A**) n'est pas suffisante pour restaurer la sensibilité de ces cellules à TRAIL (**Figure 19B**), bien qu'une restauration partielle de l'activation de Bax soit observée (**Figure 19C**). Enfin, il existe un lien entre *RASSF1A* et la kinase Akt, puisque l'inhibition de l'expression de *RASSF1A* par shRNA entraîne une induction de la forme active phosphorylée de Akt dans les cellules HeLa contrôles (**Figure 20A**). Cette observation suggère que *RASSF1A* contrôle l'inhibition de la

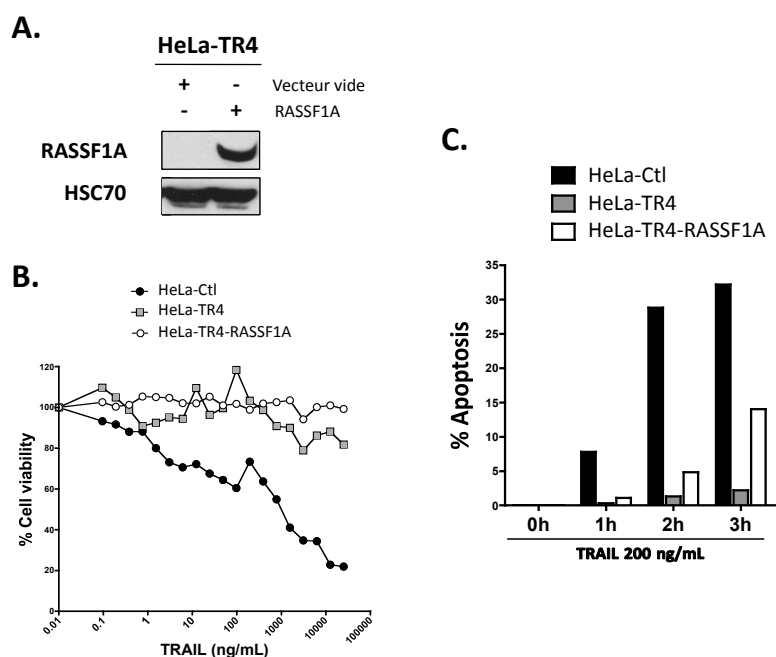


Figure 19: Surexpression exogène de RASSF1A dans les lignées HeLa exprimant TRAIL-R4.

A. Analyse par Western blot de l'expression de RASSF1A et MAP1 dans les cellules HeLa exprimant TRAIL-R4 (HeLa-TR4), transfectées ou non de façon stable par un vecteur rétroviral codant le gène RASSF1A. HSC70 est utilisé ici comme contrôle de dépôt.

B. Viabilité cellulaire mesurée par la méthode au PMS/MTS après traitement par TRAIL (0 à 25 000 ng/mL) pendant 24h dans les populations HeLa contrôles (HeLa-Ctl), exprimant TRAIL-R4 (HeLa-TR4), ou TRAIL-R4 et RASSF1A (HeLa-TR4-RASSF1A).

C. Activation conformationnelle de Bax par TRAIL. Les cellules H-Ctl, H-TR4 ou H-TR4-RASSF1A sont traitées par TRAIL (200 ng/mL) pendant 1h, 2h ou 3h. Les cellules sont marquées par cytométrie en flux après marquage intracytoplasmique de la forme active de Bax à l'aide d'un anticorps spécifique (clone 6A7). L'acquisition porte sur 10 000 événements.

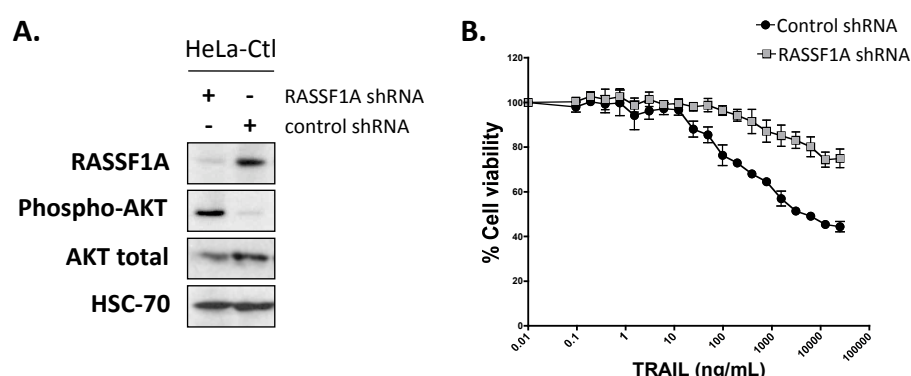


Figure 20: Inhibition de RASSF1A par interférence à ARN.

A. Inhibition de l'expression de RASSF1A par shRNA. Les cellules HeLa-Ctl ont été transfectées de façon stable par un plasmide contenant le shRNA dirigé contre RASSF1A ou le shRNA contrôle. L'expression protéique de RASSF1A et AKT a été analysée par western blot. HSC70 est utilisé comme contrôle de dépôt.

B. Viabilité cellulaire mesurée par la méthode au PMS/MTS après traitement par TRAIL (0 à 25 000 ng/mL) pendant 24h dans les cellules HeLa-Ctl transfectées de façon stable par un plasmide contenant le shRNA dirigé contre RASSF1A ou le shRNA contrôle (mismatch).

forme active de Akt, et c'est donc l'inhibition de RASSF1A par TRAIL-R4 qui serait responsable de l'activation de la voie de survie Akt.

Par ailleurs, une étude a montré que RASSF1A est capable d'inhiber l'expression de c-Fos (Deng et al., 2008). Pourtant, cette observation n'est pas valable dans les lignées Jurkat et SW480, puisque ni Akt, ni RASSF1A ne sont modulés par TRAIL-R4 dans ces populations, alors que l'inhibition de c-Fos est retrouvée dans ces 3 lignées. Il apparaît donc évident que la lignée HeLa est un modèle particulier, peut-être en raison de la présence d'oncoprotéines virales HPV. Nous avons donc cherché à élucider un mécanisme universel de signalisation par TRAIL-R4, quelle que soit la lignée cancéreuse.

Afin de décrypter les voies de signalisation induites par TRAIL-R4 dans une autre lignée que HeLa, j'ai réalisé une analyse globale de l'expression des gènes à l'aide d'une puce à ADN (Affymetrix). L'expression des gènes a ainsi été comparée dans les cellules SW480 transfectées par un vecteur rétroviral codant TRAIL-R4 par rapport à la lignée contrôle transfectée à l'aide d'un vecteur vide (**Figure 21**). Cette analyse nous a permis de mettre en évidence qu'un certain nombre de gènes voient leur expression influencée par la surexpression de TRAIL-R4, parmi lesquels nous retrouvons le gène codant c-Fos. En particulier, nous avons sélectionné 7 gènes cibles potentiellement intéressants, sur la base de différents paramètres tels que la variation d'expression entre les deux conditions (*fold change*), le test statistique sur la probabilité d'un faux positif (*t-test*), ainsi que les fonctions connues des protéines associées.

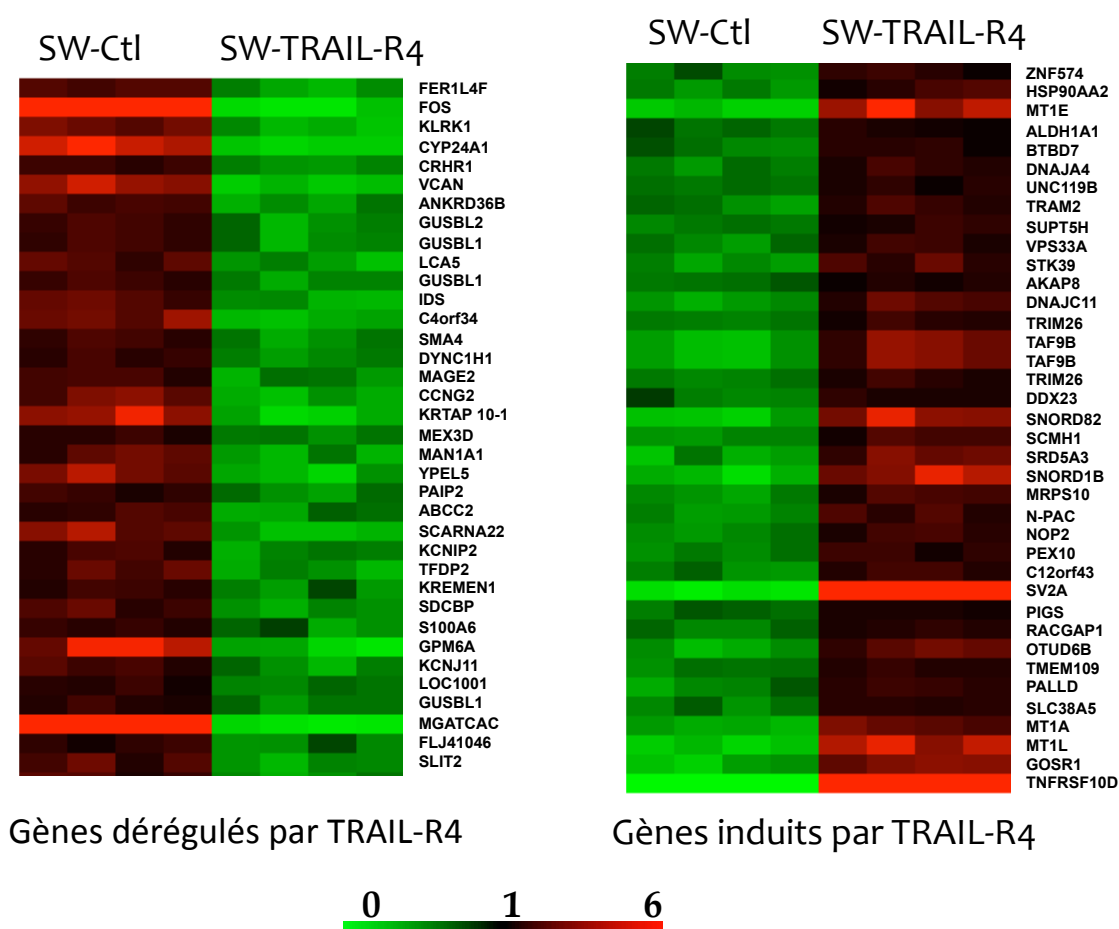


Figure 21: Analyse par puces à ADN affymetrix de l'expression des gènes dans les lignées SW480 exprimant de façon stable TRAIL-R4 (SW-TRAIL-R4) ou un vecteur vide (SW-Ctl).

La liste des gènes est limitée aux cibles ayant une valeur statistique $p \leq 0,05$ et une variation d'expression $> 1,19$ ou $< 0,8$. Les gènes apparaissant en rouge dans la lignée SW-TRAIL-R4 sont surexprimés et les gènes apparaissant en vert sont sous-exprimés.

Ainsi, notre attention s'est focalisée sur les protéines suivantes :

- Versican (VCAN), connu pour être régulé par le complexe transcriptionnel AP-1 (dont c-Fos), est une glycoprotéine extracellulaire qui inhibe l'adhésion cellulaire et favorise l'invasion cellulaire (Sakko et al., 2003; Domenzain-Reyna et al., 2009).
- La Claspine (CLSPN) qui est connu pour son rôle dans l'arrêt de la mitose en cas de dommages à l'ADN (Praetorius-Ibba et al., 2007).
- La Métallothionéine 1E, capable de lier des atomes de Zinc ou de Fer et influençant la prolifération, la différenciation et l'apoptose par la régulation de facteurs de transcription à domaine doigts de Zinc (Lim et al., 2009).
- La Carboxypeptidase A4 (CPA4) est une enzyme capable de cliver les acides aminés en C-ter. La fonction de cette protéine est encore mal connue, mais elle joue notamment un rôle dans l'hyper-acétylation des histones et l'agressivité dans cancers de la prostate (Tanco et al., 2010).
- La protéine SV2A (*synaptic vesicle glycoprotein*), localisée dans les membranes des vésicules, a été décrit comme étant associée à certaines tumeurs cérébrales (de Groot et al., 2010).
- La Mannosyl- α -1,3-glycoprotein- β -1,4-N-acetylglucosaminyltransferase 4C (Mgat4c) est une protéine du métabolisme des nucléotides (Furukawa et al., 1999).
- Le facteur de transcription c-Fos (FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog), capable de s'associer aux protéines de la famille Jun pour former le complexe transcriptionnel AP-1, impliqué dans l'apoptose, la différenciation ou la prolifération cellulaire.

Cette étude que j'ai initié, et visant à établir un lien entre ces différentes protéines et l'expression du récepteur antagoniste TRAIL-R4 fera l'objet de la première année de thèse du doctorant Aymeric Morlé. Ce travail débutera par la validation par Q-PCR des données obtenues avec la puce à ADN, puis se poursuivra par la caractérisation fonctionnelle de ces protéines dans nos modèles cellulaires.

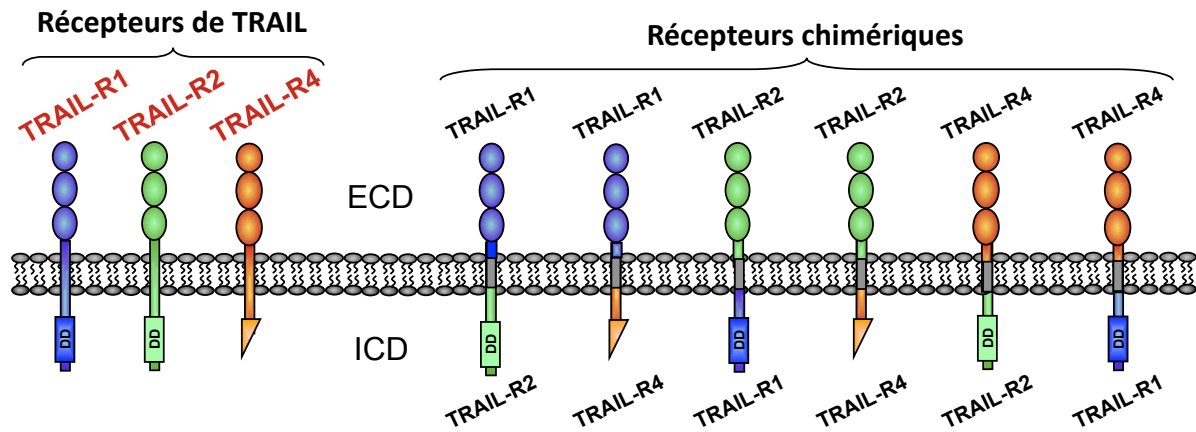


Figure 22: Représentation schématique des différents récepteurs de TRAIL chimériques mis au point dans notre laboratoire.
ECD: Extracellular domain; ICD: Intracellular domain.

3. Comment le récepteur antagoniste TRAIL-R4 est-il capable d'induire une signalisation intracellulaire?

Parallèlement à l'identification des voies de signalisations régulées par TRAIL-R4, nous tenterons de préciser le mécanisme d'action de TRAIL-R4. Nous avons réalisé plusieurs constructions plasmidiques codant des protéines chimériques constituées des parties extracellulaires (ECD) et intracellulaires (ICD) de chacun des récepteurs de TRAIL. Ces différents récepteurs chimériques sont schématisés dans la **Figure 22**. Nous pourrions ainsi connaître l'importance de la partie extracellulaire de TRAIL-R4, ou encore l'importance du domaine de mort tronqué de ce récepteur antagoniste dans le déclenchement d'un signal de survie ou de prolifération. L'identification des partenaires directs de TRAIL-R4 impliqués dans ces signaux sera ensuite la prochaine étape à décrypter.

II - Chimiothérapie combinée à TRAIL : Une stratégie efficace pour vaincre les cellules tumorales exprimant TRAIL-R4.

Article II : Chemotherapy overcomes TRAIL-R4-mediated TRAIL resistance at the DISC level.

Alexandre Morizot*, Delphine Mérino*, Najoua Lalaoui, **Guillaume Jacquemin**, Virginie Granci, Elisabetta Iessi, David Lanneau, Florence Bouyer, Eric Solary, Bruno Chauffert, Philippe Saas, Carmen Garrido and Olivier Micheau.

* Ces auteurs ont contribué de façon égale à cet article.

Cell Death & Differentiation (Morizot et al., 2010)

Contexte et résumé du travail :

Le récepteur antagoniste TRAIL-R4 bloque l'apoptose induite par TRAIL en inhibant l'activation de la caspase-8 dans le DISC et en induisant des voies de survie. Ce récepteur peut donc constituer un frein à l'utilisation de TRAIL en thérapie anti-cancéreuse lorsqu'il est exprimé par la tumeur. Pour remédier à ce problème, nous avons combiné TRAIL à des agents chimiothérapeutiques classiques afin de voir si la résistance provoquée par TRAIL pouvait ainsi être contournée. Ce travail, auquel j'ai contribué durant mes deux premières années de thèse, a été initié et conduit par Alexandre Morizot et Delphine Mérino (Morizot et al., 2010).

L'utilisation de TRAIL en association avec la chimiothérapie s'est déjà révélée efficace dans de nombreux types cellulaires cancéreux résistants (*cf Introduction, Chapitre II.2*). En revanche, ce type de traitement combiné n'avait encore jamais été évalué dans des cellules tumorales exprimant le récepteur antagoniste TRAIL-R4. Les résultats que nous avons obtenus sont encourageants puisqu'ils montrent que la combinaison de TRAIL avec des

composés anti-cancéreux standards permet de restaurer la sensibilité de cellules exprimant TRAIL-R4. Nous avons pour cela utilisé des cellules initialement sensibles à TRAIL, que nous avons rendu résistantes en surexprimant TRAIL-R4 par une approche rétrovirale. Nous avons également utilisé la lignée de lymphome VAL, résistante à TRAIL et exprimant TRAIL-R4 de façon endogène. Nos résultats montrent qu'un pré-traitement par le cisplatine, l'étoposide ou le 5-FU à des doses pharmacologiques subtoxiques sensibilise à TRAIL ces lignées tumorales exprimant TRAIL-R4. Le mécanisme moléculaire sous-jacent est dépendant de la formation du DISC, puisque l'expression ectopique de c-FLIP bloque totalement la synergie. Plus précisément, nous montrons dans ce travail que les agents chimiothérapeutiques accélèrent la formation du DISC et facilitent le recrutement et l'activation de la caspase-8 par TRAIL. En revanche, la voie mitochondriale ne semble pas nécessaire puisque l'expression de Bcl-2 ou de Bcl-XL n'interfère pas avec l'efficacité de la combinaison TRAIL-chimiothérapie. Enfin, nous avons validé cette stratégie thérapeutique combinatoire dans un modèle murin *in vivo*. Contrairement aux tumeurs contrôles, les xénogreffes tumorales exprimant TRAIL-R4 ne répondent pas à l'action cytotoxique de TRAIL. Le traitement par les agents de chimiothérapie permet de rétablir la régression tumorale induite par TRAIL des xénogreffes exprimant le récepteur antagoniste.

Cette étude est rassurante sur le fait que l'expression de TRAIL-R4 par les tumeurs peut être contrée par un traitement séquentiel avec la chimiothérapie et TRAIL. Cependant, l'expression concomitante de TRAIL-R4 et de c-FLIP devra être pris en compte car l'efficacité du traitement combinatoire sera compromise dans ce contexte cellulaire précis.

Chemotherapy overcomes TRAIL-R4-mediated TRAIL resistance at the DISC level

A Morizot^{1,2,9}, D Mérino^{1,2,9}, N Lalaoui^{1,2}, G Jacquemin^{1,2}, V Granci^{1,2}, E Iessi^{1,2}, D Lanneau^{1,2}, F Bouyer^{1,2}, E Solary^{1,2,3,4}, B Chauffert^{1,2,5}, P Saas^{6,7,8}, C Garrido^{1,2} and O Micheau^{*,1,2,5}

TNF-related apoptosis-inducing ligand or Apo2L (Apo2L/TRAIL) is a promising anti-cancer drug owing to its ability to trigger apoptosis by binding to TRAIL-R1 or TRAIL-R2, two membrane-bound receptors that are often expressed by tumor cells. TRAIL can also bind non-functional receptors such as TRAIL-R4, but controversies still exist regarding their potential to inhibit TRAIL-induced apoptosis. We show here that TRAIL-R4, expressed either endogenously or ectopically, inhibits TRAIL-induced apoptosis. Interestingly, the combination of chemotherapeutic drugs with TRAIL restores tumor cell sensitivity to apoptosis in TRAIL-R4-expressing cells. This sensitization, which mainly occurs at the death-inducing signaling complex (DISC) level, through enhanced caspase-8 recruitment and activation, is compromised by c-FLIP expression and is independent of the mitochondria. Importantly, TRAIL-R4 expression prevents TRAIL-induced tumor regression in nude mice, but tumor regression induced by TRAIL can be restored with chemotherapy. Our results clearly support a negative regulatory function for TRAIL-R4 in controlling TRAIL signaling, and unveil the ability of TRAIL-R4 to cooperate with c-FLIP to inhibit TRAIL-induced cell death.

Cell Death and Differentiation advance online publication, 12 November 2010; doi:10.1038/cdd.2010.144

TNF-related apoptosis-inducing ligand or Apo2L (TRAIL) is a promising tool for cancer therapy, owing to its ability to eradicate tumor cells while sparing normal cells.¹ TRAIL is a type II transmembrane protein, whose binding to its agonistic receptors, namely TRAIL-R1 (DR4) and TRAIL-R2 (DR5, TRICK2 or KILLER), triggers apoptosis in a p53-independent manner. Engagement of TRAIL agonistic receptors induces the formation of a molecular platform called the DISC (death-inducing signaling complex) within minutes, through homotypic interactions.² This platform includes the adapter protein FADD and caspase-8, an initiator caspase that is activated and subsequently released from the DISC to the cytosol for dismantling of the cells. The amount of caspase-8 generated within the DISC in type I cells is sufficient to trigger apoptosis through the direct activation of the effector caspase-3. Type II cells require the engagement of a mitochondrial amplification loop, which is activated by caspase-8-dependent cleavage of Bid, a BH3-only protein that targets the intrinsic pathway through Bax and Bak, allowing the formation of the apoptosome. However, enforced aggregation of TRAIL agonistic receptors in these cells enhances caspase-8 activation at the DISC level and overcomes mitochondrial checkpoints.³ Likewise, enhanced caspase-8 recruitment and activation at the TRAIL DISC by chemotherapeutic drugs has been associated with the restoration of TRAIL sensitivity in hepatocellular and colon carcinomas.^{4,5}

Cellular resistance to TRAIL-induced cell death arises from a large variety of events, ranging from defects in DISC formation, or inhibition of more distal events, including mitochondrial block.^{6,7}

TRAIL-induced cell death can be specifically inhibited by two membrane-bound antagonistic receptors, TRAIL-R3 (DcR1, LIT or TRID) or TRAIL-R4 (DcR2 or TRUND).² These receptors have been shown to be expressed and to prevent TRAIL-induced cell death in various human primary tumor cells, including lymphomas, lung, breast and prostate carcinomas,^{8–10} but the inhibitory potential of this receptor still remains controversial.¹¹ Although TRAIL-R3 is a GPI-anchored receptor that sequesters TRAIL into lipid rafts, TRAIL-R4 interacts with TRAIL-R2 within the DISC, and impairs caspase-8 processing,¹² thus, inhibiting TRAIL-induced apoptosis.^{13,14}

The efficacy of recombinant hApo2L/TRAIL in association with chemotherapy is evaluated in ongoing clinical trials.¹ It remains unknown whether TRAIL-R4 expression may compromise the efficacy of TRAIL.

We demonstrate here that TRAIL-R4 efficiently inhibits TRAIL, and that chemotherapeutic drugs can overcome this resistance. Restoration of apoptosis primarily occurs at the membrane level, irrespective of the mitochondria, through enhanced caspase-8 recruitment and activation at the TRAIL DISC. TRAIL-R4 expression also impairs TRAIL-induced tumor regression *in vivo*, but sequential treatments associating

¹INSERM, U866, Dijon, F-21079 France; ²Faculty of Medicine and Pharmacy, Université de Bourgogne, Dijon, F-21079, France; ³INSERM, U1009, Villejuif, F-94805, France; ⁴Institut Gustave Roussy, University of Paris XI, Villejuif, F-94805, France; ⁵Centre Georges-François Leclerc, Dijon, F-21000, France; ⁶INSERM, U645, Besançon, F-25020, France; ⁷EFS Bourgogne Franche Comté, Besançon, Plateforme BioMonitoring, F-25020, France and ⁸University of Franche-Comté, Besançon, F-25020, France

*Corresponding author: O Micheau, Faculty of Medicine and Pharmacy, Mort Cellulaire et Cancer, INSERM U866, 7, Bd Jeanne d'Arc, Dijon F-21079, France.

Tel: +333 8039 3468; Fax: +333 8039 3434; E-mail: omicheau@u-bourgogne.fr

⁹These authors contributed equally to this work.

Keywords: TRAIL; TRAIL-R4; c-FLIP; chemotherapy; apoptosis

Abbreviations: 5FU, 5-fluorouracil; CDDP, cisplatin; DISC, death-inducing signaling complex; TRAIL-R, trail Receptor; VP16, etoposide

Received 07.7.10; revised 07.9.10; accepted 08.10.10; Edited by S Nagata

CDDP and TRAIL prevent tumor growth in nude mice. Altogether, our results demonstrate that TRAIL-R4 is a negative regulator of TRAIL, whose inhibitory function can be overcome by chemotherapy.

Results

TRAIL and chemotherapeutic drugs synergistically induce apoptosis in TRAIL-R4-expressing cells. We have demonstrated previously that, ectopic expression of TRAIL-R4 impairs TRAIL-induced cell death through the formation of a heteromeric complex with TRAIL-R2, leading to the inhibition of caspase-8 activation within the TRAIL DISC.¹² Owing to the ability of TRAIL-R4 to inhibit TRAIL-induced cell death, we evaluated whether its expression may compromise combination therapies associating TRAIL with conventional chemotherapeutic drugs. To test this hypothesis, TRAIL-R4 was ectopically expressed using retroviruses in three TRAIL-sensitive tumoral cell lines, HeLa, Jurkat and SW480. Cell surface expression was assessed by flow cytometry (Figure 1a and b). TRAIL-R4 inhibited TRAIL-induced apoptosis in these cells (Figure 1c and d). Strikingly, TRAIL-R4 also inhibited death induced by chemotherapeutic drugs in some cell lines. Pre-treatment with pharmacological concentrations of CDDP, VP16 for 3 h or 5FU for 72 h, however, restored TRAIL sensitivity in these cells (Figure 1c and d). Similar results were obtained in the B-lymphoma cell line VAL, in which the cells are poorly sensitive to TRAIL-induced cell death (Figure 1e). VAL cells endogenously express TRAIL-R4 at the cell surface and high levels of Bcl-2, because of the t(14;18) chromosomal translocation (Figure 1f and g). Cells sensitivity to TRAIL-induced cell death was restored in VAL cells after pre-treatment with CDDP, VP16, or 5FU (Figure 1e). siRNA-mediated downregulation of TRAIL-R4 or Bcl-2 expression in VAL cells also restored sensitivity to TRAIL (Figure 1f and g), demonstrating that both TRAIL-R4 and Bcl-2 are functional in these cells.

Sequential chemotherapy and TRAIL treatments restore caspase activation. Chemotherapeutic drugs enhanced caspase activation upon TRAIL stimulation (Figure 2a) without changing TRAIL receptor expression (Supplementary Figure S1). In HeLa control cells, TRAIL

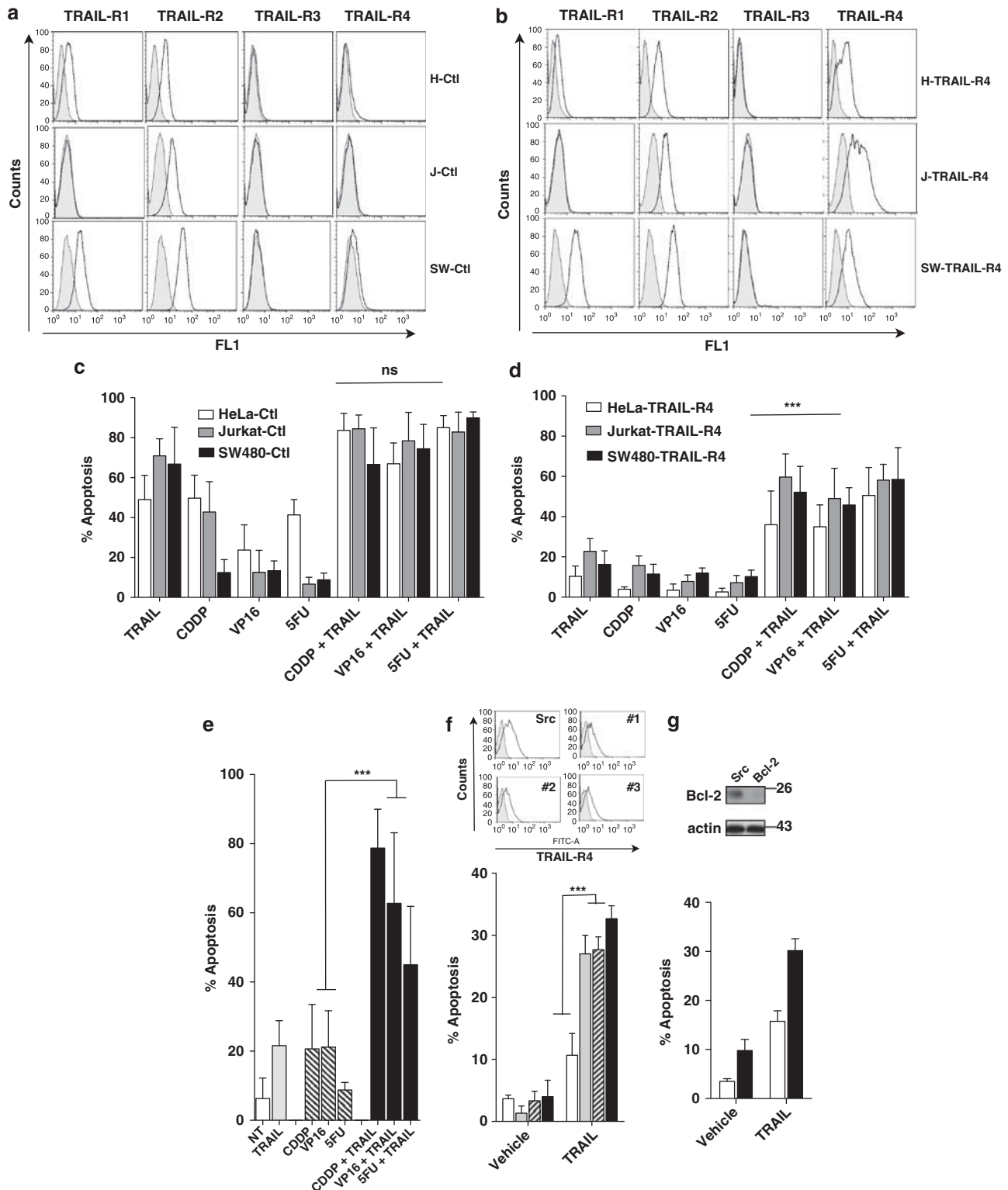
alone triggered the activation of caspase-8, caspase-9 and caspase-3, and induced Bid and PARP cleavage, as demonstrated by the disappearance of their proform or the appearance of cleaved fragments (Figure 2a). However, in HeLa cells expressing TRAIL-R4 (H-TRAIL-R4 cells), TRAIL induced only a modest cleavage of caspase-8 and caspase-9, resulting in the poor activation of caspase-3 (Figure 2a). Pre-treatment of these cells with CDDP, VP16, or 5FU restored caspase-3 activation upon TRAIL stimulation, as demonstrated by the appearance of the caspase-3 p17 fragment and an increase in PARP cleavage (Figure 2a). Restoration of caspase-3 activation by chemotherapeutic drugs in HeLa-TRAIL-R4 cells was associated with partial activation of both caspase-8 and caspase-9 (Figure 2a).

Activation of the mitochondrial intrinsic pathway is not required to restore sensitivity to TRAIL in response to chemotherapy. As most chemotherapeutic drugs engage the mitochondrial pathway to trigger apoptosis, we next analyzed its contribution with regard to chemotherapy-mediated sensitization to TRAIL-induced cell death. TRAIL stimulation in control HeLa cells triggered the activation of the intrinsic pathway, as evidenced by the disappearance of Bid (Figure 2a), the release of cytochrome c, Smac/DIABLO and omi to the cytosol (Figure 2b), and by the activation of Bax (Figure 2d and e). Release of cytochrome c, Smac/DIABLO and omi were much weaker in H-TRAIL-R4 cells as compared with control cells (Figure 2c), however, chemotherapy combined with TRAIL nearly completely restored Bax activation in these cells (Figure 2d and e). Overexpression of Bcl-2 or Bcl-xL in H-TRAIL-R4 failed to protect cells from TRAIL-induced apoptosis after chemotherapy (Figure 3a and b). These results are consistent with the demonstration that chemotherapeutic drugs can restore TRAIL sensitivity in VAL cells, despite large amounts of Bcl-2 expression (Figure 1f). To determine the role of Bax in drug-mediated sensitization to TRAIL-induced cell death, we performed the same experiments in the Bax-deficient or parental WT HCT116 cells engineered to express TRAIL-R4 (Figure 3c). TRAIL-mediated apoptosis in HCT116 cells was shown to rely on Bax but not Bak activation.¹⁵ According to these findings, TRAIL alone, or simultaneous combinations of TRAIL and 5FU, failed to induce apoptosis in Bax-deficient cells (Figure 3d and

Figure 1 Chemotherapeutic drugs restore TRAIL-induced cell death in TRAIL-R4-expressing cells. (a) and (b), HeLa, Jurkat or SW480 cancer cell lines were infected with empty vector (H-Ctl, J-Ctl or SW-Ctl) or with a vector encoding TRAIL-R4 (H-TRAIL-R4, J-TRAIL-R4 or SW-TRAIL-R4). Expression of TRAIL receptors was analyzed by flow cytometry (gray line) against an isotype control (filled curve). (c) and (d), control cells or TRAIL-R4-expressing cells were stimulated with His-TRAIL (500 ng/ml, 6 h), Cisplatin (CDDP, 20 μ M, 3 h), etoposide (VP16, 10 μ M, 3 h) or 5-fluorouracil (5FU, 1 μ g/ml, 72 h). Apoptosis was evaluated after 6 h (TRAIL), 48 h (CDDP or VP16) or 72 h (5FU) by Hoechst staining in HeLa (white), Jurkat (gray) or SW480 (black). Sequential stimulation with chemotherapeutic drugs and TRAIL was performed as follows. Cells were pre-treated with CDDP or VP16 for 3 h, in serum-free medium, then washed and allowed to recover at 37 °C in complete medium for 48 h before stimulation with His-TRAIL (500 ng/ml) for an additional 6 h. Alternatively, cells were stimulated for 72 h with 5FU, then His-TRAIL for 6 h. (e) VAL cell sensitivity to His-TRAIL, chemotherapy or sequential treatments was analyzed as described above. (f) Deregulation of TRAIL-R4 expression in VAL cells using three different siRNAs (scramble siRNA, Src; TRAIL-R4 siRNA, #1, #2 and #3) as analyzed by Facs for TRAIL-R4 expression using an anti-TRAIL-R4 antibody (gray line) or a control isotype (filled curve). The effect of TRAIL-R4 downregulation was assessed by Hoechst staining 6 h after His-TRAIL treatment (500 ng/ml), scramble (white) and TRAIL-R4 siRNA (#1 gray; #2 dashed and #3 black). (g) Bcl-2 expression in VAL cells after transfection with the scramble siRNA (Src) or the Bcl-2 siRNA (Bcl-2) and corresponding Hoechst staining 6 h after His-TRAIL treatment (500 ng/ml), Bcl-2 siRNA (in black) or a scramble siRNA (in white). These results are representative of at least three independent experiments. Mean percentage of apoptotic cells and S.D. shown (mean $\pm$ S.D.). Differences between selected groups were compared by non-parametric analysis of variance (ANOVA) with Bonferroni *post hoc* multiple comparison test, ****P* < 0.001. Molecular size markers are shown on the right in kDa

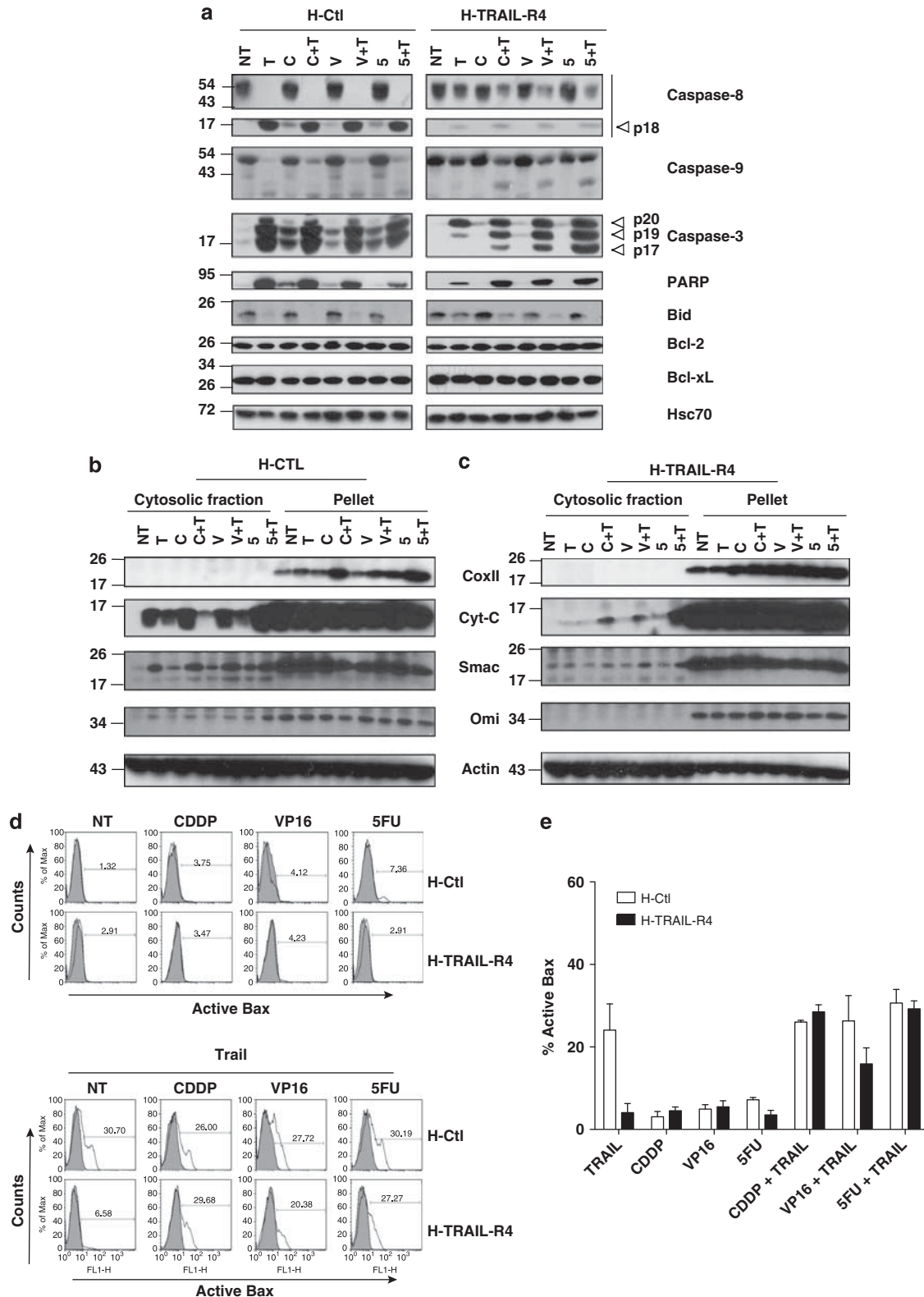
Supplementary Figure S2). Nevertheless, pre-treatment for 72 h with 5FU before adding TRAIL efficiently induced cell death in these cells (Figure 3d). Likewise, treating Bax-deficient cells sequentially for 3 h with CDDP or VP16, and stimulating with TRAIL, 48 h after the onset of the treatment

in drug-free medium (see Materials and Methods) restored TRAIL-induced apoptosis (Figure 3d). As in HeLa cells, sequential use of chemotherapy and TRAIL afforded sensitization to TRAIL-induced cell death in Bax-proficient cells expressing TRAIL-R4 ectopically (Figure 3d). However,



in the absence of Bax, TRAIL-R4 overexpression induced resistance to TRAIL after CDDP or VP16 pretreatment, but not upon 5FU stimulation (Figure 3d).

Sensitization to TRAIL-induced cell death by 5FU has previously been described to involve the deregulation of c-FLIP.^{4,16} We, therefore, analyzed c-FLIP expression after



chemotherapy at the time when the cells were exposed to TRAIL stimulation. Contrary to our expectations, we found that 5FU poorly induced c-FLIP deregulation in our settings (Figure 3e), but that CDDP and VP16 induced c-FLIP upregulation in these cells (Figure 3e). Consistent with these findings, expression of c-FLIP abrogated sensitization to TRAIL after 5FU treatment, irrespective of TRAIL-R4 or Bax expression in HCT116 cells (Figure 3f), indicating that the mere upregulation of c-FLIP is probably sufficient to impair the synergy irrespective of the mitochondria. In agreement with this finding, the caspase-9 inhibitor z-LEHD-fmk failed to protect TRAIL-R4-expressing cells from TRAIL-induced cell death after chemotherapy, while the pan-caspase inhibitor z-VAD-fmk completely abrogated the synergy (Supplementary Figure S3).

Chemotherapeutic drugs enhance caspase-8 recruitment and activation within the TRAIL DISC. To determine the contribution of TRAIL DISC formation and caspase-8 activation in the synergy, c-FLIP was co-expressed in H-TRAIL-R4 cells and cells were stimulated with TRAIL after chemotherapy. Like TRAIL-R4, expression of c-FLIP (Figure 3g) reduced cell sensitivity to TRAIL, but alone failed to block apoptosis induced by TRAIL upon chemotherapy (Figure 3h). However, combined expression of TRAIL-R4 and c-FLIP severely impaired TRAIL-induced apoptosis by chemotherapeutic drugs, indicating that activation of caspase-8 *per se* has a prominent role in the synergy (Figure 3h). In agreement with these findings, DISC analysis in cells subjected to chemotherapy and TRAIL treatments revealed that chemotherapeutic drugs enhanced caspase-8 recruitment and activation within the TRAIL DISC in HeLa control cells (Figure 4a) but, probably more importantly, also in HeLa expressing TRAIL-R4 (Figure 4b) and VAL cells (Figure 4c), which express TRAIL-R4 endogenously. Altogether, these results clearly demonstrate that TRAIL-R4 inhibits TRAIL-induced cell death, and that chemotherapy can restore tumor cell sensitivity to apoptosis, mainly through the restoration of caspase-8 recruitment and activation within the DISC.

TRAIL-R4 inhibits TRAIL-induced cell death but not chemotherapy-induced sensitization to TRAIL *in vivo*. Ability of TRAIL-R4 to prevent TRAIL-induced tumor regression, combined or not with chemotherapy, was next evaluated in nude mice using xenografts of HCT116 cells expressing TRAIL-R4. Mice were implanted, in both flanks, with

HCT116-Ctl cells (right flank) and HCT116-TRAIL-R4 (left flank). When the tumor volume reached 20 mm³, mice were treated with phosphate-buffered saline (PBS), CDDP, recombinant TRAIL or treated sequentially with CDDP and TRAIL as described in the Materials and Methods section. Compared with PBS-treated mice, HCT116-Ctl tumor growth was inhibited in mice receiving injections of TRAIL, CDDP and by the combined treatment (Figure 5a). However, TRAIL, and to a lesser extent CDDP, failed to induce tumor regression in TRAIL-R4-expressing cells (Figure 5b), but combined treatments induced a marked inhibition of the tumor growth of HCT116 cells expressing TRAIL-R4 (Figure 5b), with statistically significant *P*-values <0.001 as compared with PBS-treated mice. These results demonstrate that TRAIL-R4 efficiently inhibits TRAIL-induced cell death not only *in vitro*, but also *in vivo*. However, chemotherapeutic drugs, including CDDP, can overcome TRAIL-R4 mediated resistance, highlighting the potential therapeutic value of these combined therapies for cancer.

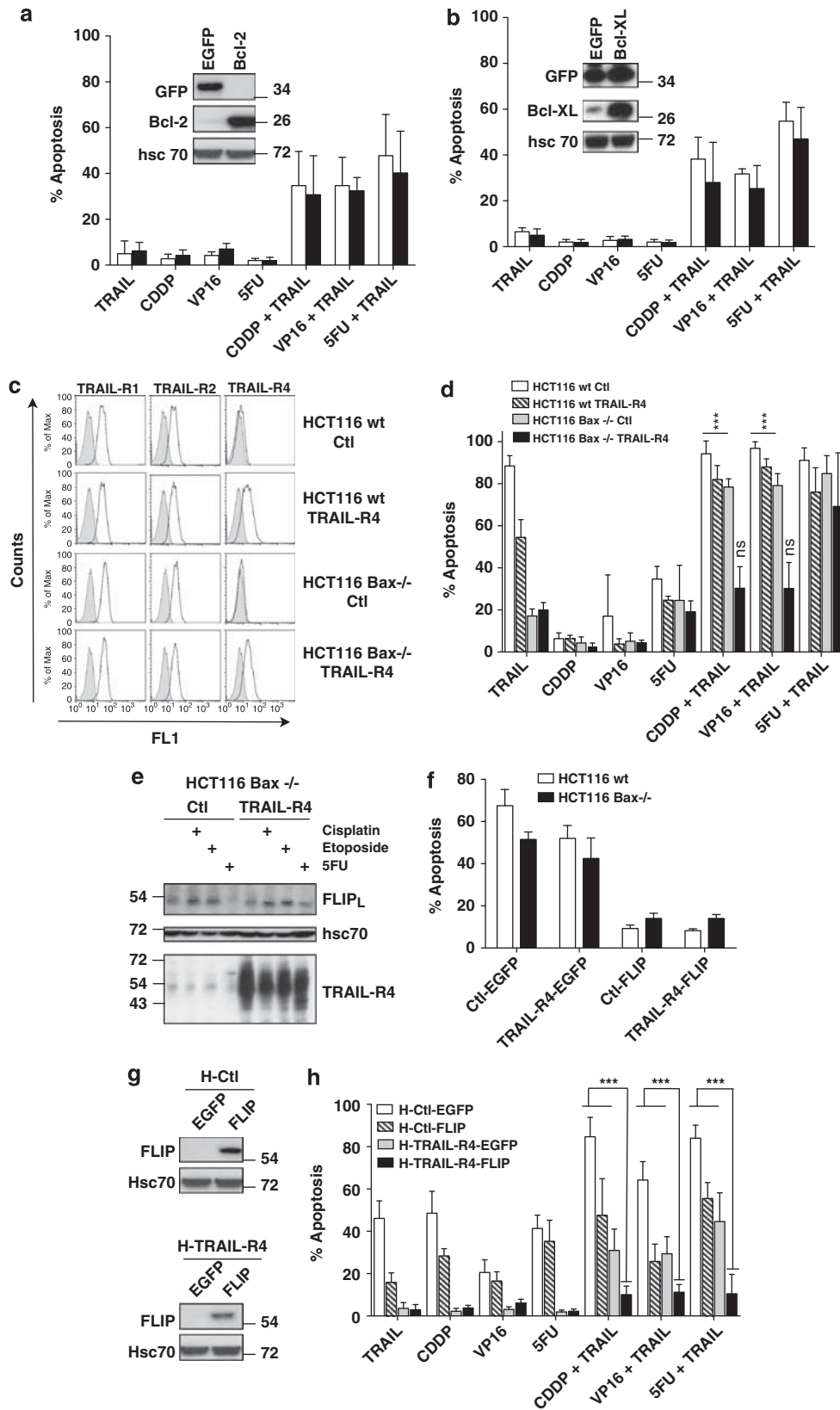
Discussion

TRAIL-based combinatorial therapies are emerging paradigms for cancer treatment as synergistic activation of TRAIL-induced apoptosis by chemotherapeutic drugs generally affords to overcome tumor cell resistance, whereas monotherapies are most of the time poorly successful. Pre-clinical studies and clinical trials are giving promising results, supporting the potential of these combining approaches.^{17,18}

Cell surface expression of TRAIL agonistic receptors is the first requirement in order to trigger the TRAIL apoptotic machinery but, to date, the expression of TRAIL receptors in primary tumors remains poorly studied and the anti-apoptotic function of TRAIL-R4 remains controversial. It was found, however, in a few studies that primary lymphomas could express functional TRAIL antagonistic receptors at the cell surface.¹⁰ In solid tumors, analysis of TRAIL receptor expression was often performed by immunohistochemistry, and although this method does not provide the information whether the receptors are expressed at the cell surface, these studies indicate that the extent of expression of the antagonistic receptors TRAIL-R3 and TRAIL-R4 is probably underestimated.^{9,19–21}

Engagement of apoptosis upon TRAIL stimulation in a given tissue type, primary tumor or cell line, relies on the contribution of multiple players, including proapoptotic and prosurvival factors, which ultimately determine cell fate. It has

Figure 2 Chemotherapeutic drugs activate the mitochondrial apoptotic pathway. (a) Western blot analysis of caspase-8, caspase-9, and caspase-3, PARP, Bid, Bcl-2, Bcl-xL and hsc70 in control HeLa cells (H-Ctl) or cells expressing TRAIL-R4 (H-TRAIL-R4) after stimulation with His-TRAIL (T) and/or chemotherapeutic pretreatments with cisplatin (C), etoposide (V) or 5FU (5). White arrows indicate cleavage fragments. Molecular size markers are shown on the left in kDa. These results are representative of at least three independent experiments. (b) and (c) A digitonin-based permeabilisation experiment followed by western blot analysis of the different fractions (cytosolic or pellet) was performed to analyze the release of cytochrome c, Smac and Omi from the mitochondria. CoxII antibody was used as a control for efficient subcellular fractionation and the actin was probed for normalization. Control HeLa cells and H-TRAIL-R4 cells were treated as previously with cisplatin (C), etoposide (V) or 5-fluorouracil (5) plus or minus His-TRAIL (T). Molecular size markers are shown on the left in kDa. (d) Control HeLa cells and H-TRAIL-R4 cells were pre-treated as above with cisplatin (CDDP), etoposide (VP16) or 5-fluorouracil (5FU) then subsequently stimulated or not with His-TRAIL (TRAIL), as in Figure 1. After treatment, cells were permeabilized and stained with an antibody recognizing active Bax and analyzed by flow cytometry. (e) The percentage of cells containing active Bax was determined by FACS in control HeLa cells (H-Ctl, white bars) or TRAIL-R4-expressing cells (H-TRAIL-R4, black bars). These results are representative of at least three independent experiments. Mean %Active Bax values and S.D. are shown (mean ± S.D.)



recently been demonstrated that naturally occurring differences in the levels or states of proteins regulating TRAIL signaling are the primary causes of cell-to-cell variability.²² The large variety of cellular changes in protein levels or status induced by chemotherapeutic drugs may explain why these drugs, restore TRAIL sensitivity in resistant cells, albeit targeting different signaling pathways. Sensitization to TRAIL by chemotherapeutic drugs, has been attributed to multiple molecular mechanisms including the upregulation of TRAIL-R2,²³ activation of the mitochondrial pathway^{24,25} inhibition of c-FLIP expression²⁶ or enhanced caspase-8 recruitment to the TRAIL DISC.^{4,5}

We demonstrate here that chemotherapy overcomes TRAIL resistance induced by TRAIL-R4 at the level of the DISC, and provide strong evidence that the mitochondrial pathway is dispensable for the restoration of TRAIL sensitivity by chemotherapeutic drugs (Figure 6). Chemotherapeutic drugs afforded sensitization to TRAIL of aggressive B-cell follicular lymphomas such as VAL cells, despite endogenous expression of functional TRAIL-R4 and Bcl-2. Likewise, these compounds restored TRAIL sensitivity of epithelial-derived tumor cell lines harboring either a deficiency for Bax expression, or engineered to express Bcl-2 or Bcl-x_L, irrespective of TRAIL-R4 expression levels. Bax deficiency however, may be detrimental to some chemotherapeutic drugs in cells that express TRAIL-R4 and low but significant levels of c-FLIP. Accordingly, restoration of TRAIL sensitivity in HCT116 Bax-deficient cells expressing TRAIL-R4 was only observed with 5FU, but not CDDP or VP16 because of their ability to induce c-FLIP expression. These results could explain some discrepancies regarding the lack of correlation regarding TRAIL-R4 expression and cell sensitivity to TRAIL-induced cell death. In particular, c-FLIP expression levels have scarcely been taken into consideration in these studies.

Our results demonstrate that TRAIL-R4 can inhibit TRAIL-induced cell death both *in vitro* and *in vivo*, and cooperate with c-FLIP to inhibit chemotherapy-mediated sensitization to TRAIL-induced apoptosis (Figure 6). These findings not only

have important implications for the understanding of the molecular mechanisms involved in the regulation of TRAIL signaling, but also for therapeutic approaches aiming at utilizing recombinant TRAIL to cure patients suffering from cancer.

The physiological function and relevance of TRAIL-R4 is still unclear. Our study is probably the first demonstration that TRAIL-R4 can confer TRAIL resistance *in vivo*, as we demonstrate that ectopic expression of this receptor in the colon carcinoma cell line HCT116 efficiently impairs TRAIL-induced tumor killing in nude mice. At the physiological level, TRAIL-R4 could protect cells selectively from TRAIL-induced cell death. Noteworthy, it has been demonstrated that NK and CD8⁺ T cells are induced to express TRAIL, TRAIL-R2, TRAIL-R4 and c-FLIP upon activation.²⁷ Despite high expression levels of TRAIL, these cells are resistant to TRAIL, but selective inhibition of c-FLIP expression induced TRAIL sensitivity.²⁷ It should be noted, however, that selective TRAIL-R4 downregulation was not assessed in this study, therefore, it is conceivable that TRAIL-R4 may also have a role in protecting these cells from TRAIL-induced cell death. Although the function of TRAIL-R4 remains to be determined in a physiological context, our results indicate that this receptor in pathological conditions, such as overexpression in primary tumor cells, could represent a problem in oncology. Our results clearly support the inhibitory potential of TRAIL-R4 and, in agreement with previous studies,^{4,5} sustain the demonstration that chemotherapy sensitize tumor cells to TRAIL mainly through the regulation of caspase-8 activation at the DISC level.

The molecular mechanisms leading to the restoration of caspase-8 recruitment and enhancement of caspase-8 activation within the TRAIL DISC after chemotherapy remains an open question. Some reports indicate that chemotherapeutic drugs could enhance TRAIL receptor clustering at the cell surface, through ceramide production and receptor partitioning into lipid rafts.^{28,29} Work is currently in progress to address this question in our laboratory.

Figure 3 The mitochondrial pathway is dispensable for the synergy in TRAIL-R4 expressing HeLa cells. (a) H-TRAIL-R4 cells were infected using the pBabe-blasticidin retroviral vector encoding EGFP or Bcl-2. The expression of the different transgenes was checked by western blot using an anti-Bcl-2 or anti-GFP antibody. Hsc70 was used as a loading control. Molecular size markers are shown on the right in kDa. TRAIL-R4 HeLa cells overexpressing EGFP (EGFP, in white) or Bcl-2 (Bcl-2, in black) were pre-treated with the chemotherapeutic drugs as described in Figure 1 and sequentially treated with His-TRAIL (500 ng/ml for 6 h). Apoptosis was quantified by Hoechst staining. (b) H-TRAIL-R4 cells were infected with pMIG empty vector (EGFP) or pMIG-Bcl-x_L and analyzed by western blot. Molecular size markers are shown on the right in kDa. Sensitivity to apoptosis induced by His-TRAIL, chemotherapy or sequential treatments (H-TRAIL-R4-EGFP, white; H-TRAIL-R4-Bcl-x_L, black) was assessed by Hoechst staining. (c) HCT116 parental (HCT116 wt) and HCT116 Bax^{-/-} cells were infected with an empty pMSCV-vector (HCT116 wt Ctl and HCT116 Bax^{-/-} Ctl) or with pMSCV-vector encoding TRAIL-R4 (HCT116 wt TRAIL-R4 and HCT116 Bax^{-/-} TRAIL-R4). Expression of TRAIL receptors was analyzed by flow cytometry. (d) Apoptosis induced by His-TRAIL (500 ng/ml, 6 h) after chemotherapeutic treatment was measured by Hoechst staining in HCT116 parental Bax wt Ctl (white), HCT116 wt overexpressing TRAIL-R4 (HCT116 wt TRAIL-R4, dashed), HCT116 Bax^{-/-} Ctl (gray) and HCT116 Bax^{-/-} overexpressing TRAIL-R4 cells (HCT116 Bax^{-/-} TRAIL-R4, black). These results are representative of three independent experiments performed in triplicate. Mean percentage of apoptotic cells values and S.D. are shown (mean ± S.D.). Differences between selected groups were compared by non-parametric analysis of variance (ANOVA) with Bonferroni *post hoc* multiple comparison test, ****P* < 0.001, compared with TRAIL stimulation alone in HCT116 Bax-deficient or HCT116 Bax-deficient expressing TRAIL-R4 cells, ns (not statistically significant). (e) Cells were stimulated as above for 3 h with treatments CDDP or VP16 or 72 h with 5FU, and c-FLIP or TRAIL-R4 expression was analyzed by western blotting 48 h or immediately after stimulation, respectively. Molecular size markers are shown on the left in kDa. (f) HCT116 Bax wt and Bax^{-/-} control (Ctl) or TRAIL-R4 (TRAIL-R4) were infected with pMIG-FLIP₁ (FLIP) or an empty vector (EGFP), and sorted by flow cytometry based on GFP positivity. Sensitivity to TRAIL-induced apoptosis after a 72 h pre-treatment with 5FU was measured by Hoechst staining 6 h after His-TRAIL (500 ng/ml) treatment. (g) HeLa control (H-Ctl) and HeLa overexpressing TRAIL-R4 (H-TRAIL-R4) were infected with pBabe-EGFP or pBabe-FLIP. Expression of the different transgenes was checked by western blot. (h) Cells overexpressing EGFP (H-Ctl-GFP in white bars and H-TRAIL-R4-GFP in gray bars) or FLIP (H-Ctl-FLIP dashed bars and H-TRAIL-R4-FLIP in black bars) were stimulated with the chemotherapeutic agents, as described previously, and sequentially treated with His-TRAIL (500 ng/ml) for 6 h. Apoptotic cells were counted after Hoechst staining. These results are representative of at least three independent experiments. Mean percentage of apoptotic cells and S.D. are shown (mean ± S.D.). Differences between selected groups were compared by non-parametric analysis of variance (ANOVA) with Bonferroni *post hoc* multiple comparison test. ****P* < 0.001, H-TRAIL-R4-FLIP compared with H-Ctl-Mock, H-Ctl-FLIP or H-TRAIL-R4-Mock

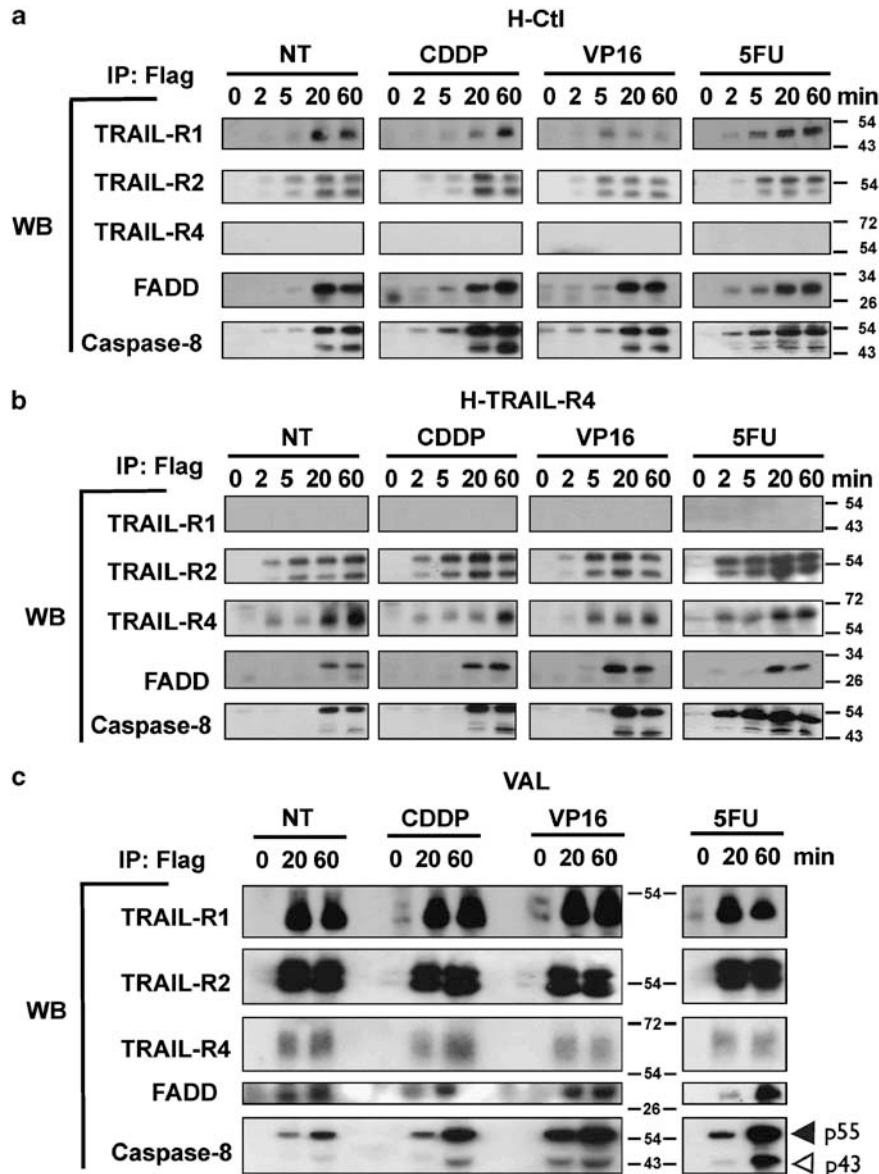


Figure 4 Chemotherapeutic drugs restore TRAIL sensitivity at the DISC level. (a) control HeLa cells (H-Ctl), (b) TRAIL-R4 expressing HeLa cells (H-TRAIL-R4) or (c) VAL cells were pre-treated with CDDP, VP16 or 5FU or left untreated as described in Figure 1, then stimulated with TRAIL for the indicated time. TRAIL DISC was immunoprecipitated (see Materials and Methods section) and analyzed by western blot. Molecular size markers are shown on the right in kDa

Remarkably, like c-FLIP,^{30,31} ectopic expression of TRAIL-R4 induced cross-resistance to some chemotherapeutic drugs *in vitro* and *in vivo*. How TRAIL-R4 impairs chemotherapy-induced apoptosis remains to be determined. Some reports point to the observation that forced aggregation of some death receptors of the TNF family including Fas, or downstream effectors like Bid, may contribute to genotoxic drug-induced apoptosis in a ligand-independent manner.^{31–33} Combined expression of TRAIL-R4 and c-FLIP may, therefore, not only impair TRAIL-induced cell death after chemotherapy, but may also alter chemotherapy itself. In line with this hypothesis, it has been demonstrated that c-FLIP and TRAIL-R4 are overexpressed in a growing number of primary tumors and that their expression levels has recently been

defined as a poor prognostic marker in colorectal³⁴ and prostate cancer patients.³⁵

Altogether our results clearly demonstrate that TRAIL-R4 is a negative regulator of TRAIL whose inhibitory function can be overcome using chemotherapy to restore TRAIL-induced cell death. However, we also demonstrate that TRAIL-R4 cooperates with c-FLIP to inhibit TRAIL-induced apoptosis after chemotherapy. Their ability to cooperate and to efficiently inhibit TRAIL-induced apoptosis needs to be taken into consideration both *in vitro* and in future clinical trials to assess the efficacy of combinatorial treatments associating recombinant TRAIL with chemotherapy. It is anticipated that patients expressing both TRAIL-R4 and c-FLIP may respond better to alternative therapeutic approaches, including

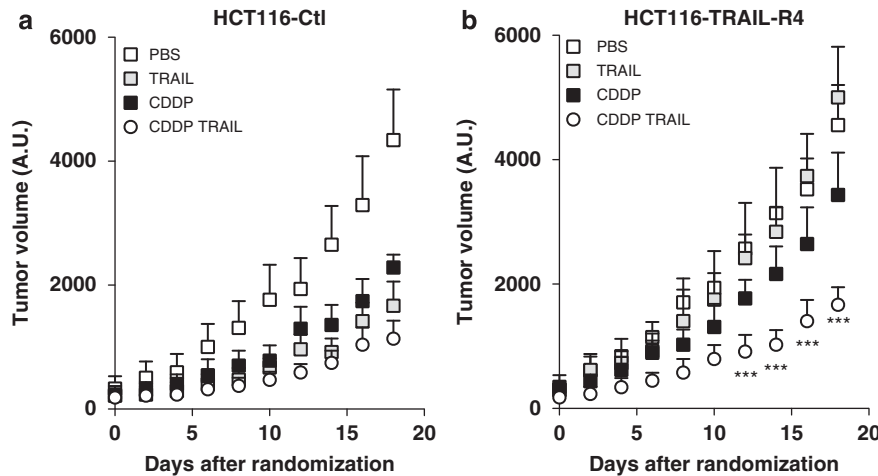


Figure 5 Chemotherapeutic drugs restore TRAIL sensitivity *in vivo*. (a) and (b), HCT116-Ctl or HCT116-TRAIL-R4 cells were implanted into NMRI nu/nu mice and allowed to reach 20 mm³. After randomization (day 0), mice were either injected with PBS (white squares), His-TRAIL alone at 8 mg/kg (gray squares), CDDP at 4 mg/kg (black squares) or sequentially with CDDP and 2 days later with His-TRAIL 8 mg/kg (white circle). Mice were subjected to two treatments spaced within 2 days. Tumors were measured every 2 days using a caliper. The combination was found statistically different from single treatments (****P* < 0.001) at days 14, 16, 18 and 20 as analyzed by ANOVA, two-sided. These results represent mean tumor volume in arbitrary units $\pm$ S.D. of 9 to 10 mice per group from three independent experiments

non-conventional chemotherapeutic drugs, TRAIL derivatives, targeting specifically TRAIL-R2, or to strategies aiming at inhibiting c-FLIP expression or blocking TRAIL-R4.

Materials and Methods

Ligand production and antibodies. Flag-tagged recombinant soluble human TRAIL, his-tagged TRAIL and FasL were produced and used as described previously.³⁶ Anti-Flag (M2) and staurosporin were from Sigma-Aldrich (Lyon, France). For western blot analysis, anti-TRAIL-R1, anti-TRAIL-R2, anti-TRAIL-R3 and anti-TRAIL-R4 antibodies were purchased from Chemicon (Millipore, Molsheim, France), anti-FADD was obtained from Transduction Laboratories (BD biosciences, Le Pont de Claix, France), anti-caspase-8 and anti-caspase-10 were from Medical & Biological Laboratories (Clinisciences, Montrouge, France). Antibodies against active cleaved fragment of caspase-3, and PARP were from Cell Signaling (Millipore), anti-GFP, Bcl-2, cytochrome c, Bax (N-20) and HSC-70 were from Santa Cruz Biotechnology (Tebu-bio, Le Perray en Yvelines, France) and anti-caspase-9 was from Upstate (Millipore). Anti-Bid, anti-Bcl-xL and anti-FLIP (NF6) antibodies were purchased from BD Pharmingen, Transduction Lab (BD Biosciences), Calbiochem (VWR, Fontenay-sous-Bois, France) and Alexis (Coger, Paris, France), respectively. Anti-CoxII, anti-Smac/DIABLO and anti-Omi/HtrA2 were from Molecular probes (Invitrogen, Cergy Pontoise, France), Proscience (Coger, Paris, France) and R&D systems (Lille, France), respectively. For flow cytometry experiments, the anti-TRAIL-R1, anti-TRAIL-R2, anti-TRAIL-R3 and anti-TRAIL-R4 (clones wB-K32, B-L27, wB-B44 and wB-P30 respectively), were kindly provided by Diacalone (Besançon, France). The secondary antibody was an Alexa-488 coupled-goat anti-mouse from Molecular Probes (Invitrogen). The pan-caspase inhibitor (z-VAD-fmk) and caspase-9 inhibitor (z-LEHD-fmk) were purchased from Alexis.

Cell culture. The HeLa (human cervix carcinoma) and SW480 (human colon adenocarcinoma) cell lines were cultured with high-glucose Dulbecco's modified Eagle's medium (Lonza, Levallois-Perret, France) supplemented with 10% fetal bovine serum (Lonza) and penicillin/streptomycin (100 mg/ml of each). The Jurkat (human T lymphoma) cells, VAL (human B lymphoma) and HCT116 human colon adenocarcinoma cell lines were cultured in RPMI 1640 medium (Lonza) containing 10% fetal bovine serum and penicillin/streptomycin. All these cell lines were grown in 5% CO₂ at 37°C. HCT116 Bax +/– or Bax –/– are kind gifts of Dr. Bert Vogelstein (Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, MD, USA).

Retrovirus production and cell transduction. The retroviral vector pMSCV-puro for TRAIL-R4 expression and generation of viruses has been previously described.³⁷ Cells were transduced for 16 h with viral supernatants containing polybrene (8 mg/ml), washed in PBS, and cultured in complete medium containing puromycin (2.5 mg/ml). EGFP, FLIP_L and Bcl-2 were cloned into pBabe-Blasticidin. Transduced cells were then selected with blasticidin (2.5 μ g/ml). pMIG-Bcl-xL expression vector³⁸ was purchased from Addgene (plasmid 8790, Cambridge, MA, USA). pMIG-FLIP_L was obtained as previously described.¹⁴ After transduction, cells were sorted using a cell sorter Coulter Epics Elite ESP (Beckman-Coulter-France, Villepinte, France).

Treatments with chemotherapy and TRAIL. For sequential treatments, cells were treated for 3 h with CDDP (20 μ M) or VP16 (10 μ M) in serum-free medium and then washed. Cells were cultured for 48 h in complete medium before being treated for 6 h with His-TRAIL (500 ng/ml). 5FU was added in complete medium 72 h before TRAIL treatments and the Hoechst analysis.

Hoechst analysis. Apoptosis was assessed by Hoechst staining and determination of the percentage of condensed and fragmented nuclei from at least 300 cells per conditions. Experiments were repeated at least three times.

Bcl-2 and TRAIL-R4 gene silencing by siRNA. TRAIL-R4 siRNA #1 (5'-UCCUUAAGUUCGUCGUCUU-3'), TRAIL-R4 siRNA #2 (5'-UCACUACCUAAU CAUCAU-3') and TRAIL-R4 siRNA #3 (5'-GGGUGUGGAUACACCAU-3') were purchased from Eurogentec (Angers, France). Bcl-2 siRNA was purchased from Invitrogen. Cells were transfected with a scramble, Bcl-2 or TRAIL-R4 targeting siRNAs using Amaxa cell line nucleofector kit V (Lonza) with transfection program N016. 48 h after transfection, Bcl-2 and TRAIL-R4 expression were monitored either by western blotting or by flow cytometry, and sensitivity to TRAIL was assessed by Hoechst.

Bax activation by flow cytometry analysis. Cells, treated or untreated with His-TRAIL and/or chemotherapy were fixed with 4% PFA, permeabilized (PBS, BSA 1% and saponin 0.1%) for 10 min at room temperature and stained with an anti-Bax antibody which recognizes the active N-terminal form of Bax (clone 6A7, Tebu-bio). In all, 10 000 events were analyzed using a LSR2 flow cytometer (BD Biosciences).

Digitonin permeabilization. After treatment, cells were washed in PBS and lysed in buffer containing 75 mM KCl, 1 mM NaH₂PO₄, 8 mM Na₂HPO₄ and 250 mM sucrose containing 400 μ g/ml digitonin. Cells were kept on ice to obtain 90–95% of

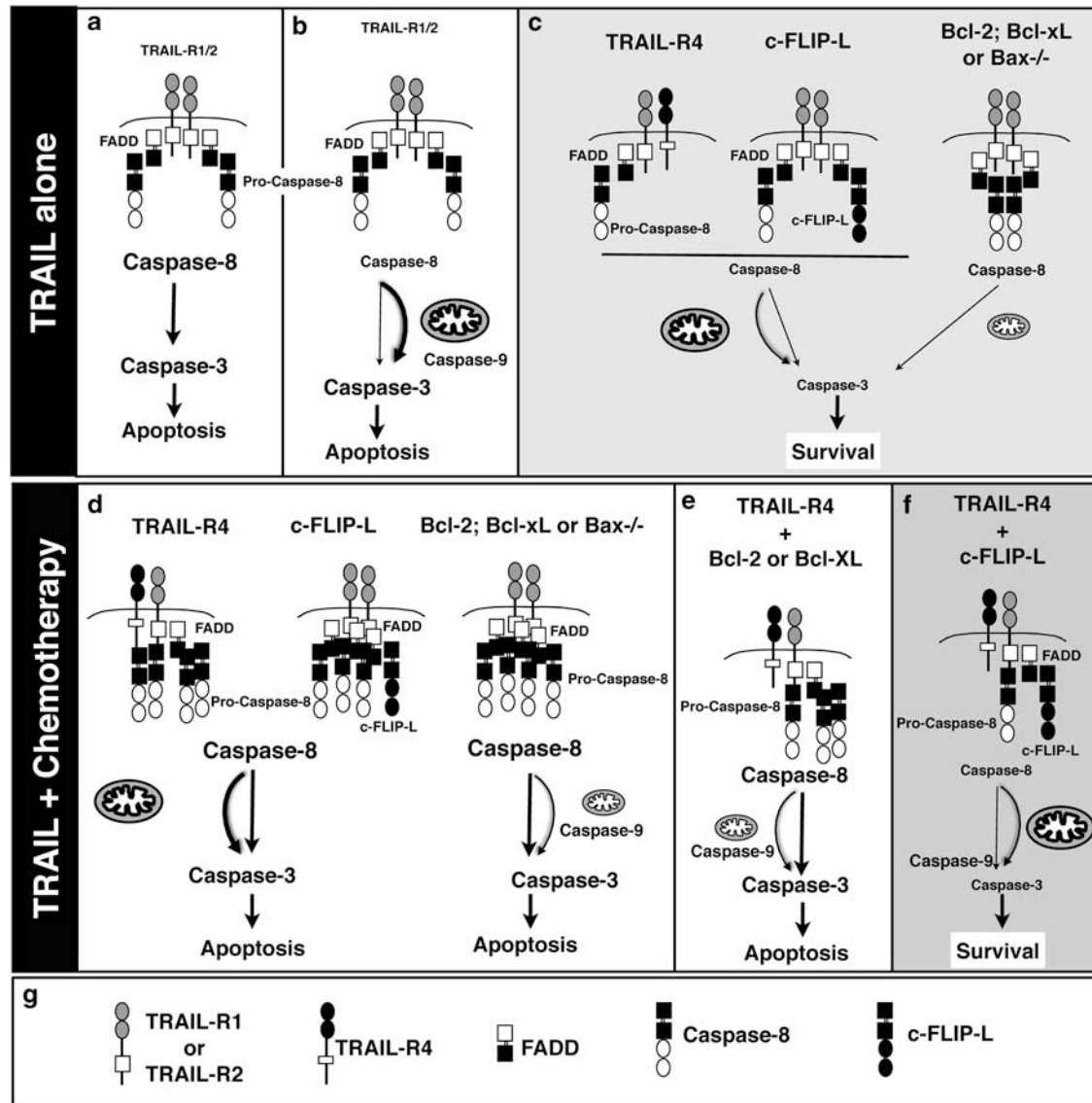


Figure 6 Proposed model of TRAIL-induced cell death regulation. (a) Direct activation of caspase-8 by TRAIL in type I cells. (b) A mitochondrial amplification loop of caspase activation in type II cells is required because of reduced caspase-8 activation upon TRAIL engagement. (c) Overexpression of TRAIL-R4, FLIP-L or mitochondrial block, protects type II cells from TRAIL-induced cell death. TRAIL-R4 and c-FLIP-L limit caspase-8 activation within the TRAIL DISC, which impairs mitochondrial activation, leading to low caspase-3 activation and survival. Mitochondrial block in type II cells, induced by Bcl-2 or Bcl-xL overexpression or Bax-deficiency inhibit amplification of the signal. Caspase-8 is activated but much less efficiently than in type I cells, leading to low caspase-3 activation and survival. (d) Chemotherapeutic drugs restore TRAIL sensitivity mainly through enhanced caspase-8 recruitment to and activation at the DISC. Thus, the threshold of active caspase-8 required to induce direct caspase-3 activation can be reached and cells undergo apoptosis, overcoming TRAIL-R4- and c-FLIP-mediated inhibition of caspase-8, but also inhibition induced by Bcl-2 or Bcl-xL overexpression or Bax-deficiency. (e) Inhibition of the mitochondrial pathway by Bcl-2 or Bcl-xL overexpression in TRAIL-R4-expressing cells fails to compromise chemotherapy-induced sensitization to TRAIL. (f) Forced inhibition of caspase-8 activation in TRAIL-R4 and c-FLIP-L-expressing cells abrogates apoptosis induced by TRAIL after chemotherapy. (g) Schematic representation of TRAIL receptors, FADD, c-FLIP and caspase-8

trypan blue-permeabilized cells. After 5 min at $16\,000 \times g$, supernatants were collected as the cytosolic fraction. Pellets were then lysed in buffer containing 1% Triton-X100. After centrifugation for 20 min at $16\,000 \times g$, supernatants were collected.

Immunoprecipitations. For DISC analysis, 10^8 cells in 1 ml of medium were stimulated with $5\,\mu\text{g}$ Flag-TRAIL cross-linked with $10\,\mu\text{g}$ of M2 antibody for the indicated times at 37°C . Cells were then washed with cold phosphate saline buffer, lysed in 1 ml of lysis buffer containing 1% NP40, 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl and 10% glycerol. Lysates were pre-cleared with Sepharose 6B (Sigma-Aldrich), and immunoprecipitated overnight at 4°C with G-protein Sepharose beads (Amersham Biosciences, Les Ulis, France). Beads were then washed four times

with the respective detergent, and immunoprecipitates were eluted in lysis buffer (Tris-HCl 63 mM, SDS 2%, phenol red 0.03%, glycerol 10% and DTT 100 mM of pH 6.8), boiled for 5 min and processed for immunoblotting.

Western blotting. Immunoprecipitates or cell lysates were resolved by SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes. Nonspecific binding sites were blocked by incubation in PBS containing 0.05% of Tween 20 and 5% of milk powder. Immunoblots were then incubated with specific primary antibody followed by HRP-conjugated secondary antibody and were developed by the enhanced chemiluminescence method according to the manufacturer's protocol (Pierce, Rockford, IL, USA).

In vivo evaluation of the combination of CDDP and TRAIL. 5-week-old athymic female mice (NMRI nu/nu) were obtained from Janvier (Le Genest Saint-Isle, France). This protocol was approved by the local Animal Ethical committee (Université de Bourgogne, Dijon, France). Mice were subcutaneously xenografted with 4×10^6 HCT116-Ctl cells in the right flank and 4×10^6 HCT116-TRAIL-R4 in the left flank. Mice were weighed and tumor volume was evaluated every 2 days by caliper measurement using the following formula: $(l \times l \times L)/2$, with l the lower and L the higher dimension. When the tumor volume reached 20 mm^3 , mice were divided randomly into four groups with four mice per group (day 0). The first group served as a control and received 0.2 ml PBS as vehicle at days 0 and 8, and 0.1 ml PBS containing 10 mM β -mercaptoethanol at days 2, 3, 4, 5 and 10, 11, 12, 13. The second group was injected as group 1, but received 4 mg/kg CDDP at day 0 and day 8. The third group received 8 mg/kg recombinant His-TRAIL at days 2, 3, 4, 5 and days 10, 11, 12, 13 and PBS at days 0 and 8. The fourth group received 4 mg/kg CDDP at days 0 and 8 and 8 mg/kg recombinant His-TRAIL at days 2, 3, 4, 5 and days 10, 11, 12, 13. All administrations were done intraperitoneally. The initial value for each group (day 0) was arbitrarily established as 100, and all subsequent changes in tumor volume for each group were expressed as a percentage change in comparison with the starting tumor volume $[(\text{Tumor volume day } 1) \times 100 / (\text{Tumor volume at day } 0)]$, and are referred as arbitrary tumor volume.

Conflict of interest

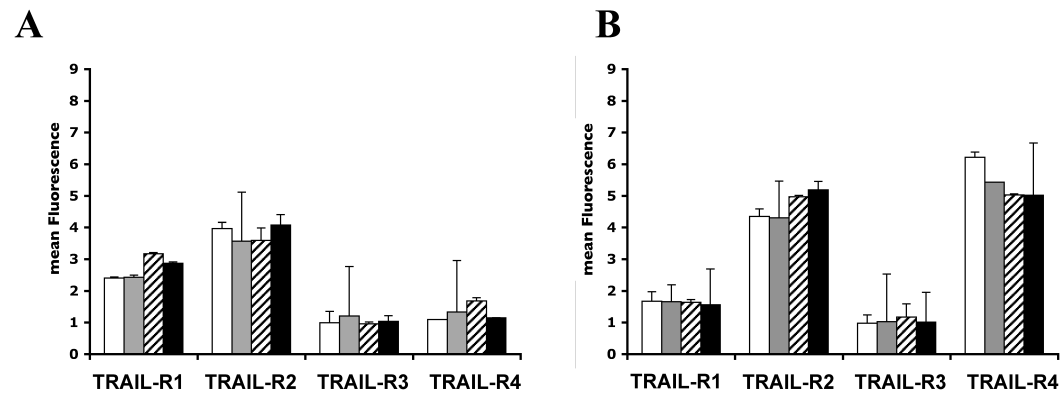
The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements. This work is supported by grants of the Conseil Régional de Bourgogne, the INCa (Institut National du Cancer), Cancéropôle Grand-Est, ANR (Agence Nationale de la Recherche, ANR-06-JCJC-0103 and 07-PCV-0031), and the European Community (ApopTrain Marie Curie RTN) (OM and EI). AM, DM, NL, DL and GJ are supported by fellowships from the Ligue Nationale contre le Cancer, the Ministry of Research and Education, the ARC (Association pour la Recherche sur le Cancer), the INSERM and the Conseil Régional de Bourgogne. We are indebted to Bert Vogelstein for HCT116 Bax^{-/-} cell line, to Eric Fourneau for technical help with *in vivo* experiments and to Sarah Shirley for critical reading of the manuscript.

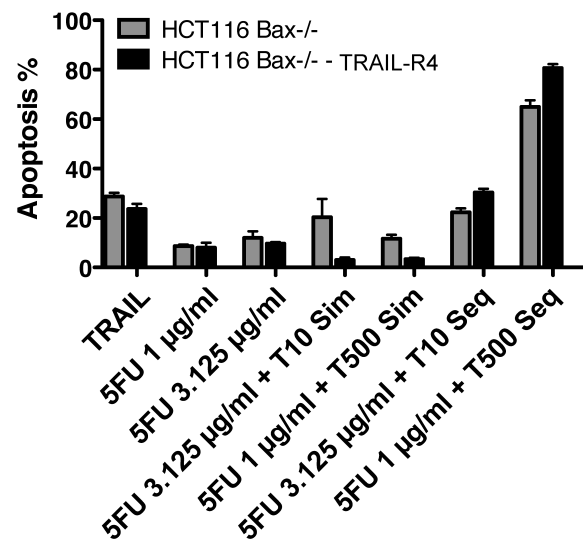
- Ashkenazi A, Holland P, Eckhardt SG. Ligand-based targeting of apoptosis in cancer: the potential of recombinant human apoptosis ligand 2/Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (rhApo2L/TRAIL). *J Clin Oncol* 2008; **26**: 3621–3630.
- Merino D, Lalaoui N, Morizot A, Solary E, Micheau O. TRAIL in cancer therapy: present and future challenges. *Expert opin ther targets* 2007; **11**: 1299–1314.
- Berg D, Lehne M, Muller N, Siegmund D, Munkel S, Sebald W *et al*. Enforced covalent trimerization increases the activity of the TNF ligand family members TRAIL and CD95L. *Cell Death Differ* 2007; **14**: 2021–2034.
- Ganten TM, Haas TL, Sykora J, Stahl H, Sprick MR, Fas SC *et al*. Enhanced caspase-8 recruitment to and activation at the DISC is critical for sensitization of human hepatocellular carcinoma cells to TRAIL-induced apoptosis by chemotherapeutic drugs. *Cell Death Differ* 2004; **11**(Suppl 1): S86–S96.
- Lacour S, Micheau O, Hammann A, Drouineau V, Tschopp J, Solary E *et al*. Chemotherapy enhances TNF-related apoptosis-inducing Ligand DISC assembly in HT29 human colon cancer cells. *Oncogene* 2003; **22**: 1807–1816.
- Ndozangue-Tourigoue O, Sebbagh M, Merino D, Micheau O, Bertoglio J, Breard J. A mitochondrial block and expression of XIAP lead to resistance to TRAIL-induced apoptosis during progression to metastasis of a colon carcinoma. *Oncogene* 2008; **27**: 6012–6022.
- LeBlanc H, Lawrence D, Varfolomeev E, Totpal K, Morlan J, Schow P *et al*. Tumor-cell resistance to death receptor-induced apoptosis through mutational inactivation of the proapoptotic Bcl-2 homolog Bax. *Nat Med* 2002; **8**: 274–281.
- Sanlioglu AD, Karacay B, Koksali IT, Griffith TS, Sanlioglu S. DcR2 (TRAIL-R4) siRNA and adenovirus delivery of TRAIL (Ad5hTRAIL) break down *in vitro* tumorigenic potential of prostate carcinoma cells. *Cancer Gene Ther* 2007; **14**: 976–984.
- Sanlioglu AD, Korum AF, Pesterelli E, Erdogan G, Karaveli S, Savas B *et al*. TRAIL death receptor-4 expression positively correlates with the tumor grade in breast cancer patients with invasive ductal carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2007; **69**: 716–723.
- Riccioni R, Pasquini L, Mariani G, Saulle E, Rossini A, Diverio D *et al*. TRAIL decoy receptors mediate resistance of acute myeloid leukemia cells to TRAIL. *Haematologica* 2005; **90**: 612–624.
- Griffith TS, Chin WA, Jackson GC, Lynch DH, Kubin MZ. Intracellular regulation of TRAIL-induced apoptosis in human melanoma cells. *J Immunol* 1998; **161**: 2833–2840.
- Merino D, Lalaoui N, Morizot A, Schneider P, Solary E, Micheau O. Differential inhibition of TRAIL-mediated DR5-DISC formation by decoy receptors 1 and 2. *Mol Cell Biol* 2006; **26**: 7046–7055.
- Llobet D, Eritja N, Encinas M, Llecha N, Yeramian A, Pallares J *et al*. CK2 controls TRAIL and Fas sensitivity by regulating FLIP levels in endometrial carcinoma cells. *Oncogene* 2008; **27**: 2513–2524.
- Travert M, Ame-Thomas P, Pangault C, Morizot A, Micheau O, Semana G *et al*. CD40 ligand protects from TRAIL-induced apoptosis in follicular lymphomas through NF- κ B activation and up-regulation of c-FLIP and Bcl-xL. *J Immunol* 2008; **181**: 1001–1011.
- von Haefen C, Gillissen B, Hemmati PG, Wendt J, Guner D, Mrozek A *et al*. Multidomain Bcl-2 homolog Bax but not Bak mediates synergistic induction of apoptosis by TRAIL and 5-FU through the mitochondrial apoptosis pathway. *Oncogene* 2004; **23**: 8320–8332.
- Galligan L, Longley DB, McEwan M, Wilson TR, McLaughlin K, Johnston PG. Chemotherapy and TRAIL-mediated colon cancer cell death: the roles of p53, TRAIL receptors, and c-FLIP. *Mol Cancer Ther* 2005; **4**: 2026–2036.
- Pavet V, Beyrath J, Pardin C, Morizot A, Lechner MC, Briand JP *et al*. Multivalent DR5 peptides activate the TRAIL death pathway and exert tumoricidal activity. *Cancer res* 2010; **70**: 1101–1110.
- Soria JC, Smit E, Khayat D, Besse B, Yang X, Hsu CP *et al*. Phase 1b study of dulanermin (recombinant human Apo2L/TRAIL) in combination with paclitaxel, carboplatin, and bevacizumab in patients with advanced non-squamous non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2010; **28**: 1527–1533.
- Koornstra JJ, Kleibeuker JH, van Geelen CM, Rijkken FE, Hollema H, de Vries EG *et al*. Expression of TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) and its receptors in normal colonic mucosa, adenomas, and carcinomas. *J Pathol* 2003; **200**: 327–335.
- Ganten TM, Sykora J, Koschny R, Batke E, Aulmann S, Mansmann U *et al*. Prognostic significance of tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) receptor expression in patients with breast cancer. *J Mol Med* 2009; **87**: 995–1007.
- Granci V, Bibeau F, Kramar A, Boissiere-Michot F, Thezenas S, Thirion A *et al*. Prognostic significance of TRAIL-R1 and TRAIL-R3 expression in metastatic colorectal carcinomas. *Eur J Cancer* 2008; **44**: 2312–2318.
- Spencer SL, Gaudet S, Albeck JG, Burke JM, Sorger PK. Non-genetic origins of cell-to-cell variability in TRAIL-induced apoptosis. *Nature* 2009; **459**: 428–432.
- Nagane M, Pan G, Weddle JJ, Dixit VM, Cavenue WK, Huang HJ. Increased death receptor 5 expression by chemotherapeutic agents in human gliomas causes synergistic cytotoxicity with tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand *in vitro* and *in vivo*. *Cancer res* 2000; **60**: 847–853.
- Nguyen DM, Yeow WS, Ziauddin MF, Baras A, Tsai W, Reddy RM *et al*. The essential role of the mitochondria-dependent death-signaling cascade in chemotherapy-induced potentiation of Apo2L/TRAIL cytotoxicity in cultured thoracic cancer cells: amplified caspase 8 is indispensable for combination-mediated massive cell death. *Cancer J* 2006; **12**: 257–273.
- Ruiz-Ruiz C, Lopez-Rivas A. Mitochondria-dependent and -independent mechanisms in tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis are both regulated by interferon-gamma in human breast tumour cells. *Biochem J* 2002; **365** (Part 3): 825–832.
- Wilson TR, McLaughlin KM, McEwan M, Sakai H, Rogers KM, Redmond KM *et al*. c-FLIP: a key regulator of colorectal cancer cell death. *Cancer res* 2007; **67**: 5754–5762.
- Mirandola P, Ponti C, Gobbi G, Sponzilli I, Vaccarezza M, Cocco L *et al*. Activated human NK and CD8⁺ T cells express both TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) and TRAIL receptors but are resistant to TRAIL-mediated cytotoxicity. *Blood* 2004; **104**: 2418–2424.
- Dumitru CA, Carpinteiro A, Trarbach T, Hengge UR, Gulbins E. Doxorubicin enhances TRAIL-induced cell death via ceramide-enriched membrane platforms. *Apoptosis* 2007; **12**: 1533–1541.
- Xu L, Qu X, Zhang Y, Hu X, Yang X, Hou K *et al*. Oxaliplatin enhances TRAIL-induced apoptosis in gastric cancer cells by CBL-regulated death receptor redistribution in lipid rafts. *FEBS Lett* 2009; **583**: 943–948.
- Longley DB, Wilson TR, McEwan M, Allen WL, McDermott U, Galligan L *et al*. c-FLIP inhibits chemotherapy-induced colorectal cancer cell death. *Oncogene* 2006; **25**: 838–848.
- Micheau O, Solary E, Hammann A, Dimanche-Boitrel MT. Fas ligand-independent, FADD-mediated activation of the Fas death pathway by anticancer drugs. *JBiol Chem* 1999; **274**: 7987–7992.
- Rebillard A, Jouan-Lanhuet S, Jouan E, Legembre P, Pizon M, Sergent O *et al*. Cisplatin-induced apoptosis involves a Fas-ROCK-ezrin-dependent actin remodelling in human colon cancer cells. *Eur J Cancer* 2010; **46**: 1445–1455.
- Kohler B, Anguissola S, Concannon CG, Rehm M, Kogel D, Prehn JH. Bid participates in genotoxic drug-induced apoptosis of HeLa cells and is essential for death receptor ligands' apoptotic and synergistic effects. *PLoS One* 2008; **3**: e2844.
- Ullenhag GJ, Mukherjee A, Watson NF, Al-Attar AH, Scholefield JH, Durrant LG. Overexpression of FLIPL is an independent marker of poor prognosis in colorectal cancer patients. *Clin Cancer Res* 2007; **13**: 5070–5075.

35. Koksai IT, Sanlioglu AD, Karacay B, Griffith TS, Sanlioglu S. Tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand-R4 decoy receptor expression is correlated with high Gleason scores, prostate-specific antigen recurrence, and decreased survival in patients with prostate carcinoma. *Urol Oncol* 2008; **26**: 158–165.
36. Schneider P. Production of recombinant TRAIL and TRAIL receptor: Fc chimeric proteins. *Methods Enzymol* 2000; **322**: 325–345.
37. Morgenstern JP, Land H. Advanced mammalian gene transfer: high titre retroviral vectors with multiple drug selection markers and a complementary helper-free packaging cell line. *Nucleic Acids Res* 1990; **18**: 3587–3596.
38. Cheng EH, Wei MC, Weiler S, Flavell RA, Mak TW, Lindsten T *et al*. BCL-2, BCL-X(L) sequester BH3 domain-only molecules preventing BAX- and BAK-mediated mitochondrial apoptosis. *Mol cell* 2001; **8**: 705–711.

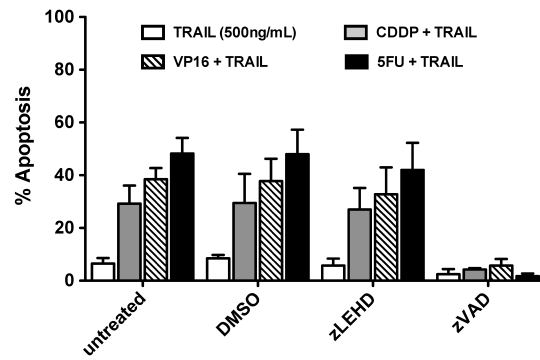
Supplementary Information accompanies the paper on Cell Death and Differentiation website (<http://www.nature.com/cdd>)



Supplementary Figure 1: FACS analysis of TRAIL receptor after chemotherapy Example of one representative analysis of TRAIL receptor expression in **(A)** control HeLa cells (H-Ctl) **(B)** H-TRAIL-R4 cells, 48 hours (CDDP and VP16) or 72 hours (5FU) after chemotherapy. Untreated cells (white), stimulated with CDDP (grey), VP16 (dashed) or 5FU (black).



Supplementary Figure 2: Comparison of treatments schemes, sequential versus simultaneous combined *TRAIL* and *5FU*. HCT116 cells deficient for Bax expression (grey bars) or Bax-deficient cells ectopically expressing TRAIL-R4 (black bars) were stimulated with 500 ng recombinant His-TRAIL, 1 µg/ml or 3.125 µg/ml 5FU for 72 hours or the combinations for 24 hours at the indicated concentrations, either sequentially (Seq) or simultaneously (Sim). Apoptosis was determined by Hoescht staining 24 h after TRAIL stimulation.



Supplementary Figure 3: The Pancaspase inhibitor zVAD but not the Caspase-9 inhibitor zLEHD abrogates chemotherapy-induced sensitization to TRAIL. After chemotherapy, parental H-TRAIL-R4 cells were pretreated for 30 minutes, prior His-TRAIL stimulation (500 ng/ml, 6 hours) with 25 μ M of z-VAD-fmk, 25 μ M z-LEHD-fmk or the corresponding amount of DMSO. Apoptosis was measured by Hoechst staining. These results are representative of 3 independent experiments. Mean apoptosis values and SD are shown (mean $\pm$ SD).

III - Combinaison de TRAIL et d'un composé anti-cancéreux issu des plantes : la quercétine

Article III : Mcl-1 and survivin downregulation by quercetin restores TRAIL-induced apoptosis in Non-Hodgkin Lymphoma B-Cells.

Guillaume Jacquemin, Granci Virginie, Gallouet Anne Sophie, Lalaoui Najoua, Morlé Aymeric, Iessi Elisabetta, Morizot Alexandre, Garrido Carmen, Guillaudeux Thierry and Micheau Olivier

Article en préparation.

Contexte de l'étude :

Dans la première partie de ce manuscrit, nous nous sommes focalisés aux cellules cancéreuses dont la résistance à TRAIL était due à l'expression membranaire de TRAIL-R4. Nous avons décrypté les mécanismes en jeu dans cette résistance et nous avons validé une stratégie combinatoire, basée sur l'utilisation de drogues chimiothérapeutiques, permettant de contourner cette résistance à TRAIL. Cependant, toutes les cellules tumorales résistantes n'expriment pas forcément les récepteurs antagonistes, et les mécanismes de résistance à TRAIL sont très variés. Dans cette partie, nous nous sommes donc intéressés à d'autres types de cellules résistantes à TRAIL, notamment en raison de l'expression concomitante de protéines anti-apoptotiques des familles Bcl-2 et IAP. Plus particulièrement, nous avons choisi de travailler sur des lignées de lymphomes B non-Hodgkiniens, très résistantes à TRAIL, pour les raisons évoquées ci-après.

Le lymphome est une prolifération cellulaire maligne du tissu lymphoïde qui se développe principalement à partir des ganglions lymphatiques. Selon la nature des cellules atteintes, les lymphomes sont divisés en deux grandes catégories, la maladie de Hodgkin et les lymphomes non-Hodgkiniens. Depuis 25 ans, l'incidence des lymphomes Hodgkiniens a tendance à décroître, tandis que le nombre de lymphomes non-Hodgkiniens (LNH) a presque triplé durant la même période. Les LNH sont désormais au cinquième rang des cancers les plus

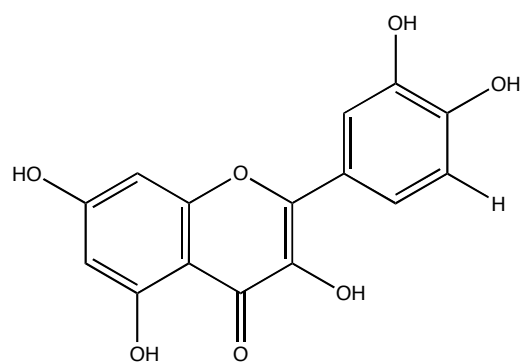


Figure 23: Structure chimique de la quercétine (3,3',4',5,7-pentahydroxyflavone).

fréquents, soit 4 % des cancers. En France, 13 000 nouveaux cas de LNH dont 5 000 décès ont été recensés en 2006 (Ferlay et al., 2007). Parmi les LNH, environ 85 % des cas ont pour origine les cellules B du système immunitaire, contre seulement 15 % pour les cellules T. Le traitement standard des lymphomes B non-Hodgkiniens comprend un protocole chimiothérapeutique classique (CHOP) pouvant être combiné à une immunothérapie par le Rituximab (anticorps monoclonal anti-CD20). Malgré une efficacité plutôt satisfaisante, des résistances peuvent apparaître et ce traitement est associé à des effets secondaires gênants, notamment chez les sujets âgés. Ces lymphomes représentent donc un problème majeur de santé publique, d'où la nécessité d'améliorer les traitements existants ou de trouver de nouvelles combinaisons thérapeutiques efficaces.

Pour cette étude, nous avons choisi de travailler sur trois lignées de lymphomes B non-Hodgkiniens : VAL, RL et SUDHL4. Ces lignées sont de type folliculaire transformé et représentent le type le plus fréquent de lymphome non-Hodgkiniens (40 % des LNH). Leur particularité est la présence d'une translocation chromosomique t(14;18), très fréquente dans ce type de pathologie, qui conduit à la surexpression constitutive de la protéine anti-apoptotique Bcl-2. Cette caractéristique participe à l'agressivité de cette pathologie et à la résistance aux traitements anti-cancéreux actuels. Nous avons dans un premier temps évalué la sensibilité à TRAIL de ces trois lignées. Les lignées VAL et RL sont totalement résistantes à TRAIL, tandis que la lignée SUDHL4 répond partiellement à cette cytokine. Au niveau moléculaire, la différence de sensibilité entre ces cellules peut s'expliquer par la plus forte expression de Mcl-1 et de survivine dans les VAL et les RL. L'implication de ces protéines dans la résistance à TRAIL des VAL et RL a été confirmée par siRNA. De plus, contrairement aux SUDHL4, la voie mitochondriale de l'apoptose n'est pas activée en réponse à TRAIL dans les VAL et les RL. Les lymphomes VAL et RL sont donc particulièrement intéressants puisqu'ils possèdent une multi-résistance à TRAIL de par l'expression de Bcl-2, Mcl-1, la survivine et même de TRAIL-R4 dans le cas des VAL.

Pour contourner la forte résistance à TRAIL des lymphomes VAL et RL, notre intérêt s'est porté sur un composé naturel polyphénolique de la classe des flavonoïdes, la quercétine (**Figure 23**). La quercétine est un pigment de couleur jaune présent dans certaines plantes et dans la plupart des fruits et des légumes et est connu pour ses propriétés anticancéreuses (Bischoff, 2008). L'oignon est notamment connu pour contenir les plus fortes concentrations de quercétine. Plusieurs études ont démontré le potentiel pro-apoptotique de la quercétine

envers divers types de tumeurs. De plus, des études *in vivo* chez l'animal ont mis en avant l'absence de toxicité envers les cellules saines. En 1996, une étude clinique de phase I a montré que cette molécule pouvait être administrée chez l'Homme en intraveineuse sans effets secondaires majeurs (Ferry et al., 1996). La quercétine est donc un excellent candidat pour une future utilisation clinique. Enfin, certaines études ont démontré la capacité de la quercétine à inhiber l'expression de Bcl-2 et de la survivine (Tan et al., 2009). Toutes ces raisons font de la quercétine une molécule potentiellement intéressante en association avec TRAIL dans nos modèles cellulaires de lymphomes.

Résumé des résultats obtenus :

Nos résultats montrent qu'un pré-traitement par la quercétine permet de rétablir efficacement la sensibilité à TRAIL des lymphomes VAL et RL. L'action synergique de ces deux composés est strictement dépendante des caspases et notamment de l'activation de la caspase-9. D'autre part, la quercétine ne modifie pas l'expression des récepteurs de TRAIL à la membrane, mais stimule l'expression et le recrutement de la caspase-10 au sein du DISC de TRAIL. Cependant, la caspase-10 ne semble pas nécessaire à l'effet synergique puisque son invalidation par siRNA n'influence pas l'efficacité du traitement. Nous montrons que la quercétine agit en inhibant l'expression protéique de Mcl-1 et de la survivine. Ces 2 protéines étant connues pour être régulées négativement par p53, nous avons regardé l'importance de ce suppresseur de tumeur lors du traitement par la quercétine. Nous observons que l'expression de la protéine p53 est induite par la quercétine, en même temps que la dérégulation de son inhibiteur MDM2. En fait, nous avons montré que l'inhibition de Mcl-1 est dépendante de l'action du protéasome, tandis que l'inhibition de la survivine intervient plutôt au niveau transcriptionnel. D'autre part, la quercétine permet de restaurer l'activation de la voie mitochondriale par TRAIL, comme l'attestent les mesures de relargage du cytochrome c dans le cytoplasme. L'inactivation de Bid par siRNA ou l'utilisation d'un inhibiteur de la perméabilisation mitochondriale (le *bax channel blocker*) bloque l'effet synergique. Lors du traitement séquentiel, l'activation de la mitochondrie implique à la fois Bax et Bak, puisque l'inactivation simultanée de ces 2 protéines par siRNA est requise pour bloquer la synergie.

Ce travail démontre que la combinaison de TRAIL avec la quercétine agit efficacement contre des lymphomes B très résistants exprimant à la fois Bcl-2, Mcl-1 et la survivine. Le

mécanisme moléculaire sous-jacent implique l'inhibition de Mcl-1, de la survivine et l'activation de la boucle mitochondriale, indépendamment de p53. Les récepteurs de mort de TRAIL, tout comme Bcl-2, ne sont pas régulés par la quercétine, et la sensibilisation n'intervient pas au niveau de la formation du DISC. Cette étude est la première à prouver l'efficacité de cette combinaison thérapeutique sur ce type de cancer agressif. De même, l'inhibition de l'expression de Mcl-1 par la quercétine n'avait encore jamais été décrite auparavant. Ce travail ouvre des perspectives prometteuses qui pourront par la suite être confirmées dans un modèle *in vivo*.

Mcl-1 and survivin downregulation by quercetin restores TRAIL-induced apoptosis in Non-Hodgkin Lymphoma B-Cells

Jacquemin Guillaume¹, Granci Virginie¹, Gallouet Anne Sophie², Lalaoui Najoua¹, Morlé Aymeric¹, Iessi Elisabetta¹, Morizot Alexandre¹, Garrido Carmen¹, Guillaudeux Thierry² and Micheau Olivier^{1,3,4}

¹ INSERM, U866, Dijon, F-21079 France ; Faculty of Medicine and Pharmacy, Univ. Bourgogne, Dijon, F-21079 France.

² INSERM, U917, Université de Rennes 1, IFR140, Campus médical de Villejean, 2 Av. du Pr. Léon Bernard, 35043 Rennes cedex, France.

³ Centre Georges-François Leclerc, Dijon, F-21000 France.

⁴ Correspondence should be addressed to: O Micheau, INSERM, U866, Dijon, F-21079 France; Faculty of Medicine and Pharmacy, Univ Bourgogne, Dijon, F-21079 France. Phone: + 33 3 80 39 34 68. Fax: + 33 3 80 39 34 34; e-mail: omicheau@u-bourgogne.fr.

Running Title : Quercetin restores TRAIL-induced apoptosis in Non-Hodgkin B Lymphomas

Abstract

Non-Hodgkin's B cell lymphoma account for approximately 70% of B cell lymphomas. While its incidence worldwide is increasing dramatically, the disease is still associated with high morbidity due to ineffectiveness of conventional therapies, urging for novel therapeutic approaches. Unconventional compounds including polyphenols and the cytokine TRAIL are being extensively studied for their capacity to restore apoptosis in a large number of tumors including lymphomas.

We demonstrate here that quercetin, a natural flavonoid, restores TRAIL-induced cell death in transformed follicular lymphoma B cell lines, despite high Bcl-2 expression levels owing to the chromosomal translocation t(14;18). Quercetin rescued mitochondrial activation by inhibiting TRAIL-mediated Mcl-1 up-regulation, through proteasomal degradation and by inhibiting survivin expression at the transcriptional level, irrespective of p53. Restoration of the TRAIL pathway required Bax and Bak but was independent of enhanced TRAIL DISC formation, regardless of quercetin's ability to induce caspase-10 upregulation.

We demonstrate altogether that quercetin-mediated inactivation of survivin and Mcl-1 is sufficient to restore TRAIL sensitivity in B cell non-Hodgkin's lymphoma. Our results suggest therefore that combining quercetin to TRAIL treatments may be useful to non-Hodgkin's lymphoma patients.

Introduction:

Follicular lymphomas (FL) are indolent non-Hodgkin lymphomas which prognosis and median survival is relatively good. However, the majority of patients having FL experience recurrent relapse, leading to death. High morbidity is most of the time associated with ineffectiveness of most conventional therapies to eradicate diffuse large B cell lymphoma (DLBCL) arising from transformed follicular lymphoma ¹. Transformed FL give rise to a more aggressive phase that is clinically marked by rapidly enlarging lymph nodes, development of B-symptoms causing the death of the patients ². High-grade B-cell lymphoma/leukemia are often associated with Bcl-2 chromosomal translocation t(14;18) ⁴ or 8q24/MYC rearrangements ^{5,6} leading to dysregulated apoptosis. Bcl-2 being an important negative regulator of the mitochondrial pathway, novel therapeutic approaches circumventing the mitochondrial block may thus prove useful to treat patients suffering from NHL ⁷. In this context, unconventional anti-tumor compounds including polyphenols and the cytokine TRAIL are being extensively studied for their capacity to restore apoptosis in a large number of tumors ⁸.

Apo2L/TRAIL is a promising anti-tumor drug owing to its ability to trigger apoptosis selectively in cancer cells. TRAIL binding to its cognate receptors TRAIL-R1 or TRAIL-R2 induces the formation of a molecular platform called the DISC (Death-Inducing Signaling Complex), through homotypic interactions, enabling the recruitment of the adaptor protein FADD which in turn allows the recruitment of caspase-8 and -10 ⁹. Formation of the TRAIL DISC brings together caspases monomers in close proximity, enabling their activation and subsequent release to the cytosol, inducing caspase-3 activation through proteolytic cleavage, and execution of the apoptotic program ¹⁰. Cell dismantling heavily relies on the amount of caspase-8 that gets activated within the DISC ¹¹. Two main apoptotic signaling pathways have been described so far,

based on caspase-8 and mitochondrial activation. In type I cells, caspase-3 is directly processed by the active caspase-8 that originates from the TRAIL DISC, while caspase-3 activation in type II cells, requires the mitochondrial amplification loop leading to the activation of caspase-9¹². In the latter situation, caspase-8 cleaves Bid, a BH3-only protein that targets the intrinsic pathway through Bax and Bak, allowing the formation of the apoptosome, another molecular platform, in which caspase-9 gets activated. Mitochondrial block in type II cells, induced by Bcl-2 or Bcl-xL overexpression, or by a deficiency in Bax and/or Bak expression, impedes caspase-3 activation and thus protects tumor cells from TRAIL-induced apoptosis^{13,14}. At the membrane level, TRAIL-induced cell death can also be tightly controlled by two antagonistic receptors, namely TRAIL-R3 and TRAIL-R4. These receptors can selectively compromise TRAIL-induced apoptosis. We have demonstrated recently that TRAIL-R4 could interact with TRAIL-R2 within the TRAIL DISC, where it impairs caspase-8 activation¹⁵. Restoration of cell sensitivity to TRAIL can however be obtained in a large panel of tumor types, by conventional or non-conventional anti-tumor drugs, including polyphenols⁸. We demonstrate here that transformed follicular lymphoma B cell lines can exhibit cell resistance to TRAIL-induced cell death due to endogenous elevated expression of several anti-apoptotic proteins, including Mcl-1, survivin, Bcl-2 or TRAIL-R4. Interestingly, the tested NHL-B cell lines, which are characterized by a robust inhibition of the mitochondrial pathway, are sensitized to apoptosis after sequential stimulation with non-cytotoxic concentrations of quercetin and TRAIL induced apoptosis in these cells, which are characterized by a robust inhibition of the mitochondrial pathway. We demonstrate here that quercetin rescues TRAIL-induced cell death through Mcl-1-mediated proteasomal degradation and inhibition of survivin expression at the transcriptional level. Our results uncover a novel molecular mechanism by which quercetin exerts synergistic activity with

TRAIL, namely restoration of the mitochondrial pro-apoptotic potential through the inactivation of Mcl-1.

Results :

VAL and RL B cell lines display resistance to TRAIL-induced apoptosis.

The non hodgkin's B lymphoma cell lines VAL, RL and SUDHL4 exhibit differential sensitivity to TRAIL (Figure 1A). While VAL and RL cells are nearly completely insensitive to TRAIL-induced killing, viability of SUDHL4 cells decreased after TRAIL stimulation in a dose dependent manner (Figure 1A). Analysis of caspases activation by western blotting after TRAIL stimulation indicated that caspase-3 is fully cleaved in the sensitive SUDHL4 cell line, but is only partly cleaved in the resistant VAL and RL cells (Figure 1B). Moreover, caspase-2 cleavage is lower in VAL and RL cells than in SUDHL4 cells. However, activation of caspase-8 and caspase-9, as well as Bid, is quite similar in these three lymphomas cell lines. Caspase-9 cleavage in the two resistant VAL and RL cell lines probably results from caspase-8 activation, since neither Bax nor Bak get significantly activated upon TRAIL stimulation, as opposed to SUDHL4 cells (Figure 1C). In agreement with these findings, strong cytochrome c release was observed in SUDHL4 cells, but not in VAL and RL cells (Figure 1D). The defect in TRAIL-induced mitochondrial activation in VAL and RL cells could explain their resistance to other pro-apoptotic stimuli such as staurosporine, in a dose-dependent manner (supplemental Figure #2).

Resistance to TRAIL-induced apoptosis in VAL and RL cells is multifactorial but can be overcome by quercetin

Resistance to TRAIL-induced cell death can occur at the membrane or mitochondrial level, but also downstream the mitochondria. In order to understand the molecular mechanisms underlying TRAIL resistance in these B cell lymphoma cell lines, TRAIL-receptor expression was first analyzed by FACS staining. TRAIL-R1 and TRAIL-R2 were expressed to similar extent in all cell lines and no expression of TRAIL-R3 could be detected (Figure 2A). TRAIL-R4 was expressed by the TRAIL resistant cell lines to varying extent, with VAL cells expressing high levels of TRAIL-R4 and RL cells expressing low levels of TRAIL-R4. Strikingly, SUDHL4 and VAL cells expressed comparable levels of TRAIL-R4, suggesting that TRAIL-R4 expression alone might not account for TRAIL resistance. However, TRAIL-R4 inactivation in VAL cells partially restored TRAIL sensitivity (Figure 2C), indicating that TRAIL-R4 contributes, at least in part, to the resistance in VAL cells. TRAIL-R4 inactivation in RL cells failed to restore TRAIL sensitivity, indicating that this antagonistic receptor is not involved in the resistance, probably due to the limited amount of receptor expressed at the cell surface. We next analyzed c-FLIP expression levels by western blotting, and found a clear difference in c-FLIP expression content in resistant cells as compared to sensitive SUDHL4 cells (Figure 2B). Yet, inhibition of c-FLIP by siRNA only partially restored TRAIL-induced cell death in both cell lines (Suppl Fig #1). Thus, c-FLIP levels could not explain why VAL and RL cells are resistant to TRAIL, in line with the observation that caspase-8 is equally cleaved in all these cells. Consistent with the Bcl-2 chromosomal translocation t(14;18) which characterizes these B lymphoma cell lines, and with the finding that TRAIL resistance in VAL and RL cells is associated with a lack of mitochondrial

activation, Bcl-2 was found to be expressed at high levels in these cells (Figure 2B). Inactivation of Bcl-2 by use of siRNA significantly restored apoptosis induced by TRAIL in both resistant cells (Figure 2C). Despite high amount of Bcl-2 expression levels, TRAIL stimulation, in SUDHL4 cells, induced Bax/Bak activation and cytochrome c release from mitochondria. We thus searched for differentially expressed anti-apoptotic proteins that could explain why VAL and RL cells, contrary to SUDHL4, fail to engage the mitochondrial pathway. Western blot analysis did not reveal any change in the expression of Bcl-2 or Bcl-xL (Figure 2A) but a marked differential expression of Mcl-1 in resistant cells as compared to the sensitive cell line SUDHL4. Moreover, Mcl-1 expression was increased in a time-dependent manner upon TRAIL stimulation (Figure 2B). In contrast, Mcl-1 was not induced upon TRAIL stimulation in SUDHL4 cells (Figure 2B). Similar to TRAIL-R4 or Bcl-2, inactivation of Mcl-1 partially restored TRAIL-induced apoptosis in VAL and RL cells (Figure 2C). Moreover, we have found that survivin, which is an inhibitor of apoptosis (IAP) family member, was also overexpressed in resistant cells (Figure 2B), and that siRNA-mediated knockdown of survivin significantly restored TRAIL sensitivity in VAL and RL cells (Figure 2C). Altogether, these results indicate that resistance to TRAIL-induced cell death in these B lymphoma cell lines is a multimodal process implicating robust inhibition of the mitochondrial pathway. We next assessed the ability of quercetin to restore TRAIL-induced cell death in these resistant cells, as this flavonoid has previously been demonstrated to target survivin¹⁶, and to synergize with TRAIL in various tumor cell types⁸. Pretreatment with quercetin overcame TRAIL resistance in these cells, in a caspase-dependant manner, as demonstrated by the use of the pan-caspase inhibitor ZVAD (Figure 3A). This flavonoid restored the activation of initiator caspases, including caspase-8, -9 and -2, allowing full caspase-3 activation (Figure 3B). Engagement of the apoptotic machinery mainly required

caspase-8 and caspase-9, and to a lesser extent caspase-2 as specific inhibitors of caspases-8 and -9 abrogated TRAIL-induced apoptosis to similar extent, while caspase-2 inhibitors only partially reduced the synergy (Figure 3C).

Quercetin induces caspase-10 upregulation and recruitment to the DISC, but sensitization to TRAIL does not require caspase-10.

To understand the molecular mechanisms involved in the restoration of apoptosis induced by TRAIL after quercetin stimulation, we next evaluated whether quercetin might regulate TRAIL receptor expression or enhance TRAIL DISC formation. By flow cytometry, we demonstrate that quercetin pretreatment induced no change of expression of any of the TRAIL receptors in VAL or RL cells (Figure 4A). Likewise, TRAIL DISC formation was poorly accelerated by quercetin, with the exception of caspase-10 whose recruitment within the DISC is strongly enhanced in VAL cells, and to a lesser extent in RL cells (Figure 4B). In VAL cells, increased caspase-10 recruitment correlated with enhanced caspase-8 activation, as seen by the p43 cleaved caspase-8 products (Figure 4B). We therefore analyzed caspase-10 expression by western blotting and found that quercetin induced upregulation of caspase-10 in VAL and RL cells, the activation of which was increased by the quercetin/TRAIL treatment but inhibited by the pancaspase inhibitor ZVAD (Figure 4C). Induction of caspase-10 upregulation by quercetin occurred at the transcriptional level, as measured by realtime PCR (Figure 1D). Caspase-10 was however dispensable for the restoration of TRAIL signaling, as inactivation of this initiator caspase by specific siRNA failed to impair the efficiency of the combined treatment (Fig 4E and F). Altogether these results suggest that quercetin-induced sensitization to TRAIL is independent of

caspase-10 and most likely independent of TRAIL DISC formation regulation, albeit caspase-8 cleavage appears to be slightly enhanced in VAL cells.

Sensitization mainly requires mitochondrial activation

Since enhanced TRAIL DISC formation appears to be dispensable for quercetin-mediated TRAIL-induced cell death restoration, we focused our attention on the mitochondrial pathway. Fractionation experiments to analyze cytochrome c release were performed from cells pretreated or not with quercetin and stimulated with TRAIL for the indicated period of time. Stimulation with quercetin enhanced cytochrome c release after TRAIL stimulation in VAL cells and restored cytochrome c release in RL cells (Figure 5A). To determine whether reactivation of the mitochondrial pathway required caspase-8 mediated Bid cleavage, Bid expression was knocked-down using siRNA (suppl fig #3). Inactivation of Bid partially inhibited TRAIL-induced cell death after quercetin stimulation (Figure 5B), indicating that the mitochondrial amplification loop, through Bax or Bak activation is required. In agreement with this hypothesis, Bax channel blockers were found to inhibit TRAIL-induced cell death after quercetin pretreatment (Figure 5C) and combined Bax and Bak knockdown abrogated the synergy (Figure 5D). Inactivation of Bax or Bak alone was however insufficient to fully inhibit TRAIL-induced apoptosis after quercetin pretreatment (Figure 5D).

Inhibition of Mcl-1 and survivin correlates with the quercetin-mediated mitochondrial reactivation.

To elucidate which molecular events induced by quercetin bypassed the mitochondrial block in VAL and RL lymphoma B cells, we next checked Bcl-2 anti-apoptotic family member protein levels. Western blot analysis did not reveal any change in the expression of Bcl-2 or Bcl-xL (not shown). Interestingly, quercetin induced the depletion of survivin independently of caspases activation, as shown using the pancaspase inhibitor zVAD (Figure 6A). Likewise, Mcl-1 protein level decreased after treatment with quercetin. Moreover, as shown in figure 1 and in agreement with previous findings ¹⁷, we have found that Mcl-1 expression is induced by TRAIL in both resistant cell lines (Figure 6A), but that TRAIL-induced Mcl-1 expression was prevented by quercetin (Figure 6A). On the other hand, western blot analysis shown that p53 was upregulated by quercetin, whereas the expression of the p53 inhibitor MDM2 was reduced (Figure 6B). Because p53 is known to be a negative regulator of Mcl-1 and survivin, we therefore wondered whether p53 might be involved in the regulation of these proteins by quercetin. Inactivation of p53 using specific siRNAs, however, failed to inhibit the synergy and to prevent Mcl-1 or survivin depletion, showing that this mechanism is independent of p53 (Figure 6C). On the contrary, MG132, a proteasome inhibitor, was able to prevent the inhibition of Mcl-1 following quercetin treatment, thus demonstrating that quercetin-mediated Mcl-1 inhibition occurred through proteasomal degradation (Figure 6D). Inhibition of survivin expression, on the other hand, was not induced by proteasomal degradation (Figure 6D), but rather controlled at the transcriptional level as evidenced by qPCR, with a reduction of about 40% of survivin transcripts in quercetin stimulated cells as compared to non-stimulated cells (Figure 6E). Surprisingly, despite the finding that quercetin represses Mcl-1 expression at the protein level, quercetin

induced an increase in Mcl-1 mRNA expression level in VAL and RL cells, of 70 or 30% above control cells respectively (Figure 6E), further highlighting the strong implication of the proteasome in mediating Mcl-1 degradation after quercetin stimulation.

Altogether our results demonstrate that quercetin restores TRAIL-induced apoptosis in resistant NHL-B cell lines through mitochondrial activation. To our knowledge, this is the first report demonstrating that a flavonoid, quercetin, can restore TRAIL-induced cell death in aggressive B lymphoma cell lines through Mcl-1-mediated proteasomal degradation. These results should pave the way to novel therapeutic combinations to cure B cell lymphoma, which aggressiveness has been associated with high Mcl-1 expression levels ¹⁸.

Discussion

Quercetin has been shown to restore TRAIL-induced cell death in several tumor types, including non-small lung carcinoma, ¹⁹, prostate adenocarcinoma ^{20,21}, hepatocarcinoma ²², colon adenocarcinoma ²³, glioma ¹⁶ and T leukemia ²⁴ cell lines. We demonstrate in this study that quercetin synergizes with TRAIL to trigger apoptosis in FL transformed resistant B cell lines, despite strong mitochondrial inhibition mainly due to Bcl-2 and Mcl-1 overexpression.

Molecular mechanisms underlying sensitization to TRAIL-induced cell death by quercetin, remain largely unknown, but have so far mainly been attributed to the regulation of TRAIL signaling at the membrane or mitochondrial level. At the proximal level, quercetin-mediated sensitization to TRAIL has been correlated with TRAIL-R2 stabilization ²⁰, increased TRAIL-R2 expression at the cell surface ^{19,22}, enhanced TRAIL DISC formation ²³ and even c-

FLIP downregulation²². In B cell lymphoma, regulation of proximal events is unlikely to explain the synergy as the only obvious change evidenced within the DISC after quercetin stimulation was the enhanced recruitment of caspase-10. Indeed, caspase-10 appears to be dispensable to restore TRAIL sensitivity in both resistant cells. However, resistance to TRAIL-induced cell death in VAL and RL cells may partly be attributed to c-FLIP as this caspase-8 inhibitor is expressed to higher levels in resistant cells as compared to the sensitive cell line. Accordingly, c-FLIP inactivation partially restored TRAIL-induced cell death in RL and VAL cells. However, c-FLIP expression levels remained unchanged upon quercetin pretreatments and no obvious change in c-FLIP recruitment occurred within the TRAIL DISC. Discrepancies regarding the implication of TRAIL proximal events in restoring TRAIL-induced cell death by quercetin may merely reflect differences in drug concentrations. At this point it should be emphasized that the concentrations of quercetin used in our study, 20 μ M, are lower than those used in most studies which generally range from 50 to 200 μ M, the concentration of which increases TRAIL-R2 expression. Besides, it cannot be excluded that cell specificities may also give rise to discrepant results. Likewise, the mitochondrial apoptotic pathway is strongly inhibited in resistant B lymphoma cell lines, yet quercetin achieves restoration of the TRAIL signaling apoptotic machinery. Moreover, contrary to quercetin, we have recently demonstrated that conventional chemotherapeutic drugs, such as cisplatin or 5FU, synergized with TRAIL through enhanced TRAIL DISC formation leading to a robust increase in caspase-8 activation in VAL cells (Morizot et al., CDD accepted). We cannot exclude that the slight increase in TRAIL DISC formation in VAL cells might contribute to some extent to the synergy quercetin/TRAIL. However, our findings do not support a general function for quercetin in synergizing with TRAIL owing to regulation of TRAIL receptor expression or DISC formation and activation. Rather, our

findings demonstrate that the main target of quercetin in our cell lines is the mitochondria. Indeed, we could demonstrate that quercetin stimulates cytochrome c release from the mitochondria to the cytosol, upon TRAIL stimulation, and that inactivating Bid or Bax/Bak using siRNA, or inhibiting mitochondrial activation using Bax channel blockers, efficiently abrogated the synergy.

The antiapoptotic properties of survivin are now well established, but its mechanism of action remains uncertain. Survivin has been proposed to act mainly at the post-mitochondrial level, through its ability to inhibit Smac release from the mitochondria, stabilizing thus XIAP and leading to inhibition of caspase-9 and -3 activation²⁵. Here, we demonstrated that quercetin induced strong survivin deregulation at the transcriptional level. Survivin has previously been shown to be modulated by proteasomal targeted degradation and through Akt inhibition ^{16,19}. However, in VAL and RL cells, neither the proteasome nor Akt were required for survivin inhibition as evidenced by the use of proteasome inhibitors (Figure 6D) or siRNA targeting Akt (Suppl Figure #4). Interestingly, and contrary to previous findings ²⁶, upregulation of p53 by quercetin in these cells was not associated with sensitization to TRAIL-induced cell death nor with survivin repression (Figure 6C).

Importantly, our results highlight a novel regulatory event, controlling restoration of TRAIL apoptotic signaling activity by quercetin. We demonstrate here that proteasomal targeted degradation of Mcl-1 by quercetin is associated with the sensitization to TRAIL, through the restoration of the mitochondrial apoptotic machinery, in the resistant B lymphoma cell lines VAL and RL. In agreement with previous findings ¹⁷, TRAIL alone induced Mcl-1 up-regulation. Interestingly, quercetin inhibited Mcl-1 expression despite concomitant up-regulation induced by TRAIL stimulation. Mcl-1 is known to sequester BH3-only proteins including Bid and Bim ²⁷⁻²⁹

but also Bak³⁰, affording high level of protection against mitochondrial depolarization, cytochrome c release and activation of caspase-9. Mcl-1 has thus been proposed to protect cells from TRAIL-induced cell death by inhibiting Bak and Bid, the inhibition of which impacts on Bax activation^{28,31}. This assumption is in clear agreement with our findings as inactivation of Bak or Bax alone by siRNA was not sufficient to inhibit apoptosis induced by the quercetin and TRAIL, while simultaneous inhibition of Bax and Bak was required to impair the synergy. Our results are particularly important as it had been suggested that Mcl-1 expression in mantle cell lymphoma was associated with high-grade morphology and proliferative state¹⁸. Thus quercetin's ability to prevent Mcl-1 expression probably represents a very important mechanism enabling restoration of the mitochondrial pathway and apoptosis induced by TRAIL.

Collectively, we have demonstrated that quercetin restores mitochondrial activation. Restoration of TRAIL sensitivity was independent of p53 or caspase-10 up-regulation as well as regulation of TRAIL DISC formation. Quercetin enhanced TRAIL-induced cell death by its ability to induce the proteasomal degradation of Mcl-1 and to restore caspase-3 activation through inhibition of survivin expression, at the transcriptional level, regardless of p53 or Akt. These findings indicate that therapeutic strategies associating TRAIL and quercetin to eradicate tumors and to overcome cell resistance with limited toxicity against normal cells may be at reached⁸. Keeping in mind that quercetin and TRAIL are safe and exhibit no or minimum side effects, as demonstrated by early clinical trials^{32,33}, combining TRAIL with naturally occurring flavonoid quercetin could represent an attractive therapeutic approach for NHL.

Materials and methods

TRAIL production and antibodies:

His-tagged recombinant soluble human TRAIL was produced and used as previously described³⁴.

For western blot analysis, antibodies against TRAIL-R1, TRAIL-R2 and TRAIL-R4 were purchased from Chemicon (Millipore, Molsheim, France). Anti-FADD and anti-Bid were obtained from Transduction Laboratories (BD biosciences, Le Pont de Claix, France). Anti-caspase-8 and -10 were from Medical & Biological Laboratories (Clinisciences, Montrouge, France). Antibodies against survivin, phospho-MDM2 and cleaved fragments of caspase-3 were from Cell Signaling (Millipore, Molsheim, France). Anti-caspase-2 (C-20), Bcl-2, cytochrome c, Bax (2D2), Mcl-1 (S-19) and MDM2 antibodies were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Tebu-bio, Le Perray en Yvelines, France). Anti-Bak (ab-1), anti-caspase-9 and anti-FLIP (NF6) antibodies were purchased from EMD Biosciences (Darmstadt, Germany), Upstate (Millipore, Molsheim, France) and Alexis (Coger, Paris, France), respectively. Anti-Bcl-xL antibody was from Calbiochem (VWR, Fontenay-sous-Bois, France), anti-COXII from Molecular probes (Invitrogen, Cergy Pontoise, France), anti-p53 from Ancell (Coger, Paris, France), anti-HSP60 from Stressgen, Enzo Life Sciences (Covalab, Villeurbanne, France) and anti-actin from Sigma-Aldrich (Lyon, France).

For flow cytometry experiments, the antibodies directed against TRAIL-R1, TRAIL-R2, TRAIL-R3 and TRAIL-R4 (wB-K32, B-L27, wB-B44 and wB-P30 clones, respectively) were kindly provided by Diaclone (Besançon, France). The secondary antibody was an Alexa-488 coupled-goat anti-mouse from Molecular Probes (Invitrogen, Cergy Pontoise, France).

Cell culture and treatments:

VAL, RL and SUDHL4 cell lines (human B-cell lymphomas) were cultured in RPMI 1640 medium (Lonza, Levallois-Perret, France) containing ultraglutamine, 10% fetal bovine serum and penicillin/streptomycin/Amphotericin B. These cell lines were grown in 5% CO₂ at 37°C.

Quercetin (>98% pure) was obtained from Sigma-Aldrich (Lyon, France). A 24 mg/ml stock solution was prepared in DMSO. For sequential treatments, cells were treated for 24 hours with 20 µM quercetin in complete medium before being treated with His-TRAIL (500 ng/ml)

for the indicated times. Control cells were treated with DMSO alone. Caspases inhibitors (20 µM) were added 30 min prior to TRAIL. The pan caspase inhibitor (z-VAD-fmk), caspase-8 inhibitor (z-IETD-fmk), caspase-9 inhibitor (z-LEHD-fmk) and caspase-2 inhibitor (z-VDVAD-fmk) were purchased from Alexis (Coger, Paris, France). The Bax channel blocker (Santa Cruz Biotechnology) was used at 5 µM, 1 h prior to TRAIL stimulation.

Measurement of cell viability:

In 96-well plates, 5.10⁴ cells were incubated for 24h with increasing concentrations of his-TRAIL (from 0 to 25 000 ng/ml) or staurosporin (from 0 to 1000 nM) (Sigma-Aldrich). Cell viability was assessed by the AlamarBlue[®] method, according to the manufacturer specifications (Invitrogen).

Quantification of apoptosis:

After treatments, cells were washed twice with PBS and stained with annexin V-FITC, according to the manufacturer's protocol (BD Pharmingen). After staining with annexin V for 15 min at room temperature, the percentage of annexin V-positive cells was analyzed by flow cytometry.

Immunoprecipitation of the TRAIL DISC:

For DISC analysis, 30×10^6 cells were stimulated with 5 µg of his-TRAIL in 1 ml of complete medium, for the indicated times at 37°C. Cells were then washed with cold PBS and lysed in 1 ml of lysis buffer containing 1 % NP40, 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, and 10 % glycerol. Lysates were precleared with Sepharose 6B (Sigma-Aldrich) for 1h at 4 °C with gentle shaking, and immunoprecipitated at 4°C overnight with G protein Sepharose beads (Amersham Biosciences, Les Ullis, France), in the presence of 4 µg of anti-TRAIL-R2 antibody. Beads were then washed four times with the respective detergent, and immunoprecipitates were eluted in lysis buffer (Tris-HCl 63 mM, SDS 2 %, phenol red 0.03 %, glycerol 10 %, DTT 100 mM, pH 6.8), boiled for 5 minutes and processed for immunoblotting.

Activation of Bax and Bak by immunoprecipitation:

After treatments, cells were lysed in CHAPS buffer (10 mM HEPES pH7,4; 150 mM NaCl; 1% CHAPS) for 30 min on ice, and lysates were precleared with G-coupled sepharose beads for 1h at 4°C. Then, the conformationally active form of Bax or Bak was immunoprecipitated with 4 µg of anti-Bax (clone 6A7, BD Biosciences) or anti-Bak (clone NT, Millipore) antibodies, overnight at 4°C on a rotating wheel. The immunoprecipitated proteins, as well as whole cell lysates, were then analyzed by western blot.

Western blot analysis:

Immunoprecipitates or cell lysates were resolved by SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes. Nonspecific binding sites were blocked by incubation in PBS containing Tween 20 (0.05 %) and fat-free dry milk (5 %). Membranes were incubated with specific primary antibody, overnight at 4°C, followed by HRP-conjugated secondary antibody, at room temperature for 1h. Immunoblots were then developed by the enhanced chemiluminescence (ECL) reagent kit from Santa Cruz Biotechnology (CA, USA), according to the manufacturer's protocol.

Measurement of cytochrome c release:

After treatment, cells were washed in PBS and resuspended in a permeabilization buffer containing 400 µg/ml digitonin, 75 mM KCl, 1mM NaH₂PO₄, 8 mM Na₂HPO₄ and 250 mM Sucrose, and were kept on ice during 10 min. After centrifugation (5 min at 16 000 g), supernatants were collected as the cytosolic fraction. Pellets were then lysed in buffer containing 1% Triton-X100, 30 min on ice. After centrifugation (15 min at 16 000 g), supernatants were collected as the total extracts that contains mitochondria.

Gene silencing using small interfering RNA:

For siRNA-mediated gene knockdown, 4×10^6 cells were transfected by nucleoporation with the Amaxa nucleofector (Köln, Germany). VAL and RL cells were resuspended in 100 µL of Nucleofector solution V containing 200 pm of siRNA, and electroporated with the program N-016 (VAL) or X-001 (RL). Then, cells were cultured in complete medium for 48h before treatments with TRAIL and/or quercetin. SiGenome SMARTpool technology siRNA (set of 4) were purchased from Thermo Scientific (Dharmacon Division).

Real-time PCR assay:

RNA was extracted from treated cells with the RNeasy Mini Kit from Qiagen (Valencia, CA). cDNAs were synthesized from total RNA using M-MLV Reverse Transcriptase (Promega). Real time PCR was performed in triplicates using syber green PCR master Mix from Applied

Biosystems (Foster City, CA) and analyzed in a 7500 Fast detection System (Applied Biosystems). The oligonucleotides used in this study were designed and synthesized (Eurogentec) as follow:

Caspase-10 sense GAAGAGAACAGTGTGGGGTG, antisense GAGGTTTCCGTCTTGCTGTA; Mcl-1 sense CGTTGTCTCGAGTGATGATCCA, antisense TCACAATCCTGCCCCAGTTT; Survivin sense GCCGAGGCTGGCTTCA, antisense GAAGAAACACTGGGCCAAGTCT.

Authorship G.J. designed and performed the experiments, and wrote the paper. G.V., G.A.S., L.N., I.E., A.M., contributed to some experiments. T.G. designed some experiments and participated to helpful discussion. O.M. designed research, analyzed data and wrote the paper. All authors discussed the results and commented on the manuscript.

Conflict-of-interest disclosure: The authors declare no competing financial interests.

References

1. Lossos IS, Alizadeh AA, Diehn M, et al. Transformation of follicular lymphoma to diffuse large-cell lymphoma: alternative patterns with increased or decreased expression of c-myc and its regulated genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99:8886-8891.
2. de Vos S, Hofmann WK, Grogan TM, et al. Gene expression profile of serial samples of transformed B-cell lymphomas. *Lab Invest*. 2003;83:271-285.
3. Zinzani PL, Quaglino P, Pimpinelli N, et al. Prognostic factors in primary cutaneous B-cell lymphoma: the Italian Study Group for Cutaneous Lymphomas. *J Clin Oncol*. 2006;24:1376-1382.
4. Tsujimoto Y, Finger LR, Yunis J, Nowell PC, Croce CM. Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation. *Science*. 1984;226:1097-1099.
5. Showe LC, Ballantine M, Nishikura K, Erikson J, Kaji H, Croce CM. Cloning and sequencing of a c-myc oncogene in a Burkitt's lymphoma cell line that is translocated to a germ line alpha switch region. *Mol Cell Biol*. 1985;5:501-509.
6. Lin P, Medeiros LJ. High-grade B-cell lymphoma/leukemia associated with t(14;18) and 8q24/MYC rearrangement: a neoplasm of germinal center immunophenotype with poor prognosis. *Haematologica*. 2007;92:1297-1301.
7. Fulda S. Inhibitor of apoptosis proteins in hematological malignancies. *Leukemia*. 2009;23:467-476.

8. Jacquemin G, Shirley S, Micheau O. Combining naturally occurring polyphenols with TNF-related apoptosis-inducing ligand: a promising approach to kill resistant cancer cells? *Cell Mol Life Sci.* 2010;67:3115-3130.
9. Merino D, Lalaoui N, Morizot A, Solary E, Micheau O. TRAIL in cancer therapy: present and future challenges. *Expert Opin Ther Targets.* 2007;11:1299-1314.
10. Micheau O, Merino D. Controlling TRAIL-mediated caspase-3 activation. *Leukemia.* 2004;18:1578-1580.
11. Peter ME. The TRAIL DISCussion: It is FADD and caspase-8! *Cell Death Differ.* 2000;7:759-760.
12. Ashkenazi A, Holland P, Eckhardt SG. Ligand-based targeting of apoptosis in cancer: the potential of recombinant human apoptosis ligand 2/Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (rhApo2L/TRAIL). *J Clin Oncol.* 2008;26:3621-3630.
13. Ndozangue-Touriguine O, Sebbagh M, Merino D, Micheau O, Bertoglio J, Breard J. A mitochondrial block and expression of XIAP lead to resistance to TRAIL-induced apoptosis during progression to metastasis of a colon carcinoma. *Oncogene.* 2008;27:6012-6022.
14. LeBlanc H, Lawrence D, Varfolomeev E, et al. Tumor-cell resistance to death receptor--induced apoptosis through mutational inactivation of the proapoptotic Bcl-2 homolog Bax. *Nat Med.* 2002;8:274-281.
15. Merino D, Lalaoui N, Morizot A, Schneider P, Solary E, Micheau O. Differential inhibition of TRAIL-mediated DR5-DISC formation by decoy receptors 1 and 2. *Mol Cell Biol.* 2006;26:7046-7055.
16. Siegelin MD, Reuss DE, Habel A, Rami A, von Deimling A. Quercetin promotes degradation of survivin and thereby enhances death-receptor-mediated apoptosis in glioma cells. *Neuro Oncol.* 2009;11:122-131.
17. Son JK, Varadarajan S, Bratton SB. TRAIL-activated stress kinases suppress apoptosis through transcriptional upregulation of MCL-1. *Cell Death Differ.* 2010;17:1288-1301.
18. Khoury JD, Medeiros LJ, Rassidakis GZ, McDonnell TJ, Abruzzo LV, Lai R. Expression of Mcl-1 in mantle cell lymphoma is associated with high-grade morphology, a high proliferative state, and p53 overexpression. *J Pathol.* 2003;199:90-97.
19. Chen W, Wang X, Zhuang J, Zhang L, Lin Y. Induction of death receptor 5 and suppression of survivin contribute to sensitization of TRAIL-induced cytotoxicity by quercetin in non-small cell lung cancer cells. *Carcinogenesis.* 2007;28:2114-2121.
20. Jung YH, Heo J, Lee YJ, Kwon TK, Kim YH. Quercetin enhances TRAIL-induced apoptosis in prostate cancer cells via increased protein stability of death receptor 5. *Life Sci.* 2010;86:351-357.
21. Kim YH, Lee DH, Jeong JH, Guo ZS, Lee YJ. Quercetin augments TRAIL-induced apoptotic death: involvement of the ERK signal transduction pathway. *Biochem Pharmacol.* 2008;75:1946-1958.
22. Kim JY, Kim EH, Park SS, Lim JH, Kwon TK, Choi KS. Quercetin sensitizes human hepatoma cells to TRAIL-induced apoptosis via Sp1-mediated DR5 up-regulation and proteasome-mediated c-FLIPS down-regulation. *J Cell Biochem.* 2008;105:1386-1398.
23. Psahoulia FH, Drosopoulos KG, Doubravska L, Andera L, Pintzas A. Quercetin enhances TRAIL-mediated apoptosis in colon cancer cells by inducing the accumulation of death receptors in lipid rafts. *Mol Cancer Ther.* 2007;6:2591-2599.
24. Russo M, Nigro P, Rosiello R, D'Arienzo R, Russo GL. Quercetin enhances CD95- and TRAIL-induced apoptosis in leukemia cell lines. *Leukemia.* 2007;21:1130-1133.

25. Altieri DC. Survivin and IAP proteins in cell-death mechanisms. *Biochem J*. 2010;430:199-205.
26. Hoffman WH, Biade S, Zilfou JT, Chen J, Murphy M. Transcriptional repression of the anti-apoptotic survivin gene by wild type p53. *J Biol Chem*. 2002;277:3247-3257.
27. Clohessy JG, Zhuang J, de Boer J, Gil-Gomez G, Brady HJ. Mcl-1 interacts with truncated Bid and inhibits its induction of cytochrome c release and its role in receptor-mediated apoptosis. *J Biol Chem*. 2006;281:5750-5759.
28. Gillissen B, Wendt J, Richter A, et al. Endogenous Bak inhibitors Mcl-1 and Bcl-xL: differential impact on TRAIL resistance in Bax-deficient carcinoma. *J Cell Biol*. 2010;188:851-862.
29. Han J, Goldstein LA, Gastman BR, Rabinowich H. Interrelated roles for Mcl-1 and BIM in regulation of TRAIL-mediated mitochondrial apoptosis. *J Biol Chem*. 2006;281:10153-10163.
30. Willis SN, Chen L, Dewson G, et al. Proapoptotic Bak is sequestered by Mcl-1 and Bcl-xL, but not Bcl-2, until displaced by BH3-only proteins. *Genes Dev*. 2005;19:1294-1305.
31. Chen S, Dai Y, Harada H, Dent P, Grant S. Mcl-1 down-regulation potentiates ABT-737 lethality by cooperatively inducing Bak activation and Bax translocation. *Cancer Res*. 2007;67:782-791.
32. Herbst RS, Mendolson DS, Ebbinghaus S, et al. A phase I safety and pharmacokinetic (PK) study of recombinant Apo2L/TRAIL, an apoptosis-inducing protein in patients with advanced cancer. *J Clin Oncol (Meeting Abstracts)*. 2006;24:3013-.
33. Ferry DR, Smith A, Malkhandi J, et al. Phase I clinical trial of the flavonoid quercetin: pharmacokinetics and evidence for in vivo tyrosine kinase inhibition. *Clin Cancer Res*. 1996;2:659-668.
34. Schneider P. Production of recombinant TRAIL and TRAIL receptor: Fc chimeric proteins. *Methods Enzymol*. 2000;322:325-345.

Figure 1. VAL and RL non-Hodgkin's B cell lymphomas are resistant to TRAIL-induced cell death due to a defect in the apoptotic mitochondrial pathway. (A) Sensitivity to TRAIL-induced cell death of the non-Hodgkin's B lymphoma cell lines VAL, RL and SUDHL4. Cells were treated with different concentrations of hisTRAIL for 24h. Cell viability was measured by the AlamarBlue method. (B) Measurement of caspases and bid activation by western blot after treatment with TRAIL (500 ng/mL) for the indicated times. (C) TRAIL-induced Bax and Bak activation. After treatment with TRAIL at 500 ng/mL for the indicated times, the active forms of Bax or Bak were immunoprecipitated and analysed by western blot. (D) TRAIL-induced cytochrome c release from the mitochondria to the cytosol. VAL, RL and SUDHL4 cells were treated with TRAIL (500 ng/mL) for the indicated times. Cytosolic and mitochondrial fractions were analysed by western blot to detect the presence of cytochrome c. COXII was used as a mitochondrial marker to check the absence of mitochondrial contamination in the cytosolic fraction. Error bars indicate SD of triplicate experiments.

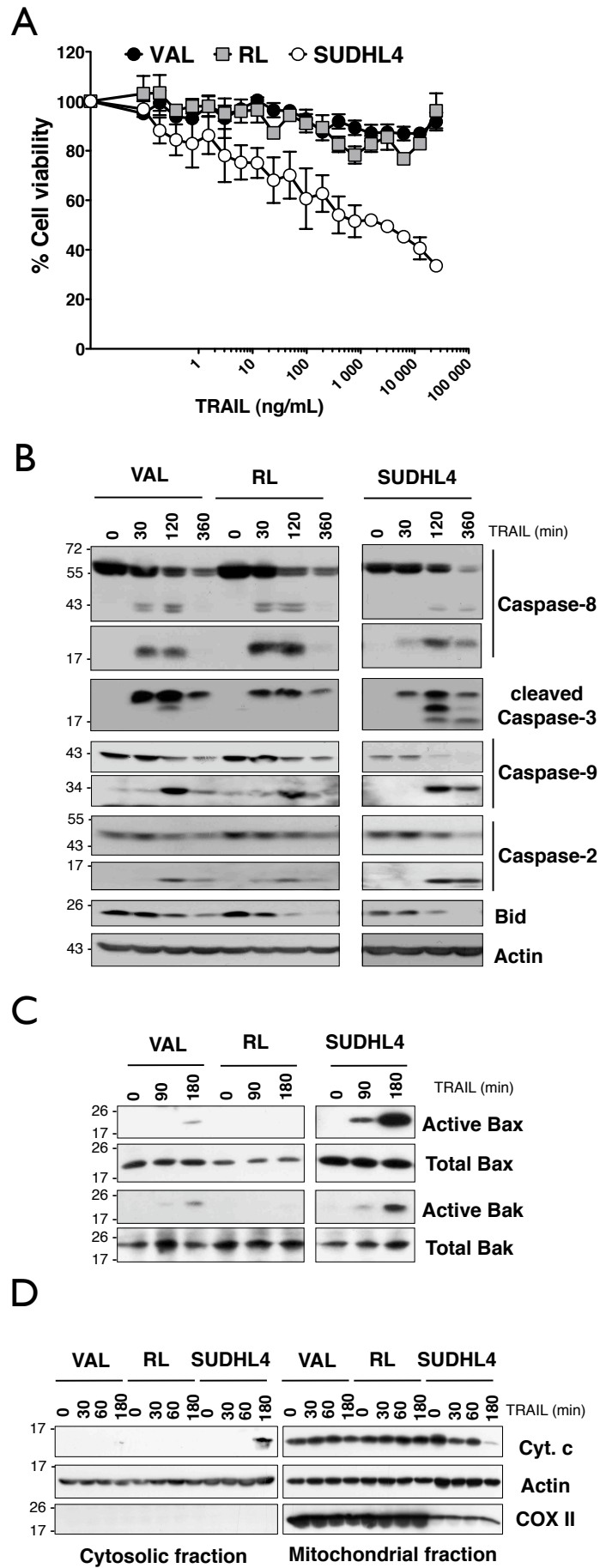
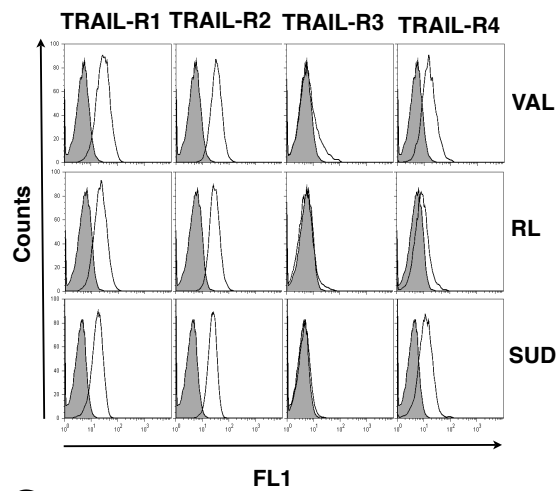
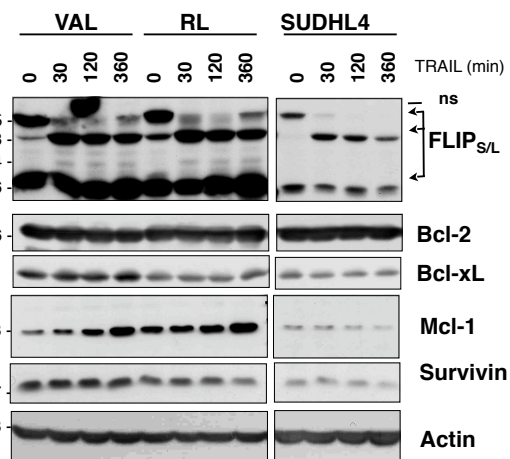


Figure 2. Both Mcl-1, survivin, Bcl-2 and TRAIL-R4 account for the resistance to TRAIL of VAL and RL lymphoma cell lines. (A) TRAIL receptors expression on VAL, RL and SUDHL4 cells. The expression of each TRAIL receptor at the membrane level was measured by flow cytometry (unfilled peaks). Shaded peaks correspond to the isotype control antibody staining. (B) Western blot analysis of antiapoptotic proteins upon stimulation with TRAIL (500 ng/mL) for the indicated times. (C) Effect of siRNA-mediated knockdown of Mcl-1, survivin, Bcl-2 or TRAIL-R4 on the sensitivity to TRAIL-induced apoptosis. 48h after electroporation with a specific siRNA or a control siRNA (scramble), VAL and RL cells were treated with TRAIL at 500 ng/mL for 3h. Apoptosis was measured by flow cytometry after annexin V staining. Error bars indicate SD of triplicate experiments.

A



B



C

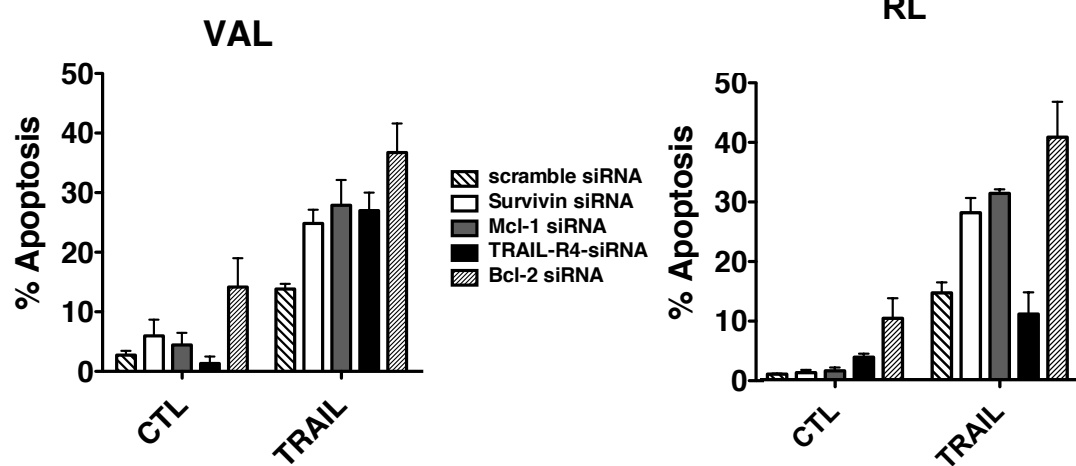
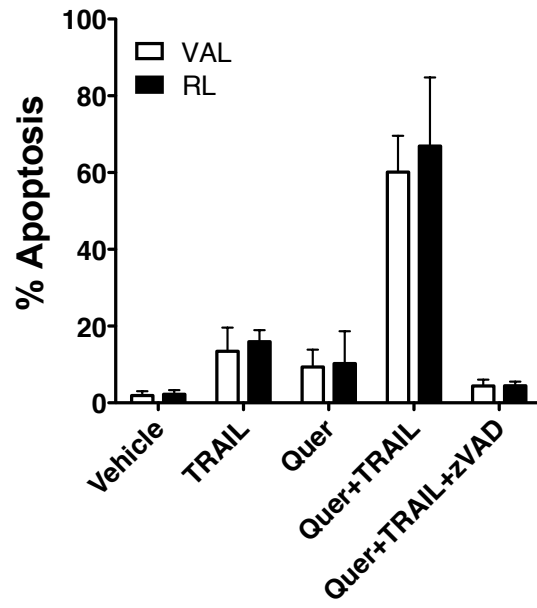
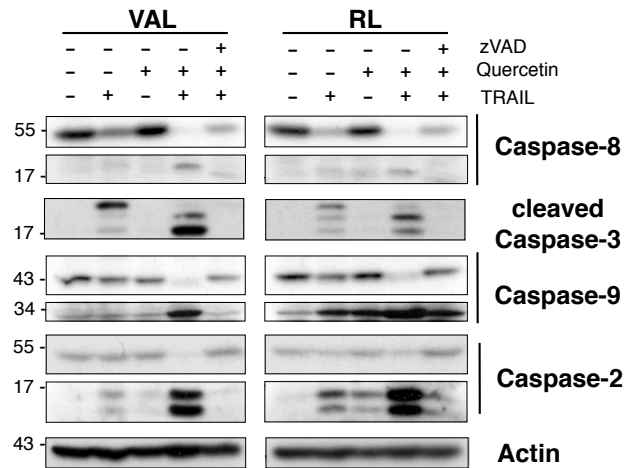


Figure 3. Quercetin sensitizes VAL and RL resistant non-Hodgkin's B lymphomacell lines to TRAIL-induced apoptosis. (A) VAL and RL cells were treated with 20 μ M quercetin (Quer) for 24h prior to TRAIL (500 ng/mL for 3h). The pan caspases inhibitor zVAD-fmk (20 μ M) was added 30 min before treatment with TRAIL. Apoptosis was measured by annexin V staining. (B) Western blot analysis of caspases activation upon treatment with quercetin (20 μ M, 24h), followed by TRAIL (500 ng/mL, 6h) and/or zVAD-fmk (20 μ M, 30 min before TRAIL). (C) Quantification of apoptosis by annexin V staining after treatment with quercetin and TRAIL as described in (A). Caspase-8 inhibitor (z-IETD-fmk), caspase-9 inhibitor (z-LEHD-fmk) or caspase-2 inhibitor (z-VDVAD-fmk) were used at 20 μ M, 30 min before TRAIL stimulation. Error bars indicate SD of triplicate experiments.

A



B



C

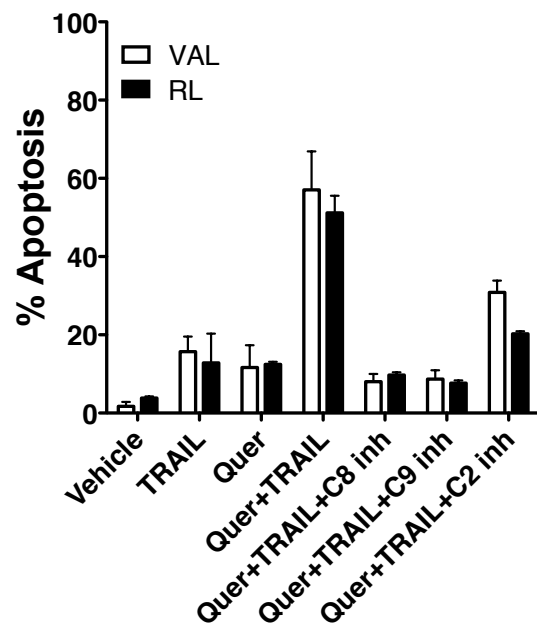


Figure 4. Quercetin induces caspase-10 upregulation and recruitment to the DISC, but sensitization to TRAIL occurs independently of caspase-10. (A) Levels of TRAIL receptors expression at the surface of VAL and RL cells after treatment with quercetin (24h at 20 μ M) or DMSO (Vehicle). Cells were analysed by flow cytometry after staining with specific (unshaded areas) or control (shaded areas) antibodies. (B) Analysis of TRAIL-induced DISC formation. VAL and RL cells were treated by quercetin (20 μ M, 24h) and stimulated with TRAIL (5 μ g/mL) for the indicated times. After cell lysis (see Materials and Methods), the DISC was immunoprecipitated using an antibody against TRAIL-R2 and the DISC-associated proteins were analysed by Western blotting. Data are representative of three independent experiments. (C) Western blot analysis of caspase-10 expression after treatment with quercetin (20 μ M, 24h), followed by TRAIL (500 ng/mL, 6h) and/or zVAD-fmk (20 μ M, 30 min before TRAIL). (D) Relative expression of caspase-10 mRNA by Q-PCR after treatment with quercetin (20 μ M, 24h), as described in "Materials and methods". Results correspond to the fold change mRNA expression compared with cells treated with DMSO, and were normalized to L32 levels. (E-F) Effect of siRNA-mediated knockdown of caspase-10 on the efficiency of the combined treatment with quercetin and TRAIL. 24h after electroporation with a specific siRNA or a control siRNA (scramble), VAL and RL cells were treated with quercetin (20 μ M) for 24h, followed by TRAIL (500 ng/mL) for 3h. Apoptosis was measured by flow cytometry after annexin V staining. Efficiency of the caspase-10 siRNA was evaluated by Western blotting. Error bars indicate SD of triplicate experiments.

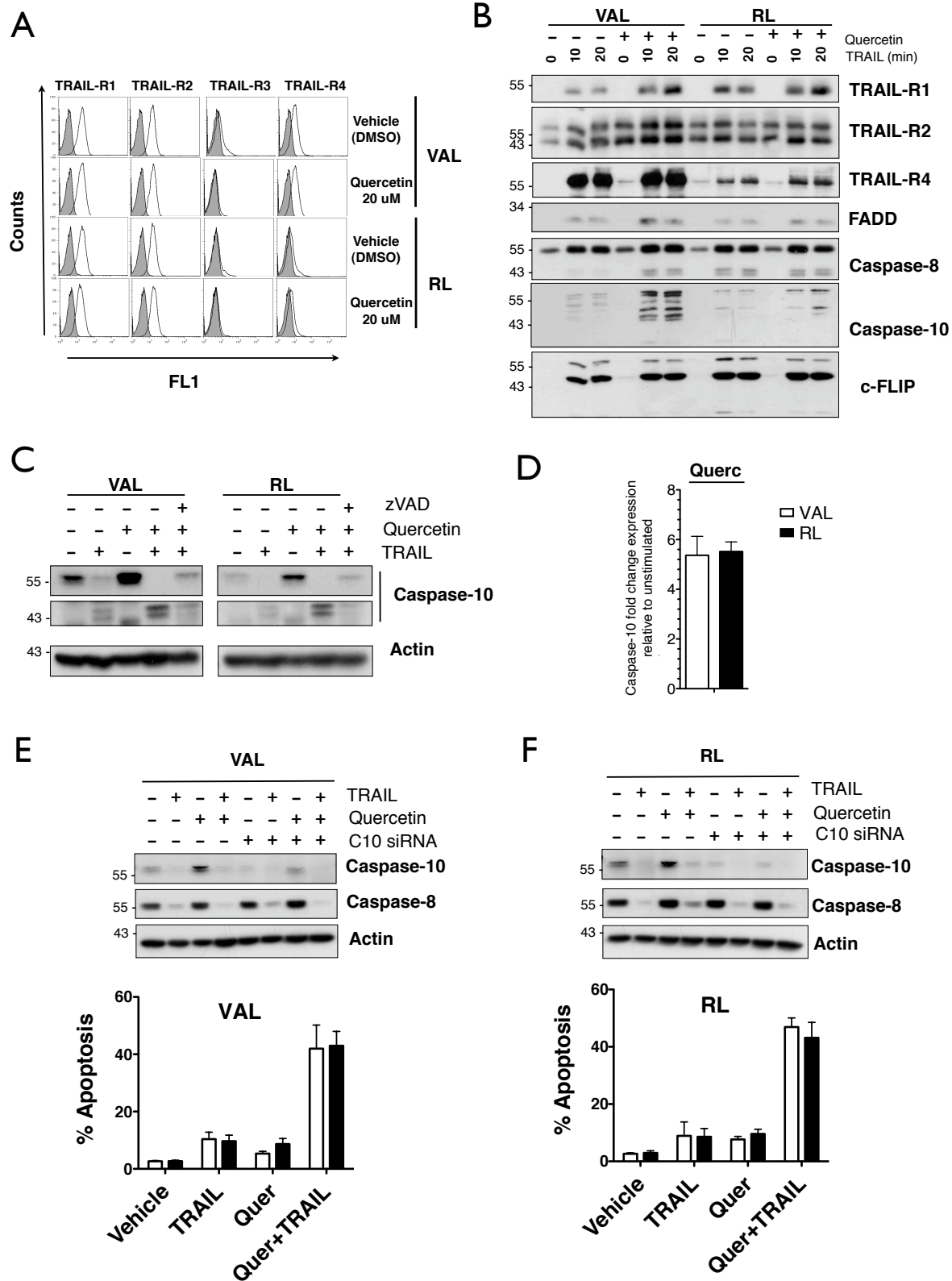
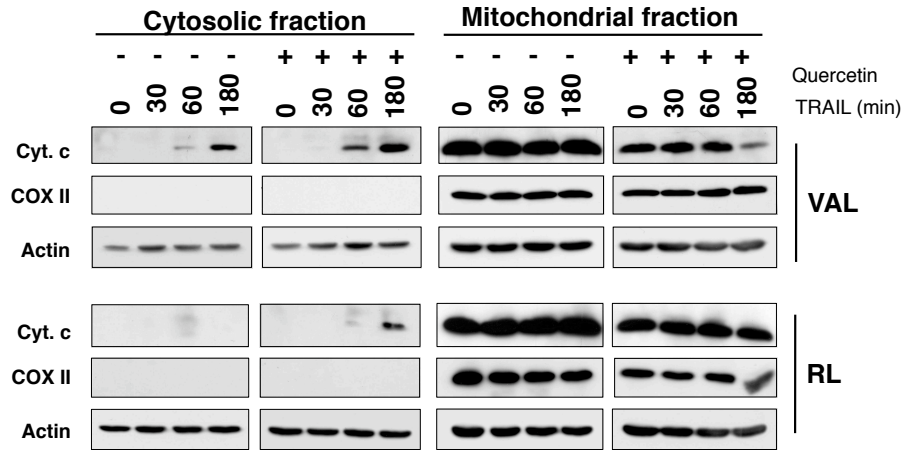
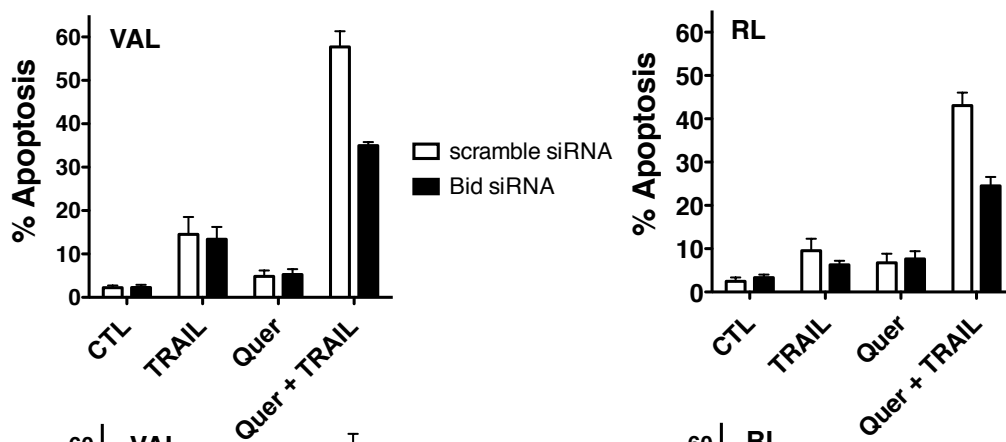


Figure 5. Sensitization to TRAIL by quercetin requires the mitochondrial apoptotic pathway. (A) TRAIL-induced cytochrome c release from the mitochondria to the cytosol after quercetin pre-treatment. VAL and RL cells were treated with quercetin (20 μ M) for 24h, followed by TRAIL (500 ng/mL) for the indicated times periods. Cytosolic and mitochondrial fractions were analysed by western blot for the detection of cytochrome c. COXII was used as a mitochondrial marker to check the absence of mitochondrial contamination in the cytosolic fraction. (B) Effect of siRNA-mediated Bid knockdown on the efficiency of the combined treatment with quercetin and TRAIL. 24h after electroporation with a specific siRNA or a control siRNA (scramble), VAL and RL cells were treated with quercetin (20 μ M) for 24h, followed by TRAIL (500 ng/mL) for 3h. (C) Effect of Bax channel formation on the efficiency of the combined treatment with quercetin and TRAIL. VAL and RL cells were treated with quercetin (20 μ M) for 24h. Bax Channel Blocker was added at 5 μ M, 1h before stimulation with TRAIL (500 ng/mL for 3h). (D) Effect of siRNA-mediated knockdown of Bax and/or Bak on the efficiency of the combined treatment with quercetin and TRAIL. Cells were treated as in (B). (B-C-D) Apoptosis was measured by flow cytometry after annexin V staining. Error bars indicate SD of triplicate experiments.

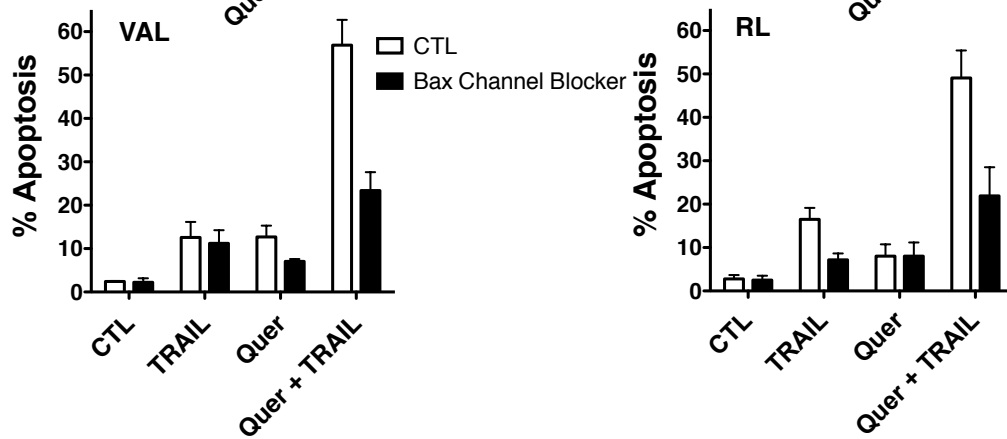
A



B



C



D

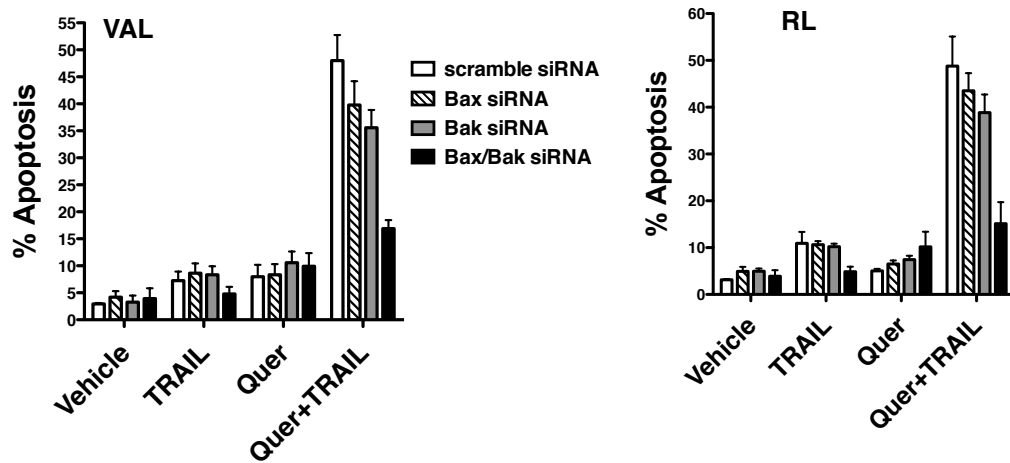
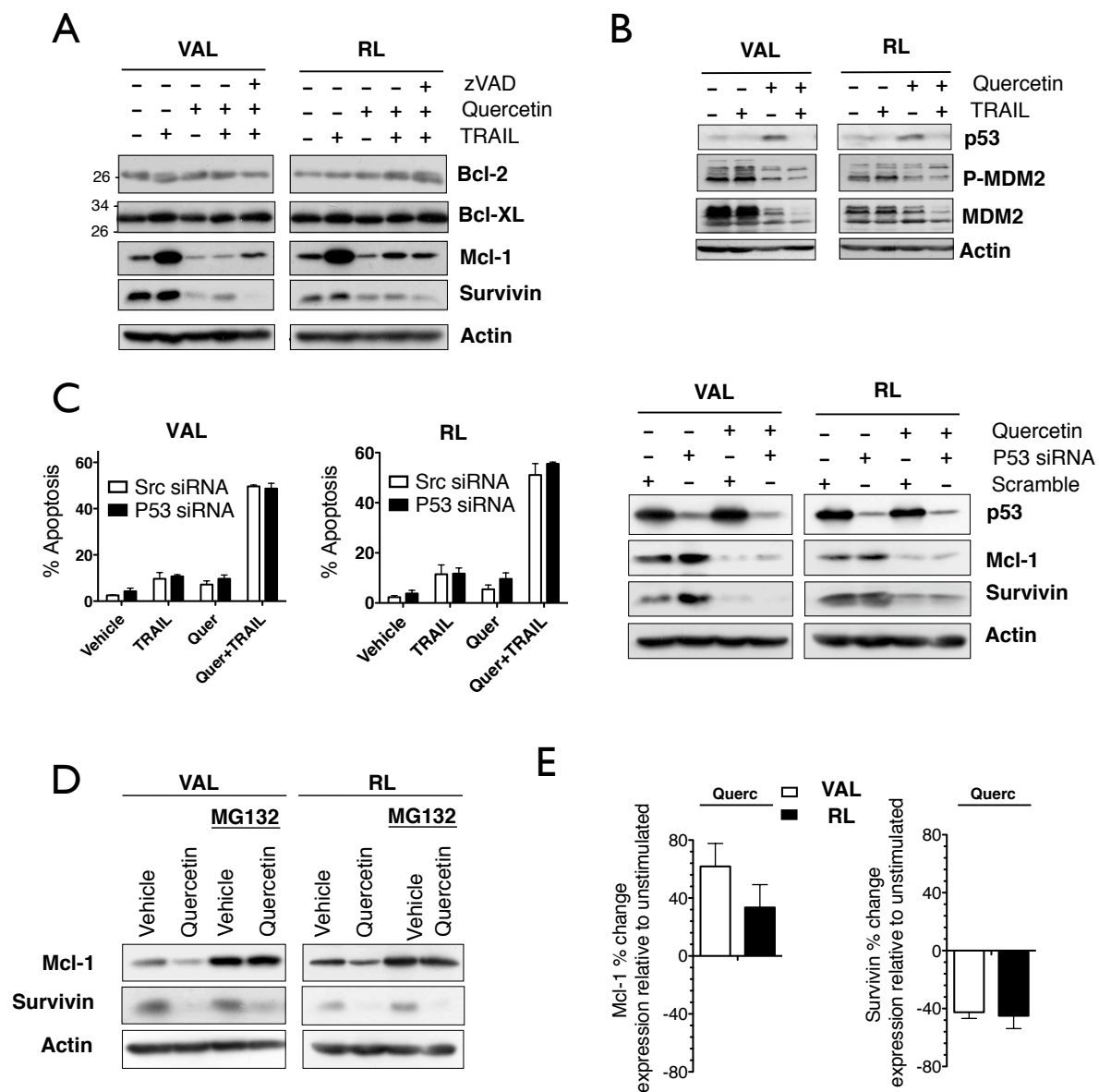
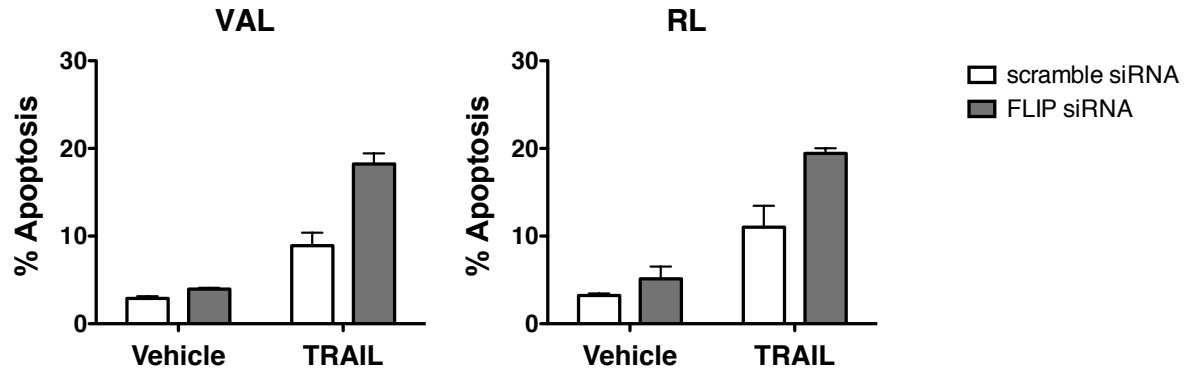
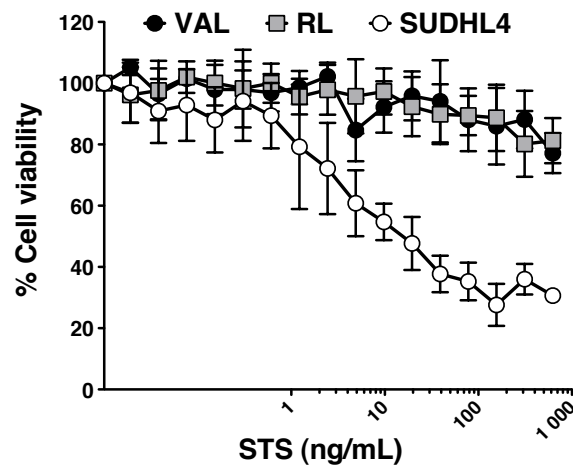


Figure 6. Quercetin inhibits Mcl-1 through proteasomal degradation and downregulates survivin at the transcriptional level, independently of p53. (A-B) Western blot analysis of Mcl-1, survivin, p53, phospho-MDM2 and total MDM2 expression after treatment with quercetin (20 μ M, 24h), followed by TRAIL (500 ng/mL, 6h) and/or zVAD-fmk (20 μ M, 30 min before TRAIL). (C) Effect of siRNA-mediated knockdown of p53 on the efficiency of the combined treatment with quercetin and TRAIL. 24h after electroporation with a specific siRNA or a control siRNA (scramble), VAL and RL cells were treated with quercetin (20 μ M) for 24h, followed by TRAIL (500 ng/mL) for 3h. Apoptosis was measured by flow cytometry after annexin V staining. The efficiency of the p53 siRNA and its effect on Mcl-1 and survivin expression were evaluated by Western blotting. (D) Impact of proteasome inhibition on Mcl-1 and survivin protein levels. Cells were treated with quercetin (20 μ M) or DMSO (vehicle), in the presence of the proteasome inhibitor MG132 (1 μ M) for 24h. (E) Relative expression of Mcl-1 or survivin mRNA by Q-PCR after treatment with quercetin (20 μ M, 24h), as described in "Materials and methods". Results correspond to the fold change mRNA expression (%) compared with cells treated with DMSO, and were normalized to L32 levels. Error bars indicate SD of triplicate experiments.

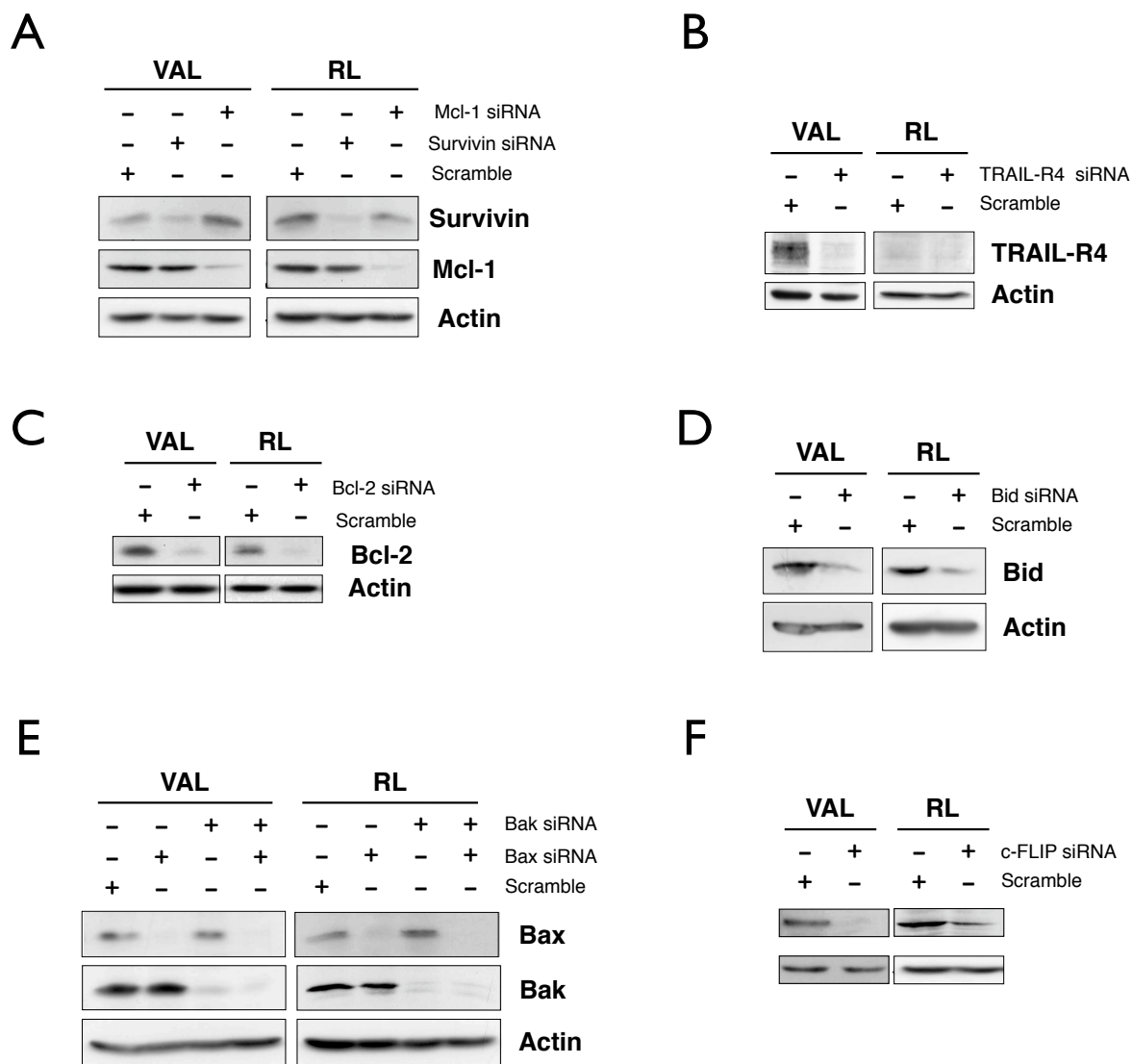




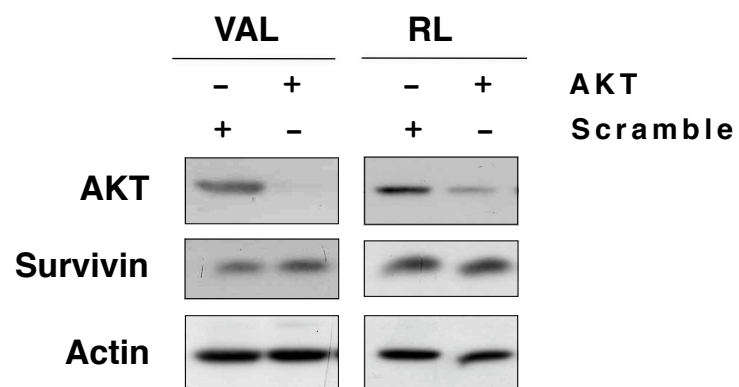
Supplementary figure #1. Effect of siRNA-mediated knockdown of c-FLIP on the sensitivity to TRAIL-induced apoptosis. 48h after electroporation with a specific siRNA or a control siRNA (scramble), VAL and RL cells were treated with TRAIL at 500 ng/mL for 3h. Apoptosis was measured by flow cytometry after annexin V staining. Error bars indicate SD of triplicate experiments.



Supplementary figure #2. VAL and RL non-Hodgkin's B lymphoma cell lines are resistant to staurosporine-induced cell death, but not SUDHL4 cells. Sensitivity to staurosporine-induced cell death of the non-Hodgkin B lymphoma cell lines VAL, RL and SUDHL4. Cells were treated with different concentrations of staurosporine (STS) for 24h. Cell viability was measured by the AlamarBlue method. Error bars indicate SD of triplicate experiments.



Supplementary figure #3. siRNA-mediated downregulation of Mcl-1, survivin, TRAIL-R4, Bid, Bcl-2, Bax and Bak. (A-E) 48h after electroporation with a specific siRNA or with a control siRNA (scramble), VAL and RL cells were lysed in a NP40-containing buffer, as described in "Materials and Methods". The efficiency of each siRNA was assessed by western blot analysis of the corresponding proteins.



Supplementary figure #4. siRNA-mediated downregulation of Akt. 48h after electroporation with a specific siRNA or with a control siRNA (scramble), VAL and RL cells were lysed in a NP40-containing buffer, as described in "Materials and Methods". Akt and survivin protein level were assessed by western blot analysis.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Le cancer est depuis toujours une source de peur car tout le monde peut être touché par cette maladie et les traitements disponibles sont parfois inefficaces. Pourtant, les progrès réalisés ces dernières années ont été significatifs, et la probabilité de survie dans les 5 ans atteint 50 % en moyenne. Le pronostic de guérison est même relativement bon pour certains types de cancer, notamment celui du sein (73 %), de la thyroïde (75 %) ou du testicule (90 %). D'autres cancers à développement rapide sont en revanche très difficiles à traiter, et les taux de survie sont alors très faibles (4 % pour le cancer du pancréas, 5 % pour les cancers du foie). Le développement de nouvelles thérapies plus adaptées et moins contraignantes est donc cruciale pour offrir aux patient une réponse efficace contre cette pathologie.

La protéine TRAIL fait partie des nombreuses options thérapeutiques évaluées. Cette protéine du système immunitaire est notamment impliquée dans la réponse anti-tumorale de l'organisme. La cytokine TRAIL est largement étudiée depuis une dizaine d'années et différents essais cliniques ont été conduits, aussi bien en monothérapie qu'en combinaison avec d'autres agents chimiothérapeutiques. Les effets indésirables après administration sont minimes, mais l'efficacité de cet agent en monothérapie semble limitée. Pour optimiser l'action anti-tumorale de TRAIL et contourner la résistance de certaines cellules cancéreuses, plusieurs stratégies combinatoires sont possibles, notamment avec la radiothérapie ou la chimiothérapie classique.

Dans ce contexte, mon travail de thèse s'est porté sur deux principaux aspects :

- La compréhension de certains mécanismes de résistance à TRAIL, causés notamment par l'expression du récepteur antagoniste TRAIL-R4 dans le modèle HeLa de carcinome utérin, ou encore par l'expression constitutive des protéines anti-apoptotiques Bcl-2, Mcl-1 et survivine dans deux modèles de lymphomes non-Hodgkiniens agressifs.

- La recherche de stratégies thérapeutiques combinatoires visant à contourner les différents types de résistance à TRAIL. Nous avons ainsi évalué l'efficacité de l'association de TRAIL avec des agents de chimiothérapie pour sensibiliser les cellules cancéreuses exprimant TRAIL-R4. Nous avons également étudié l'efficacité d'un traitement par TRAIL en association avec un polyphénol issu des plantes, la quercétine, pour éradiquer les formes agressives de lymphomes non-Hodgkiniens.

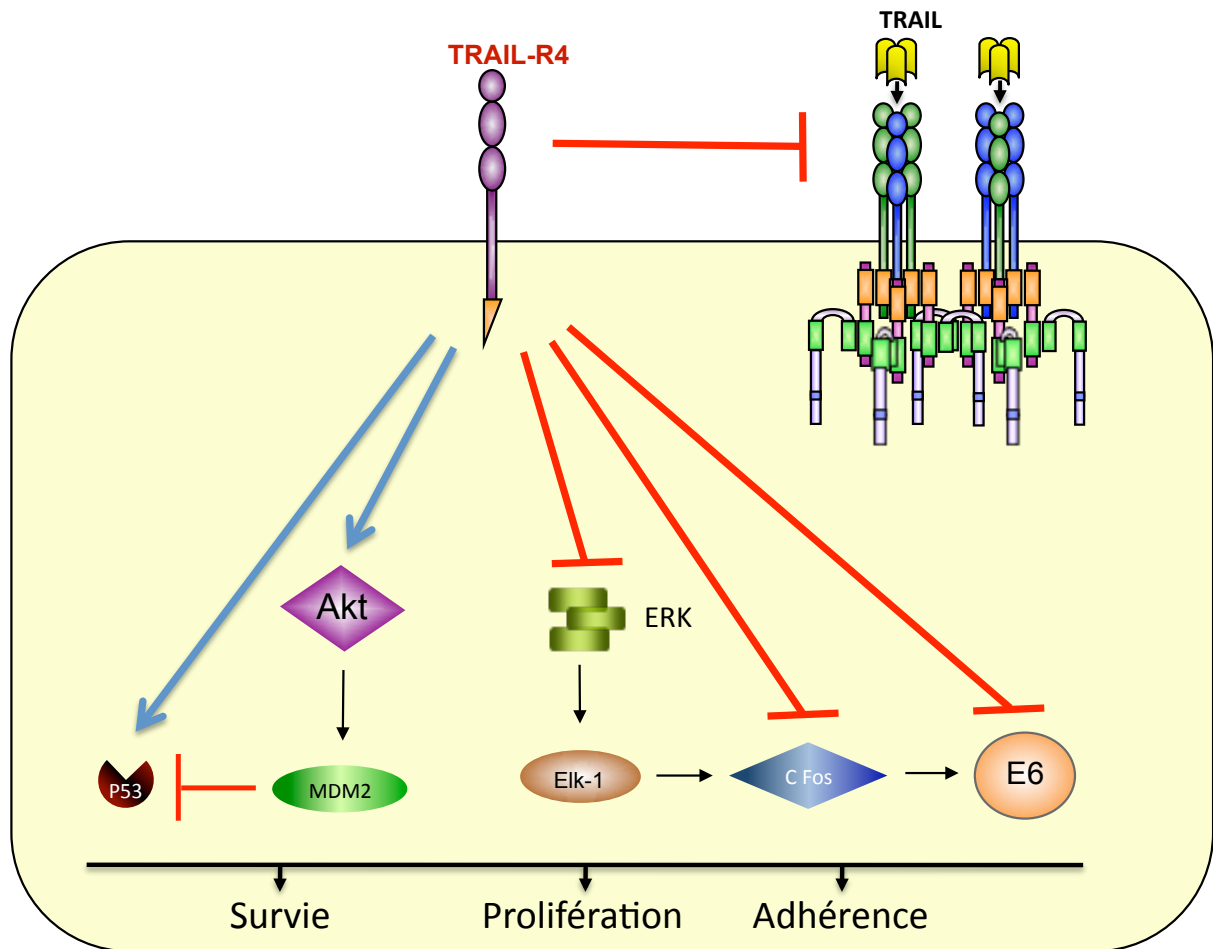


Figure 24: Schéma simplifié résumant l'action de TRAIL-R4 sur l'induction de voies de signalisation intracellulaires de survie et de prolifération dans le modèle cellulaire HeLa.

TRAIL-R4 : un régulateur de la voie TRAIL plutôt qu'un récepteur leurre

La première partie de ma thèse a donc consisté à étudier la résistance à TRAIL provoquée par l'expression du récepteur TRAIL-R4. Ce récepteur agit principalement au niveau du DISC en inhibant le recrutement et l'activation des caspases initiatrices. Mais ce mécanisme d'action n'est probablement pas le seul impliqué dans la résistance à TRAIL par TRAIL-R4. En effet, en raison de la présence d'un domaine intracellulaire contenant un domaine de mort partiel, le récepteur antagoniste TRAIL-R4 est soupçonné de pouvoir interagir avec d'autres protéines et d'agir sur des voies de signalisation intracellulaires.

Plusieurs indices nous ont amené à étudier l'action de TRAIL-R4 sur une éventuelle voie de signalisation. Premièrement, une étude a fait le lien entre l'expression ectopique de ce récepteur et l'activation de la voie NF- κ B (Degli-Esposti et al., 1997a). Deuxièmement, nous avons observé un changement morphologique significatif dans les lignées HeLa dans lesquelles TRAIL-R4 avait été exprimé de façon stable. L'indice de prolifération de ces cellules est également augmenté par TRAIL-R4, tandis que l'adhérence cellulaire est diminuée. Ces observations nous ont donc poussé à explorer diverses voies de survie ou de prolifération modulées par ce récepteur. Ma participation à ce travail lors de mes deux premières années de thèse a consisté entre autres à générer des lignées stables exprimant TRAIL-R4, ainsi qu'à étudier des voies de signalisation pro-apoptotiques, en particulier la voie RASSF1A / MAP1. J'ai également réalisé une étude différentielle des gènes exprimés dans les populations exprimant ou non ce récepteur, à l'aide de puces à ADN.

Les résultats que nous avons obtenus sont particulièrement intéressants et n'avaient encore jamais été décrits précédemment. Nous avons découvert la capacité de TRAIL-R4 à induire des voies de signalisation de survie et de prolifération, indépendamment de la présence du ligand TRAIL (**Figure 24**). En particulier, la kinase anti-apoptotique Akt est activée constitutivement par TRAIL-R4, tandis que le facteur de transcription c-Fos est inhibé. Cette inhibition de c-Fos est retrouvée dans d'autres lignées (SW480 et Jurkat) exprimant de façon stable TRAIL-R4, ce qui constitue un mode d'action commun, quel que soit le type cellulaire. En revanche, l'activation d'Akt est observée uniquement dans la lignée HeLa, qui est également la seule lignée à subir un changement morphologique significatif. Cette particularité de la lignée HeLa est peut être due à la présence du virus du Papillomavirus humain (HPV) et de ses transcrits E6. En effet, une étude a montré que certains variants de

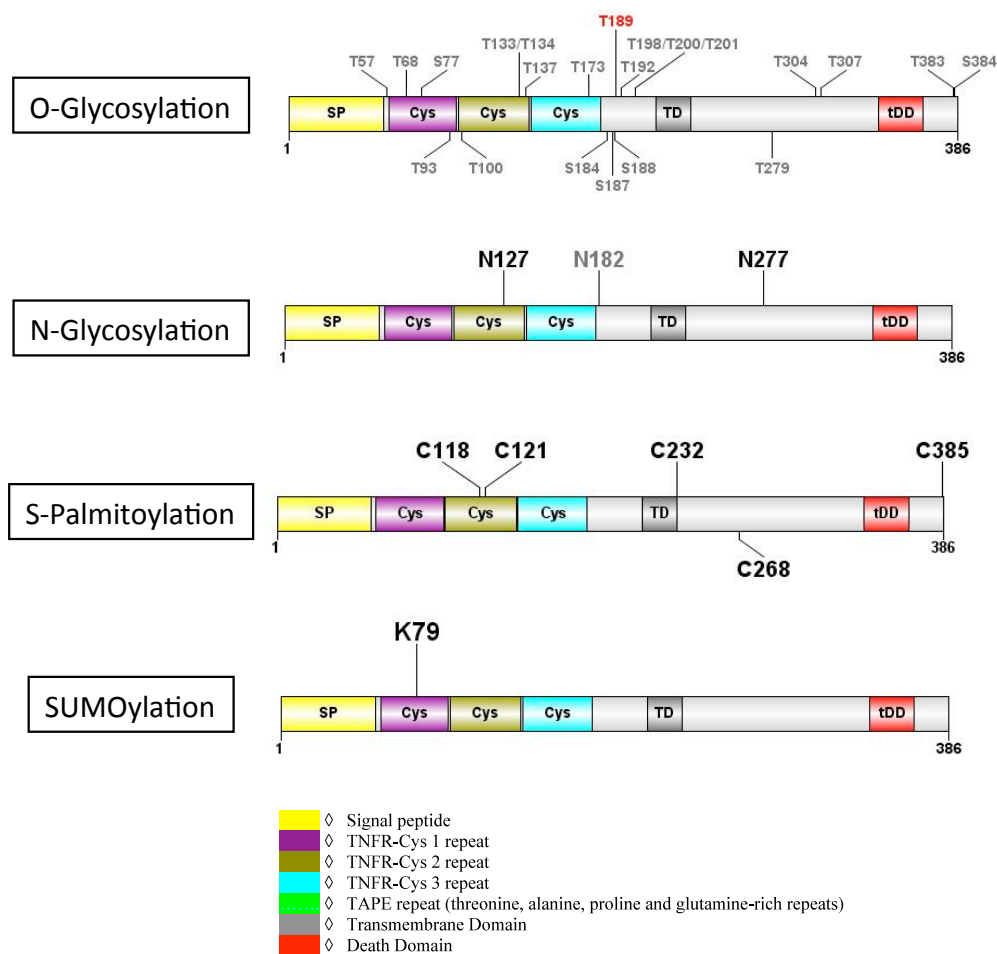


Figure 25: Sites de prédiction des modifications post-traductionnelles de TRAIL-R4.

L'analyse bioinformatique de la séquence de TRAIL-R4 a été réalisée à l'aide des programmes NetNGlyc (N-Glycosylation), NetOGlyc 3.1 (O-Glycosylation, les scores de prédiction élevés sont figurés en rouge), CSS Palm 2.0 (S-Palmitoylation) et SUMOsp 2.0 (SUMOylation).

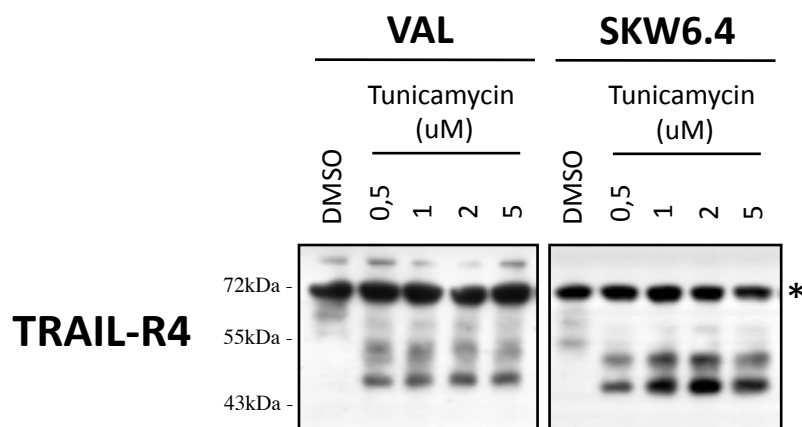


Figure 26: Analyse du profil de migration de TRAIL-R4 en gel SDS-PAGE après traitement par la tunicamycine

Traitements de 24 heures par la tunicamycine aux concentrations indiquées, dans les cellules de lymphomes VAL et SKW6.4. * Signal non-spécifique.

l'oncoprotéine E6 provoquent une diminution de l'expression de Akt (Pim et al., 2009). Dans notre cas, la présence de TRAIL-R4 conduit à l'inhibition de l'expression de E6. L'effet de TRAIL-R4 sur Akt est donc probablement dû à l'inhibition des transcrits E6, et pourrait donc expliquer les changements phénotypiques spécifiques aux cellules HeLa-TRAIL-R4. Cette hypothèse pourra être vérifiée en exprimant TRAIL-R4 dans d'autres lignées HPV-positives, comme par exemple la lignée métastatique CaSki de cancer de col de l'utérus, ou en surexprimant l'oncoprotéine E6 dans des lignées cancéreuses HPV-négatives.

Pour l'instant, le mécanisme par lequel le récepteur antagoniste TRAIL-R4 induit une signalisation moléculaire demeure inconnu. L'importance du domaine de mort tronqué est actuellement en cours d'investigation dans notre laboratoire. Nous avons pour cela cloné des vecteurs codant des récepteurs chimériques constitués par les séquences extracellulaires des différents récepteurs de TRAIL fusionnés aux différents domaines intracellulaires (**Figure 22**). Les éventuels partenaires recrutés par TRAIL-R4 pourront être identifiés après immunoprécipitation en conditions non dénaturantes et analyse par spectrométrie de masse.

D'autre part, plusieurs indices nous amènent à penser que TRAIL-R4 est un récepteur sujet à d'importantes modifications post-traductionnelles. La **Figure 25** montre les différentes modifications post-traductionnelles détectées par analyse bio-informatique de la séquence de TRAIL-R4. Nos expériences préliminaires montrent que l'utilisation de la tunicamycine, qui est un inhibiteur de la N-glycosylation, provoque un changement significatif du profil de migration de TRAIL-R4 en gel SDS-PAGE (**Figure 26**). Alors que le poids de TRAIL-R4 habituellement observé est d'environ 65 kDa, plusieurs bandes situées entre 45 et 55 kDa apparaissent après traitement par la tunicamycine, ce qui est plus proche du poids moléculaire estimé de la protéine native (36 kDa). Il sera donc intéressant de comprendre quelles sont les fonctions physiologiques de ces modifications post-traductionnelles, et surtout de comprendre si celles-ci jouent un rôle dans l'induction des voies de signalisation moléculaires par TRAIL-R4.

Une autre hypothèse est la possibilité d'une interaction de TRAIL-R4 avec TRAIL-R2, en l'absence du ligand, *via* leur domaine PLAD. Le complexe TRAIL-R2/TRAIL-R4 pourrait ainsi induire le recrutement de protéines spécifiques impliquées dans une signalisation anti-apoptotique. Cependant, nos expériences d'immunoprécipitation n'ont pas révélé d'interaction entre TRAIL-R4 et TRAIL-R2 en l'absence de TRAIL. L'existence du domaine PLAD est

donc discutable car nos observations sont contradictoires avec l'étude qui a décrit l'association TRAIL-R2/TRAIL-R4, indépendamment de TRAIL (Clancy et al., 2005). Dans cette étude, l'interaction TRAIL-R2/TRAIL-R4 a été analysée en co-exprimant des récepteurs de TRAIL mutés, ne comportant pas de domaine de mort. On peut donc penser que ces mutants adoptent une conformation différente de celle des récepteurs entiers, provoquant artificiellement une affinité entre TRAIL-R4 et TRAIL-R2. Nos expériences ont contredit ces résultats, aussi bien sur des modèles cellulaires surexprimant TRAIL-R4, que sur des lignées exprimant TRAIL-R2 et TRAIL-R4 de façon endogène (lignées de lymphomes VAL, SUDHL4 et SKW6.4). La signalisation anti-apoptotique induite par TRAIL-R4 serait donc indépendante d'une quelconque interaction avec un autre récepteur de TRAIL.

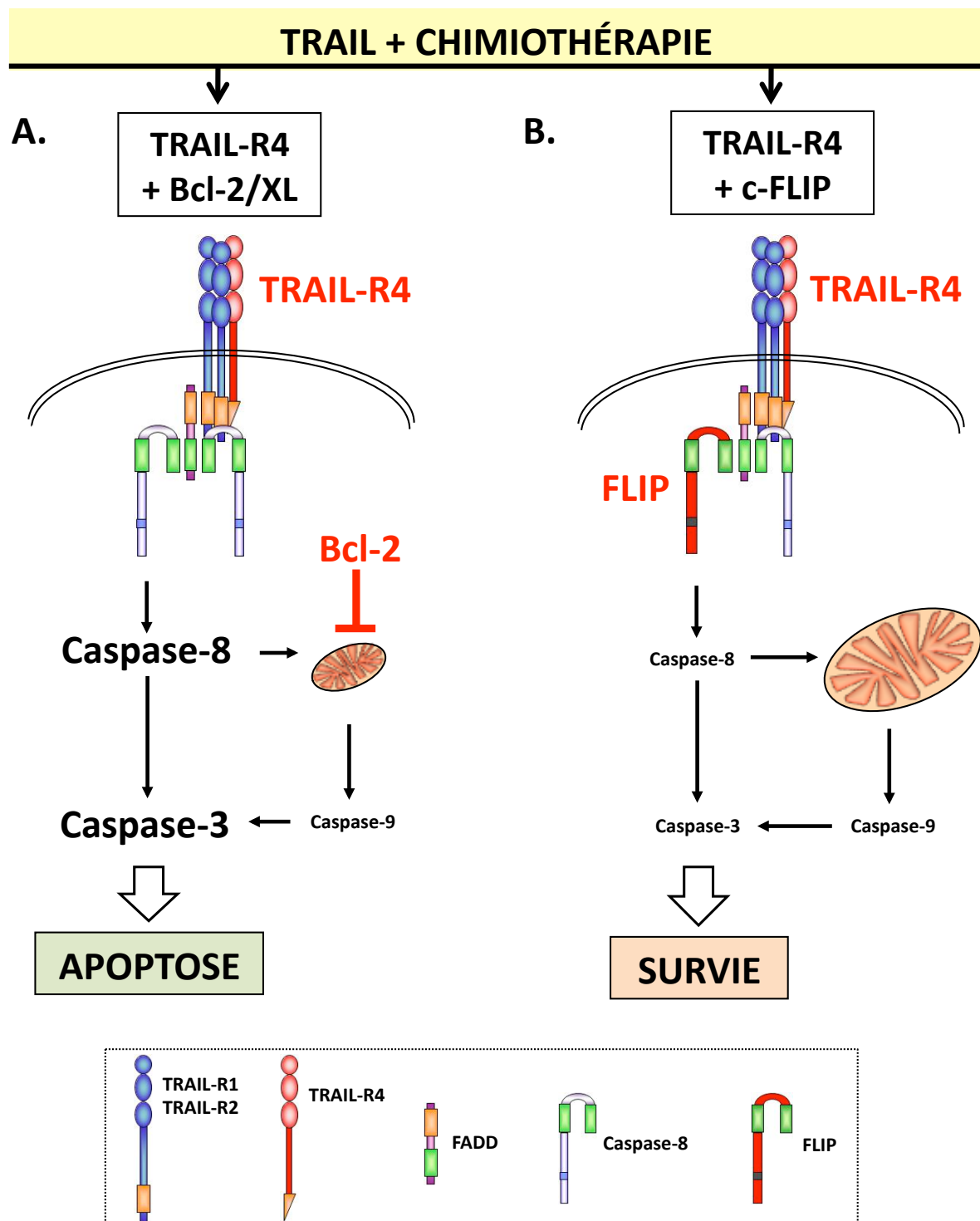


Figure 27: Schématisation de l'efficacité d'un traitement combiné TRAIL + chimiothérapie à induire l'apoptose dans les cellules cancéreuses, en fonction de l'expression de TRAIL-R4, c-FLIP et/ou Bcl-2.

A. L'inhibition de la voie mitochondriale par l'expression de Bcl-2 ou Bcl-XL n'entrave pas l'efficacité de la combinaison de TRAIL avec la chimiothérapie dans les cellules exprimant TRAIL-R4.

B. L'expression simultanée de TRAIL-R4 et c-FLIP bloque totalement l'activation des caspases initiatrices au sein du DISC de TRAIL.

Expression de TRAIL-R4 dans les tumeurs : La chimiothérapie en renfort de TRAIL

L'expression de TRAIL-R4 par les cellules tumorales rend ces dernières insensibles à un traitement par TRAIL. Le problème est que la littérature actuelle ne permet pas de dire si ce type de résistance peut être contournée par un traitement combinatoire. Cette partie de ma thèse a consisté à évaluer la capacité de différentes classes d'agents chimiothérapeutiques à re-sensibiliser à TRAIL des cellules cancéreuses TRAIL-R4-positives. Ma participation à ce projet initié par Alexandre Morizot et Delphine Mérino a consisté, entre autres, à générer des lignées stables exprimant TRAIL-R4 ainsi qu'à diverses expériences d'analyses d'expression protéique, d'interférence à ARN, ou encore de mesure de l'activation de Bax.

Nos résultats sont rassurants quant à l'utilisation en clinique de cette cytokine. En effet, nous avons prouvé que des agents chimiothérapeutiques classiques, aux modes d'action pourtant différents, agissent de façon synergique avec TRAIL pour éradiquer des cellules exprimant TRAIL-R4 à leur membrane. Les composés que nous avons testés sont le cisplatine, l'étoposide et le 5-fluorouracile, utilisés en pré-traitement à des doses pharmacologiques subtoxiques. La résistance à TRAIL induite par TRAIL-R4 est levée, ou plus exactement contournée par la chimiothérapie. Le mécanisme moléculaire que nous avons identifié est indépendant de la voie mitochondriale de l'apoptose, et dépend strictement de la voie extrinsèque. Plus précisément, le traitement séquentiel accélère la formation du DISC et y favorise l'activation des caspases initiatrices. La co-expression de TRAIL-R4 et de c-FLIP dans ces cellules bloque totalement l'effet synergique. Cette observation montre par ailleurs que c-FLIP coopère avec TRAIL-R4 pour bloquer l'initiation de la voie TRAIL au niveau des récepteurs de mort, en verrouillant complètement le DISC (**Figure 27B**). Par conséquent, l'expression de TRAIL-R4 et de c-FLIP dans les tumeurs des patients devrait être prise en compte lors des essais cliniques de ce traitement combiné. Une alternative pourrait être la combinaison de la chimiothérapie avec des anticorps agonistes dirigés contre TRAIL-R1 ou TRAIL-R2, ce qui permettrait de s'affranchir de la présence de TRAIL-R4. Cependant, cette stratégie pourrait également être inefficace en raison de l'existence des voies de survies induites par TRAIL-R4.

Le mécanisme par lequel les agents chimiothérapeutiques favorisent l'agrégation des récepteurs n'est pas encore élucidé, mais certaines études suggèrent le rôle des radeaux lipidiques et l'importance de la production de céramides (Dumitru et al., 2007; Xu et al., 2009). Une augmentation de la fluidité membranaire pourrait également favoriser la formation du DISC, comme cela a été montré dans le cas d'un choc thermique ou d'un traitement par l'éthanol (Moulin et al., 2007). Le cisplatine est d'ailleurs connu pour entraîner une fluidification de la membrane (Rebillard et al., 2007). Une autre étude a montré que le cisplatine est capable de modifier les propriétés de la membrane, en interagissant avec les phosphatidylsérines membranaires (Taylor et al., 1995). Des travaux visant à vérifier ces hypothèses sont actuellement en cours dans notre laboratoire.

Par ailleurs, en plus de leur résistance à TRAIL, les cellules exprimant TRAIL-R4 sont également résistantes aux agents chimiothérapeutiques. Cette observation intéressante soutient l'observation selon laquelle TRAIL-R4 induit des voies de survie intracellulaires. On alors imaginer que certains échecs en chimiothérapie soient causés par l'expression de TRAIL-R4. L'expression de TRAIL-R4 constitue d'ailleurs un facteur pronostique défavorable chez les patients atteints de cancer de la prostate (Koksai et al., 2008). Quoiqu'il en soit, la présence du récepteur TRAIL-R4 est un paramètre qui devra probablement être pris en compte pour établir un protocole thérapeutique adapté.

Enfin, nous avons montré l'efficacité de l'association de TRAIL avec la chimiothérapie contre des tumeurs exprimant TRAIL-R4, dans un modèle de xénogreffe chez la souris. Par ailleurs, c'est également la première démonstration *in vivo* de l'effet anti-tumoral de TRAIL-R4.

Lymphomes multi-résistants à TRAIL : La solution quercétine.

Notre objectif est de trouver des moyens pour contourner la résistance à TRAIL des cellules cancéreuses. En dehors de TRAIL-R4, les protéines pouvant être responsables d'une résistance à TRAIL sont nombreuses et agissent à différents niveaux de la signalisation. Dans ce cadre, nous nous sommes intéressés à des lymphomes non-Hodgkiniens agressifs particulièrement résistants à TRAIL, les lignées VAL et RL. Ces cellules sont des lymphomes B non-Hodgkiniens de type folliculaire et représentent le 5^e cancer le plus fréquent en France

(Ferlay et al., 2007). L'origine de la résistance à TRAIL des lignées VAL et RL est multiple, de par l'expression de Bcl-2, Mcl-1, c-FLIP et la survivine. La voie mitochondriale est notamment bloquée dans ces cellules. L'élaboration d'une stratégie pour re-sensibiliser ces cellules à TRAIL est donc un défi particulièrement intéressant. Ce travail que j'ai initié et conduit a constitué la majeure partie de ma thèse.

Pour surpasser la résistance à TRAIL des lymphomes VAL et RL, nous nous sommes focalisé sur l'utilisation de composés issus du règne végétal, les polyphénols. Ces dernières années, plusieurs types de polyphénols ont été testés avec succès en association avec TRAIL (Jacquemin et al., 2010). Parmi ces molécules, nous avons choisi d'évaluer en particulier un composé de la classe des flavonoïdes, la quercétine. Ce pigment végétal de couleur jaune est un polyphénol capable de stimuler l'apoptose des cellules cancéreuses à différents niveaux, que ce soit au niveau de la voie extrinsèque ou de la voie intrinsèque. Plusieurs polyphénols ont été testés lors d'essais cliniques, par voie orale. Cependant, ce mode d'administration par voie orale ne correspond pas à l'application de notre étude. En effet, nos cellules sont traitées *in vitro* par la quercétine sous sa forme native non modifiée. Lors d'une administration par voie orale, la forme native de la quercétine est rapidement absorbée et métabolisée par l'organisme sous forme de différents métabolites. La concentration de quercétine native qui atteint le sang et le site tumoral après ingestion est donc très faible. Notre étude équivaut donc à une injection intraveineuse directe, et non pas à une supplémentation alimentaire. Or la quercétine est le seul polyphénol à avoir été testé en phase I d'essai clinique par voie intraveineuse (Ferry et al., 1996).

Une action synergique efficace

Les résultats que nous avons obtenus en combinant TRAIL et la quercétine sont prometteurs. Nous avons montré qu'un pré-traitement de 24 heures par une dose non toxique de quercétine permet de rétablir efficacement la sensibilité des lymphomes VAL et RL à l'apoptose induite par TRAIL. Lors du traitement, aucune modification d'expression de Bcl-2, Bcl-XL, ni des récepteurs de TRAIL n'est observée. A l'inverse, plusieurs événements moléculaires sont observés, à commencer par l'induction de l'expression de la caspase-10, ce qui n'avait encore jamais été décrit. Le recrutement de la caspase-10 dans le DISC est également facilité, bien que les autres composants du DISC ne soient pas affectés par le traitement. Cependant, l'invalidation par siRNA montre que la caspase-10 n'est pas essentielle à la synergie observée.

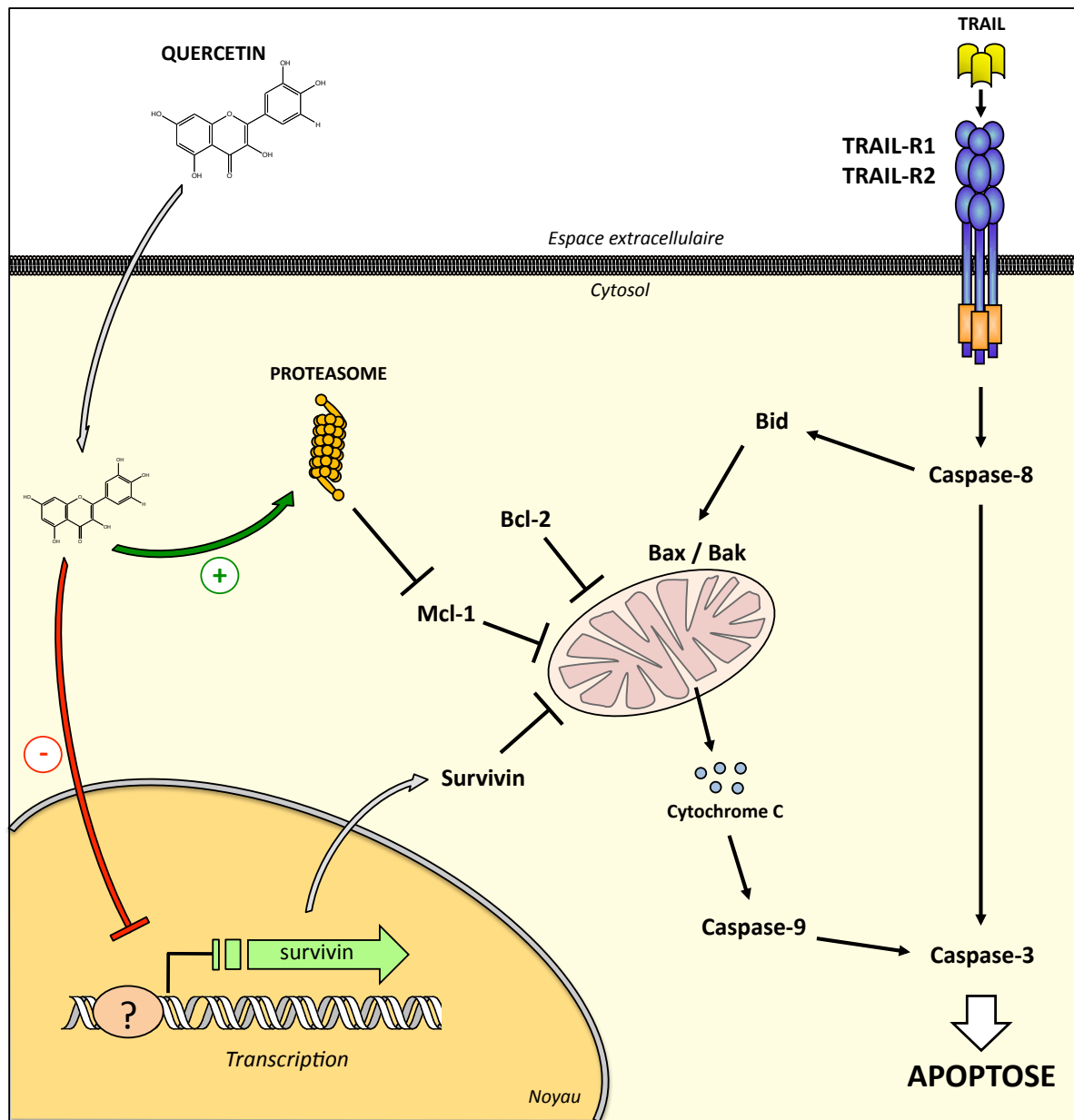


Figure 28: Schéma simplifié montrant le mode d'action de la quercétine dans la sensibilisation à TRAIL des lymphomes B non-Hodgkiniens.

La quercétine active la dégradation de Mcl-1 par le protéasome et inhibe la survivine au niveau transcriptionnel. La voie mitochondriale de l'apoptose est ainsi restaurée lors d'un traitement séquentiel par la quercétine et TRAIL.

En revanche, nos résultats démontrent que la voie mitochondriale est nécessaire au processus de sensibilisation. Le mécanisme de sensibilisation implique en particulier l'inhibition de la protéine anti-apoptotique Mcl-1, *via* l'activation du protéasome, et de la survivine, probablement *via* son inhibition transcriptionnelle. Enfin, le suppresseur de tumeur p53 n'est pas requis dans cette synergie, ce qui est rassurant étant donné la forte proportion de tumeurs exprimant des formes non fonctionnelles de p53.

Le rôle clef de Mcl-1 et de la survivine

L'effet modulateur de la quercétine sur l'expression de Mcl-1 et de la survivine est intéressant, puisque ces deux protéines sont fréquemment surexprimées dans les tumeurs. Ces protéines anti-apoptotiques entraînent une résistance à TRAIL, à la chimiothérapie, ou encore à la radiothérapie (Lei et al., 2010; Thomas et al., 2010).

La survivine appartient à la famille des IAP, et son expression est associée à un facteur pronostique défavorable dans de nombreux cancers (Fukuda and Pelus, 2006; Kanwar et al., 2010). Le mode d'action de cette protéine n'est pas encore totalement compris, mais plusieurs études ont montré sa capacité à inhiber l'apoptose en aval de la mitochondrie. Cette inhibition de la voie intrinsèque par la survivine passerait notamment par la stabilisation de XIAP, ou encore par la séquestration de Smac/Diablo (Romagnoli et al., 2008; Altieri, 2010), tandis que l'inhibition des caspases effectrices par interaction directe avec la survivine semble définitivement exclue (Altieri, 2010). La régulation de la survivine intervient à différents niveaux. Au niveau post-traductionnel, la survivine est dégradée par le protéasome après polyubiquitinylation de plusieurs résidus lysine (Zhao et al., 2000). Nos expériences montrent cependant que le protéasome n'est pas impliqué dans l'inhibition de cette protéine par la quercétine. Selon le contexte cellulaire, l'expression de la survivine peut également être contrôlée par diverses voies de signalisation telles que NF- κ B, STAT3 ou PI3K/Akt, ou encore par les oncogènes Myc et ErbB2. Le suppresseur de tumeur p53 est également capable de réprimer la transcription du gène codant la survivine. Dans notre cas, l'inhibition de la survivine par la quercétine a lieu au niveau transcriptionnel (**Figure 28**), mais ce mécanisme ne dépend ni de p53, ni de la kinase Akt. Les voies de signalisation impliquées dans la régulation de la survivine lors du traitement mériteront donc d'être précisées par la suite.

Mcl-1, qui fait partie de la famille Bcl-2, est également un facteur anti-apoptotique important dans de nombreux cancers. Des souris surexprimant le transgène codant Mcl-1 dans leur tissu hémato-lymphoïde ont une très forte probabilité de développer un lymphome B (probabilité de 85 % dans les 2 ans), ce qui confirme l'importance de cette protéine dans cette pathologie (Zhou et al., 2001). Un traitement par TRAIL a généralement pour conséquence l'augmentation des taux protéiques de Mcl-1, ce que nous observons dans nos lignées VAL et RL. Cette induction de Mcl-1, qui a pour but de réguler la signalisation par TRAIL, constitue un frein au déclenchement de l'apoptose mitochondriale. Dans notre cas, un traitement par la quercétine permet d'inhiber l'expression de Mcl-1 et d'empêcher son induction suite à l'ajout de TRAIL. D'après la littérature, l'expression de Mcl-1 peut être régulée à la fois au niveau transcriptionnel et post-traductionnel. L'analyse des transcrits de Mcl-1 montre que la quercétine n'influe pas sa transcription, ni la stabilité de ses ARN messagers. Un autre mode de régulation possible est la dégradation *via* le protéasome. Mcl-1 est ubiquitinylée de façon constitutive par l'ubiquitinye ligase MULE (*Mcl-1 Ubiquitin Ligase E3*) avant d'être dégradée par le protéasome, ce qui explique sa demi-vie courte (30-40 min) (Thomas et al., 2010). Lors de notre étude, l'utilisation d'un inhibiteur du protéasome abolit la diminution l'expression de Mcl-1 induite par la quercétine. La dégradation de Mcl-1 par le protéasome est donc activée par la quercétine dans nos cellules (**Figure 28**). Il semblerait par ailleurs que la phosphorylation de Mcl-1 sur certains résidus par la GSK-3 (*glycogen synthase kinase-3*) soit nécessaire pour sa reconnaissance par le protéasome (Opferman, 2006). Il est donc possible que la quercétine inhibe Mcl-1 en stimulant sa phosphorylation et donc son adressage vers la machinerie du protéasome. Cette hypothèse pourra être vérifiée en évaluant le statut de phosphorylation de Mcl-1 et en surexprimant des mutants hyper- ou hypo-phosphorylables de Mcl-1.

L'importance de Bax et Bak

D'après les connaissances actuelles sur le mode d'action de Mcl-1, nous savons que cette protéine a plutôt tendance à séquestrer spécifiquement Bak sans interagir avec Bax, contrairement à Bcl-2 qui séquestre Bax plutôt que Bak (Willis et al., 2005). Or, dans nos lymphomes, la quercétine inhibe Mcl-1 sans affecter les niveaux protéiques de Bcl-2. Dans ce cas, l'inhibition de Bak serait levée, tandis que Bax resterait inhibé par Bcl-2. Pourtant, nos expériences de dérégulation de Bax et Bak par siRNA montrent que seule l'inhibition

simultanée de Bax et de Bak supprime l'effet synergique du traitement combiné, ce qui démontre l'implication de ces deux protéines. Plusieurs hypothèses peuvent être formulées pour expliquer comment Bax peut être activé en présence d'une forte expression de Bcl-2 :

- On peut imaginer que la quercétine soit capable de rendre Bcl-2 inactif sans changer son niveau d'expression, par exemple en modifiant son état de phosphorylation. La phosphorylation de certains résidus de Bcl-2 entraînerait ainsi la dissociation des dimères Bax-Bcl-2 (Wei et al., 2008).

- Une étude sur la lignée HeLa a montré que l'inhibition de l'apoptose par Mcl-1 passait par l'inhibition directe de Bak, mais dépendait également de la présence de Bax, de façon indirecte (Germain et al., 2008). Cette étude a également montré que l'expression de Mcl-1 à des taux proches du niveau endogène conduisait à l'inhibition du relargage du cytochrome c induit par Bax. En réalité, Mcl-1 n'interagit pas directement avec Bax et n'inhibe pas son changement conformationnel, ni sa translocation vers la mitochondrie. En revanche, Mcl-1 prévient l'agrégation de Bax sous forme d'oligomères de haut poids moléculaire (> 200 kDa), connus pour déclencher le relargage du cytochrome c (Antonsson et al., 2001). Il est probable que cette inhibition indirecte de Bax par Mcl-1 soit due à l'interaction de Mcl-1 avec des activateurs de Bax. En effet, l'activité de Mcl-1 est inhibée par contact direct avec les membres pro-apoptotiques "BH3-only" Bim, Bid ou PUMA. Ces protéines "BH3-only" ne sont alors pas disponibles pour activer Bax lorsque Mcl-1 est exprimée. Dans le contexte d'un traitement par la quercétine, la diminution des taux de Mcl-1 permettrait alors de libérer Bid et Bim, qui sont des activateurs directs de Bax et Bak. De la même façon, PUMA serait libérée et pourrait donc être mobilisée pour l'inhibition de Bcl-2 et Bcl-XL, ce qui lèverait l'inhibition de Bax et Bak par ces protéines.

Comment agit la quercétine?

Plusieurs explications ont été avancées pour expliquer comment les polyphénols agissent en amont pour réguler de nombreuses voies de signalisation. Les événements moléculaires que nous observons après traitement par la quercétine sont probablement la cause indirecte des effets de ce polyphénol sur le statut redox de la cellule. Cette propriété est conférée par la structure particulière des polyphénols, à savoir la présence d'un cycle aromatique et de groupements hydroxyles réactifs (Depeint et al., 2002). La quercétine, de par sa structure,

aurait ainsi une action sur les radicaux libres, ou dérivés réactifs de l'oxygène (ROS, *reactive oxygen species*), qui sont impliqués dans les mutations et les dommages à l'ADN.

A faibles doses, la quercétine serait capable de donner des électrons aux radicaux libres et de réduire les dommages à l'ADN. Cet effet anti-oxydant à faible dose serait impliqué dans les propriétés préventives de ce composé contre l'apparition du cancer (Vargas and Burd, 2010).

A plus fortes doses (> 40 uM), la quercétine aurait un effet pro-oxydant en favorisant la formation de radicaux libres (Sakao et al., 2009). Ce stress oxydatif entraînerait des dommages à l'ADN irréversibles, conduisant au déclenchement de l'apoptose. La quercétine utilisée à de telles concentrations aurait donc un effet thérapeutique, et non plus préventif (Vargas and Burd, 2010). De façon surprenante, cet effet pro-apoptotique de la quercétine cible spécifiquement les cellules malignes en épargnant les cellules saines. L'origine de cette spécificité n'est pas encore clarifiée.

Dans notre cas, la dose subtoxique de quercétine que nous avons utilisée (20 uM) aurait donc un effet anti-oxydant, ce qui pourra être vérifié par dosage des ROS. Cette concentration n'est pas suffisante à elle seule pour déclencher la machinerie apoptotique, mais permet de diminuer le seuil de déclenchement de l'apoptose par TRAIL, d'où l'effet synergique observé contre les lymphomes. La modulation de l'expression des gènes par la quercétine peut alors s'expliquer par l'activation ou l'inhibition de facteurs de transcriptions sensibles au statut redox de la cellule, comme NFkB ou AP-1 (Leonarduzzi et al., 2010). Certains polyphénols ont également la capacité de se lier directement sur des protéines cibles, notamment sur différents récepteurs à tyrosine kinase, les MAPK (Teillet et al., 2008), PI3K (Walker et al., 2000), mais aussi la protéine kinase C (PKC) (Conboy et al., 2009). Les flavonoïdes seraient capables de se lier sur les poches de fixation de l'ATP situées sur différentes kinases (Teillet et al., 2008). D'autre part, l'inhibition de la PKC par certains polyphénols, notamment la curcumine, pourrait être due à la compétition de ce composé avec les ions Ca²⁺ pour la fixation sur la sous-unité régulatrice de cette protéine (Mahmmoud, 2007). La quercétine, quant à elle, est capable d'inhiber la PI3K par fixation directe (Hwang et al., 2009), tout comme la lipoxycgénases LOX-3 (Fiorucci et al., 2008). L'inhibition de ces deux protéines est connue pour favoriser la régression tumorale et participe sans doute à l'effet anti-tumoral de ce flavonoïde. Une autre étude a démontré une interaction directe entre la quercétine et la

kinase MEK1, probablement en formant un pont hydrogène avec un résidu sérine, ce qui conduit à la stabilisation de la MEK1 sous forme inactive (Lee et al., 2008).

Une autre propriété pouvant expliquer la bioactivité des polyphénols est leur capacité de chélation des métaux (Mira et al., 2002). La quercétine pourrait ainsi réguler l'activité d'enzymes dont la catalyse nécessite un cofacteur métallique tel que le fer, le cuivre ou le zinc (Frei and Higdon, 2003; Leopoldini et al., 2006).

De cette façon, l'effet des polyphénols sur différentes protéines clefs permet de comprendre comment ces composés exercent un large spectre d'activités biologiques. En agissant à différents niveaux de la signalisation apoptotique, la quercétine est ainsi capable de contourner la résistance à TRAIL des lymphomes B agressifs.

Pertinence de l'utilisation de la quercétine en clinique

L'étude que nous avons menée a été réalisée dans des conditions *in vitro*, à une concentration de 20 uM. Cette concentration est largement compatible avec une utilisation clinique, les patients pouvant tolérer des doses atteignant 200 uM dans le sérum après injection intraveineuse (Ferry et al., 1996). Des expériences *in vivo* ont montré que la demi-vie de la quercétine dans le sang était inférieure à 2 heures suivant une injection intraveineuse chez le rat (Khaled et al., 2003). Le principal problème à une utilisation clinique serait donc la stabilité de la quercétine. Cependant, plusieurs formulations galéniques permettent d'augmenter la stabilité des polyphénols dans le sang. Nous citerons par exemple l'utilisation de billes de pectinate de calcium ou de stratégies basées sur les liposomes. L'encapsulation de la quercétine dans des liposomes permet d'améliorer très significativement sa demi-vie et sa concentration dans la tumeur (Yuan et al., 2006). Après injection intraveineuse chez la souris, l'inhibition de la croissance des xénogreffes tumorales est alors plus efficace que dans le cas d'une utilisation du polyphénol sous forme libre. Les auteurs ont également constaté que les liposomes permettaient d'éviter l'adressage de la quercétine vers les reins ou les poumons, comparé à la quercétine libre. Cette observation peut s'expliquer par la présence de défauts dans l'endothélium des tissus cancéreux, qui permettrait l'extravasation des liposomes vers la tumeur, ce qui n'arrive pas dans les tissus sains. L'utilisation des liposomes permettrait donc également de diminuer les effets secondaires de la quercétine. De façon intéressante, ces

formulations protègent donc le composé polyphénolique de la dégradation et augmentent sa redistribution vers le site tumoral (Jacquemin et al., 2010). De telles formulations sont également applicables pour TRAIL (Martinez-Lostao et al., 2010).

CONCLUSION

GENERALE

Depuis quelques années, notre équipe de recherche s'intéresse à la cytokine TRAIL, qui est une protéine anti-cancéreuse au potentiel intéressant. Au cours de ces trois années de thèse, notre intérêt s'est focalisé sur deux aspects de la signalisation par TRAIL :

- Origine de la résistance à l'apoptose induite par TRAIL.

Les différents types de résistance à TRAIL constituent des problèmes quant à une future utilisation en clinique. Nous avons donc étudié le mode d'action du récepteur TRAIL-R4, un récepteur antagoniste de TRAIL encore mal connu. Nous nous sommes ensuite intéressés à une forme agressive de lymphomes B dont la résistance à TRAIL a une origine multiple, causée à la fois par des membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 et de la famille IAP.

- Stratégies pour contourner la résistance à TRAIL.

L'état actuel des connaissances ne permettait pas de savoir si des tumeurs exprimant TRAIL-R4 pouvaient être sensibilisées à TRAIL. Notre but a donc été de trouver un moyen de surpasser l'effet anti-apoptotique de TRAIL-R4, notamment en utilisant différentes drogues chimiothérapeutiques combinées à TRAIL. Dans le cas des lymphomes multi-résistants, notre objectif a été d'évaluer l'association de TRAIL avec un composé végétal de la classe des polyphénols, la quercétine, connu pour moduler un large spectre de protéines.

Ces axes de recherche nous ont permis d'apporter des réponses nouvelles aux connaissances actuelles. Ma thèse a ainsi permis d'éclaircir plusieurs points :

- Signalisations de survie et de prolifération induites par TRAIL-R4.

Nous avons décrit de façon inédite des voies de signalisation activées constitutivement par le récepteur antagoniste TRAIL-R4, en l'absence du ligand TRAIL. Nous avons ainsi identifié différentes voies induites par TRAIL-R4 dans la lignée HeLa de carcinome utérin, impliquant en particulier les protéines c-Fos, CHOP, c-Jun, Akt, ou encore les voies NF- κ B et RASSF1A/MAP1. L'analyse d'autres lignées cancéreuses a permis de retrouver un dénominateur commun, le facteur de transcription c-Fos, dans la signalisation induite par TRAIL-R4. Le récepteur TRAIL-R4 n'est donc pas un simple récepteur leurre puisqu'il est à l'origine d'une signalisation non-apoptotique.

- La chimiothérapie peut surpasser la résistance à TRAIL.

La résistance à TRAIL causée par TRAIL-R4, qui est très peu étudiée dans la littérature actuelle, est problématique si l'on souhaite utiliser TRAIL en thérapie anti-cancéreuse. Nous avons montré que des agents chimiothérapeutiques classiques (cisplatine, étoposide ou 5-FU) agissent de façon synergique avec TRAIL pour éliminer des cellules cancéreuses dont la résistance est provoquée par TRAIL-R4. Cette "chimio-sensibilisation" à TRAIL est la conséquence d'une accélération de la formation du DISC et du clivage des caspases initiatrices, indépendamment de la voie mitochondriale.

- La multi-résistance à TRAIL des lymphomes B peut être contournée par un flavonoïde issu des plantes, la quercétine.

Nos travaux montrent pour la première fois que des lymphomes B très résistants à TRAIL peuvent être supprimés en combinant TRAIL avec un composé végétal polyphénolique, la quercétine. La quercétine agit en activant la voie mitochondriale de l'apoptose, indépendamment de p53. Au cours du traitement, la survivine est inhibée, tout comme Mcl-1. Notre étude est la première à décrire l'inhibition de Mcl-1 par la quercétine. Ces résultats préliminaires sont très encourageants car ils montrent que les résistances à l'apoptose induites par des protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 ou IAP peuvent être surmontées en combinant TRAIL et la quercétine.

Dans l'ensemble, ces travaux apportent de nouvelles briques à l'immense édifice de la recherche contre le cancer. Les chercheurs s'accordent sur le fait que l'avenir s'oriente vers une thérapie anti-cancéreuse ciblée et personnalisée. L'analyse de la tumeur du patient permettra d'établir la "signature" moléculaire de celle-ci afin de choisir le protocole thérapeutique adapté. Dans ce cadre, TRAIL est un candidat prometteur qui suscite l'intérêt des chercheurs. Malgré la faible efficacité de TRAIL en monothérapie, son utilisation en thérapie combinatoire donne des résultats efficaces qui devront être validés au cours d'essais cliniques.

ANNEXES

ANNEXE I

A.

Expression des récepteurs de TRAIL dans différents types de leucémie aiguë myéloblastique (LAM).

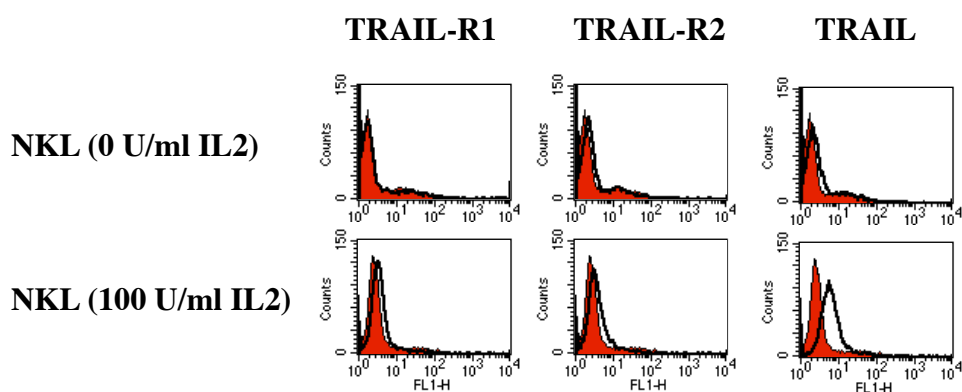
Résultats obtenus à partir de 28 échantillons de patients, en collaboration avec le Pr. Philippe Saas, Besançon.

Diagnostic	TRAIL-R1	TRAIL-R2	TRAIL-R3	TRAIL-R4
LAM M1	0	0	19%	17%
LAM M2	0	0	0%	10%
LAM M4	31%	0	0	0
LAM M4	22%	17%	35%	25%
LAM M4	0	15%	12%	0
LAM M5	15%	23%	22%	21%
LAM MLL	RFI > 2	RFI > 2	29%	18%

B.

Expression des récepteurs de TRAIL et du ligand TRAIL à la surface des cellules de la lignée humaine NKL.

Analyse par cytométrie en flux de l'expression des récepteurs agonistes TRAIL-R1 et TRAIL-R2, ainsi que du ligand TRAIL, sur les cellules de la lignée NKL cultivées ou non en présence d'IL2 (100 U/ml). Le contrôle isotypique est figuré en rouge, et le marquage des différents récepteurs ou du ligand est représenté par la courbe noire.



ANNEXE II

ANNEXE III

Combining naturally occurring polyphenols with TNF-related apoptosis-inducing ligand: a promising approach to kill resistant cancer cells?

Guillaume Jacquemin · Sarah Shirley ·
Olivier Micheau

Received: 25 March 2010 / Revised: 16 April 2010 / Accepted: 11 May 2010
© Springer Basel AG 2010

Abstract TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) and its receptors are attractive targets for anti-cancer therapy owing to their ability to trigger apoptosis selectively in cancer cells but not in normal cells. To date, many combinatorial strategies, such as chemotherapy or radiotherapy, have given encouraging results for overcoming TRAIL resistance in preclinical models. In this review, we provide an overview of the molecular mechanisms underlying sensitization to TRAIL-induced apoptosis by polyphenols. These naturally occurring compounds can restore tumor cell sensitivity to TRAIL-induced cell death with no apparent toxicity towards normal cells. Both extrinsic and intrinsic pathways can be modulated by polyphenols, the activation of which largely depends on the cell type, the particular polyphenolic compound, and the conditions of treatment. The large variety of polyphenol cellular targets could prove useful in circumventing TRAIL resistance. The relevance of these combined treatments for cancer therapy is discussed in the light of recent preclinical studies.

Keywords Cancer · Apoptosis · TRAIL · DR4 · DR5 · Polyphenol · Flavonoid · Stilbene

Introduction

During the last decade, the cytokine TRAIL (APO2-L or TNF-related apoptosis-inducing ligand) and agonistic antibodies targeting TRAIL receptors have gained considerable interest in cancer therapy, due to their ability to induce tumor regression in preclinical studies with no significant side-effects [1]. However, it appears that often treatment with TRAIL or agonistic antibody alone is not sufficient for an effective apoptotic response. Mapatumumab, an antibody which targets TRAIL-R1, exhibits little clinical activity as single agent in patients with refractory colorectal cancer [2]. Other clinical trials nevertheless provide encouraging results when recombinant human TRAIL or anti-TRAIL-R1 or -R2 agonistic antibodies are combined with conventional chemotherapy [3]. The problem in current cancer therapy is the occurrence of a few resistant tumor cells that cause cancer relapse. The current challenge in oncology is therefore to find a treatment able to eradicate the tumor without triggering resistance, and to limit as much as possible its toxicity against normal cells. Combined treatments seem to be the best way to reach this objective. With this in mind, since 2002 it progressively became apparent that the combination of TRAIL with naturally occurring polyphenols would represent an attractive therapeutic approach (Table 1).

TRAIL and its receptors in cancer therapy

TRAIL is a member of the tumor necrosis factor (TNF) gene superfamily that displays great apoptosis-inducing

G. Jacquemin · S. Shirley · O. Micheau
INSERM, U866, 21079 Dijon, France
e-mail: jacquemin.gui@gmail.com

S. Shirley
e-mail: sarah.shirley21000@gmail.com

G. Jacquemin · S. Shirley · O. Micheau (✉)
Faculty of Medicine and Pharmacy, University of Bourgogne,
21079 Dijon, France
e-mail: omicheau@u-bourgogne.fr

O. Micheau
Centre Georges-François Leclerc, 21000 Dijon, France

Table 1 Classification of polyphenols that have been shown to exhibit a synergistic effect with TRAIL

Classification	Compounds	References
Flavonoids		
Anthocyanidins	ND	
Flavanols	Epigallocatechin gallate	[55–59]
Flavonols	Quercetin	[62–66, 68, 69]
	Methyldihydroquercetin BB-1	[70]
	Kaempferol	[71, 73]
	Myricetin	[74]
Flavanones	ND	
Flavones	Apigenin	[75, 76]
	Luteolin	[77, 78]
	Wogonin	[79, 80, 82]
	Baicalein	[84]
	Flavopyridol (semi-synthetic flavone)	[125–130]
Isoflavones	Genistein	[86–92]
	Daidzein	[93]
Chalcones	Butein	[94]
	Isoliquiritigenin	[95]
Stilbenes	Resveratrol	[82, 96–104]
Lignans/flavonolignans	Nordihydroguaiaretic acid	[105]
	Honokiol	[106]
	Silibinin	[107]
Phenolic acids and derivatives	Curcumin	[96, 110–121]
	Cycloartenyl ferulate	[122]

activity against cancer cells both in vitro and in vivo. Unlike FasL or TNF, which are known to cause severe toxicity to liver tissue, TRAIL was shown to be safe following in vivo administration [4–6]. However, the reason for the apparent specificity of TRAIL ligand for killing tumor cells remains largely unknown [1].

The physiological role of TRAIL is not well defined, but it has been shown to play a role in T cell memory, haematopoiesis, autoimmune diseases and many other physiological processes [7–11]. TRAIL plays a major role in the anti-tumor immune surveillance mediated by T cells and natural killer (NK) cells [12, 13]. Indeed, TRAIL was shown to contribute to the regulation of tumor onset, progression, and metastasis [14]. TRAIL is mainly expressed at the membrane level of some immune cells, but can be found in some immune privilege sites [15] or in the circulation in some pathological conditions, including viral infections [16, 17]. Soluble TRAIL, like TNF or sFasL, is less cytotoxic than the membrane-bound form [18]. However, recombinant soluble forms of TRAIL can be used for in vitro assays as tagged or non-tagged versions to allow ligand cross-linking and induction of apoptosis.

TRAIL ligand interacts with four distinct receptors at the membrane level, namely DR4 (Death Receptor 4/TRAIL-R1; see Ref. [19]), DR5 (Death Receptor 5/TRAIL-R2/Killer; see Ref. [20–23]), DcR1 (Decoy

Receptor 1/TRAIL-R3/TRID/LIT [22–25]) and DcR2 (Decoy Receptor 2/TRAIL-R4/TRUNDD; see Ref. [26, 27]). The two agonistic receptors DR4 and DR5 contain an intracellular death domain (DD), which can recruit pro-Caspase-8 and -10 through the adaptor protein FADD (Fas-associated death domain) after TRAIL stimulation. The multiprotein complex formed by DR4/5, pro-Caspase-8/-10 and FADD is called the death-inducing signaling complex (DISC) and leads to the activation of effector caspases for the triggering of apoptosis (Fig. 1).

Depending on the cell type, an amplification loop involving the mitochondria may be required to fully trigger TRAIL-induced cell death [28, 29]. This mitochondrial pathway, also called the intrinsic pathway, is activated after Caspase-8 mediated cleavage of Bid. Truncated Bid activates Bax and Bak, triggering the release of pro-apoptotic factors such as cytochrome *c* that lead to the formation of a soluble complex called apoptosome, in which the pro-Caspase-9 is activated. Caspase-9 in turn cleaves and activates Caspase-3, allowing execution of apoptosis. This amplification loop is negatively controlled by anti-apoptotic members of the Bcl-2 family and is heavily dependent on Bax [30], in type II cells [31]. TRAIL-induced apoptosis can also be negatively regulated by other intracellular factors including cellular inhibitor of apoptosis protein (cIAP), X-linked IAP (XIAP) or survivin, downstream of

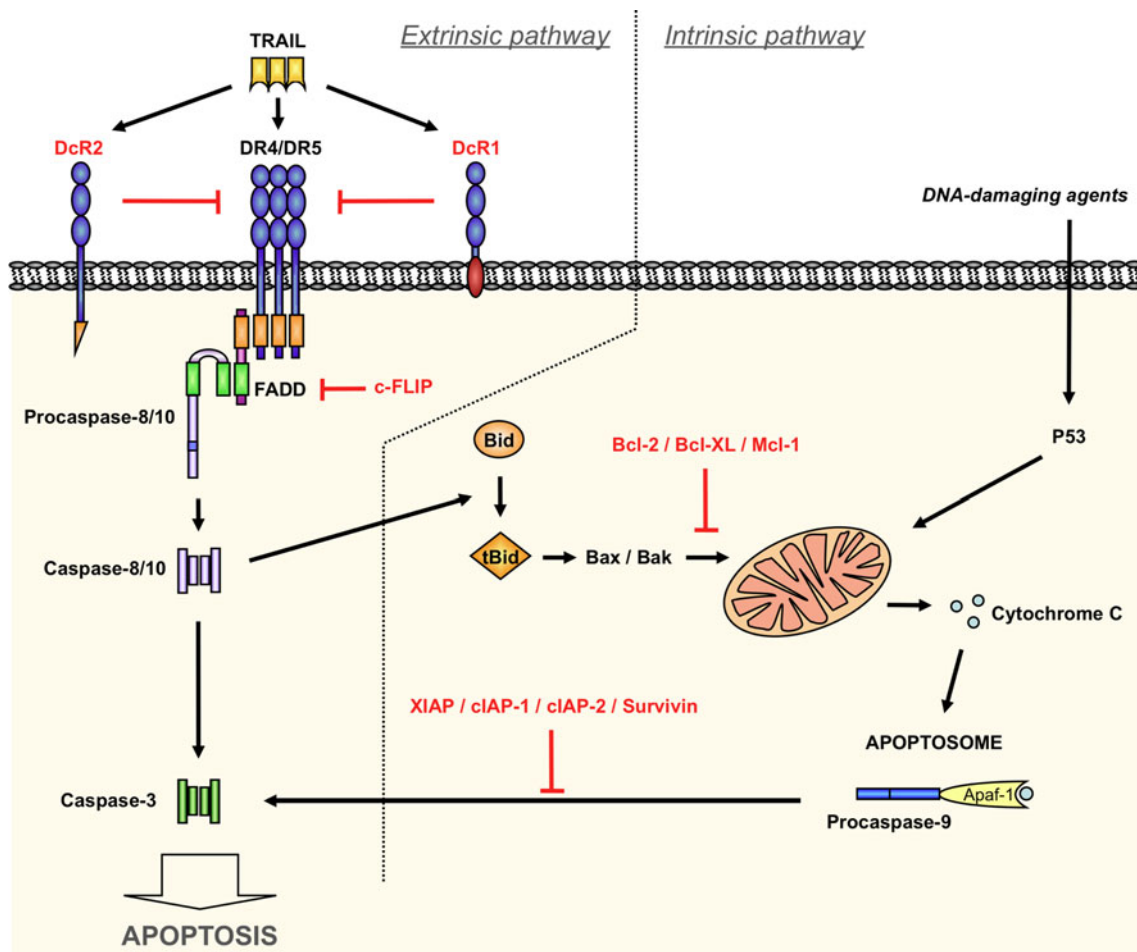


Fig. 1 Schematic diagram of the TRAIL-induced apoptotic signaling. TRAIL binding on DR4 and/or DR5 triggers the recruitment of the adaptor protein FADD and the subsequent recruitment of the initiator Caspase-8 and/or -10, forming the DISC. The effector Caspase-3 is activated either directly by the initiator caspases

(extrinsic pathway), or through the mitochondrial activation of Caspase-9 within the apoptosome (intrinsic pathway). The decoy receptors DcR1 and DcR2, as well as various anti-apoptotic proteins (in red), are involved in the regulation of the TRAIL signaling

the mitochondrial pathway [32, 33]. Activation of pro-Caspase-8 and -10 within the TRAIL DISC is tightly controlled by the anti-apoptotic protein c-FLIP (cellular FLICE-like inhibitory protein) [34], but its inhibitory function also applies to Fas or TNFR1 [35].

Selective inhibition of the TRAIL pathway can be mediated by the two antagonistic TRAIL receptors, DcR1 and DcR2. Although their exact function is still unclear, these receptors lack a functional DD and are unable to induce the apoptotic program. DcR1 is a GlycosylPhosphatidylinositol (GPI)-anchored protein and does not contain the intracellular DD, whereas DcR2 contains a truncated DD that cannot induce caspases activation [22, 26]. The inhibitory effect of these two antagonistic receptors was initially attributed to their ability to sequester the ligand TRAIL, but it has recently been demonstrated that DcR1 and DcR2 act by two different mechanisms. While DcR1 competes with DR4 and DR5 for TRAIL binding,

DcR2 interacts with DR5 within the DISC, and impairs efficient Caspase-8 activation [36]. Another mode of regulation has recently emerged and highlighted the importance of post-translational modifications of death receptors for TRAIL signaling, such as palmitoylation of DR4 [37] or glycosylation of both receptors [38, 39].

Defects in the intrinsic and extrinsic pathways [40, 41], including survival pathways such as NF- κ B or Akt and more generally the tumor microenvironment [42], may lead to cell resistance and hamper the future clinical use of TRAIL in oncology. In all of these cases, the threshold of apoptosis induction is too high for efficient cancer therapy, and the current challenge is to decrease this threshold to restore TRAIL functionality.

Thus far, many efforts have been made to find therapeutic strategies that can eradicate cancer cells, without appearance of resistance and without toxic side-effects. Some combinatorial strategies have given interesting

synergistic activities with TRAIL, for example the use of a broad range of protein inhibitors, chemotherapy, or irradiation [43]. More recently, the use of natural compounds, including polyphenols (Table 1), led to a growing interest for these combined therapeutic approaches due to their relative safety and their anti-tumor efficacy in preclinical models.

Polyphenols

Polyphenols are the products of secondary metabolism in plants. They play a role in defence mechanisms against pathogens or radiations and give plants their colors. They are found in fruits and vegetables, but also in wine, tea, coffee, chocolate, and many other plant-derived products [44]. These compounds are known for their beneficial effects against a large number of diseases, including cardiovascular or neurodegenerative diseases, osteoporosis, and cancer [45]. The biological activity of polyphenols is mainly attributed to their antioxidant properties, which is strictly related to their chemical structure [46] (Fig. 2). Polyphenols prevent reactive oxygen species (ROS)-induced DNA damage by scavenging free radicals (reactive oxygen, nitrogen, and chlorine species) and by inactivating metal catalysts by chelation, decreasing their oxidative activity. Their ability to interact with other reducing compounds and to inhibit redox-active transcription factors may also contribute to the antioxidant properties of these molecules as well as to their ability to regulate gene expression. Paradoxically, in addition to their antioxidant effects, polyphenols have also been shown to exert pro-oxidant effects that could also be responsible for their anticancer properties [47]. For example, owing to the presence of its hydroxyl groups, the flavonoid quercetin was shown to inhibit proliferation and to induce apoptosis of malignant cells through the generation of intracellular superoxide [48].

Enhancing TRAIL-induced cell death using polyphenolic compounds: molecular mechanisms

Flavonoids

This group of polyphenols has been identified in fruits, vegetables, grains, roots, flowers, wine, tea, and other related products [49]. More than 4,000 different flavonoids have been identified, many of which are responsible for the infinite color variations of flowers, leaves, and fruits. These compounds are divided into several classes on the basis of their molecular structure, namely anthocyanidins, flavanols, flavonols, flavanones, flavones, isoflavones, and chalcones.

Anthocyanidins

Anthocyanidins and flavanols are the most common flavonoids found in the diet. They are generally found in nature as glycosides, called anthocyanins, and are responsible for the blue, red, or purple colors of plants. Anthocyanin-rich extracts demonstrated chemopreventive activities against cancer in animal models of carcinogenesis [50]. Single agents have been tested in *in vitro* models and have shown interesting anti-proliferative and pro-apoptotic properties, acting by modulating survival pathways such as NF κ B [51] or MAPK [52]. So far, their association with TRAIL has not been documented, albeit the pro-apoptotic activity of prodelphinidin B-2 3,3'-di-*O*-gallate, a proanthocyanidin, was proposed to proceed through the concurrent upregulation of Fas and FasL [53]. It remains to be demonstrated whether this group of flavonoids might prove useful to sensitize resistant cancer cells to TRAIL. Since anthocyanins are more stable than their aglycone anthocyanidins [54], the former should be preferred to assess their suitability in preclinical settings before considering these compounds for future clinical use.

Flavanols

The richest sources of flavanols are green tea, chocolate, red wine, and many types of fruits. They are found as monomers, called catechins, or as polymers, commonly called condensed tannins. The only compound tested in association with TRAIL is epigallocatechin-3-gallate (EGCG) (Fig. 2a). Nishikawa et al. [55] were the first to show the synergistic effect of the association of EGCG with TRAIL in human hepatocellular carcinomas. The authors attributed this effect to the inhibition of Bcl-2 and Bcl-XL by EGCG, probably through NF κ B inhibition. In this study, no apparent change in the survivin, XIAP, c-IAP1, or c-FLIP expression levels were observed. Of note, the amount of EGCG used in this work was high (100 μ g/ml) and the safety of such a concentration on normal cells was not addressed. Later, two different teams demonstrated the efficiency of EGCG, used at lower concentrations, on glioblastomas [56] or prostate carcinomas [57]. Siegelin et al. [56] observed that sensitization of glioblastomas to TRAIL-induced apoptosis occurred through EGCG-mediated Akt inhibition, leading to the downregulation of survivin and the death effector-domain (DED)-containing protein PEA15. DR4 and DR5 were not regulated by EGCG at the protein level, but since their expression at the membrane level was not assessed, it cannot be excluded that these receptors might partially contribute to the synergy. On the contrary, another study by Siddiqui et al. [57] demonstrated that similar

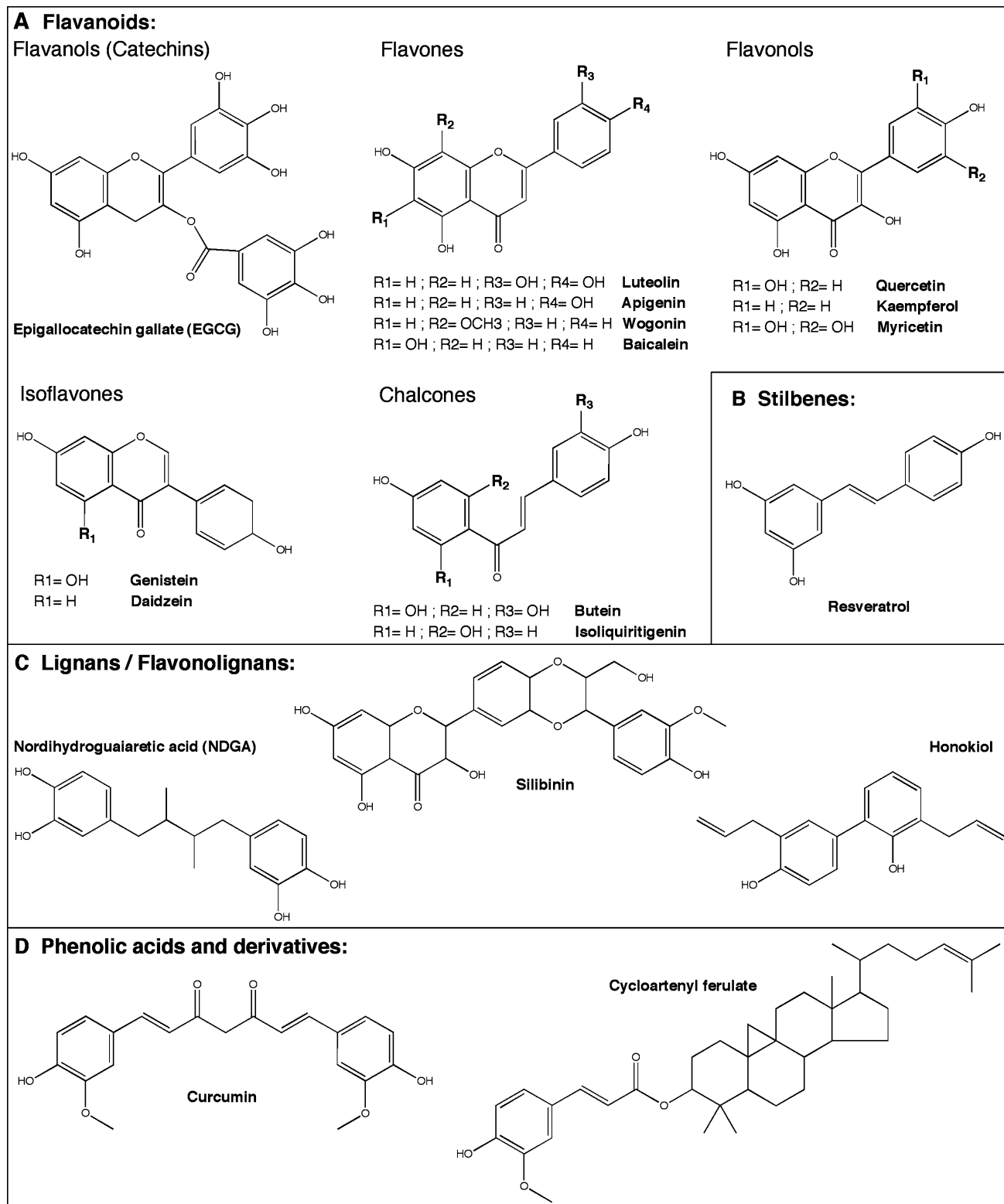


Fig. 2 Chemical structures of polyphenols that exhibit a synergistic effect with TRAIL

concentrations of EGCG induced an increase in DR4 expression on prostate carcinomas. Many other proteins were modulated in this model, such as Bcl-2, Bcl-XL, IAP

proteins, survivin, c-FLIP, Bad, Bax, Bak, and Smac/Diablo, but their relative requirement regarding cell sensitization to TRAIL was not assessed. Another paper

recently revealed that EGCG upregulated DR4 and DR5 and promoted TRAIL-induced cell death of pancreatic carcinomas [58]. The human melanoma A375 cell line was also shown to be responsive to the combinatorial treatment, but the molecular mechanisms were not clarified [59].

Flavonols

This flavonoid subgroup is abundant in a variety of foods including onion, broccoli, apple, curly kale, leek, and tea. To date, flavonols that have been described to exhibit TRAIL-sensitizing properties are quercetin, kaempferol, and myricetin (Fig. 2a).

Quercetin has been widely studied for its anti-oxidative action and its effect on the expression of many genes. It has been reported to confer protection against disorders such as neurodegeneration, cardiovascular diseases, or cancers [60]. In 1996, a phase I clinical trial showed that quercetin can be safely administered by intravenous injection [61]. Several studies have been performed investigating the effects of associating TRAIL with quercetin. Kim et al. [62] showed that this co-treatment efficiently killed prostate carcinomas but not normal prostate cells, though the concentrations of quercetin used in this study were very high. Quercetin's sensitizing activity was associated with its ability to inhibit the Akt pathway. The authors subsequently demonstrated that quercetin enhanced TRAIL-induced apoptosis by downregulating survivin through a mechanism involving ERK-MSK1-mediated deacetylation of histone H3, independently of the MAPK and the JNK pathways [63]. They also showed that quercetin did not change the protein levels of the TRAIL receptors, c-FLIP, IAP proteins, Bcl-2, Bcl-XL, and Bax. Russo et al. [64] reported that leukemia cell lines were efficiently sensitized by quercetin and TRAIL co-treatment, except for the T cell acute lymphoblastic leukemia HPB-ALL. At the same time, Chen et al. [65] elegantly demonstrated that pre-treatment with quercetin sensitized non-small cell lung cancer cells to TRAIL-induced apoptosis via two distinct mechanisms. On one hand, quercetin acted on the Akt pathway to downregulate survivin expression and, on the other hand, quercetin targeted the PKC kinase, leading to an increase in DR5 expression. In their settings, neither c-FLIP nor IAP family members were modulated, and interestingly, normal bronchial epithelial cells were not affected by this treatment. Another report showed that quercetin stimulated DR5 expression and synergized with TRAIL to kill six different hepatoma cell lines [66]. Quercetin-mediated DR5 upregulation was triggered by Sp1. Supporting Chen's results, this transcription factor was shown to be itself under the control of PKC [67]. Moreover, this study is probably the only instance in the literature to report a diminution of the short isoform of

c-FLIP by quercetin, through proteasomal degradation. The synergistic activation of the TRAIL pathway by quercetin has also been associated with the cell surface redistribution of TRAIL receptors. Indeed, while Psahoulia et al. [68] observed no particular change in DR4 and DR5 expression levels on colon adenocarcinomas after quercetin pre-treatment, they found out that these receptors were redistributed into lipid rafts, thus facilitating TRAIL DISC formation and initiator caspases processing. However, as far as TRAIL receptor partitioning to lipid rafts is concerned, conclusions regarding enhanced DISC formation in these particular membrane compartments should be moderated, as DISC analysis was performed using a detergent that is unable to solubilize lipid rafts. Alternatively, mitochondrial activation or post-mitochondrial events were also shown to contribute to the synergy. Siegelin et al. [69] supported the importance of survivin in quercetin-induced sensitization to TRAIL on various glioma cell lines. In four glioma cell lines that displayed good synergistic apoptotic activities upon TRAIL and quercetin treatment, the authors observed a proteasomal degradation of survivin mediated by inhibition of Akt, whereas in gliomas resistant to the combined treatment, survivin levels remained unchanged. In this model, the ability of quercetin to regulate survivin expression appeared to be the major event governing the efficiency of the combined treatment. Finally, Hasegawa et al. [70] assessed the efficiency of methylidihydroquercetin, a methylated version of quercetin called BB-1, extracted from the Asian medicinal plant *Blumea balsamifera*. Similar to quercetin, BB-1 enhanced TRAIL-induced apoptosis in six different leukemia cell lines. Upon methylidihydroquercetin pre-treatment, DR5 was upregulated at the membrane level, but contrary to the observation of Chen et al., PKC was not required for this regulation. In addition, while a downregulation of active Akt and a modulation of transcription factors such as c-Rel and p52 were observed, the levels of survivin, Bax, Bak, Bcl-2, Bcl-XL, XIAP, c-IAP1, c-IAP2, and c-FLIPs remained unaffected in this study. Interestingly, this treatment was not toxic against normal peripheral blood mononuclear cells (PBMC).

Kaempferol is another flavonol that has been described to facilitate TRAIL-induced apoptosis. Resistant colon carcinomas were efficiently eradicated by this co-treatment through a mechanism involving DR4 and DR5 upregulation, but in the absence of XIAP, survivin, Bcl-XL, or Bax regulation [71]. Interestingly, while silencing of DR5 blocked the synergy, silencing of DR4 was unable to protect tumor cells to the combination. However, it should be noted that the membrane levels of DR5 or DR4 were not assessed in this study, so the absence of blockade after DR4 silencing could be explained by a lack of DR4 at the cell surface. Consistent with a previous study [72], Bcl-2 was

surprisingly upregulated by kaempferol without compromising TRAIL-induced cell death. Association of kaempferol with TRAIL was also effective in the prostate carcinoma cell line PC-3 [71], and in three out of seven gliomas [73]. The sensitization was associated in gliomas with a decrease in XIAP, Bcl-2 (but not Bcl-XL), Mcl-1, and with the proteasomal-mediated degradation of survivin, due to Akt inhibition. Kaempferol and TRAIL co-treatments were unable to engage the apoptotic machinery in normal hepatocytes [71].

Another flavonol of interest for combination with TRAIL therapy is myricetin. It has been revealed to exert synergistic pro-apoptotic effects when combined with TRAIL at subtoxic doses on glioma cells, but not on normal astrocytes [74]. During synergy, both c-FLIP_S and c-FLIP_L were downregulated, as well as Bcl-2. Interestingly, overexpression of Bcl-2 or c-FLIP_S (but not c-FLIP_L) attenuated TRAIL-induced cell death in cells co-treated with myricetin, indicating that these inhibitory proteins are relevant for the control of the synergy. Here, sensitization to TRAIL was independent of the tumor suppressor P53 because P53-mutant gliomas were as responsive as wild-type P53 expressing gliomas.

Flavanones

Hesperetin, naringenin, and eriodictyol are the most abundant flavanones found in plants, mainly in citrus fruits. The validity of this kind of flavonoid in combination with TRAIL remains to be assessed.

Flavones

The flavones subgroup of flavonoids is not widely distributed in plants but is abundant in celery, parsley, and some herbs. Apigenin, luteolin, wogonin, and baicalein were studied in association with TRAIL and were shown to exhibit interesting combinatorial properties (Fig. 2a).

Apigenin was the first flavone revealed to sensitize breast cancer cells to TRAIL-induced apoptosis [75]. This phytochemical was shown to inhibit Casein kinase II, leading to inhibition of NF κ B-mediated expression of Bcl-XL and c-FLIP. The synergy appeared to be largely dependent on Bax but independent of p53, as demonstrated on colon carcinomas deficient either for Bax or for p53. Later, Horinaka et al. [76] reported the suitability of this co-treatment on lymphoblastic leukemia (Jurkat), metastatic prostate carcinoma (DU145), and colon carcinoma (DLD-1). They described a new mechanism of action of apigenin, based on DR5 stabilization independent of p53. The co-treatment was safe toward normal PBMC in vitro, and DR5 was not modulated by apigenin on these non-cancerous cells.

Horinaka et al. [77] also studied the flavone luteolin, in human cervical cancer HeLa cells. Cleavage of Bid was observed during co-treatment with TRAIL and luteolin, as well as an increase in the expression of the TRAIL receptor DR5. While the synergy was blocked by DR5 silencing, underlying the importance of this receptor, the implication of DR4 was not analyzed in this study. However, the authors demonstrated that the combination of luteolin and TRAIL is safe for normal PBMC. Concurrently, Shi et al. [78] demonstrated another mechanism of sensitization, independent of any regulation of the TRAIL receptors or Bcl-2, Bcl-XL, c-FLIP, c-IAP1, c-IAP2, or NF κ B. In their study, cervical, colon, liver, or nasopharyngeal carcinomas were greatly sensitized to TRAIL-induced cell death upon a short exposure to luteolin. Sensitization was attributed to the inhibition of PKC, which led to increased XIAP ubiquitination and degradation. Thus, the authors proposed that luteolin could be a potent compound to overcome TRAIL resistance in cancers that exhibit elevated PKC activity.

Wogonin is another flavone shown to sensitize different lymphomas to TRAIL or TNF- α -induced cell death, without having effects on normal peripheral blood T cells [79]. Wogonin was shown to inhibit TNF- α -induced NF κ B activation in a ROS-independent manner, but it was not confirmed for TRAIL. More recently, Lee et al. [80] underlined the importance of P53, Puma, and Bax during co-treatment with TRAIL and wogonin, using prostate and colon carcinomas deficient for each of these proteins. A schematic model of action was proposed, where wogonin induced ROS production and subsequent P53 activation. The histone H2A.X was also phosphorylated, which is a typical feature of DNA damage. These events led to the upregulation of Puma and the activation of the mitochondrial pathway [81]. In another study, wogonin was shown to be unable to sensitize four different pancreatic carcinomas to the combined treatment with TRAIL [82], but these cells are known to bear p53 mutations. This fact could explain, at least in part, the relative cell specificity of the combined treatment. Finally, wogonin has been shown to be safe when administered intravenously to dogs [83], and could be an interesting therapeutic candidate in association with TRAIL for tumors harboring a functional P53 protein.

Baicalein is a flavone originally isolated from the roots of the Asian medicinal herb *Scutellaria baicalensis*. This molecule was studied for its anticancer potential when associated with TRAIL on prostate, colon, T cell leukemia, and hepatoma cancer cell lines [84], and the combination was not toxic against normal blood cells and hepatocytes. Baicalein-induced sensitization to TRAIL was shown to be mediated via two different mechanisms, namely ROS induction or upregulation of CHOP transcription factor, depending on the cell type. Both pathways led to an

increased expression of DR5 that could explain the synergistic effect.

Isoflavones

Isoflavones are commonly referred to as phytoestrogens because of their structural similarities with estrogens. Particularly, these molecules can bind estrogen receptors and mimic their effects [85]. Leguminous plants are almost the exclusive source of isoflavones, such as genistein or daidzein (Fig. 2a).

The ability of genistein to enhance TRAIL-induced cell death was first demonstrated on lung carcinomas, through downregulation of both Akt and Bcl-XL [86]. An in vivo study in mice transplanted with human pancreatic cancer cells revealed that genistein co-treatment with TRAIL triggered a significant reduction of tumor volume, without toxic side-effects [87]. The effectiveness of genistein was explained in cervical cancer HeLa cells by its ability to inhibit the ERK pathway [88]. Genistein was reported to enhance TRAIL killing of hepatocellular and lung carcinomas, via inactivation of the p38 MAPK signaling and activation of the mitochondrial pathway [89, 90]. Gastric adenocarcinomas were also greatly sensitized, as demonstrated by Jin et al. [91], in a way involving mitochondrial activation, DR5 upregulation, and Bcl-XL downregulation, without affecting the levels of Bcl-2 and IAP proteins. On the contrary, Siegelin et al. [92] showed that genistein decreased the levels of Bcl-2, XIAP, survivin, and active Akt, and enhanced the proteasomal degradation of c-FLIP_S, in glioblastoma cells. Interestingly, normal human astrocytes were not sensitized to TRAIL-induced cell death by genistein. While these findings are interesting in vitro for the treatment of glioblastomas, it remains to be determined whether genistein can cross the blood–brain barrier.

Only one study has reported the synergistic effect of the isoflavone daidzein in association with TRAIL against glioblastoma cancer cells [93]. Siegelin et al. demonstrated that this synergy was essentially mediated via Bcl-2 downregulation, whereas c-FLIP, XIAP, survivin, or the TRAIL receptors were not modulated.

Chalcones

Chalcone is the first compound in flavonoid biosynthesis and thus is widely found in all kinds of plants. Two chalcone derivatives have been tested in combination with TRAIL, namely butein and isoliquiritigenin (Fig. 2a).

Butein, a chalcone purified from the barks of the lacquer tree *Rhus verniciflua*, was reported to enhance TRAIL-promoting effects on monoblastoma and leukemia cell lines, through an increase in DR5 expression at the membrane level [94]. This compound could be interesting for

future clinical protocols because no toxicity was observed in normal lymphocytes and CD34+ cells from healthy donors.

Isoliquiritigenin is a chalcone derivative found abundantly in licorice. Co-treatment with subtoxic doses of isoliquiritigenin and TRAIL efficiently killed colorectal HT29 cells [95]. Expression of Bcl-2 and Bcl-XL was not changed, but a slight increase of DR5 was reported. However, the importance of DR5 during the synergy was not assessed and the mechanism of action need to be further explored.

Stilbenes

Stilbenes are produced by plants that are subjected to various stressful conditions. Resveratrol has been widely studied for several years due to its anti-carcinogenic properties (Fig. 2b). Since 2003, ten different studies have assessed the potential of resveratrol to sensitize resistant cancer cells to TRAIL-induced apoptosis (Table 1). Resveratrol, at a concentration of 10 μ M, was initially shown to be unable to sensitize prostate LNCaP cells to TRAIL [96]. In two other studies using ten-fold higher concentrations, Fulda and Debatin [97, 98] reported that resveratrol sensitized various cancer cells to TRAIL-induced apoptosis, including neuroblastoma, medulloblastoma, glioblastoma, melanoma, T cell leukemia, as well as pancreatic, breast, and colon carcinomas. Sensitization was associated with a p21-mediated cell-cycle arrest and concomitant survivin depletion, independent of P53. Untransformed human fibroblasts remained insensitive to the co-treatment. Delmas et al. [99] demonstrated that, while their expression levels remained the same, partitioning of the TRAIL receptors into lipid rafts was responsible for resveratrol's sensitizing activity in two carcinoma cell lines. Later, Shankar et al. [100, 101] reported that resveratrol sensitized prostate carcinomas to TRAIL by way of the modulation of many molecular targets. The expression of survivin, Bcl-2, Bcl-XL, and XIAP was inhibited while the expression of DR4, DR5, Bim, Bax, Bak, Noxa, and PUMA was increased. Of note, sequential treatments were more efficient than co-treatment in triggering cell death in this study. Importantly, the combination was not toxic against normal prostate epithelial cells. Contrary to these results, Gill et al. [102] observed no major changes regarding DR4, DR5, Bcl-2, Bcl-XL, survivin, and XIAP on the same prostate cancer cell lines. In their hands, c-IAP1 was downregulated but seemed to be only partially involved, because cIAP-1 siRNA alone did not restore the full sensitivity to TRAIL. The synergy could also be explained by the increased expression of Bax that could change the Bax/Bcl-2/Bcl-XL ratio, or upstream by the observed inactivation of the Akt

pathway. Using the same prostate cells, Sallman et al. [103] proposed that the combined effect of resveratrol and TRAIL is mediated by the inhibition of the src/jak-Stat1 pathway. According to their study, resveratrol decreased Clusterin expression by inhibiting the phosphorylation of the Src and Jak kinases, resulting in loss of Stat1 activation. Using different melanoma cell lines, Ivanov et al. [104] also demonstrated the efficacy of resveratrol associated with TRAIL. They observed that the JNK-cJun and MAPK p38-ATF2 pathways were activated upon resveratrol pretreatment, as well as many downstream targets such as c-FLIP, Bcl-XL, survivin, and Cyclin D1. Moreover, normal human lung fibroblasts and melanocytes remained protected from apoptosis. Despite many promising investigations regarding the effect of resveratrol, the TRAIL-enhancing properties of this phytochemical might depend on the cellular context. For example, researchers have shown that three pancreatic carcinomas were resistant to the combined treatment, whereas one other cell line exhibited only a slight additive effect [82].

Lignans and flavonolignans

Plant lignans are polyphenolic compounds that are referred to as phytoestrogens, like isoflavones. Flavonolignans, such as silibinin, are heterodimers formed through the coupling of a flavonoid and a lignan component (Fig. 2c).

Nordihydroguaiaretic acid (NDGA) is a phenolic lignan that has been considered as a lipoxygenase inhibitor. This molecule was shown to enhance the pro-apoptotic effect of TRAIL in leukemia Jurkat cells, SW480 colon carcinomas, and prostate cancer DU145 cells, without affecting normal PBMC [105]. The increased expression of DR5 at the membrane level was proposed to explain the synergy because most of the major apoptosis-related proteins such as Bcl-2, Bcl-XL, survivin, c-IAP1, and XIAP remained unaffected.

Honokiol is a lignan originally isolated from *Magnolia officinalis*. Raja et al. [106] reported an interesting synergy with TRAIL on non-small cell lung cancer cell lines, which was accompanied by the modulation of proteins such as DR4, DR5, survivin, and c-FLIP. However, some clues highlighted the prevalence of c-FLIP regulation during honokiol and TRAIL co-treatment. Actually, c-FLIP inhibition appeared to be the earlier event, and its overexpression strongly abolished the synergy. The researchers went a step further in the experiment by testing different honokiol derivatives. They observed a correlation between the efficacy of these molecules and their ability to inhibit c-FLIP. Therefore, c-FLIP appeared to be critical for honokiol-mediated sensitization to TRAIL in this model.

Silibinin from the herb milk thistle was tested with TRAIL on glioma cells [107]. This flavonolignan exerted significant TRAIL-enhancing effects on gliomas but not on normal astrocytes. During synergy, DR5 appeared to be upregulated via the transcription factor CHOP, whereas survivin and c-FLIP were downregulated.

Phenolic acids and derivatives

Plant phenolic acids are derived either from benzoic acid or cinnamic acid (Fig. 2d). Curcumin is a hydroxycinnamic acid derivative responsible for the yellow color of the spice turmeric. Anticancer action of curcumin has given rise to many publications that have revealed a broad spectrum of molecular targets [108, 109]. Co-treatment with TRAIL has also been well studied since 2003 (Table 1). Deeb et al. demonstrated in human prostate carcinomas that curcumin-mediated sensitization to TRAIL involved both the activation of mitochondria [96] and the inhibition of NF κ B signaling [110]. Curcumin was shown to block I κ B α phosphorylation, thus allowing sustained sequestration of NF κ B into the cytosol [111]. The combination of curcumin with TRAIL appeared to be safe for non-tumorigenic prostate epithelial cells. The authors further pointed out that in prostate cancer cells with a high level of active Akt (LNCap and PC-3), sensitization to TRAIL by curcumin was mediated by the suppression of NF κ B via inactivation of the Akt pathway. In prostate cancer cells that lack basal active Akt (DU145), sensitization was also mediated by inhibition of NF κ B through the suppression of I κ B α phosphorylation, but independently of Akt [112]. In both cases, NF κ B inhibition by curcumin resulted in the inhibition of Bcl-2, Bcl-XL, and XIAP expression. These results were confirmed in vivo, as prostate PC3 cells xenografted in mice were efficiently killed upon co-treatment [113]. Shankar et al. also studied the effect of curcumin and TRAIL on prostate carcinomas. They confirmed the observations of Deeb et al. concerning the downregulation of XIAP, Bcl-2, and Bcl-XL, but showed in addition that survivin and Noxa were also inhibited whereas the levels of Bax, Bak, Bim, PUMA, DR4, and DR5 were augmented [114]. In vivo experiments performed on nude mice xenografted with prostate LNCAP cells revealed that treatment with a combination of curcumin and TRAIL inhibited tumor growth by apoptosis triggering, but also through the activation of anti-proliferative, anti-angiogenic, and anti-metastatic mechanisms [115]. Many proteins were positively regulated, such as DR4, DR5, Bax, Bak, p21, and p27, whereas NF κ B was negatively regulated as well as its various gene products, including Bcl-2, Bcl-XL, and Cyclin D1. In contrast, Jung et al. [116] demonstrated that in renal and hepatocellular carcinomas, curcumin and TRAIL-mediated apoptosis

occurred with no change in expression of Bcl-2, Bax, c-IAP2, or XIAP. The synergy was proposed to be induced via a ROS-mediated DR5 upregulation, and the combination was safe toward non-malignant mesangial cells [117]. However, in these settings, the transcription factor CHOP, although activated by ROS, was neither associated with curcumin-mediated DR5 upregulation nor with the synergistic activity of the combination. The mitochondrial pathway was proposed to play a minor role because Bcl-2 overexpression in hepatocarcinomas failed to interfere with the sensitization. Using Burkitt's lymphoma cells lacking a functional Bax protein, Hussain et al. [118] came to similar conclusions. However, the mitochondrial pathway was still activated upon co-treatment in Bax-deficient lymphomas, suggesting that Bak may compensate for the loss of Bax. Sensitization to TRAIL in these cells was also associated with the upregulation of DR5 and the inactivation of NF κ B in a ROS-dependent manner. The efficacy of curcumin and TRAIL association was also demonstrated in gliomas [119], bladder [120], and ovarian carcinomas [121]. Thereby, curcumin could be a potent phytochemical in order to overcome TRAIL resistance in diverse cancer types.

Recently, another phenolic compound called cycloartenyl ferulate, extracted from rice bran oil, has been shown to potentiate TRAIL-induced cell death, which is associated with the upregulation of DR4, DR5, and Bak and the decrease in Bcl-2 expression [122].

Synthetic flavonoids

Given that naturally occurring flavonoids are interesting compounds for anticancer therapy or chemoprevention, researchers aimed to design synthetic versions that can be

produced in large amounts. Thus, a semi-synthetic flavone called flavopiridol has been developed by Aventis (Fig. 3), and has been shown to display both in vitro and in vivo selective antitumor activity [123]. Phase I and II trials have demonstrated the absence of cytotoxicity of this molecule [124]. Flavopiridol was shown to efficiently synergize with TRAIL in several cancer types including cholangiocarcinomas [125] and leukemia cell lines [126] through the respective downregulation of Mcl-1 or XIAP. In hepatocarcinomas, co-administration of flavopiridol and TRAIL resulted in a decline of survivin expression and an increase of DR4 and DR5 at the membrane level [127]. In contrast, breast cancer cells were mainly sensitized by an enhanced formation of the TRAIL DISC and a downregulation of c-FLIP [128]. Likewise, a deregulation of c-FLIP was observed in myeloma and breast cancer cells [129]. Flavopiridol antitumor activity with TRAIL has also been reported in lung carcinomas [130].

Concluding remarks

The interest in natural substances for the treatment of cancer is not recent [131]. Many existing drugs have been discovered from plants used in traditional medicine. For the moment, polyphenols are not yet used in anticancer therapy, but they are currently used as dietary supplements because of their known preventive properties against ageing, neurodegeneration, cardiovascular risk, and cancer. The anticancer efficacy of polyphenols in association with chemotherapy, radiotherapy [132], or in combination with TRAIL [133, 134] in preclinical models is now well demonstrated. The molecular events driving tumor cell sensitization to TRAIL-induced cell death generally target both the intrinsic and the extrinsic pathways. In most cases, polyphenols are able to lower the threshold of caspase activation, thus allowing TRAIL-induced apoptosis triggering. Considering all the data published so far, it is difficult to define a general rule concerning the molecular action of each polyphenol. Rather, it appears that molecular events that allow engagement of the apoptotic machinery upon combined treatments largely depend on the cancer type, and on the signaling pathways engaged in controlling cell resistance to apoptosis. For example, in cancer cells that are resistant to TRAIL through a blockage of the intrinsic pathway, polyphenolic compounds are generally able to inhibit anti-apoptotic proteins of the Bcl-2 family such as Bcl-XL, Bcl-2, or Mcl-1, or to upregulate pro-apoptotic members such as Bax or Bak (Fig. 4). Likewise, inhibition of the Akt pathway by polyphenols can lead to the restoration of the mitochondrial pathway, affording an enhanced sensitivity of the tumor cells to TRAIL-induced cell death (Fig. 4). On the other hand, when the resistance

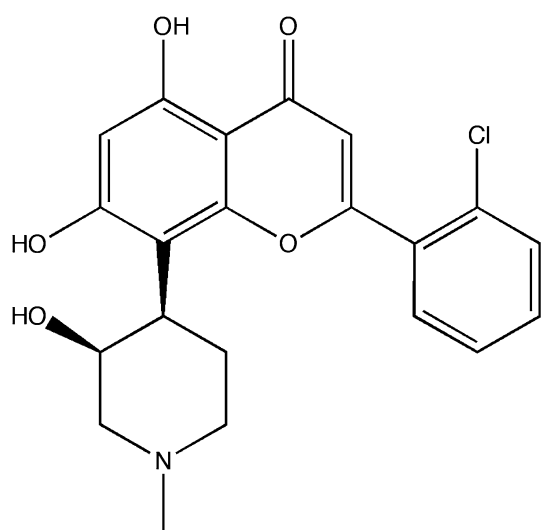


Fig. 3 Chemical structure of the synthetic flavonoid flavopiridol

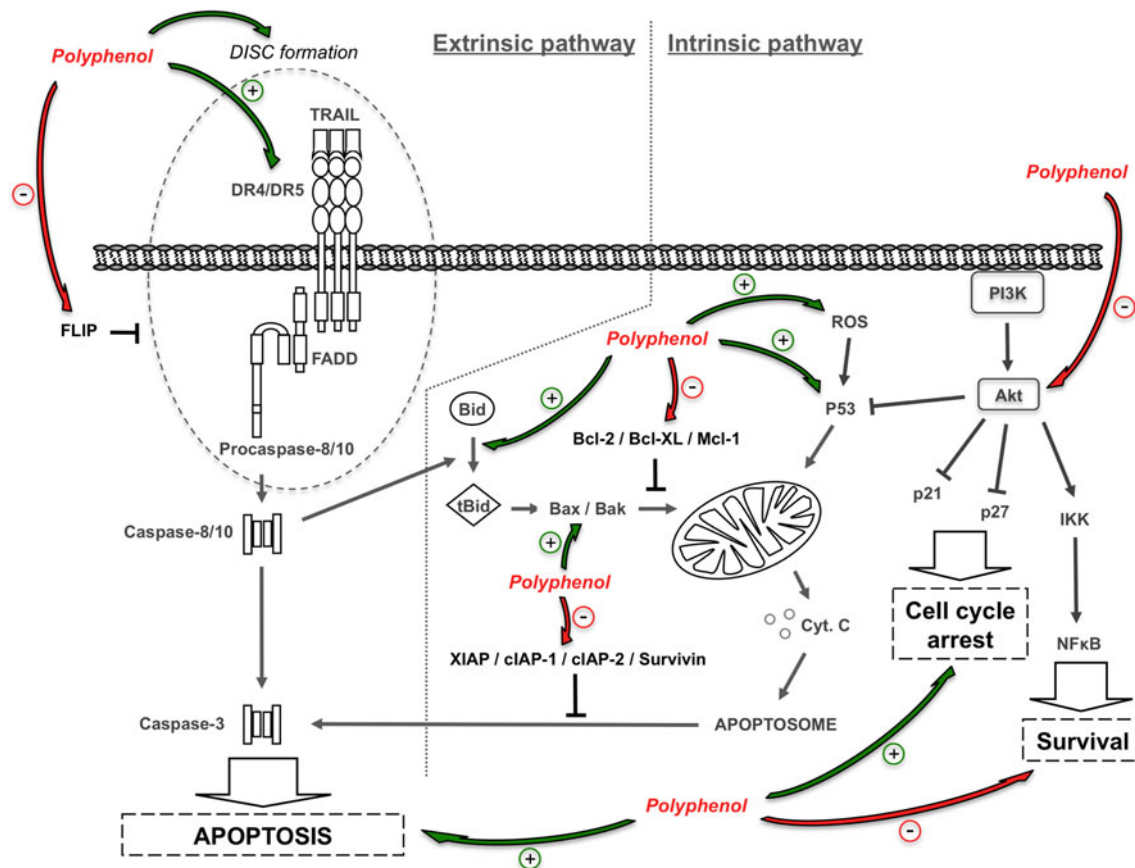


Fig. 4 Schematic model of action of polyphenols on the TRAIL signaling pathway. Polyphenols modulate both the extrinsic and intrinsic pathways, and also tumor suppressors such as P53 and

survival proteins such as Akt. The molecular targets vary depending on the structure of the polyphenolic compound and the cell type. This model reports only the main molecular targets of polyphenols

occurs at the level of the extrinsic pathway, the synergistic activity of these polyphenols is often associated with the upregulation of the agonistic TRAIL receptors, the down-regulation of c-FLIP, or through a facilitation of TRAIL receptor aggregation and DISC formation (Fig. 4). Interestingly, most of these synergistic activities appear to occur independently of *p53*, a tumor suppressor gene that confers resistance to anticancer treatments if mutated or deleted. Aside from polyphenols, it is relevant to mention that other agents with related structures, although not polyphenolic, could also sensitize cells to TRAIL by similar mechanisms of action, such as the triterpenoids celastrol [135, 136] and lupeol [137].

Overall, the finding that polyphenols exert multimodal sensitizing activities is very encouraging for future combined treatments with TRAIL or TRAIL derivatives. However, it is crucial to be cautious about the clinical relevance of these *in vitro* studies. Most *in vitro* studies are likely to be relevant for intravenous administration protocols in future clinical uses, but not for nutritional intake of a polyphenol-rich food. Indeed, *in vitro* studies are often performed with high concentrations of polyphenol that in

no way mimic the concentration at the tumor site following oral delivery [138]. Moreover, the compounds tested in these studies are almost always native polyphenols, but these non-conjugated forms are found at low levels after oral administration due to fact that polyphenols are rapidly absorbed and metabolized, mainly as sulfates, glucuronates, or methylated forms [139]. Thus, almost all the data collected correspond to a direct injection of polyphenols into the blood, but not to a dietary supplementation. The poor stability of polyphenolic compounds within the blood, although problematic, could nonetheless be resolved using various galenic formulations, such as calcium-pectinate beads or liposome-based delivery strategies [140, 141]. For example, intratumor injection of EGCG after encapsulation into liposomes provided interesting results in a mouse model of human cancer [142]. Liposomes protected EGCG from degradation and increased cell death in melanomas and colon carcinomas compared to free EGCG. Thus, liposomes could allow the use of lower doses of polyphenol and possibly reduce side-effects without reducing their anticancer efficacy. Accordingly, it has been demonstrated that encapsulation of quercetin into liposomes drastically

increases its lifetime in plasma, and allows increased quercetin delivery to the tumor, leading to cancer growth inhibition in tumor-bearing mice after intravenous injection [143]. Interestingly, liposome-mediated quercetin delivery into the kidney and the lungs was lower as compared to free quercetin, a finding that may prove useful to limit treatment side-effects. According to the authors, the tumor-selectivity of these liposomes could be explained by the presence of defects in the capillary endothelium of tumoral tissues, which allow their extravasation from the blood to the tumor cells [143]. Therefore, the use of liposomes for intravenous administration of polyphenols could be relevant for the treatment of solid tumors.

Alternatively, direct administration by application onto the skin may be considered in the case of skin cancers, including melanomas. Indeed, topically applied resveratrol was shown to be a safe and efficient approach for transdermal delivery of active polyphenols into the skin [144].

These preliminary in vitro studies are very promising and encouraging for the use of polyphenols and TRAIL for future therapeutic protocols. Both compounds exert specific antitumor activity, and the combination of the two molecules is proven safe for normal cells, at least in vitro. Thus, future work in vivo should help our understanding of the different mechanisms for synergy, and ultimately clinical trials will reveal whether a combination treatment utilizing TRAIL and natural polyphenols represents a realistic and effective anticancer therapy.

Acknowledgments This work was supported by grants of the Conseil Régional de Bourgogne, the INCa (Institut National du Cancer) Canceropôle Grand-Est, ANR (Agence Nationale de la Recherche, ANR-06-JCJC-0103 and 07-PCV-0031) and the European Community (ApopTrain Marie Curie RTN) (O.M.). G.J. is supported by a fellowship from the Ligue Nationale Contre le Cancer. S.S. is supported by the INCa (POLYNOM-174).

References

- Ashkenazi A, Holland P, Eckhardt SG (2008) Ligand-based targeting of apoptosis in cancer: the potential of recombinant human apoptosis ligand 2/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (rhApo2L/TRAIL). *J Clin Oncol* 26:3621–3630
- Trarbach T, Moehler M, Heinemann V, Kohne CH, Przyborek M, Schulz C, Sneller V, Gallant G, Kanzler S (2010) Phase II trial of mapatumumab, a fully human agonistic monoclonal antibody that targets and activates the tumour necrosis factor apoptosis-inducing ligand receptor-1 (TRAIL-R1), in patients with refractory colorectal cancer. *Br J Cancer* 102:506–512
- Newsom-Davis T, Prieske S, Walczak H (2009) Is TRAIL the holy grail of cancer therapy? *Apoptosis* 14:607–623
- Ashkenazi A, Pai RC, Fong S, Leung S, Lawrence DA, Marsters SA, Blackie C, Chang L, McMurtrey AE, Hebert A, DeForge L, Koumenis IL, Lewis D, Harris L, Bussiere J, Koeppe H, Shahrokh Z, Schwall RH (1999) Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand. *J Clin Invest* 104:155–162
- Kelley SK, Harris LA, Xie D, Deforge L, Totpal K, Bussiere J, Fox JA (2001) Preclinical studies to predict the disposition of Apo2L/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in humans: characterization of in vivo efficacy, pharmacokinetics, and safety. *J Pharmacol Exp Ther* 299:31–38
- Lawrence D, Shahrokh Z, Marsters S, Achilles K, Shih D, Mounho B, Hillan K, Totpal K, DeForge L, Schow P, Hooley J, Sherwood S, Pai R, Leung S, Khan L, Gliniak B, Bussiere J, Smith CA, Strom SS, Kelley S, Fox JA, Thomas D, Ashkenazi A (2001) Differential hepatocyte toxicity of recombinant Apo2L/TRAIL versions. *Nat Med* 7:383–385
- Zauli G, Secchiero P (2006) The role of the TRAIL/TRAIL receptors system in hematopoiesis and endothelial cell biology. *Cytokine Growth Factor Rev* 17:245–257
- Boehrer S, Nowak D, Hoelzer D, Mitrou PS, Chow KU (2006) The molecular biology of TRAIL-mediated signaling and its potential therapeutic exploitation in hematopoietic malignancies. *Curr Med Chem* 13:2091–2100
- Cretney E, Shanker A, Yagita H, Smyth MJ, Sayers TJ (2006) TNF-related apoptosis-inducing ligand as a therapeutic agent in autoimmunity and cancer. *Immunol Cell Biol* 84:87–98
- Diehl GE, Yue HH, Hsieh K, Kuang AA, Ho M, Morici LA, Lenz LL, Cado D, Riley LW, Winoto A (2004) TRAIL-R as a negative regulator of innate immune cell responses. *Immunity* 21:877–889
- Janssen EM, Droin NM, Lemmens EE, Pinkoski MJ, Bensinger SJ, Ehst BD, Griffith TS, Green DR, Schoenberger SP (2005) CD4+ T-cell help controls CD8+ T-cell memory via TRAIL-mediated activation-induced cell death. *Nature* 434:88–93
- Cretney E, Takeda K, Yagita H, Glaccum M, Peschon JJ, Smyth MJ (2002) Increased susceptibility to tumor initiation and metastasis in TNF-related apoptosis-inducing ligand-deficient mice. *J Immunol* 168:1356–1361
- Schmaltz C, Alpdogan O, Kappel BJ, Muriglan SJ, Rotolo JA, Ongchin J, Willis LM, Greenberg AS, Eng JM, Crawford JM, Murphy GF, Yagita H, Walczak H, Peschon JJ, van den Brink MR (2002) T cells require TRAIL for optimal graft-versus-tumor activity. *Nat Med* 8:1433–1437
- Grosse-Wilde A, Kemp CJ (2008) Metastasis suppressor function of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-R in mice: implications for TRAIL-based therapy in humans? *Cancer Res* 68:6035–6037
- Secchiero P, Lamberti G, Corallini F, Melloni E, Guarnotta C, Sebastiani A, Zauli G (2009) Conjunctival sac fluid contains elevated levels of soluble TRAIL: implications for the anti-tumoral surveillance of the anterior surface of the eye. *J Cell Physiol* 218:199–204
- Bem RA, Bos AP, Wosten-van Asperen RM, Bruijn M, Lutter R, Sprick MR, van Woensel JB (2009) Potential role of soluble TRAIL in epithelial injury in children with severe RSV infection. *Am J Respir Cell Mol Biol*. doi:10.1165/rcmb.2009-0100OC
- Han LH, Sun WS, Ma CH, Zhang LN, Liu SX, Zhang Q, Gao LF, Chen YH (2002) Detection of soluble TRAIL in HBV infected patients and its clinical implications. *World J Gastroenterol* 8:1077–1080
- Schneider P, Holler N, Bodmer JL, Hahne M, Frei K, Fontana A, Tschoep J (1998) Conversion of membrane-bound Fas(CD95) ligand to its soluble form is associated with downregulation of its proapoptotic activity and loss of liver toxicity. *J Exp Med* 187:1205–1213
- Pan G, O'Rourke K, Chinnaiyan AM, Gentz R, Ebner R, Ni J, Dixit VM (1997) The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *Science* 276:111–113
- Chaudhary PM, Eby M, Jasmin A, Bookwalter A, Murray J, Hood L (1997) Death receptor 5, a new member of the TNFR

- family, and DR4 induce FADD-dependent apoptosis and activate the NF-kappaB pathway. *Immunity* 7:821–830
21. Walczak H, Degli-Esposti MA, Johnson RS, Smolak PJ, Waugh JY, Boiani N, Timour MS, Gerhart MJ, Schooley KA, Smith CA, Goodwin RG, Rauch CT (1997) TRAIL-R2: a novel apoptosis-mediating receptor for TRAIL. *EMBO J* 16:5386–5397
22. Schneider P, Bodmer JL, Thome M, Hofmann K, Holler N, Tschopp J (1997) Characterization of two receptors for TRAIL. *FEBS Lett* 416:329–334
23. MacFarlane M, Ahmad M, Srinivasula SM, Fernandes-Alnemri T, Cohen GM, Alnemri ES (1997) Identification and molecular cloning of two novel receptors for the cytotoxic ligand TRAIL. *J Biol Chem* 272:25417–25420
24. Degli-Esposti MA, Smolak PJ, Walczak H, Waugh J, Huang CP, DuBose RF, Goodwin RG, Smith CA (1997) Cloning and characterization of TRAIL-R3, a novel member of the emerging TRAIL receptor family. *J Exp Med* 186:1165–1170
25. Pan G, Ni J, Wei YF, Yu G, Gentz R, Dixit VM (1997) An antagonist decoy receptor and a death domain-containing receptor for TRAIL. *Science* 277:815–818
26. Degli-Esposti MA, Dougall WC, Smolak PJ, Waugh JY, Smith CA, Goodwin RG (1997) The novel receptor TRAIL-R4 induces NF-kappaB and protects against TRAIL-mediated apoptosis, yet retains an incomplete death domain. *Immunity* 7:813–820
27. Marsters SA, Sheridan JP, Pitti RM, Huang A, Skubatch M, Baldwin D, Yuan J, Gurney A, Goddard AD, Godowski P, Ashkenazi A (1997) A novel receptor for Apo2L/TRAIL contains a truncated death domain. *Curr Biol* 7:1003–1006
28. Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A, Friesen C, Li F, Tomaselli KJ, Debatin KM, Krammer PH, Peter ME (1998) Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J* 17:1675–1687
29. Ozoren N, El-Deiry WS (2002) Defining characteristics of types I and II apoptotic cells in response to TRAIL. *Neoplasia* 4:551–557
30. LeBlanc H, Lawrence D, Varfolomeev E, Totpal K, Morlan J, Schow P, Fong S, Schwall R, Sinicropi D, Ashkenazi A (2002) Tumor-cell resistance to death receptor-induced apoptosis through mutational inactivation of the proapoptotic Bcl-2 homolog Bax. *Nat Med* 8:274–281
31. Scaffidi C, Schmitz I, Zha J, Korsmeyer SJ, Krammer PH, Peter ME (1999) Differential modulation of apoptosis sensitivity in CD95 type I and type II cells. *J Biol Chem* 274:22532–22538
32. Aggarwal BB, Bhardwaj U, Takada Y (2004) Regulation of TRAIL-induced apoptosis by ectopic expression of antiapoptotic factors. *Vitam Horm* 67:453–483
33. LaCasse EC, Mahoney DJ, Cheung HH, Plenchette S, Baird S, Korneluk RG (2008) IAP-targeted therapies for cancer. *Oncogene* 27:6252–6275
34. Ricci MS, Jin Z, Dews M, Yu D, Thomas-Tikhonenko A, Dicker DT, El-Deiry WS (2004) Direct repression of FLIP expression by c-myc is a major determinant of TRAIL sensitivity. *Mol Cell Biol* 24:8541–8555
35. Micheau O, Tschopp J (2003) Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell* 114:181–190
36. Merino D, Lalaoui N, Morizot A, Schneider P, Solary E, Micheau O (2006) Differential inhibition of TRAIL-mediated DR5-DISC formation by decoy receptors 1 and 2. *Mol Cell Biol* 26:7046–7055
37. Rossin A, Derouet M, Abdel-Sater F, Hueber AO (2009) Palmitoylation of the TRAIL receptor DR4 confers an efficient TRAIL-induced cell death signalling. *Biochem J* 419:185–192 (2 p following 192)
38. Wagner KW, Punnoose EA, Januario T, Lawrence DA, Pitti RM, Lancaster K, Lee D, von Goetz M, Yee SF, Totpal K, Huw L, Katta V, Cavet G, Hymowitz SG, Amler L, Ashkenazi A (2007) Death-receptor O-glycosylation controls tumor-cell sensitivity to the proapoptotic ligand Apo2L/TRAIL. *Nat Med* 13:1070–1077
39. Yoshida T, Shiraishi T, Horinaka M, Wakada M, Sakai T (2007) Glycosylation modulates TRAIL-R1/death receptor 4 protein: different regulations of two pro-apoptotic receptors for TRAIL by tunicamycin. *Oncol Rep* 18:1239–1242
40. Thorburn A, Behbakht K, Ford H (2008) TRAIL receptor-targeted therapeutics: resistance mechanisms and strategies to avoid them. *Drug Resist Updat* 11:17–24
41. Zhang L, Fang B (2005) Mechanisms of resistance to TRAIL-induced apoptosis in cancer. *Cancer Gene Ther* 12:228–237
42. Kim M, Park SY, Pai HS, Kim TH, Billiar TR, Seol DW (2004) Hypoxia inhibits tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis by blocking Bax translocation. *Cancer Res* 64:4078–4081
43. Mahalingam D, Szegezdi E, Keane M, Jong S, Samali A (2009) TRAIL receptor signalling and modulation: are we on the right TRAIL? *Cancer Treat Rev* 35:280–288
44. D'Archivio M, Filesi C, Di Benedetto R, Gargiulo R, Giovannini C, Masella R (2007) Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Ann Ist Super Sanita* 43:348–361
45. Ramos S (2008) Cancer chemoprevention and chemotherapy: dietary polyphenols and signalling pathways. *Mol Nutr Food Res* 52:507–526
46. Depeint F, Gee JM, Williamson G, Johnson IT (2002) Evidence for consistent patterns between flavonoid structures and cellular activities. *Proc Nutr Soc* 61:97–103
47. Murzakhmetova M, Moldakarimov S, Tancheva L, Abarova S, Serkedjieva J (2008) Antioxidant and prooxidant properties of a polyphenol-rich extract from *Geranium sanguineum* L. in vitro and in vivo. *Phytother Res* 22:746–751
48. Sakao K, Fujii M, Hou DX (2009) Clarification of the role of quercetin hydroxyl groups in superoxide generation and cell apoptosis by chemical modification. *Biosci Biotechnol Biochem* 73:2048–2053
49. Harborne JB, Williams CA (2000) Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* 55:481–504
50. Thomasset S, Teller N, Cai H, Marko D, Berry DP, Steward WP, Gescher AJ (2009) Do anthocyanins and anthocyanidins, cancer chemopreventive pigments in the diet, merit development as potential drugs? *Cancer Chemother Pharmacol* 64:201–211
51. Hafeez BB, Siddiqui IA, Asim M, Malik A, Afaq F, Adhami VM, Saleem M, Din M, Mukhtar H (2008) A dietary anthocyanidin delphinidin induces apoptosis of human prostate cancer PC3 cells in vitro and in vivo: involvement of nuclear factor-kappaB signaling. *Cancer Res* 68:8564–8572
52. Ding M, Feng R, Wang SY, Bowman L, Lu Y, Qian Y, Castranova V, Jiang BH, Shi X (2006) Cyanidin-3-glucoside, a natural product derived from blackberry, exhibits chemopreventive and chemotherapeutic activity. *J Biol Chem* 281:17359–17368
53. Kuo PL, Hsu YL, Lin TC, Lin LT, Lin CC (2004) Induction of apoptosis in human breast adenocarcinoma MCF-7 cells by prodelphinidin B-2 3, 3'-di-O-gallate from *Myrica rubra* via Fas-mediated pathway. *J Pharm Pharmacol* 56:1399–1406
54. Fleschhut J, Kratzer F, Reckemmer G, Kulling SE (2006) Stability and biotransformation of various dietary anthocyanins in vitro. *Eur J Nutr* 45:7–18
55. Nishikawa T, Nakajima T, Moriguchi M, Jo M, Sekoguchi S, Ishii M, Takashima H, Katagishi T, Kimura H, Minami M, Itoh Y, Kagawa K, Okanoue T (2006) A green tea polyphenol, epigallocatechin-3-gallate, induces apoptosis of human hepatocellular carcinoma, possibly through inhibition of Bcl-2 family proteins. *J Hepatol* 44:1074–1082
56. Siegelin MD, Habel A, Gaiser T (2008) Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) downregulates PEA15 and thereby augments

- TRAIL-mediated apoptosis in malignant glioma. *Neurosci Lett* 448:161–165
57. Siddiqui IA, Malik A, Adhami VM, Asim M, Hafeez BB, Sarfaraz S, Mukhtar H (2008) Green tea polyphenol EGCG sensitizes human prostate carcinoma LNCaP cells to TRAIL-mediated apoptosis and synergistically inhibits biomarkers associated with angiogenesis and metastasis. *Oncogene* 27:2055–2063
 58. Basu A, Haldar S (2009) Combinatorial effect of epigallocatechin-3-gallate and TRAIL on pancreatic cancer cell death. *Int J Oncol* 34:281–286
 59. Shen Q, Tian F, Jiang P, Li Y, Zhang L, Lu J, Li J (2009) EGCG enhances TRAIL-mediated apoptosis in human melanoma A375 cell line. *J Huazhong Univ Sci Technol Med Sci* 29:771–775
 60. Bischoff SC (2008) Quercetin: potentials in the prevention and therapy of disease. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 11:733–740
 61. Ferry DR, Smith A, Malkhandi J, Fyfe DW, deTakats PG, Anderson D, Baker J, Kerr DJ (1996) Phase I clinical trial of the flavonoid quercetin: pharmacokinetics and evidence for in vivo tyrosine kinase inhibition. *Clin Cancer Res* 2:659–668
 62. Kim YH, Lee YJ (2007) TRAIL apoptosis is enhanced by quercetin through Akt dephosphorylation. *J Cell Biochem* 100:998–1009
 63. Kim YH, Lee DH, Jeong JH, Guo ZS, Lee YJ (2008) Quercetin augments TRAIL-induced apoptotic death: involvement of the ERK signal transduction pathway. *Biochem Pharmacol* 75:1946–1958
 64. Russo M, Nigro P, Rosiello R, D'Arienzo R, Russo GL (2007) Quercetin enhances CD95- and TRAIL-induced apoptosis in leukemia cell lines. *Leukemia* 21:1130–1133
 65. Chen W, Wang X, Zhuang J, Zhang L, Lin Y (2007) Induction of death receptor 5 and suppression of survivin contribute to sensitization of TRAIL-induced cytotoxicity by quercetin in non-small cell lung cancer cells. *Carcinogenesis* 28:2114–2121
 66. Kim JY, Kim EH, Park SS, Lim JH, Kwon TK, Choi KS (2008) Quercetin sensitizes human hepatoma cells to TRAIL-induced apoptosis via Sp1-mediated DR5 up-regulation and proteasome-mediated c-FLIPS down-regulation. *J Cell Biochem* 105:1386–1398
 67. You HL, Eng HL, Hsu SF, Chen CM, Ye TC, Liao WT, Huang MY, Baer R, Cheng JT (2007) A PKC-Sp1 signaling pathway induces early differentiation of human keratinocytes through upregulation of TSG101. *Cell Signal* 19:1201–1211
 68. Psahoulia FH, Drosopoulos KG, Doubravska L, Andera L, Pintzas A (2007) Quercetin enhances TRAIL-mediated apoptosis in colon cancer cells by inducing the accumulation of death receptors in lipid rafts. *Mol Cancer Ther* 6:2591–2599
 69. Siegelin MD, Reuss DE, Habel A, Rami A, von Deimling A (2009) Quercetin promotes degradation of survivin and thereby enhances death-receptor-mediated apoptosis in glioma cells. *Neuro Oncol* 11:122–131
 70. Hasegawa H, Yamada Y, Komiyama K, Hayashi M, Ishibashi M, Yoshida T, Sakai T, Koyano T, Kam TS, Murata K, Sugahara K, Tsuruda K, Akamatsu N, Tsukasaki K, Masuda M, Takasu N, Kamihira S (2006) Dihydroflavonol BB-1, an extract of natural plant *Blumea balsamifera*, abrogates TRAIL resistance in leukemia cells. *Blood* 107:679–688
 71. Yoshida T, Konishi M, Horinaka M, Yasuda T, Goda AE, Taniguchi H, Yano K, Wakada M, Sakai T (2008) Kaempferol sensitizes colon cancer cells to TRAIL-induced apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 375:129–133
 72. Leung LK, Po LS, Lau TY, Yuen YM (2004) Effect of dietary flavonols on oestrogen receptor transactivation and cell death induction. *Br J Nutr* 91:831–839
 73. Siegelin MD, Reuss DE, Habel A, Herold-Mende C, von Deimling A (2008) The flavonoid kaempferol sensitizes human glioma cells to TRAIL-mediated apoptosis by proteasomal degradation of survivin. *Mol Cancer Ther* 7:3566–3574
 74. Siegelin MD, Gaiser T, Habel A, Siegelin Y (2009) Myricetin sensitizes malignant glioma cells to TRAIL-mediated apoptosis by down-regulation of the short isoform of FLIP and bcl-2. *Cancer Lett* 283:230–238
 75. Ravi R, Bedi A (2002) Sensitization of tumor cells to Apo2 ligand/TRAIL-induced apoptosis by inhibition of casein kinase II. *Cancer Res* 62:4180–4185
 76. Horinaka M, Yoshida T, Shiraishi T, Nakata S, Wakada M, Sakai T (2006) The dietary flavonoid apigenin sensitizes malignant tumor cells to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *Mol Cancer Ther* 5:945–951
 77. Horinaka M, Yoshida T, Shiraishi T, Nakata S, Wakada M, Nakanishi R, Nishino H, Sakai T (2005) The combination of TRAIL and luteolin enhances apoptosis in human cervical cancer HeLa cells. *Biochem Biophys Res Commun* 333:833–838
 78. Shi RX, Ong CN, Shen HM (2005) Protein kinase C inhibition and x-linked inhibitor of apoptosis protein degradation contribute to the sensitization effect of luteolin on tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis in cancer cells. *Cancer Res* 65:7815–7823
 79. Fas SC, Baumann S, Zhu JY, Giaisi M, Treiber MK, Mählknecht U, Krammer PH, Li-Weber M (2006) Wogonin sensitizes resistant malignant cells to TNF α - and TRAIL-induced apoptosis. *Blood* 108:3700–3706
 80. Lee DH, Rhee JG, Lee YJ (2009) Reactive oxygen species up-regulate p53 and Puma; a possible mechanism for apoptosis during combined treatment with TRAIL and wogonin. *Br J Pharmacol* 157:1189–1202
 81. Rushworth SA, Micheau O (2009) Molecular crosstalk between TRAIL and natural antioxidants in the treatment of cancer. *Br J Pharmacol* 157:1186–1188
 82. Kallifatidis G, Rausch V, Baumann B, Apel A, Beckermann BM, Groth A, Mattern J, Li Z, Kolb A, Moldenhauer G, Altevogt P, Wirth T, Werner J, Schemmer P, Buchler MW, Salnikow AV, Herr I (2009) Sulforaphane targets pancreatic tumour-initiating cells by NF- κ B-induced antiapoptotic signalling. *Gut* 58:949–963
 83. Peng J, Qi Q, You Q, Hu R, Liu W, Feng F, Wang G, Guo Q (2009) Subchronic toxicity and plasma pharmacokinetic studies on wogonin, a natural flavonoid, in Beagle dogs. *J Ethnopharmacol* 124:257–262
 84. Taniguchi H, Yoshida T, Horinaka M, Yasuda T, Goda AE, Konishi M, Wakada M, Kataoka K, Yoshikawa T, Sakai T (2008) Baicalein overcomes tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand resistance via two different cell-specific pathways in cancer cells but not in normal cells. *Cancer Res* 68:8918–8927
 85. Messina MJ, Wood CE (2008) Soy isoflavones, estrogen therapy, and breast cancer risk: analysis and commentary. *Nutr J* 7:17
 86. Park SY, Seol DW (2002) Regulation of Akt by EGF-R inhibitors, a possible mechanism of EGF-R inhibitor-enhanced TRAIL-induced apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 295:515–518
 87. Nozawa F, Itami A, Saruc M, Kim M, Standop J, Picha KS, Cowan KH, Pour PM (2004) The combination of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL/Apo2L) and Genistein is effective in inhibiting pancreatic cancer growth. *Pancreas* 29:45–52
 88. Lee MW, Bach JH, Lee HJ, Lee DY, Joo WS, Kim YS, Park SC, Kim KY, Lee WB, Kim SS (2005) The activation of ERK1/2 via a tyrosine kinase pathway attenuates trail-induced apoptosis in HeLa cells. *Cancer Invest* 23:586–592

89. Jin CY, Park C, Kim GY, Lee SJ, Kim WJ, Choi YH (2009) Genistein enhances TRAIL-induced apoptosis through inhibition of p38 MAPK signaling in human hepatocellular carcinoma Hep3B cells. *Chem Biol Interact* 180:143–150
90. Jin CY, Park C, Moon SK, Kim GY, Kwon TK, Lee SJ, Kim WJ, Choi YH (2009) Genistein sensitizes human hepatocellular carcinoma cells to TRAIL-mediated apoptosis by enhancing Bid cleavage. *Anticancer Drugs* 20:713–722
91. Jin CY, Park C, Cheong J, Choi BT, Lee TH, Lee JD, Lee WH, Kim GY, Ryu CH, Choi YH (2007) Genistein sensitizes TRAIL-resistant human gastric adenocarcinoma AGS cells through activation of caspase-3. *Cancer Lett* 257:56–64
92. Siegelin MD, Siegelin Y, Habel A, Gaiser T (2009) Genistein enhances proteasomal degradation of the short isoform of FLIP in malignant glioma cells and thereby augments TRAIL-mediated apoptosis. *Neurosci Lett* 453:92–97
93. Siegelin MD, Gaiser T, Habel A, Siegelin Y (2009) Daidzein overcomes TRAIL-resistance in malignant glioma cells by modulating the expression of the intrinsic apoptotic inhibitor, Bcl-2. *Neurosci Lett* 454:223–228
94. Kim N (2008) Butein sensitizes human leukemia cells to apoptosis induced by tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand (TRAIL). *Arch Pharm Res* 31:1179–1186
95. Yoshida T, Horinaka M, Takara M, Tsuchihashi M, Mukai N, Wakada M, Sakai T (2008) Combination of isoliquiritigenin and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand induces apoptosis in colon cancer HT29 cells. *Environ Health Prev Med* 13:281–287
96. Deeb D, Xu YX, Jiang H, Gao X, Janakiraman N, Chapman RA, Gautam SC (2003) Curcumin (diferuloyl-methane) enhances tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis in LNCaP prostate cancer cells. *Mol Cancer Ther* 2:95–103
97. Fulda S, Debatin KM (2004) Sensitization for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis by the chemopreventive agent resveratrol. *Cancer Res* 64:337–346
98. Fulda S, Debatin KM (2005) Resveratrol-mediated sensitisation to TRAIL-induced apoptosis depends on death receptor and mitochondrial signalling. *Eur J Cancer* 41:786–798
99. Delmas D, Rebe C, Micheau O, Athias A, Gamber P, Grazide S, Laurent G, Latruffe N, Solary E (2004) Redistribution of CD95, DR4 and DR5 in rafts accounts for the synergistic toxicity of resveratrol and death receptor ligands in colon carcinoma cells. *Oncogene* 23:8979–8986
100. Shankar S, Chen Q, Siddiqui I, Sarva K, Srivastava RK (2007) Sensitization of TRAIL-resistant LNCaP cells by resveratrol (3, 4', 5 tri-hydroxystilbene): molecular mechanisms and therapeutic potential. *J Mol Signal* 2:7
101. Shankar S, Siddiqui I, Srivastava RK (2007) Molecular mechanisms of resveratrol (3, 4, 5-trihydroxy-trans-stilbene) and its interaction with TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) in androgen-insensitive prostate cancer cells. *Mol Cell Biochem* 304:273–285
102. Gill C, Walsh SE, Morrissey C, Fitzpatrick JM, Watson RW (2007) Resveratrol sensitizes androgen independent prostate cancer cells to death-receptor mediated apoptosis through multiple mechanisms. *Prostate* 67:1641–1653
103. Sallman DA, Chen X, Zhong B, Gilvary DL, Zhou J, Wei S, Djeu JY (2007) Clusterin mediates TRAIL resistance in prostate tumor cells. *Mol Cancer Ther* 6:2938–2947
104. Ivanov VN, Partridge MA, Johnson GE, Huang SX, Zhou H, Hei TK (2008) Resveratrol sensitizes melanomas to TRAIL through modulation of antiapoptotic gene expression. *Exp Cell Res* 314:1163–1176
105. Yoshida T, Shiraishi T, Horinaka M, Nakata S, Yasuda T, Goda AE, Wakada M, Mizutani Y, Miki T, Nishikawa A, Sakai T (2007) Lipoxygenase inhibitors induce death receptor 5/TRAIL-R2 expression and sensitize malignant tumor cells to TRAIL-induced apoptosis. *Cancer Sci* 98:1417–1423
106. Raja SM, Chen S, Yue P, Acker TM, Lefkove B, Arbiser JL, Khuri FR, Sun SY (2008) The natural product honokiol preferentially inhibits cellular FLICE-inhibitory protein and augments death receptor-induced apoptosis. *Mol Cancer Ther* 7:2212–2223
107. Son YG, Kim EH, Kim JY, Kim SU, Kwon TK, Yoon AR, Yun CO, Choi KS (2007) Silibinin sensitizes human glioma cells to TRAIL-mediated apoptosis via DR5 up-regulation and down-regulation of c-FLIP and survivin. *Cancer Res* 67:8274–8284
108. Reuter S, Eifes S, Dicato M, Aggarwal BB, Diederich M (2008) Modulation of anti-apoptotic and survival pathways by curcumin as a strategy to induce apoptosis in cancer cells. *Biochem Pharmacol* 76:1340–1351
109. Strimpakos AS, Sharma RA (2008) Curcumin: preventive and therapeutic properties in laboratory studies and clinical trials. *Antioxid Redox Signal* 10:511–545
110. Deeb DD, Jiang H, Gao X, Divine G, Dulchavsky SA, Gautam SC (2005) Chemosensitization of hormone-refractory prostate cancer cells by curcumin to TRAIL-induced apoptosis. *J Exp Ther Oncol* 5:81–91
111. Deeb D, Jiang H, Gao X, Hafner MS, Wong H, Divine G, Chapman RA, Dulchavsky SA, Gautam SC (2004) Curcumin sensitizes prostate cancer cells to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand/Apo2L by inhibiting nuclear factor-kappaB through suppression of IkappaBalpha phosphorylation. *Mol Cancer Ther* 3:803–812
112. Deeb D, Jiang H, Gao X, Al-Holou S, Danyluk AL, Dulchavsky SA, Gautam SC (2007) Curcumin [1, 7-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1-6-heptadine-3, 5-dione; C21H20O6] sensitizes human prostate cancer cells to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand/Apo2L-induced apoptosis by suppressing nuclear factor-kappaB via inhibition of the prosurvival Akt signaling pathway. *J Pharmacol Exp Ther* 321:616–625
113. Andrzejewski T, Deeb D, Gao X, Danyluk A, Arbab AS, Dulchavsky SA, Gautam SC (2008) Therapeutic efficacy of curcumin/TRAIL combination regimen for hormone-refractory prostate cancer. *Oncol Res* 17:257–267
114. Shankar S, Chen Q, Sarva K, Siddiqui I, Srivastava RK (2007) Curcumin enhances the apoptosis-inducing potential of TRAIL in prostate cancer cells: molecular mechanisms of apoptosis, migration and angiogenesis. *J Mol Signal* 2:10
115. Shankar S, Ganapathy S, Chen Q, Srivastava RK (2008) Curcumin sensitizes TRAIL-resistant xenografts: molecular mechanisms of apoptosis, metastasis and angiogenesis. *Mol Cancer* 7:16
116. Jung EM, Park JW, Choi KS, Lee HI, Lee KS, Kwon TK (2006) Curcumin sensitizes tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-mediated apoptosis through CHOP-independent DR5 upregulation. *Carcinogenesis* 27:2008–2017
117. Jung EM, Lim JH, Lee TJ, Park JW, Choi KS, Kwon TK (2005) Curcumin sensitizes tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis through reactive oxygen species-mediated upregulation of death receptor 5 (DR5). *Carcinogenesis* 26:1905–1913
118. Hussain AR, Ahmed M, Al-Jomah NA, Khan AS, Manogaran P, Sultana M, Abubaker J, Platanias LC, Al-Kuraya KS, Uddin S (2008) Curcumin suppresses constitutive activation of nuclear factor-kappa B and requires functional Bax to induce apoptosis in Burkitt's lymphoma cell lines. *Mol Cancer Ther* 7:3318–3329
119. Gao X, Deeb D, Jiang H, Liu YB, Dulchavsky SA, Gautam SC (2005) Curcumin differentially sensitizes malignant glioma cells to TRAIL/Apo2L-mediated apoptosis through activation of

- procaspases and release of cytochrome *c* from mitochondria. *J Exp Ther Oncol* 5:39–48
120. Kamat AM, Sethi G, Aggarwal BB (2007) Curcumin potentiates the apoptotic effects of chemotherapeutic agents and cytokines through down-regulation of nuclear factor-kappaB and nuclear factor-kappaB-regulated gene products in IFN-alpha-sensitive and IFN-alpha-resistant human bladder cancer cells. *Mol Cancer Ther* 6:1022–1030
 121. Wahl H, Tan L, Griffith K, Choi M, Liu JR (2007) Curcumin enhances Apo2L/TRAIL-induced apoptosis in chemoresistant ovarian cancer cells. *Gynecol Oncol* 105:104–112
 122. Kong CK, Lam WS, Chiu LC, Ooi VE, Sun SS, Wong YS (2009) A rice bran polyphenol, cycloartenyl ferulate, elicits apoptosis in human colorectal adenocarcinoma SW480 and sensitizes metastatic SW620 cells to TRAIL-induced apoptosis. *Biochem Pharmacol* 77:1487–1496
 123. Drees M, Dengler WA, Roth T, Labonte H, Mayo J, Malspeis L, Grever M, Sausville EA, Fiebig HH (1997) Flavopiridol (L86-8275): selective antitumor activity in vitro and activity in vivo for prostate carcinoma cells. *Clin Cancer Res* 3:273–279
 124. Shapiro GI (2004) Preclinical and clinical development of the cyclin-dependent kinase inhibitor flavopiridol. *Clin Cancer Res* 10:4270s–4275s
 125. Taniai M, Grambihler A, Higuchi H, Werneburg N, Bronk SF, Farrugia DJ, Kaufmann SH, Gores GJ (2004) Mcl-1 mediates tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand resistance in human cholangiocarcinoma cells. *Cancer Res* 64:3517–3524
 126. Rosato RR, Dai Y, Almenara JA, Maggio SC, Grant S (2004) Potent antileukemic interactions between flavopiridol and TRAIL/Apo2L involve flavopiridol-mediated XIAP downregulation. *Leukemia* 18:1780–1788
 127. Miyashita K, Shiraki K, Fuke H, Inoue T, Yamanaka Y, Yamaguchi Y, Yamamoto N, Ito K, Sugimoto K, Nakano T (2006) The cyclin-dependent kinase inhibitor flavopiridol sensitizes human hepatocellular carcinoma cells to TRAIL-induced apoptosis. *Int J Mol Med* 18:249–256
 128. Palacios C, Yerbes R, Lopez-Rivas A (2006) Flavopiridol induces cellular FLICE-inhibitory protein degradation by the proteasome and promotes TRAIL-induced early signaling and apoptosis in breast tumor cells. *Cancer Res* 66:8858–8869
 129. Fandy TE, Ross DD, Gore SD, Srivastava RK (2007) Flavopiridol synergizes TRAIL cytotoxicity by downregulation of FLIPL. *Cancer Chemother Pharmacol* 60:313–319
 130. Kim DM, Koo SY, Jeon K, Kim MH, Lee J, Hong CY, Jeong S (2003) Rapid induction of apoptosis by combination of flavopiridol and tumor necrosis factor (TNF)-alpha or TNF-related apoptosis-inducing ligand in human cancer cell lines. *Cancer Res* 63:621–626
 131. Newman DJ, Cragg GM (2007) Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *J Nat Prod* 70:461–477
 132. Garg AK, Buchholz TA, Aggarwal BB (2005) Chemosensitization and radiosensitization of tumors by plant polyphenols. *Antioxid Redox Signal* 7:1630–1647
 133. Ishibashi M, Ohtsuki T (2008) Studies on search for bioactive natural products targeting TRAIL signaling leading to tumor cell apoptosis. *Med Res Rev* 28:688–714
 134. Szliszka E, Czuba ZP, Domino M, Mazur B, Zydowicz G, Krol W (2009) Ethanolic extract of propolis (EEP) enhances the apoptosis-inducing potential of TRAIL in cancer cells. *Molecules* 14:738–754
 135. Sung B, Park B, Yadav VR, Aggarwal BB (2010) Celastrol, a triterpene, enhances TRAIL-induced apoptosis through the down-regulation of cell survival proteins and up-regulation of death receptors. *J Biol Chem* 285:11498–11507
 136. Zhu H, Ding WJ, Wu R, Weng QJ, Lou JS, Jin RJ, Lu W, Yang B, He QJ (2010) Synergistic anti-cancer activity by the combination of TRAIL/APO-2L and celastrol. *Cancer Investig* 28:23–32
 137. Murtaza I, Saleem M, Adhami VM, Hafeez BB, Mukhtar H (2009) Suppression of cFLIP by lupeol, a dietary triterpene, is sufficient to overcome resistance to TRAIL-mediated apoptosis in chemoresistant human pancreatic cancer cells. *Cancer Res* 69:1156–1165
 138. Scalbert A, Williamson G (2000) Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J Nutr* 130:2073S–2085S
 139. Kroon PA, Clifford MN, Crozier A, Day AJ, Donovan JL, Manach C, Williamson G (2004) How should we assess the effects of exposure to dietary polyphenols in vitro? *Am J Clin Nutr* 80:15–21
 140. Das S, Ng KY (2010) Resveratrol-loaded calcium-pectinate beads: effects of formulation parameters on drug release and bead characteristics. *J Pharm Sci* 99:840–860
 141. Narayanan NK, Nargi D, Randolph C, Narayanan BA (2009) Liposome encapsulation of curcumin and resveratrol in combination reduces prostate cancer incidence in PTEN knockout mice. *Int J Cancer* 125:1–8
 142. Fang JY, Lee WR, Shen SC, Huang YL (2006) Effect of liposome encapsulation of tea catechins on their accumulation in basal cell carcinomas. *J Dermatol Sci* 42:101–109
 143. Yuan ZP, Chen LJ, Fan LY, Tang MH, Yang GL, Yang HS, Du XB, Wang GQ, Yao WX, Zhao QM, Ye B, Wang R, Diao P, Zhang W, Wu HB, Zhao X, Wei YQ (2006) Liposomal quercetin efficiently suppresses growth of solid tumors in murine models. *Clin Cancer Res* 12:3193–3199
 144. Hung CF, Lin YK, Huang ZR, Fang JY (2008) Delivery of resveratrol, a red wine polyphenol, from solutions and hydrogels via the skin. *Biol Pharm Bull* 31:955–962

Curriculum Vitae

Curriculum Vitae

Guillaume JACQUEMIN

jacquemin.gui@gmail.com

FORMATION

- Depuis 2007 : **Doctorat en Sciences de la vie** (Directeur de thèse: Dr O. Micheau)
Projet: "Induction de la mort par apoptose de lymphomes B résistants par un traitement associant la molécule TRAIL et un composé végétal, la quercétine : implication de la voie mitochondriale".
INSERM U866 « Lipides, Nutrition, Cancer », Dijon, FRANCE
Financement de la Ligue Nationale Contre le Cancer
- 2005-2007 : **Master 2 Recherche, Biochimie, Biologie Moléculaire et Cellulaire**, Mention B
Université de Bourgogne, Dijon, FRANCE
- 2002-2005 : **Licence de Biochimie**, Mention B
Université de Bourgogne, Dijon, FRANCE

EXPERIENCE SCIENTIFIQUE

- Jan-Sept 2007 *Projet de Master 2 recherche:* Rôle du suppresseur de tumeur RASSF1A dans la signalisation apoptotique induite par TRAIL. (Superviseur: Dr O. Micheau)
INSERM U517 « Mort cellulaire et Cancer », Faculté de Médecine, Dijon, FRANCE.
- Juin-Sept 2005 *Projet de Master 1:* Effets du Trans-resveratrol sur l'expression du gène codant pour la protéine iNOS dans un modèle de carcinome du colon chez le rat.
(Superviseur: Pr N. Latruffe)
Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Université de Bourgogne, Dijon.

COMPETENCES

Management de projet de recherche

- Mise au point et rédaction d'un projet de thèse
- Gestion du personnel technique
- Rédaction d'articles et de revues scientifiques
- Collaborations scientifiques:
 - Laboratoires de recherche (INSERM U865, Lyon; INSERM U917 MiCa, Rennes)
 - Industriels (Société Diaclone, Besançon)
- Demandes de financement
- Gestion des commandes de matériel
- Encadrement d'étudiants

Techniques de laboratoire

- *Culture cellulaire:* transfections, siRNA, immunomarquage, cytométrie en flux, infections rétrovirales et adénovirales, tests de viabilité, ...
- *Biochimie et biologie moléculaire:* Western blot, Real Time PCR, clonage plasmidique, fractionnement cellulaire, mutagenèse dirigée, immunoprécipitation, ...

Formations scientifiques

- Expérimentation Animale et méthodes alternatives, Niveau 1
- Culture cellulaire en laboratoire de Niveau 2.

Informatique

- Suite office, logiciels de traitement d'image
- Microsoft Project, Endnote, ImageJ

Langues

- Anglais : Courant
- Espagnol : Notions

PUBLICATIONS

Jacquemin G, Shirley S and Micheau O. (2010) **Combining naturally occurring polyphenols with TNF-related apoptosis-inducing ligand: a promising approach to kill resistant cancer cells?** Cell Mol Life Sci., 2010

Jacquemin G, Granci V, Gallouet A-S, Iessi E, Lalaoui N, Morizot A, Guillaudeux T and Micheau O. **Quercetin sensitizes B-cell follicular lymphomas to TRAIL-induced apoptosis through the deregulation of Mcl-1 and survivin and restoration of the mitochondrial pathway.** (*In preparation*)

Morizot A, Mérino D, Lalaoui N, Jacquemin G, Granci V, Iessi E, Lanneau D, Bouyer F, Solary E, Chauffert B, Saas P, Garrido C and Micheau O. **Chemotherapy overcomes TRAIL-R4-mediated TRAIL resistance at the DISC level.** Cell Death Differ, 2010.

El Fajoui Z, Toscano F, Jacquemin G, Abello J, Scoazec JY, Micheau O and Saurin JC. **Oxaliplatin overcomes human colorectal cancer cells resistance to TRAIL through JNK-dependent phosphorylation of Bcl-xL.** (*Gastroenterology, under revision*)

Estornes Y, Toscano F, Virard F, Jacquemin G, Bonnin M, Lalaoui N, Mercier P, Salaun B, Renno T, Micheau O and Lebecque S. **TLR3 behaves as a death receptor in human cancer cells.** (*Submitted*)

Lalaoui N, Jacquemin G, Morlé A, Mérino D, Iessi E, Saunier M, Morizot A, Mougin C, Robert B, Prétet J-L, Solary E, Droin N and Micheau O. **Dcr2 promotes tumor growth and resistance to apoptosis through the deregulation of Akt and c-Fos in HeLa cells.** (*In preparation*)

COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES

Sept. 2010 **18th Euro-conference on Apoptosis.** Ghent, BELGIUM - Communication affichée
Juillet 2010 **7th European Workshop on Cell Death.** Tisvildeleje, DENMARK- Communication affichée
Juin 2010 **16^e Forum des Jeunes Chercheurs,** Besançon, FRANCE.
Communication orale (2^e prix de la meilleure communication orale)
Juillet 2009 **1st Workshop on Death Domain-containing receptors and scaffold adaptors,** Dijon, FRANCE - Communication affichée

VIE ASSOCIATIVE

2007-2010 **Trésorier de l'association EDIFICE** (www.edifice-asso.fr)

EDIFICE est une association de doctorants en Sciences de la vie dont de but est d'informer les futurs docteurs des possibilités d'insertion dans le monde de l'entreprise, en organisant des rencontres avec les différents acteurs des biotechnologies et du secteur pharmaceutique.

Compétences acquises

- Organisation et coordination de conférences, de tables rondes.
- Recherche de sponsors et de financements
- Gestion des crédits, rédaction des bilans financiers annuels.
- Prises de contacts avec les intervenants.
- Organisation de congrès (Journées BIOTechno 2009, www.biotechno.asso.fr).

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

- Abou El Hassan MA, Mastenbroek DC, Gerritsen WR, Giaccone G, Kruyt FA (2004) Overexpression of Bcl2 abrogates chemo- and radiotherapy-induced sensitisation of NCI-H460 non-small-cell lung cancer cells to adenovirus-mediated expression of full-length TRAIL. *Br J Cancer* 91:171-177
- Agathangelou A, Cooper WN, Latif F (2005) Role of the Ras-association domain family 1 tumor suppressor gene in human cancers. *Cancer Res* 65:3497-3508
- Aggarwal BB, Kohr WJ, Hass PE, Moffat B, Spencer SA, Henzel WJ, Bringman TS, Nedwin GE, Goeddel DV, Harkins RN (1985) Human tumor necrosis factor. Production, purification, and characterization. *J Biol Chem* 260:2345-2354
- Aggarwal BB, Moffat B, Harkins RN (1984) Human lymphotoxin. Production by a lymphoblastoid cell line, purification, and initial characterization. *J Biol Chem* 259:686-691
- Aktas O, Smorodchenko A, Brocke S, Infante-Duarte C, Schulze Topphoff U, Vogt J, Prozorovski T, Meier S, Osmanova V, Pohl E, Bechmann I, Nitsch R, Zipp F (2005) Neuronal damage in autoimmune neuroinflammation mediated by the death ligand TRAIL. *Neuron* 46:421-432
- Altieri DC (2010) Survivin and IAP proteins in cell-death mechanisms. *Biochem J* 430:199-205
- Antonsson B, Montessuit S, Sanchez B, Martinou JC (2001) Bax is present as a high molecular weight oligomer/complex in the mitochondrial membrane of apoptotic cells. *J Biol Chem* 276:11615-11623
- Asakuma J, Sumitomo M, Asano T, Hayakawa M (2003) Selective Akt inactivation and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand sensitization of renal cancer cells by low concentrations of paclitaxel. *Cancer Res* 63:1365-1370
- Ashkenazi A, Holland P, Eckhardt SG (2008) Ligand-based targeting of apoptosis in cancer: the potential of recombinant human apoptosis ligand 2/Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (rhApo2L/TRAIL). *J Clin Oncol* 26:3621-3630
- Ashkenazi A, Pai RC, Fong S, Leung S, Lawrence DA, Marsters SA, Blackie C, Chang L, McMurtrey AE, Hebert A, DeForge L, Koumenis IL, Lewis D, Harris L, Bussiere J, Koeppen H, Shahrokh Z, Schwall RH (1999) Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand. *J Clin Invest* 104:155-162
- Bagnoli M, Canevari S, Mezzanzanica D (2010) Cellular FLICE-inhibitory protein (c-FLIP) signalling: a key regulator of receptor-mediated apoptosis in physiologic context and in cancer. *Int J Biochem Cell Biol* 42:210-213
- Baksh S, Tommasi S, Fenton S, Yu VC, Martins LM, Pfeifer GP, Latif F, Downward J, Neel BG (2005) The tumor suppressor RASSF1A and MAP-1 link death receptor signaling to Bax conformational change and cell death. *Mol Cell* 18:637-650
- Baritaki S, Huerta-Yepez S, Sakai T, Spandidos DA, Bonavida B (2007) Chemotherapeutic drugs sensitize cancer cells to TRAIL-mediated apoptosis: up-regulation of DR5 and inhibition of Yin Yang 1. *Mol Cancer Ther* 6:1387-1399
- Belot A, Grosclaude P, Bossard N, Jouglu E, Benhamou E, Delafosse P, Guizard AV, Molinie F, Danzon A, Bara S, Bouvier AM, Tretarre B, Binder-Foucard F, Colonna M, Daubisse L, Hedelin G, Launoy G, Le Stang N, Maynadie M, Monnereau A, Troussard X, Faivre J, Collignon A, Janoray I, Arveux P, Buemi A, Raverdy N, Schvartz C, Bovet M, Cherie-Challine L, Esteve J, Remontet L, Velten M (2008) Cancer incidence and mortality in France over the period 1980-2005. *Rev Epidemiol Sante Publique* 56:159-175
- Belyanskaya LL, Marti TM, Hopkins-Donaldson S, Kurtz S, Felley-Bosco E, Stahel RA (2007) Human agonistic TRAIL receptor antibodies Mapatumumab and Lexatumumab induce apoptosis in malignant mesothelioma and act synergistically with cisplatin. *Mol Cancer* 6:66
- Berg D, Lehne M, Muller N, Siegmund D, Munkel S, Sebald W, Pfizenmaier K, Wajant H (2007) Enforced covalent trimerization increases the activity of the TNF ligand family members TRAIL and CD95L. *Cell Death Differ* 14:2021-2034
- Billen LP, Shamas-Din A, Andrews DW (2008) Bid: a Bax-like BH3 protein. *Oncogene* 27 Suppl 1:S93-104
- Bischoff SC (2008) Quercetin: potentials in the prevention and therapy of disease. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 11:733-740
- Bockbrader KM, Tan M, Sun Y (2005) A small molecule Smac-mimic compound induces apoptosis and sensitizes TRAIL- and etoposide-induced apoptosis in breast cancer cells. *Oncogene* 24:7381-7388
- Bodmer JL, Meier P, Tschopp J, Schneider P (2000) Cysteine 230 is essential for the structure and activity of the cytotoxic ligand TRAIL. *J Biol Chem* 275:20632-20637
- Bos PD, Zhang XH, Nadal C, Shu W, Gomis RR, Nguyen DX, Minn AJ, van de Vijver MJ, Gerald WL, Foekens JA, Massague J (2009) Genes that mediate breast cancer metastasis to the brain. *Nature* 459:1005-1009

- Brincks EL, Katewa A, Kucaba TA, Griffith TS, Legge KL (2008) CD8 T cells utilize TRAIL to control influenza virus infection. *J Immunol* 181:4918-4925
- Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR, Morony S, Tarpley J, Capparelli C, Scully S, Tan HL, Xu W, Lacey DL, Boyle WJ, Simonet WS (1998) osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev* 12:1260-1268
- Cassatella MA (2006) On the production of TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL/Apo-2L) by human neutrophils. *J Leukoc Biol* 79:1140-1149
- Ceballos-Cancino G, Espinosa M, Maldonado V, Melendez-Zajgla J (2007) Regulation of mitochondrial Smac/DIABLO-selective release by survivin. *Oncogene* 26:7569-7575
- Chai J, Shiozaki E, Srinivasula SM, Wu Q, Datta P, Alnemri ES, Shi Y (2001) Structural basis of caspase-7 inhibition by XIAP. *Cell* 104:769-780
- Chan CW, Crafton E, Fan HN, Flook J, Yoshimura K, Skarica M, Brockstedt D, Dubensky TW, Stins MF, Lanier LL, Pardoll DM, Housseau F (2006) Interferon-producing killer dendritic cells provide a link between innate and adaptive immunity. *Nat Med* 12:207-213
- Chan FK (2007) Three is better than one: pre-ligand receptor assembly in the regulation of TNF receptor signaling. *Cytokine* 37:101-107
- Chan FK, Chun HJ, Zheng L, Siegel RM, Bui KL, Lenardo MJ (2000) A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signaling. *Science* 288:2351-2354
- Chaudhary PM, Eby M, Jasmin A, Bookwalter A, Murray J, Hood L (1997) Death receptor 5, a new member of the TNFR family, and DR4 induce FADD-dependent apoptosis and activate the NF-kappaB pathway. *Immunity* 7:821-830
- Chen X, Kandasamy K, Srivastava RK (2003) Differential roles of RelA (p65) and c-Rel subunits of nuclear factor kappa B in tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand signaling. *Cancer Res* 63:1059-1066
- Chipuk JE, Moldoveanu T, Llambi F, Parsons MJ, Green DR (2010) The BCL-2 family reunion. *Mol Cell* 37:299-310
- Clancy L, Mruk K, Archer K, Woelfel M, Mongkolsapaya J, Screaton G, Lenardo MJ, Chan FK (2005) Pre-ligand assembly domain-mediated ligand-independent association between TRAIL receptor 4 (TR4) and TR2 regulates TRAIL-induced apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:18099-18104
- Conboy L, Foley AG, O'Boyle NM, Lawlor M, Gallagher HC, Murphy KJ, Regan CM (2009) Curcumin-induced degradation of PKC delta is associated with enhanced dentate NCAM PSA expression and spatial learning in adult and aged Wistar rats. *Biochem Pharmacol* 77:1254-1265
- Connolly K, Mitter R, Muir M, Jodrell D, Guichard S (2009) Stable XIAP knockdown clones of HCT116 colon cancer cells are more sensitive to TRAIL, taxanes and irradiation in vitro. *Cancer Chemother Pharmacol* 64:307-316
- Cretney E, McQualter JL, Kayagaki N, Yagita H, Bernard CC, Grewal IS, Ashkenazi A, Smyth MJ (2005) TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)/Apo2L suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis in mice. *Immunol Cell Biol* 83:511-519
- Cretney E, Takeda K, Yagita H, Glaccum M, Peschon JJ, Smyth MJ (2002) Increased susceptibility to tumor initiation and metastasis in TNF-related apoptosis-inducing ligand-deficient mice. *J Immunol* 168:1356-1361
- Cretney E, Uldrich AP, Berzins SP, Strasser A, Godfrey DI, Smyth MJ (2003) Normal thymocyte negative selection in TRAIL-deficient mice. *J Exp Med* 198:491-496
- Dai Y, Liu M, Tang W, Li Y, Lian J, Lawrence TS, Xu L (2009) A Smac-mimetic sensitizes prostate cancer cells to TRAIL-induced apoptosis via modulating both IAPs and NF-kappaB. *BMC Cancer* 9:392
- Dan HC, Sun M, Kaneko S, Feldman RI, Nicosia SV, Wang HG, Tsang BK, Cheng JQ (2004) Akt phosphorylation and stabilization of X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP). *J Biol Chem* 279:5405-5412
- de Groot M, Toering ST, Boer K, Spliet WG, Heimans JJ, Aronica E, Reijneveld JC (2010) Expression of synaptic vesicle protein 2A in epilepsy-associated brain tumors and in the peritumoral cortex. *Neuro Oncol* 12:265-273
- Degli-Esposti MA, Dougall WC, Smolak PJ, Waugh JY, Smith CA, Goodwin RG (1997a) The novel receptor TRAIL-R4 induces NF-kappaB and protects against TRAIL-mediated apoptosis, yet retains an incomplete death domain. *Immunity* 7:813-820
- Degli-Esposti MA, Smolak PJ, Walczak H, Waugh J, Huang CP, DuBose RF, Goodwin RG, Smith CA (1997b) Cloning and characterization of TRAIL-R3, a novel member of the emerging TRAIL receptor family. *J Exp Med* 186:1165-1170

- Deng ZH, Wen JF, Li JH, Xiao DS, Zhou JH (2008) Activator protein-1 involved in growth inhibition by RASSF1A gene in the human gastric carcinoma cell line SGC7901. *World J Gastroenterol* 14:1437-1443
- Depeint F, Gee JM, Williamson G, Johnson IT (2002) Evidence for consistent patterns between flavonoid structures and cellular activities. *Proc Nutr Soc* 61:97-103
- Di Pietro R, Secchiero P, Rana R, Gibellini D, Visani G, Bemis K, Zamai L, Miscia S, Zauli G (2001) Ionizing radiation sensitizes erythroleukemic cells but not normal erythroblasts to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)--mediated cytotoxicity by selective up-regulation of TRAIL-R1. *Blood* 97:2596-2603
- Diehl GE, Yue HH, Hsieh K, Kuang AA, Ho M, Morici LA, Lenz LL, Cado D, Riley LW, Winoto A (2004) TRAIL-R as a negative regulator of innate immune cell responses. *Immunity* 21:877-889
- Dohi T, Beltrami E, Wall NR, Plescia J, Altieri DC (2004a) Mitochondrial survivin inhibits apoptosis and promotes tumorigenesis. *J Clin Invest* 114:1117-1127
- Dohi T, Okada K, Xia F, Wilford CE, Samuel T, Welsh K, Marusawa H, Zou H, Armstrong R, Matsuzawa S, Salvesen GS, Reed JC, Altieri DC (2004b) An IAP-IAP complex inhibits apoptosis. *J Biol Chem* 279:34087-34090
- Domenzain-Reyna C, Hernandez D, Miquel-Serra L, Docampo MJ, Badenas C, Fabra A, Bassols A (2009) Structure and regulation of the versican promoter: the versican promoter is regulated by AP-1 and TCF transcription factors in invasive human melanoma cells. *J Biol Chem* 284:12306-12317
- Dorsey JF, Mintz A, Tian X, Dowling ML, Plastaras JP, Dicker DT, Kao GD, El-Deiry WS (2009) Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) and paclitaxel have cooperative in vivo effects against glioblastoma multiforme cells. *Mol Cancer Ther* 8:3285-3295
- Dumitru CA, Carpinteiro A, Trarbach T, Hengge UR, Gulbins E (2007) Doxorubicin enhances TRAIL-induced cell death via ceramide-enriched membrane platforms. *Apoptosis* 12:1533-1541
- Dunkle A, Dzhagalov I, He YW (2010) Mcl-1 promotes survival of thymocytes by inhibition of Bak in a pathway separate from Bcl-2. *Cell Death Differ* 17:994-1002
- Eckelman BP, Salvesen GS (2006) The human anti-apoptotic proteins cIAP1 and cIAP2 bind but do not inhibit caspases. *J Biol Chem* 281:3254-3260
- Ehrhardt H, Fulda S, Schmid I, Hiscott J, Debatin KM, Jeremias I (2003) TRAIL induced survival and proliferation in cancer cells resistant towards TRAIL-induced apoptosis mediated by NF-kappaB. *Oncogene* 22:3842-3852
- Ehrlich S, Infante-Duarte C, Seeger B, Zipp F (2003) Regulation of soluble and surface-bound TRAIL in human T cells, B cells, and monocytes. *Cytokine* 24:244-253
- Emery JG, McDonnell P, Burke MB, Deen KC, Lyn S, Silverman C, Dul E, Appelbaum ER, Eichman C, DiPrinzio R, Dodds RA, James IE, Rosenberg M, Lee JC, Young PR (1998) Osteoprotegerin is a receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *J Biol Chem* 273:14363-14367
- Engelman JA (2009) Targeting PI3K signalling in cancer: opportunities, challenges and limitations. *Nat Rev Cancer* 9:550-562
- Evdokiou A, Bouralexis S, Atkins GJ, Chai F, Hay S, Clayer M, Findlay DM (2002) Chemotherapeutic agents sensitize osteogenic sarcoma cells, but not normal human bone cells, to Apo2L/TRAIL-induced apoptosis. *Int J Cancer* 99:491-504
- Fanger NA, Maliszewski CR, Schooley K, Griffith TS (1999) Human dendritic cells mediate cellular apoptosis via tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). *J Exp Med* 190:1155-1164
- Ferlay J, Autier P, Boniol M, Heanue M, Colombet M, Boyle P (2007) Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006. *Ann Oncol* 18:581-592
- Ferry DR, Smith A, Malkhandi J, Fyfe DW, deTakats PG, Anderson D, Baker J, Kerr DJ (1996) Phase I clinical trial of the flavonoid quercetin: pharmacokinetics and evidence for in vivo tyrosine kinase inhibition. *Clin Cancer Res* 2:659-668
- Finnberg N, Klein-Szanto AJ, El-Deiry WS (2008) TRAIL-R deficiency in mice promotes susceptibility to chronic inflammation and tumorigenesis. *J Clin Invest* 118:111-123
- Fiorucci S, Golebiowski J, Cabrol-Bass D, Antonczak S (2008) Molecular simulations enlighten the binding mode of quercetin to lipoxygenase-3. *Proteins* 73:290-298
- Frei B, Higdon JV (2003) Antioxidant activity of tea polyphenols in vivo: evidence from animal studies. *J Nutr* 133:3275S-3284S
- Fukuda S, Pelus LM (2006) Survivin, a cancer target with an emerging role in normal adult tissues. *Mol Cancer Ther* 5:1087-1098
- Furukawa T, Youssef EM, Yatsuoka T, Yokoyama T, Makino N, Inoue H, Fukushige S, Hoshi M, Hayashi Y, Sunamura M, Horii A (1999) Cloning and characterization of the human UDP-N-

- acetylglucosamine: alpha-1,3-D-mannoside beta-1,4-N-acetylglucosaminyltransferase IV-homologue (hGnT-IV-H) gene. *J Hum Genet* 44:397-401
- Galligan L, Longley DB, McEwan M, Wilson TR, McLaughlin K, Johnston PG (2005) Chemotherapy and TRAIL-mediated colon cancer cell death: the roles of p53, TRAIL receptors, and c-FLIP. *Mol Cancer Ther* 4:2026-2036
- Ganten TM, Haas TL, Sykora J, Stahl H, Sprick MR, Fas SC, Krueger A, Weigand MA, Grosse-Wilde A, Stremmel W, Krammer PH, Walczak H (2004) Enhanced caspase-8 recruitment to and activation at the DISC is critical for sensitisation of human hepatocellular carcinoma cells to TRAIL-induced apoptosis by chemotherapeutic drugs. *Cell Death Differ* 11 Suppl 1:S86-96
- Ganten TM, Koschny R, Sykora J, Schulze-Bergkamen H, Buchler P, Haas TL, Schader MB, Untergasser A, Stremmel W, Walczak H (2006) Preclinical differentiation between apparently safe and potentially hepatotoxic applications of TRAIL either alone or in combination with chemotherapeutic drugs. *Clin Cancer Res* 12:2640-2646
- Germain M, Milburn J, Duronio V (2008) MCL-1 inhibits BAX in the absence of MCL-1/BAX Interaction. *J Biol Chem* 283:6384-6392
- Gibson SB, Oyer R, Spalding AC, Anderson SM, Johnson GL (2000) Increased expression of death receptors 4 and 5 synergizes the apoptosis response to combined treatment with etoposide and TRAIL. *Mol Cell Biol* 20:205-212
- Gill C, Dowling C, O'Neill AJ, Watson RW (2009) Effects of cIAP-1, cIAP-2 and XIAP triple knockdown on prostate cancer cell susceptibility to apoptosis, cell survival and proliferation. *Mol Cancer* 8:39
- Gillissen B, Wendt J, Richter A, Muer A, Overkamp T, Gebhardt N, Preissner R, Belka C, Dorken B, Daniel PT (2010) Endogenous Bak inhibitors Mcl-1 and Bcl-xL: differential impact on TRAIL resistance in Bax-deficient carcinoma. *J Cell Biol* 188:851-862
- Golks A, Brenner D, Krammer PH, Lavrik IN (2006) The c-FLIP-NH2 terminus (p22-FLIP) induces NF-kappaB activation. *J Exp Med* 203:1295-1305
- Griffith TS, Kemp TJ (2003) The topoisomerase I inhibitor topotecan increases the sensitivity of prostate tumor cells to TRAIL/Apo-2L-induced apoptosis. *Cancer Chemother Pharmacol* 52:175-184
- Griffith TS, Wiley SR, Kubin MZ, Sedger LM, Maliszewski CR, Fanger NA (1999) Monocyte-mediated tumoricidal activity via the tumor necrosis factor-related cytokine, TRAIL. *J Exp Med* 189:1343-1354
- Grivennikov SI, Kuprash DV, Liu ZG, Nedospasov SA (2006) Intracellular signals and events activated by cytokines of the tumor necrosis factor superfamily: From simple paradigms to complex mechanisms. *Int Rev Cytol* 252:129-161
- Grosse-Wilde A, Voloshanenko O, Bailey SL, Longton GM, Schaefer U, Csernok AI, Schutz G, Greiner EF, Kemp CJ, Walczak H (2008) TRAIL-R deficiency in mice enhances lymph node metastasis without affecting primary tumor development. *J Clin Invest* 118:100-110
- Guo F, Sigua C, Tao J, Bali P, George P, Li Y, Wittmann S, Moscinski L, Atadja P, Bhalla K (2004) Cotreatment with histone deacetylase inhibitor LAQ824 enhances Apo-2L/tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand-induced death inducing signaling complex activity and apoptosis of human acute leukemia cells. *Cancer Res* 64:2580-2589
- Halaas O, Vik R, Ashkenazi A, Espevik T (2000) Lipopolysaccharide induces expression of APO2 ligand/TRAIL in human monocytes and macrophages. *Scand J Immunol* 51:244-250
- Harper N, Farrow SN, Kaptein A, Cohen GM, MacFarlane M (2001) Modulation of tumor necrosis factor apoptosis-inducing ligand-induced NF-kappa B activation by inhibition of apical caspases. *J Biol Chem* 276:34743-34752
- Herbeuval JP, Boasso A, Grivel JC, Hardy AW, Anderson SA, Dolan MJ, Chougnet C, Lifson JD, Shearer GM (2005a) TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) in HIV-1-infected patients and its in vitro production by antigen-presenting cells. *Blood* 105:2458-2464
- Herbeuval JP, Grivel JC, Boasso A, Hardy AW, Chougnet C, Dolan MJ, Yagita H, Lifson JD, Shearer GM (2005b) CD4+ T-cell death induced by infectious and noninfectious HIV-1: role of type 1 interferon-dependent, TRAIL/DR5-mediated apoptosis. *Blood* 106:3524-3531
- Herbeuval JP, Nilsson J, Boasso A, Hardy AW, Kruhlak MJ, Anderson SA, Dolan MJ, Dy M, Andersson J, Shearer GM (2006) Differential expression of IFN-alpha and TRAIL/DR5 in lymphoid tissue of progressor versus nonprogressor HIV-1-infected patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:7000-7005
- Hernandez A, Wang QD, Schwartz SA, Evers BM (2001) Sensitization of human colon cancer cells to TRAIL-mediated apoptosis. *J Gastrointest Surg* 5:56-65
- Hilliard B, Wilmen A, Seidel C, Liu TS, Goke R, Chen Y (2001) Roles of TNF-related apoptosis-inducing ligand in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 166:1314-1319

- Hoffmann O, Priller J, Prozorovski T, Schulze-Topphoff U, Baeva N, Lunemann JD, Aktas O, Mahrhofer C, Stricker S, Zipp F, Weber JR (2007) TRAIL limits excessive host immune responses in bacterial meningitis. *J Clin Invest* 117:2004-2013
- Holen I, Cross SS, Neville-Webbe HL, Cross NA, Balasubramanian SP, Croucher PI, Evans CA, Lippitt JM, Coleman RE, Eaton CL (2005) Osteoprotegerin (OPG) expression by breast cancer cells in vitro and breast tumours in vivo--a role in tumour cell survival? *Breast Cancer Res Treat* 92:207-215
- Holen I, Croucher PI, Hamdy FC, Eaton CL (2002) Osteoprotegerin (OPG) is a survival factor for human prostate cancer cells. *Cancer Res* 62:1619-1623
- Horak P, Pils D, Haller G, Pribill I, Roessler M, Tomek S, Horvat R, Zeillinger R, Zielinski C, Krainer M (2005) Contribution of epigenetic silencing of tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand receptor 1 (DR4) to TRAIL resistance and ovarian cancer. *Mol Cancer Res* 3:335-343
- Hori T, Kondo T, Kanamori M, Tabuchi Y, Ogawa R, Zhao QL, Ahmed K, Yasuda T, Seki S, Suzuki K, Kimura T (2010) Ionizing radiation enhances tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis through up-regulations of death receptor 4 (DR4) and death receptor 5 (DR5) in human osteosarcoma cells. *J Orthop Res* 28:739-745
- Hotte SJ, Hirte HW, Chen EX, Siu LL, Le LH, Corey A, Iacobucci A, MacLean M, Lo L, Fox NL, Oza AM (2008) A phase 1 study of mapatumumab (fully human monoclonal antibody to TRAIL-R1) in patients with advanced solid malignancies. *Clin Cancer Res* 14:3450-3455
- Huang S, Sinicrope FA (2008) BH3 mimetic ABT-737 potentiates TRAIL-mediated apoptotic signaling by unsequestering Bim and Bak in human pancreatic cancer cells. *Cancer Res* 68:2944-2951
- Huang Y, Park YC, Rich RL, Segal D, Myszka DG, Wu H (2001) Structural basis of caspase inhibition by XIAP: differential roles of the linker versus the BIR domain. *Cell* 104:781-790
- Hwang MK, Song NR, Kang NJ, Lee KW, Lee HJ (2009) Activation of phosphatidylinositol 3-kinase is required for tumor necrosis factor- α -induced upregulation of matrix metalloproteinase-9: its direct inhibition by quercetin. *Int J Biochem Cell Biol* 41:1592-1600
- Hymowitz SG, Christinger HW, Fuh G, Ultsch M, O'Connell M, Kelley RF, Ashkenazi A, de Vos AM (1999) Triggering cell death: the crystal structure of Apo2L/TRAIL in a complex with death receptor 5. *Mol Cell* 4:563-571
- Hymowitz SG, O'Connell MP, Ultsch MH, Hurst A, Totpal K, Ashkenazi A, de Vos AM, Kelley RF (2000) A unique zinc-binding site revealed by a high-resolution X-ray structure of homotrimeric Apo2L/TRAIL. *Biochemistry* 39:633-640
- Ichikawa K, Liu W, Zhao L, Wang Z, Liu D, Ohtsuka T, Zhang H, Mountz JD, Koopman WJ, Kimberly RP, Zhou T (2001) Tumoricidal activity of a novel anti-human DR5 monoclonal antibody without hepatocyte cytotoxicity. *Nat Med* 7:954-960
- Irmeler M, Thome M, Hahne M, Schneider P, Hofmann K, Steiner V, Bodmer JL, Schroter M, Burns K, Mattmann C, Rimoldi D, French LE, Tschopp J (1997) Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature* 388:190-195
- Ishii M, Iwai M, Harada Y, Kishida T, Asada H, Shin-Ya M, Itoh Y, Imanishi J, Okanoue T, Mazda O (2007) Soluble TRAIL gene and actinomycin D synergistically suppressed multiple metastasis of TRAIL-resistant colon cancer in the liver. *Cancer Lett* 245:134-143
- Ishimura N, Isomoto H, Bronk SF, Gores GJ (2006) Trail induces cell migration and invasion in apoptosis-resistant cholangiocarcinoma cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 290:G129-136
- Jacquemin G, Shirley S, Micheau O (2010) Combining naturally occurring polyphenols with TNF-related apoptosis-inducing ligand: a promising approach to kill resistant cancer cells? *Cell Mol Life Sci* 67:3115-3130
- Janssen EM, Droin NM, Lemmens EE, Pinkoski MJ, Bensinger SJ, Ehst BD, Griffith TS, Green DR, Schoenberger SP (2005) CD4⁺ T-cell help controls CD8⁺ T-cell memory via TRAIL-mediated activation-induced cell death. *Nature* 434:88-93
- Jin Z, Li Y, Pitti R, Lawrence D, Pham VC, Lill JR, Ashkenazi A (2009) Cullin3-based polyubiquitination and p62-dependent aggregation of caspase-8 mediate extrinsic apoptosis signaling. *Cell* 137:721-735
- Jin Z, McDonald ER, 3rd, Dicker DT, El-Deiry WS (2004) Deficient tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) death receptor transport to the cell surface in human colon cancer cells selected for resistance to TRAIL-induced apoptosis. *J Biol Chem* 279:35829-35839
- Johnstone RW, Frew AJ, Smyth MJ (2008) The TRAIL apoptotic pathway in cancer onset, progression and therapy. *Nat Rev Cancer* 8:782-798
- Kanwar RK, Cheung CH, Chang JY, Kanwar JR (2010) Recent advances in anti-survivin treatments for cancer. *Curr Med Chem* 17:1509-1515

- Karikari CA, Roy I, Tryggestad E, Feldmann G, Pinilla C, Welsh K, Reed JC, Armour EP, Wong J, Herman J, Rakheja D, Maitra A (2007) Targeting the apoptotic machinery in pancreatic cancers using small-molecule antagonists of the X-linked inhibitor of apoptosis protein. *Mol Cancer Ther* 6:957-966
- Karin M, Cao Y, Greten FR, Li ZW (2002) NF-kappaB in cancer: from innocent bystander to major culprit. *Nat Rev Cancer* 2:301-310
- Kataoka T, Tschopp J (2004) N-terminal fragment of c-FLIP(L) processed by caspase 8 specifically interacts with TRAF2 and induces activation of the NF-kappaB signaling pathway. *Mol Cell Biol* 24:2627-2636
- Kayagaki N, Yamaguchi N, Nakayama M, Eto H, Okumura K, Yagita H (1999a) Type I interferons (IFNs) regulate tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) expression on human T cells: A novel mechanism for the antitumor effects of type I IFNs. *J Exp Med* 189:1451-1460
- Kayagaki N, Yamaguchi N, Nakayama M, Takeda K, Akiba H, Tsutsui H, Okamura H, Nakanishi K, Okumura K, Yagita H (1999b) Expression and function of TNF-related apoptosis-inducing ligand on murine activated NK cells. *J Immunol* 163:1906-1913
- Keane MM, Ettenberg SA, Nau MM, Russell EK, Lipkowitz S (1999) Chemotherapy augments TRAIL-induced apoptosis in breast cell lines. *Cancer Res* 59:734-741
- Kelley RF, Totpal K, Lindstrom SH, Mathieu M, Billeci K, Deforge L, Pai R, Hymowitz SG, Ashkenazi A (2005) Receptor-selective mutants of apoptosis-inducing ligand 2/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand reveal a greater contribution of death receptor (DR) 5 than DR4 to apoptosis signaling. *J Biol Chem* 280:2205-2212
- Kelley SK, Harris LA, Xie D, Deforge L, Totpal K, Bussiere J, Fox JA (2001) Preclinical studies to predict the disposition of Apo2L/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in humans: characterization of in vivo efficacy, pharmacokinetics, and safety. *J Pharmacol Exp Ther* 299:31-38
- Kelly MM, Hoel BD, Voelkel-Johnson C (2002) Doxorubicin pretreatment sensitizes prostate cancer cell lines to TRAIL induced apoptosis which correlates with the loss of c-FLIP expression. *Cancer Biol Ther* 1:520-527
- Kemp TJ, Ludwig AT, Earel JK, Moore JM, Vanoosten RL, Moses B, Leidal K, Nauseef WM, Griffith TS (2005) Neutrophil stimulation with Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin (BCG) results in the release of functional soluble TRAIL/Apo-2L. *Blood* 106:3474-3482
- Khaled KA, El-Sayed YM, Al-Hadiya BM (2003) Disposition of the flavonoid quercetin in rats after single intravenous and oral doses. *Drug Dev Ind Pharm* 29:397-403
- Kim H, Rafiuddin-Shah M, Tu HC, Jeffers JR, Zambetti GP, Hsieh JJ, Cheng EH (2006) Hierarchical regulation of mitochondrion-dependent apoptosis by BCL-2 subfamilies. *Nat Cell Biol* 8:1348-1358
- Kim TH, Jiang HH, Youn YS, Park CW, Lim SM, Jin CH, Tak KK, Lee HS, Lee KC (2010) Preparation and characterization of Apo2L/TNF-related apoptosis-inducing ligand-loaded human serum albumin nanoparticles with improved stability and tumor distribution. *J Pharm Sci*
- Kischkel FC, Lawrence DA, Tinel A, LeBlanc H, Virmani A, Schow P, Gazdar A, Blenis J, Arnott D, Ashkenazi A (2001) Death receptor recruitment of endogenous caspase-10 and apoptosis initiation in the absence of caspase-8. *J Biol Chem* 276:46639-46646
- Koga Y, Matsuzaki A, Suminoe A, Hattori H, Hara T (2004) Neutrophil-derived TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL): a novel mechanism of antitumor effect by neutrophils. *Cancer Res* 64:1037-1043
- Kohler B, Anguissola S, Concannon CG, Rehm M, Kogel D, Prehn JH (2008) Bid participates in genotoxic drug-induced apoptosis of HeLa cells and is essential for death receptor ligands' apoptotic and synergistic effects. *PLoS One* 3:e2844
- Koksal IT, Sanlioglu AD, Karacay B, Griffith TS, Sanlioglu S (2008) Tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand-R4 decoy receptor expression is correlated with high Gleason scores, prostate-specific antigen recurrence, and decreased survival in patients with prostate carcinoma. *Urol Oncol* 26:158-165
- Kondo K, Yamasaki S, Sugie T, Teratani N, Kan T, Imamura M, Shimada Y (2006) Cisplatin-dependent upregulation of death receptors 4 and 5 augments induction of apoptosis by TNF-related apoptosis-inducing ligand against esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 118:230-242
- Kruyt FA (2008) TRAIL and cancer therapy. *Cancer Lett* 263:14-25
- Lacour S, Micheau O, Hammann A, Drouineaud V, Tschopp J, Solary E, Dimanche-Boitrel MT (2003) Chemotherapy enhances TNF-related apoptosis-inducing ligand DISC assembly in HT29 human colon cancer cells. *Oncogene* 22:1807-1816
- Lagneaux L, Gillet N, Stamatopoulos B, Delforge A, Dejenefte M, Massy M, Meuleman N, Kentos A, Martiat P, Willems L, Bron D (2007) Valproic acid induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells

- through activation of the death receptor pathway and potentiates TRAIL response. *Exp Hematol* 35:1527-1537
- Lamhamedi-Cherradi SE, Zheng S, Tisch RM, Chen YH (2003a) Critical roles of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in type 1 diabetes. *Diabetes* 52:2274-2278
- Lamhamedi-Cherradi SE, Zheng SJ, Maguschak KA, Peschon J, Chen YH (2003b) Defective thymocyte apoptosis and accelerated autoimmune diseases in TRAIL-/- mice. *Nat Immunol* 4:255-260
- Lamoureux F, Moriceau G, Picarda G, Rousseau J, Trichet V, Redini F (2010) Regulation of osteoprotegerin pro- or anti-tumoral activity by bone tumor microenvironment. *Biochim Biophys Acta* 1805:17-24
- Lawrence D, Shahrokh Z, Marsters S, Achilles K, Shih D, Mounho B, Hillan K, Totpal K, DeForge L, Schow P, Hooley J, Sherwood S, Pai R, Leung S, Khan L, Gliniak B, Bussiere J, Smith CA, Strom SS, Kelley S, Fox JA, Thomas D, Ashkenazi A (2001) Differential hepatocyte toxicity of recombinant Apo2L/TRAIL versions. *Nat Med* 7:383-385
- Lee KW, Kang NJ, Heo YS, Rogozin EA, Pugliese A, Hwang MK, Bowden GT, Bode AM, Lee HJ, Dong Z (2008) Raf and MEK protein kinases are direct molecular targets for the chemopreventive effect of quercetin, a major flavonol in red wine. *Cancer Res* 68:946-955
- Lei Y, Geng Z, Guo-Jun W, He W, Jian-Lin Y (2010) Prognostic significance of survivin expression in renal cell cancer and its correlation with radioresistance. *Mol Cell Biochem*
- Leonarduzzi G, Sottero B, Poli G (2010) Targeting tissue oxidative damage by means of cell signaling modulators: The antioxidant concept revisited. *Pharmacol Ther*
- Leopoldini M, Russo N, Chiodo S, Toscano M (2006) Iron chelation by the powerful antioxidant flavonoid quercetin. *J Agric Food Chem* 54:6343-6351
- Li F, Meng L, Xing H, Zhou J, Wang S, Huang L, Xu G, Zhu H, Lu Y, Ma D (2006) Essential role of c-Jun-NH2-terminal kinase on synergy induction of apoptosis by TRAIL plus ADM in ADM resistant MCF-7/ADM cells. *Apoptosis* 11:1239-1246
- Lichtner M, Maranon C, Vidalain PO, Azocar O, Hanau D, Lebon P, Burgard M, Rouzioux C, Vullo V, Yagita H, Rabadourdin-Combe C, Servet C, Hosmalin A (2004) HIV type 1-infected dendritic cells induce apoptotic death in infected and uninfected primary CD4 T lymphocytes. *AIDS Res Hum Retroviruses* 20:175-182
- Lim D, Jocelyn KM, Yip GW, Bay BH (2009) Silencing the Metallothionein-2A gene inhibits cell cycle progression from G1- to S-phase involving ATM and cdc25A signaling in breast cancer cells. *Cancer Lett* 276:109-117
- Lin Y, Devin A, Cook A, Keane MM, Kelliher M, Lipkowitz S, Liu ZG (2000) The death domain kinase RIP is essential for TRAIL (Apo2L)-induced activation of IkappaB kinase and c-Jun N-terminal kinase. *Mol Cell Biol* 20:6638-6645
- Liu P, Cheng H, Roberts TM, Zhao JJ (2009) Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer. *Nat Rev Drug Discov* 8:627-644
- Liu P, Mao H, Hou P (2006) Synergistic antitumor effect of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand combined with cisplatin in ovarian carcinoma cell lines in vitro and in vivo. *Int J Gynecol Cancer* 16:538-548
- Liu W, Bodle E, Chen JY, Gao M, Rosen GD, Broaddus VC (2001) Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand and chemotherapy cooperate to induce apoptosis in mesothelioma cell lines. *Am J Respir Cell Mol Biol* 25:111-118
- Liu X, Yue P, Khuri FR, Sun SY (2004) p53 upregulates death receptor 4 expression through an intronic p53 binding site. *Cancer Res* 64:5078-5083
- Locklin RM, Croucher PI, Russell RG, Edwards CM (2007) Agonists of TRAIL death receptors induce myeloma cell apoptosis that is not prevented by cells of the bone marrow microenvironment. *Leukemia* 21:805-812
- Lu W, Sun Q, Wan J, She Z, Jiang XG (2006) Cationic albumin-conjugated pegylated nanoparticles allow gene delivery into brain tumors via intravenous administration. *Cancer Res* 66:11878-11887
- Ludwig AT, Moore JM, Luo Y, Chen X, Saltsgaver NA, O'Donnell MA, Griffith TS (2004) Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand: a novel mechanism for Bacillus Calmette-Guerin-induced antitumor activity. *Cancer Res* 64:3386-3390
- Lum JJ, Bren G, McClure R, Badley AD (2005) Elimination of senescent neutrophils by TNF-related apoptosis-inducing [corrected] ligand. *J Immunol* 175:1232-1238
- MacFarlane M, Ahmad M, Srinivasula SM, Fernandes-Alnemri T, Cohen GM, Alnemri ES (1997) Identification and molecular cloning of two novel receptors for the cytotoxic ligand TRAIL. *J Biol Chem* 272:25417-25420

- MacFarlane M, Kohlhaas SL, Sutcliffe MJ, Dyer MJ, Cohen GM (2005) TRAIL receptor-selective mutants signal to apoptosis via TRAIL-R1 in primary lymphoid malignancies. *Cancer Res* 65:11265-11270
- Maduro JH, de Vries EG, Meersma GJ, Hougardy BM, van der Zee AG, de Jong S (2008) Targeting pro-apoptotic trail receptors sensitizes HeLa cervical cancer cells to irradiation-induced apoptosis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 72:543-552
- Mahalingam D, Szegezdi E, Keane M, Jong S, Samali A (2009) TRAIL receptor signalling and modulation: Are we on the right TRAIL? *Cancer Treat Rev* 35:280-288
- Mahmoud YA (2007) Modulation of protein kinase C by curcumin; inhibition and activation switched by calcium ions. *Br J Pharmacol* 150:200-208
- Manning BD, Cantley LC (2007) AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* 129:1261-1274
- Marini P, Budach W, Niyazi M, Junginger D, Stickl S, Jendrossek V, Belka C (2009) Combination of the pro-apoptotic TRAIL-receptor antibody mapatumumab with ionizing radiation strongly increases long-term tumor control under ambient and hypoxic conditions. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 75:198-202
- Marini P, Denzinger S, Schiller D, Kauder S, Welz S, Humphreys R, Daniel PT, Jendrossek V, Budach W, Belka C (2006) Combined treatment of colorectal tumours with agonistic TRAIL receptor antibodies HGS-ETR1 and HGS-ETR2 and radiotherapy: enhanced effects in vitro and dose-dependent growth delay in vivo. *Oncogene* 25:5145-5154
- Marini P, Schmid A, Jendrossek V, Faltin H, Daniel PT, Budach W, Belka C (2005) Irradiation specifically sensitises solid tumour cell lines to TRAIL mediated apoptosis. *BMC Cancer* 5:5
- Marsters SA, Sheridan JP, Pitti RM, Huang A, Skubatch M, Baldwin D, Yuan J, Gurney A, Goddard AD, Godowski P, Ashkenazi A (1997) A novel receptor for Apo2L/TRAIL contains a truncated death domain. *Curr Biol* 7:1003-1006
- Martinez-Lostao L, Garcia-Alvarez F, Basanez G, Alegre-Aguaron E, Desportes P, Larrad L, Naval J, Martinez-Lorenzo MJ, Anel A (2010) Liposome-bound APO2L/TRAIL is an effective treatment in a rabbit model of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 62:2272-2282
- Mendoza FJ, Ishdorj G, Hu X, Gibson SB (2008) Death receptor-4 (DR4) expression is regulated by transcription factor NF-kappaB in response to etoposide treatment. *Apoptosis* 13:756-770
- Merino D, Lalaoui N, Morizot A, Schneider P, Solary E, Micheau O (2006) Differential inhibition of TRAIL-mediated DR5-DISC formation by decoy receptors 1 and 2. *Mol Cell Biol* 26:7046-7055
- Merino D, Lalaoui N, Morizot A, Solary E, Micheau O (2007) TRAIL in cancer therapy: present and future challenges. *Expert Opin Ther Targets* 11:1299-1314
- Meurette O, Fontaine A, Rebillard A, Le Moigne G, Lamy T, Lagadic-Gossman D, Dimanche-Boitrel MT (2006) Cytotoxicity of TRAIL/anticancer drug combinations in human normal cells. *Ann N Y Acad Sci* 1090:209-216
- Mi QS, Ly D, Lamhamedi-Cherradi SE, Salojin KV, Zhou L, Grattan M, Meagher C, Zucker P, Chen YH, Nagle J, Taub D, Delovitch TL (2003) Blockade of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand exacerbates type 1 diabetes in NOD mice. *Diabetes* 52:1967-1975
- Miao L, Yi P, Wang Y, Wu M (2003) Etoposide upregulates Bax-enhancing tumour necrosis factor-related apoptosis inducing ligand-mediated apoptosis in the human hepatocellular carcinoma cell line QGY-7703. *Eur J Biochem* 270:2721-2731
- Micheau O, Thome M, Schneider P, Holler N, Tschoep J, Nicholson DW, Briand C, Grutter MG (2002) The long form of FLIP is an activator of caspase-8 at the Fas death-inducing signaling complex. *J Biol Chem* 277:45162-45171
- Milhas D, Cuvillier O, Therville N, Clave P, Thomsen M, Levade T, Benoist H, Segui B (2005) Caspase-10 triggers Bid cleavage and caspase cascade activation in FasL-induced apoptosis. *J Biol Chem* 280:19836-19842
- Min H, Morony S, Sarosi I, Dunstan CR, Capparelli C, Scully S, Van G, Kaufman S, Kostenuik PJ, Lacey DL, Boyle WJ, Simonet WS (2000) Osteoprotegerin reverses osteoporosis by inhibiting endosteal osteoclasts and prevents vascular calcification by blocking a process resembling osteoclastogenesis. *J Exp Med* 192:463-474
- Mira L, Fernandez MT, Santos M, Rocha R, Florencio MH, Jennings KR (2002) Interactions of flavonoids with iron and copper ions: a mechanism for their antioxidant activity. *Free Radic Res* 36:1199-1208
- Mirandola P, Sponzilli I, Gobbi G, Marmiroli S, Rinaldi L, Binazzi R, Piccari GG, Ramazzotti G, Gaboardi GC, Cocco L, Vitale M (2006) Anticancer agents sensitize osteosarcoma cells to TNF-related apoptosis-inducing ligand downmodulating IAP family proteins. *Int J Oncol* 28:127-133

- Mom CH, Verweij J, Oldenhuis CN, Gietema JA, Fox NL, Miceli R, Eskens FA, Loos WJ, de Vries EG, Sleijfer S (2009) Mapatumumab, a fully human agonistic monoclonal antibody that targets TRAIL-R1, in combination with gemcitabine and cisplatin: a phase I study. *Clin Cancer Res* 15:5584-5590
- Mongkolsapaya J, Grimes JM, Chen N, Xu XN, Stuart DI, Jones EY, Screaton GR (1999) Structure of the TRAIL-DR5 complex reveals mechanisms conferring specificity in apoptotic initiation. *Nat Struct Biol* 6:1048-1053
- Morel J, Audo R, Hahne M, Combe B (2005) Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) induces rheumatoid arthritis synovial fibroblast proliferation through mitogen-activated protein kinases and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt. *J Biol Chem* 280:15709-15718
- Moretto P, Hotte SJ (2009) Targeting apoptosis: preclinical and early clinical experience with mapatumumab, an agonist monoclonal antibody targeting TRAIL-R1. *Expert Opin Investig Drugs* 18:311-325
- Morizot A, Merino D, Lalaoui N, Jacquemin G, Granci V, Iessi E, Lanneau D, Bouyer F, Solary E, Chauffert B, Saas P, Garrido C, Micheau O (2010) Chemotherapy overcomes TRAIL-R4-mediated TRAIL resistance at the DISC level. *Cell Death Differ*
- Moscat J, Diaz-Meco MT, Wooten MW (2007) Signal integration and diversification through the p62 scaffold protein. *Trends Biochem Sci* 32:95-100
- Moulin M, Carpentier S, Levade T, Arrigo AP (2007) Potential roles of membrane fluidity and ceramide in hyperthermia and alcohol stimulation of TRAIL apoptosis. *Apoptosis* 12:1703-1720
- Na SJ, Chae SY, Lee S, Park K, Kim K, Park JH, Kwon IC, Jeong SY, Lee KC (2008) Stability and bioactivity of nanocomplex of TNF-related apoptosis-inducing ligand. *Int J Pharm* 363:149-154
- Nagane M, Cavenee WK, Shiokawa Y (2007) Synergistic cytotoxicity through the activation of multiple apoptosis pathways in human glioma cells induced by combined treatment with ionizing radiation and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *J Neurosurg* 106:407-416
- Nakao K, Hamasaki K, Ichikawa T, Arima K, Eguchi K, Ishii N (2006) Survivin downregulation by siRNA sensitizes human hepatoma cells to TRAIL-induced apoptosis. *Oncol Rep* 16:389-392
- Natoni A, MacFarlane M, Inoue S, Walewska R, Majid A, Knee D, Stover DR, Dyer MJ, Cohen GM (2007) TRAIL signals to apoptosis in chronic lymphocytic leukaemia cells primarily through TRAIL-R1 whereas cross-linked agonistic TRAIL-R2 antibodies facilitate signalling via TRAIL-R2. *Br J Haematol* 139:568-577
- Ndozangue-Touriguine O, Sebbagh M, Merino D, Micheau O, Bertoglio J, Breard J (2008) A mitochondrial block and expression of XIAP lead to resistance to TRAIL-induced apoptosis during progression to metastasis of a colon carcinoma. *Oncogene* 27:6012-6022
- Nesterov A, Nikrad M, Johnson T, Kraft AS (2004) Oncogenic Ras sensitizes normal human cells to tumor necrosis factor- α -related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis. *Cancer Res* 64:3922-3927
- Neville-Webbe HL, Cross NA, Eaton CL, Nyambo R, Evans CA, Coleman RE, Holen I (2004) Osteoprotegerin (OPG) produced by bone marrow stromal cells protects breast cancer cells from TRAIL-induced apoptosis. *Breast Cancer Res Treat* 86:269-279
- Ng CP, Bonavida B (2002) X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) blocks Apo2 ligand/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-mediated apoptosis of prostate cancer cells in the presence of mitochondrial activation: sensitization by overexpression of second mitochondria-derived activator of caspase/direct IAP-binding protein with low pl (Smac/DIABLO). *Mol Cancer Ther* 1:1051-1058
- Ng CP, Zisman A, Bonavida B (2002) Synergy is achieved by complementation with Apo2L/TRAIL and actinomycin D in Apo2L/TRAIL-mediated apoptosis of prostate cancer cells: role of XIAP in resistance. *Prostate* 53:286-299
- Nguyen DM, Yeow WS, Ziauddin MF, Baras A, Tsai W, Reddy RM, Chua A, Cole GW, Jr., Schrupp DS (2006) The essential role of the mitochondria-dependent death-signaling cascade in chemotherapy-induced potentiation of Apo2L/TRAIL cytotoxicity in cultured thoracic cancer cells: amplified caspase 8 is indispensable for combination-mediated massive cell death. *Cancer J* 12:257-273
- Nguyen V, Cudrici C, Zernetkina V, Niculescu F, Rus H, Drachenberg C, Rus V (2009) TRAIL, DR4 and DR5 are upregulated in kidneys from patients with lupus nephritis and exert proliferative and proinflammatory effects. *Clin Immunol* 132:32-42
- Nimmanapalli R, Perkins CL, Orlando M, O'Bryan E, Nguyen D, Bhalla KN (2001) Pretreatment with paclitaxel enhances apo-2 ligand/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis of prostate cancer cells by inducing death receptors 4 and 5 protein levels. *Cancer Res* 61:759-763

- Nyambo R, Cross N, Lippitt J, Holen I, Bryden G, Hamdy FC, Eaton CL (2004) Human bone marrow stromal cells protect prostate cancer cells from TRAIL-induced apoptosis. *J Bone Miner Res* 19:1712-1721
- Olsson A, Diaz T, Aguilar-Santelises M, Osterborg A, Celsing F, Jondal M, Osorio LM (2001) Sensitization to TRAIL-induced apoptosis and modulation of FLICE-inhibitory protein in B chronic lymphocytic leukemia by actinomycin D. *Leukemia* 15:1868-1877
- Opferman JT (2006) Unraveling MCL-1 degradation. *Cell Death Differ* 13:1260-1262
- Pan G, Ni J, Wei YF, Yu G, Gentz R, Dixit VM (1997a) An antagonist decoy receptor and a death domain-containing receptor for TRAIL. *Science* 277:815-818
- Pan G, O'Rourke K, Chinnaiyan AM, Gentz R, Ebner R, Ni J, Dixit VM (1997b) The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *Science* 276:111-113
- Papoff G, Hausler P, Eramo A, Pagano MG, Di Leve G, Signore A, Ruberti G (1999) Identification and characterization of a ligand-independent oligomerization domain in the extracellular region of the CD95 death receptor. *J Biol Chem* 274:38241-38250
- Pfeifer GP, Dammann R (2005) Methylation of the tumor suppressor gene RASSF1A in human tumors. *Biochemistry (Mosc)* 70:576-583
- Pim D, Tomaic V, Banks L (2009) The human papillomavirus (HPV) E6* proteins from high-risk, mucosal HPVs can direct degradation of cellular proteins in the absence of full-length E6 protein. *J Virol* 83:9863-9874
- Pitti RM, Marsters SA, Ruppert S, Donahue CJ, Moore A, Ashkenazi A (1996) Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family. *J Biol Chem* 271:12687-12690
- Plummer R, Attard G, Pacey S, Li L, Razak A, Perrett R, Barrett M, Judson I, Kaye S, Fox NL, Halpern W, Corey A, Calvert H, de Bono J (2007) Phase 1 and pharmacokinetic study of lexatumumab in patients with advanced cancers. *Clin Cancer Res* 13:6187-6194
- Praetorius-Ibba M, Wang QE, Wani G, El-Mahdy MA, Zhu Q, Qin S, Wani AA (2007) Role of Claspin in regulation of nucleotide excision repair factor DDB2. *DNA Repair (Amst)* 6:578-587
- Presta LG (2002) Engineering antibodies for therapy. *Curr Pharm Biotechnol* 3:237-256
- Pukac L, Kanakaraj P, Humphreys R, Alderson R, Bloom M, Sung C, Riccobene T, Johnson R, Fiscella M, Mahoney A, Carrell J, Boyd E, Yao XT, Zhang L, Zhong L, von Kerczek A, Shepard L, Vaughan T, Edwards B, Dobson C, Salcedo T, Albert V (2005) HGS-ETR1, a fully human TRAIL-receptor 1 monoclonal antibody, induces cell death in multiple tumour types in vitro and in vivo. *Br J Cancer* 92:1430-1441
- Rachner TD, Benad P, Rauner M, Goettsch C, Singh SK, Schoppet M, Hofbauer LC (2009) Osteoprotegerin production by breast cancer cells is suppressed by dexamethasone and confers resistance against TRAIL-induced apoptosis. *J Cell Biochem* 108:106-116
- Ravi R, Jain AJ, Schulick RD, Pham V, Prouser TS, Allen H, Mayer EG, Yu H, Pardoll DM, Ashkenazi A, Bedi A (2004) Elimination of hepatic metastases of colon cancer cells via p53-independent cross-talk between irinotecan and Apo2 ligand/TRAIL. *Cancer Res* 64:9105-9114
- Rebillard A, Tekpli X, Meurette O, Sergeant O, LeMoigne-Muller G, Vernhet L, Gorria M, Chevanne M, Christmann M, Kaina B, Counillon L, Gulbins E, Lagadic-Gossmann D, Dimanche-Boitrel MT (2007) Cisplatin-induced apoptosis involves membrane fluidification via inhibition of NHE1 in human colon cancer cells. *Cancer Res* 67:7865-7874
- Ricci MS, Jin Z, Dews M, Yu D, Thomas-Tikhonenko A, Dicker DT, El-Deiry WS (2004) Direct repression of FLIP expression by c-myc is a major determinant of TRAIL sensitivity. *Mol Cell Biol* 24:8541-8555
- Riccioni R, Pasquini L, Mariani G, Saulle E, Rossini A, Diverio D, Pelosi E, Vitale A, Chierichini A, Cedrone M, Foa R, Lo Coco F, Peschle C, Testa U (2005) TRAIL decoy receptors mediate resistance of acute myeloid leukemia cells to TRAIL. *Haematologica* 90:612-624
- Riedl SJ, Renatus M, Schwarzenbacher R, Zhou Q, Sun C, Fesik SW, Liddington RC, Salvesen GS (2001) Structural basis for the inhibition of caspase-3 by XIAP. *Cell* 104:791-800
- Rohn TA, Wagenknecht B, Roth W, Naumann U, Gulbins E, Krammer PH, Walczak H, Weller M (2001) CCNU-dependent potentiation of TRAIL/Apo2L-induced apoptosis in human glioma cells is p53-independent but may involve enhanced cytochrome c release. *Oncogene* 20:4128-4137
- Romagnoli M, Seveno C, Bataille R, Barille-Nion S (2008) [Survivin in cancerology : molecular aspects and therapeutic applications]. *Med Sci (Paris)* 24:821-827
- Rosato RR, Almenara JA, Dai Y, Grant S (2003) Simultaneous activation of the intrinsic and extrinsic pathways by histone deacetylase (HDAC) inhibitors and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) synergistically induces mitochondrial damage and apoptosis in human leukemia cells. *Mol Cancer Ther* 2:1273-1284

- Rosevear HM, Lightfoot AJ, Griffith TS (2010) Conatumumab, a fully human mAb against death receptor 5 for the treatment of cancer. *Curr Opin Investig Drugs* 11:688-698
- Rossin A, Derouet M, Abdel-Sater F, Hueber AO (2009) Palmitoylation of the TRAIL receptor DR4 confers an efficient TRAIL-induced cell death signalling. *Biochem J* 419:185-192, 182 p following 192
- Rudner J, Jendrossek V, Lauber K, Daniel PT, Wesselborg S, Belka C (2005) Type I and type II reactions in TRAIL-induced apoptosis -- results from dose-response studies. *Oncogene* 24:130-140
- Ruiz de Almodovar C, Ruiz-Ruiz C, Rodriguez A, Ortiz-Ferron G, Redondo JM, Lopez-Rivas A (2004) Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) decoy receptor TRAIL-R3 is up-regulated by p53 in breast tumor cells through a mechanism involving an intronic p53-binding site. *J Biol Chem* 279:4093-4101
- Rus V, Nguyen V, Puliaev R, Puliaeva I, Zernetkina V, Luzina I, Papadimitriou JC, Via CS (2007) T cell TRAIL promotes murine lupus by sustaining effector CD4 Th cell numbers and by inhibiting CD8 CTL activity. *J Immunol* 178:3962-3972
- Sakao K, Fujii M, Hou DX (2009) Clarification of the role of quercetin hydroxyl groups in superoxide generation and cell apoptosis by chemical modification. *Biosci Biotechnol Biochem* 73:2048-2053
- Sakko AJ, Ricciardelli C, Mayne K, Suwiwat S, LeBaron RG, Marshall VR, Tilley WD, Horsfall DJ (2003) Modulation of prostate cancer cell attachment to matrix by versican. *Cancer Res* 63:4786-4791
- Sato K, Hida S, Takayanagi H, Yokochi T, Kayagaki N, Takeda K, Yagita H, Okumura K, Tanaka N, Taniguchi T, Ogasawara K (2001) Antiviral response by natural killer cells through TRAIL gene induction by IFN-alpha/beta. *Eur J Immunol* 31:3138-3146
- Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A, Friesen C, Li F, Tomaselli KJ, Debatin KM, Krammer PH, Peter ME (1998) Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J* 17:1675-1687
- Schmaltz C, Alpdogan O, Kappel BJ, Muriglan SJ, Rotolo JA, Ongchin J, Willis LM, Greenberg AS, Eng JM, Crawford JM, Murphy GF, Yagita H, Walczak H, Peschon JJ, van den Brink MR (2002) T cells require TRAIL for optimal graft-versus-tumor activity. *Nat Med* 8:1433-1437
- Schneider P (2000) Production of recombinant TRAIL and TRAIL receptor: Fc chimeric proteins. *Methods Enzymol* 322:325-345
- Schneider P, Bodmer JL, Thome M, Hofmann K, Holler N, Tschopp J (1997a) Characterization of two receptors for TRAIL. *FEBS Lett* 416:329-334
- Schneider P, Olson D, Tardivel A, Browning B, Lugovskoy A, Gong D, Dobles M, Hertig S, Hofmann K, Van Vlijmen H, Hsu YM, Burkly LC, Tschopp J, Zheng TS (2003) Identification of a new murine tumor necrosis factor receptor locus that contains two novel murine receptors for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). *J Biol Chem* 278:5444-5454
- Schneider P, Thome M, Burns K, Bodmer JL, Hofmann K, Kataoka T, Holler N, Tschopp J (1997b) TRAIL receptors 1 (DR4) and 2 (DR5) signal FADD-dependent apoptosis and activate NF-kappaB. *Immunity* 7:831-836
- Secchiero P, Gonelli A, Carnevale E, Milani D, Pandolfi A, Zella D, Zauli G (2003) TRAIL promotes the survival and proliferation of primary human vascular endothelial cells by activating the Akt and ERK pathways. *Circulation* 107:2250-2256
- Sedger LM, Glaccum MB, Schuh JC, Kanaly ST, Williamson E, Kayagaki N, Yun T, Smolak P, Le T, Goodwin R, Gliniak B (2002) Characterization of the in vivo function of TNF-alpha-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL/Apo2L, using TRAIL/Apo2L gene-deficient mice. *Eur J Immunol* 32:2246-2254
- Sedger LM, Katewa A, Pettersen AK, Osvath SR, Farrell GC, Stewart GJ, Bendall LJ, Alexander SI (2010) Extreme lymphoproliferative disease and fatal autoimmune thrombocytopenia in FasL and TRAIL double-deficient mice. *Blood* 115:3258-3268
- Sedger LM, Shows DM, Blanton RA, Peschon JJ, Goodwin RG, Cosman D, Wiley SR (1999) IFN-gamma mediates a novel antiviral activity through dynamic modulation of TRAIL and TRAIL receptor expression. *J Immunol* 163:920-926
- Seol JW, Chaudhari AA, Lee YJ, Kang HS, Kim IS, Kim NS, Park JH, Kim TH, Seol DW, Park SY (2007) Regulation of DR-5 protein and mitochondrial transmembrane potential by gemcitabine, a possible mechanism of gemcitabine-enhanced TRAIL-induced apoptosis. *Oncol Rep* 18:523-529
- Shankar S, Chen X, Srivastava RK (2005) Effects of sequential treatments with chemotherapeutic drugs followed by TRAIL on prostate cancer in vitro and in vivo. *Prostate* 62:165-186
- Shankar S, Singh TR, Srivastava RK (2004) Ionizing radiation enhances the therapeutic potential of TRAIL in prostate cancer in vitro and in vivo: Intracellular mechanisms. *Prostate* 61:35-49
- Sheikh MS, Burns TF, Huang Y, Wu GS, Amundson S, Brooks KS, Fornace AJ, Jr., el-Deiry WS (1998) p53-dependent and -independent regulation of the death receptor KILLER/DR5 gene expression in response to genotoxic stress and tumor necrosis factor alpha. *Cancer Res* 58:1593-1598

- Shimizu S, Konishi A, Kodama T, Tsujimoto Y (2000) BH4 domain of antiapoptotic Bcl-2 family members closes voltage-dependent anion channel and inhibits apoptotic mitochondrial changes and cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:3100-3105
- Shin EC, Seong YR, Kim CH, Kim H, Ahn YS, Kim K, Kim SJ, Hong SS, Park JH (2002) Human hepatocellular carcinoma cells resist to TRAIL-induced apoptosis, and the resistance is abolished by cisplatin. *Exp Mol Med* 34:114-122
- Shin S, Sung BJ, Cho YS, Kim HJ, Ha NC, Hwang JI, Chung CW, Jung YK, Oh BH (2001) An anti-apoptotic protein human survivin is a direct inhibitor of caspase-3 and -7. *Biochemistry* 40:1117-1123
- Shipman CM, Croucher PI (2003) Osteoprotegerin is a soluble decoy receptor for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand/Apo2 ligand and can function as a paracrine survival factor for human myeloma cells. *Cancer Res* 63:912-916
- Shiraishi T, Yoshida T, Nakata S, Horinaka M, Wakada M, Mizutani Y, Miki T, Sakai T (2005) Tunicamycin enhances tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis in human prostate cancer cells. *Cancer Res* 65:6364-6370
- Shivakumar L, Minna J, Sakamaki T, Pestell R, White MA (2002) The RASSF1A tumor suppressor blocks cell cycle progression and inhibits cyclin D1 accumulation. *Mol Cell Biol* 22:4309-4318
- Siegel RM, Frederiksen JK, Zacharias DA, Chan FK, Johnson M, Lynch D, Tsien RY, Lenardo MJ (2000) Fas preassociation required for apoptosis signaling and dominant inhibition by pathogenic mutations. *Science* 288:2354-2357
- Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Luthy R, Nguyen HQ, Wooden S, Bennett L, Boone T, Shimamoto G, DeRose M, Elliott R, Colombero A, Tan HL, Trail G, Sullivan J, Davy E, Bucay N, Renshaw-Gegg L, Hughes TM, Hill D, Pattison W, Campbell P, Sander S, Van G, Tarpley J, Derby P, Lee R, Boyle WJ (1997) Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 89:309-319
- Simons MP, Nauseef WM, Griffith TS (2007) Neutrophils and TRAIL: insights into BCG immunotherapy for bladder cancer. *Immunol Res* 39:79-93
- Singh TR, Shankar S, Chen X, Asim M, Srivastava RK (2003) Synergistic interactions of chemotherapeutic drugs and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand/Apo-2 ligand on apoptosis and on regression of breast carcinoma in vivo. *Cancer Res* 63:5390-5400
- Singh TR, Shankar S, Srivastava RK (2005) HDAC inhibitors enhance the apoptosis-inducing potential of TRAIL in breast carcinoma. *Oncogene* 24:4609-4623
- Smyth MJ, Cretney E, Takeda K, Wiltout RH, Sedger LM, Kayagaki N, Yagita H, Okumura K (2001a) Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) contributes to interferon gamma-dependent natural killer cell protection from tumor metastasis. *J Exp Med* 193:661-670
- Smyth MJ, Crowe NY, Godfrey DI (2001b) NK cells and NKT cells collaborate in host protection from methylcholanthrene-induced fibrosarcoma. *Int Immunol* 13:459-463
- Smyth MJ, Thia KY, Street SE, Cretney E, Trapani JA, Taniguchi M, Kawano T, Pelikan SB, Crowe NY, Godfrey DI (2000) Differential tumor surveillance by natural killer (NK) and NKT cells. *J Exp Med* 191:661-668
- Song JH, Song DK, Herlyn M, Petruk KC, Hao C (2003a) Cisplatin down-regulation of cellular Fas-associated death domain-like interleukin-1beta-converting enzyme-like inhibitory proteins to restore tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis in human melanoma cells. *Clin Cancer Res* 9:4255-4266
- Song JJ, Lee YJ (2008) Differential cleavage of Mst1 by caspase-7/-3 is responsible for TRAIL-induced activation of the MAPK superfamily. *Cell Signal* 20:892-906
- Song K, Chen Y, Goke R, Wilmen A, Seidel C, Goke A, Hilliard B (2000) Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) is an inhibitor of autoimmune inflammation and cell cycle progression. *J Exp Med* 191:1095-1104
- Song Z, Yao X, Wu M (2003b) Direct interaction between survivin and Smac/DIABLO is essential for the anti-apoptotic activity of survivin during taxol-induced apoptosis. *J Biol Chem* 278:23130-23140
- Spierings DC, de Vries EG, Vellenga E, van den Heuvel FA, Koornstra JJ, Wesseling J, Hollema H, de Jong S (2004) Tissue distribution of the death ligand TRAIL and its receptors. *J Histochem Cytochem* 52:821-831
- Stary G, Klein I, Kohlhofer S, Koszik F, Scherzer T, Mullauer L, Quendler H, Kohrgruber N, Stingl G (2009) Plasmacytoid dendritic cells express TRAIL and induce CD4+ T-cell apoptosis in HIV-1 viremic patients. *Blood* 114:3854-3863
- Stieglmaier J, Bremer E, Kellner C, Liebig TM, ten Cate B, Peipp M, Schulze-Koops H, Pfeiffer M, Buhring HJ, Greil J, Oduncu F, Emmerich B, Fey GH, Helfrich W (2008) Selective induction of apoptosis in

- leukemic B-lymphoid cells by a CD19-specific TRAIL fusion protein. *Cancer Immunol Immunother* 57:233-246
- Sun J, Fu ZM, Fang CQ, Li JH (2007) Induction of apoptosis in osteogenic sarcoma cells by combination of tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand and chemotherapeutic agents. *Chin Med J (Engl)* 120:400-404
- Taieb J, Chaput N, Menard C, Apetoh L, Ullrich E, Bonmort M, Pequignot M, Casares N, Terme M, Flament C, Opolon P, Lecluse Y, Metivier D, Tomasello E, Vivier E, Ghiringhelli F, Martin F, Klatzmann D, Poynard T, Tursz T, Raposo G, Yagita H, Ryffel B, Kroemer G, Zitvogel L (2006) A novel dendritic cell subset involved in tumor immunosurveillance. *Nat Med* 12:214-219
- Takeda K, Smyth MJ, Cretney E, Hayakawa Y, Kayagaki N, Yagita H, Okumura K (2002) Critical role for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in immune surveillance against tumor development. *J Exp Med* 195:161-169
- Takeda K, Smyth MJ, Cretney E, Hayakawa Y, Yamaguchi N, Yagita H, Okumura K (2001) Involvement of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in NK cell-mediated and IFN-gamma-dependent suppression of subcutaneous tumor growth. *Cell Immunol* 214:194-200
- Takimoto R, El-Deiry WS (2000) Wild-type p53 transactivates the KILLER/DR5 gene through an intronic sequence-specific DNA-binding site. *Oncogene* 19:1735-1743
- Tan J, Wang B, Zhu L (2009) Regulation of survivin and Bcl-2 in HepG2 cell apoptosis induced by quercetin. *Chem Biodivers* 6:1101-1110
- Tan KO, Tan KM, Chan SL, Yee KS, Bevort M, Ang KC, Yu VC (2001) MAP-1, a novel proapoptotic protein containing a BH3-like motif that associates with Bax through its Bcl-2 homology domains. *J Biol Chem* 276:2802-2807
- Tanco S, Zhang X, Morano C, Aviles FX, Lorenzo J, Fricker LD (2010) Characterization of the substrate specificity of human carboxypeptidase A4 and implications for a role in extracellular peptide processing. *J Biol Chem* 285:18385-18396
- Tateishi K, Ohta M, Guleng B, Kanai F, Tanaka Y, Asaoka Y, Jazag A, Imamura J, Imamura T, Ijichi H, Ikenoue T, Kawakami T, Fukushima Y, Washida M, Sata M, Miyagishi M, Taira K, Yoshida H, Kawabe T, Omata M (2006) TRAIL-induced cell death cooperates with IFN-gamma activation in the graft-versus-tumor effect against colon tumors. *Int J Cancer* 118:2237-2246
- Taylor KD, Goel R, Shirazi FH, Molepo M, Popovic P, Stewart DJ, Wong PT (1995) Pressure tuning infrared spectroscopic study of cisplatin-induced structural changes in a phosphatidylserine model membrane. *Br J Cancer* 72:1400-1405
- Tecchio C, Huber V, Scapini P, Calzetti F, Margotto D, Todeschini G, Pilla L, Martinelli G, Pizzolo G, Rivoltini L, Cassatella MA (2004) IFNalpha-stimulated neutrophils and monocytes release a soluble form of TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL/Apo-2 ligand) displaying apoptotic activity on leukemic cells. *Blood* 103:3837-3844
- Teillet F, Boumendjel A, Boutonnat J, Ronot X (2008) Flavonoids as RTK inhibitors and potential anticancer agents. *Med Res Rev* 28:715-745
- Thomas LW, Lam C, Edwards SW (2010) Mcl-1; the molecular regulation of protein function. *FEBS Lett* 584:2981-2989
- Tolcher AW, Mita M, Meropol NJ, von Mehren M, Patnaik A, Padavic K, Hill M, Mays T, McCoy T, Fox NL, Halpern W, Corey A, Cohen RB (2007) Phase I pharmacokinetic and biologic correlative study of mapatumumab, a fully human monoclonal antibody with agonist activity to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor-1. *J Clin Oncol* 25:1390-1395
- Tommasi S, Dammann R, Zhang Z, Wang Y, Liu L, Tsark WM, Wilczynski SP, Li J, You M, Pfeifer GP (2005) Tumor susceptibility of Rassf1a knockout mice. *Cancer Res* 65:92-98
- Toscano F, Fajoui ZE, Gay F, Lalaoui N, Parmentier B, Chayvialle JA, Scoazec JY, Micheau O, Abello J, Saurin JC (2008) P53-mediated upregulation of DcR1 impairs oxaliplatin/TRAIL-induced synergistic anti-tumour potential in colon cancer cells. *Oncogene* 27:4161-4171
- Trauzold A, Siegmund D, Schniewind B, Sipos B, Egberts J, Zorenkov D, Emme D, Roder C, Kalthoff H, Wajant H (2006) TRAIL promotes metastasis of human pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncogene* 25:7434-7439
- Truneh A, Sharma S, Silverman C, Khandekar S, Reddy MP, Deen KC, McLaughlin MM, Srinivasula SM, Livi GP, Marshall LA, Alnemri ES, Williams WV, Doyle ML (2000) Temperature-sensitive differential affinity of TRAIL for its receptors. DR5 is the highest affinity receptor. *J Biol Chem* 275:23319-23325
- Tsai WS, Yeow WS, Chua A, Reddy RM, Nguyen DM, Schrupp DS (2006) Enhancement of Apo2L/TRAIL-mediated cytotoxicity in esophageal cancer cells by cisplatin. *Mol Cancer Ther* 5:2977-2990

- Uno T, Takeda K, Kojima Y, Yoshizawa H, Akiba H, Mittler RS, Gejyo F, Okumura K, Yagita H, Smyth MJ (2006) Eradication of established tumors in mice by a combination antibody-based therapy. *Nat Med* 12:693-698
- Vaculova A, Kaminskyy V, Jalalvand E, Surova O, Zhivotovsky B (2010) Doxorubicin and etoposide sensitize small cell lung carcinoma cells expressing caspase-8 to TRAIL. *Mol Cancer* 9:87
- van der Sloot AM, Tur V, Szegezdi E, Mullally MM, Cool RH, Samali A, Serrano L, Quax WJ (2006) Designed tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand variants initiating apoptosis exclusively via the DR5 receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:8634-8639
- Van Valen F, Fulda S, Schafer KL, Truckenbrod B, Hotfilder M, Poremba C, Debatin KM, Winkelman W (2003) Selective and nonselective toxicity of TRAIL/Apo2L combined with chemotherapy in human bone tumour cells vs. normal human cells. *Int J Cancer* 107:929-940
- Varfolomeev E, Maecker H, Sharp D, Lawrence D, Renz M, Vucic D, Ashkenazi A (2005) Molecular determinants of kinase pathway activation by Apo2 ligand/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *J Biol Chem* 280:40599-40608
- Vargas AJ, Burd R (2010) Hormesis and synergy: pathways and mechanisms of quercetin in cancer prevention and management. *Nutr Rev* 68:418-428
- Verbrugge I, de Vries E, Tait SW, Wissink EH, Walczak H, Verheij M, Borst J (2008) Ionizing radiation modulates the TRAIL death-inducing signaling complex, allowing bypass of the mitochondrial apoptosis pathway. *Oncogene* 27:574-584
- Vidalain PO, Azocar O, Lamouille B, Astier A, Rouboudin-Combe C, Servet-Delprat C (2000) Measles virus induces functional TRAIL production by human dendritic cells. *J Virol* 74:556-559
- Vidalain PO, Azocar O, Rouboudin-Combe C, Servet-Delprat C (2001) Measle virus-infected dendritic cells develop immunosuppressive and cytotoxic activities. *Immunobiology* 204:629-638
- Vilimanovich U, Bumbasirevic V (2008) TRAIL induces proliferation of human glioma cells by c-FLIPL-mediated activation of ERK1/2. *Cell Mol Life Sci* 65:814-826
- Vitovski S, Phillips JS, Sayers J, Croucher PI (2007) Investigating the interaction between osteoprotegerin and receptor activator of NF-kappaB or tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand: evidence for a pivotal role for osteoprotegerin in regulating two distinct pathways. *J Biol Chem* 282:31601-31609
- Vivo C, Liu W, Broadus VC (2003) c-Jun N-terminal kinase contributes to apoptotic synergy induced by tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand plus DNA damage in chemoresistant, p53 inactive mesothelioma cells. *J Biol Chem* 278:25461-25467
- Vogel C, Hager C, Bastians H (2007) Mechanisms of mitotic cell death induced by chemotherapy-mediated G2 checkpoint abrogation. *Cancer Res* 67:339-345
- von Haefen C, Gillissen B, Hemmati PG, Wendt J, Guner D, Mrozek A, Belka C, Dorken B, Daniel PT (2004) Multidomain Bcl-2 homolog Bax but not Bak mediates synergistic induction of apoptosis by TRAIL and 5-FU through the mitochondrial apoptosis pathway. *Oncogene* 23:8320-8332
- Vos MD, Ellis CA, Bell A, Birrer MJ, Clark GJ (2000) Ras uses the novel tumor suppressor RASSF1 as an effector to mediate apoptosis. *J Biol Chem* 275:35669-35672
- Wagner KW, Punnoose EA, Januario T, Lawrence DA, Pitti RM, Lancaster K, Lee D, von Goetz M, Yee SF, Totpal K, Huw L, Katta V, Cavet G, Hymowitz SG, Amler L, Ashkenazi A (2007) Death-receptor O-glycosylation controls tumor-cell sensitivity to the proapoptotic ligand Apo2L/TRAIL. *Nat Med* 13:1070-1077
- Walczak H, Degli-Esposti MA, Johnson RS, Smolak PJ, Waugh JY, Boiani N, Timour MS, Gerhart MJ, Schooley KA, Smith CA, Goodwin RG, Rauch CT (1997) TRAIL-R2: a novel apoptosis-mediating receptor for TRAIL. *EMBO J* 16:5386-5397
- Walczak H, Miller RE, Ariail K, Gliniak B, Griffith TS, Kubin M, Chin W, Jones J, Woodward A, Le T, Smith C, Smolak P, Goodwin RG, Rauch CT, Schuh JC, Lynch DH (1999) Tumoricidal activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vivo. *Nat Med* 5:157-163
- Walker EH, Pacold ME, Perisic O, Stephens L, Hawkins PT, Wymann MP, Williams RL (2000) Structural determinants of phosphoinositide 3-kinase inhibition by wortmannin, LY294002, quercetin, myricetin, and staurosporine. *Mol Cell* 6:909-919
- Wang J, Chun HJ, Wong W, Spencer DM, Lenardo MJ (2001) Caspase-10 is an initiator caspase in death receptor signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:13884-13888
- Wang MJ, Liu S, Liu Y, Zheng D (2007) Actinomycin D enhances TRAIL-induced caspase-dependent and -independent apoptosis in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Neurosci Res* 59:40-46
- Wang S, El-Deiry WS (2003) Requirement of p53 targets in chemosensitization of colonic carcinoma to death ligand therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:15095-15100

- Wang S, Ren W, Liu J, Lahat G, Torres K, Lopez G, Lazar AJ, Hayes-Jordan A, Liu K, Bankson J, Hazle JD, Lev D (2010) TRAIL and doxorubicin combination induces proapoptotic and antiangiogenic effects in soft tissue sarcoma in vivo. *Clin Cancer Res* 16:2591-2604
- Wang SH, Cao Z, Wolf JM, Van Antwerp M, Baker JR, Jr. (2005a) Death ligand tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand inhibits experimental autoimmune thyroiditis. *Endocrinology* 146:4721-4726
- Wang TT, Jeng J (2000) Coordinated regulation of two TRAIL-R2/KILLER/DR5 mRNA isoforms by DNA damaging agents, serum and 17beta-estradiol in human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 61:87-96
- Wang Y, Quon KC, Knee DA, Nesterov A, Kraft AS (2005b) RAS, MYC, and sensitivity to tumor necrosis factor-alpha-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis. *Cancer Res* 65:1615-1616; author reply 1616-1617
- Wassenaar TA, Quax WJ, Mark AE (2008) The conformation of the extracellular binding domain of Death Receptor 5 in the presence and absence of the activating ligand TRAIL: a molecular dynamics study. *Proteins* 70:333-343
- Wei Y, Sinha S, Levine B (2008) Dual role of JNK1-mediated phosphorylation of Bcl-2 in autophagy and apoptosis regulation. *Autophagy* 4:949-951
- Wendt J, von Haefen C, Hemmati P, Belka C, Dorken B, Daniel PT (2005) TRAIL sensitizes for ionizing irradiation-induced apoptosis through an entirely Bax-dependent mitochondrial cell death pathway. *Oncogene* 24:4052-4064
- Wiley SR, Schooley K, Smolak PJ, Din WS, Huang CP, Nicholl JK, Sutherland GR, Smith TD, Rauch C, Smith CA, et al. (1995) Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity* 3:673-682
- Willis SN, Chen L, Dewson G, Wei A, Naik E, Fletcher JI, Adams JM, Huang DC (2005) Proapoptotic Bak is sequestered by Mcl-1 and Bcl-xL, but not Bcl-2, until displaced by BH3-only proteins. *Genes Dev* 19:1294-1305
- Woods DC, Alvarez C, Johnson AL (2008) Cisplatin-mediated sensitivity to TRAIL-induced cell death in human granulosa tumor cells. *Gynecol Oncol* 108:632-640
- Wu GS, Burns TF, Zhan Y, Alnemri ES, El-Deiry WS (1999) Molecular cloning and functional analysis of the mouse homologue of the KILLER/DR5 tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) death receptor. *Cancer Res* 59:2770-2775
- Wu XX, Kakehi Y (2009) Enhancement of lexatumumab-induced apoptosis in human solid cancer cells by Cisplatin in caspase-dependent manner. *Clin Cancer Res* 15:2039-2047
- Wu XX, Kakehi Y, Mizutani Y, Nishiyama H, Kamoto T, Megumi Y, Ito N, Ogawa O (2003) Enhancement of TRAIL/Apo2L-mediated apoptosis by adriamycin through inducing DR4 and DR5 in renal cell carcinoma cells. *Int J Cancer* 104:409-417
- Xu L, Qu X, Zhang Y, Hu X, Yang X, Hou K, Teng Y, Zhang J, Sada K, Liu Y (2009) Oxaliplatin enhances TRAIL-induced apoptosis in gastric cancer cells by CBL-regulated death receptor redistribution in lipid rafts. *FEBS Lett* 583:943-948
- Yamaguchi H, Wang HG (2004) CHOP is involved in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis by enhancing DR5 expression in human carcinoma cells. *J Biol Chem* 279:45495-45502
- Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Mochizuki SI, Yano K, Fujise N, Sato Y, Goto M, Yamaguchi K, Kuriyama M, Kanno T, Murakami A, Tsuda E, Morinaga T, Higashio K (1998) Identity of osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) and osteoprotegerin (OPG): a mechanism by which OPG/OCIF inhibits osteoclastogenesis in vitro. *Endocrinology* 139:1329-1337
- Yoshida T, Shiraishi T, Horinaka M, Wakada M, Sakai T (2007) Glycosylation modulates TRAIL-R1/death receptor 4 protein: different regulations of two pro-apoptotic receptors for TRAIL by tunicamycin. *Oncol Rep* 18:1239-1242
- Yoshida T, Zhang Y, Rivera Rosado LA, Zhang B (2009) Repeated treatment with subtoxic doses of TRAIL induces resistance to apoptosis through its death receptors in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Mol Cancer Res* 7:1835-1844
- Yuan ZP, Chen LJ, Fan LY, Tang MH, Yang GL, Yang HS, Du XB, Wang GQ, Yao WX, Zhao QM, Ye B, Wang R, Diao P, Zhang W, Wu HB, Zhao X, Wei YQ (2006) Liposomal quercetin efficiently suppresses growth of solid tumors in murine models. *Clin Cancer Res* 12:3193-3199
- Yue HH, Diehl GE, Winoto A (2005) Loss of TRAIL-R does not affect thymic or intestinal tumor development in p53 and adenomatous polyposis coli mutant mice. *Cell Death Differ* 12:94-97
- Zauli G, Rimondi E, Nicolin V, Melloni E, Celeghini C, Secchiero P (2004) TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) blocks osteoclastic differentiation induced by RANKL plus M-CSF. *Blood* 104:2044-2050

- Zauli G, Rimondi E, Stea S, Baruffaldi F, Stebel M, Zerbinati C, Corallini F, Secchiero P (2008) TRAIL inhibits osteoclastic differentiation by counteracting RANKL-dependent p27Kip1 accumulation in pre-osteoclast precursors. *J Cell Physiol* 214:117-125
- Zauli G, Sancilio S, Cataldi A, Sabatini N, Bosco D, Di Pietro R (2005) PI-3K/Akt and NF-kappaB/IkappaBalpha pathways are activated in Jurkat T cells in response to TRAIL treatment. *J Cell Physiol* 202:900-911
- Zerafa N, Westwood JA, Cretney E, Mitchell S, Waring P, Iezzi M, Smyth MJ (2005) Cutting edge: TRAIL deficiency accelerates hematological malignancies. *J Immunol* 175:5586-5590
- Zhang XD, Gillespie SK, Borrow JM, Hersey P (2003a) The histone deacetylase inhibitor suberic bishydroxamate: a potential sensitizer of melanoma to TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) induced apoptosis. *Biochem Pharmacol* 66:1537-1545
- Zhang XR, Zhang LY, Devadas S, Li L, Keegan AD, Shi YF (2003b) Reciprocal expression of TRAIL and CD95L in Th1 and Th2 cells: role of apoptosis in T helper subset differentiation. *Cell Death Differ* 10:203-210
- Zhang Z, Song T, Zhang T, Gao J, Wu G, An L, Du G (2010) A novel BH3 mimetic S1 potently induces Bax/Bak-dependent apoptosis by targeting both Bcl-2 and Mcl-1. *Int J Cancer*
- Zhao J, Tenev T, Martins LM, Downward J, Lemoine NR (2000) The ubiquitin-proteasome pathway regulates survivin degradation in a cell cycle-dependent manner. *J Cell Sci* 113 Pt 23:4363-4371
- Zheng SJ, Jiang J, Shen H, Chen YH (2004) Reduced apoptosis and ameliorated listeriosis in TRAIL-null mice. *J Immunol* 173:5652-5658
- Zhou P, Levy NB, Xie H, Qian L, Lee CY, Gascoyne RD, Craig RW (2001) MCL1 transgenic mice exhibit a high incidence of B-cell lymphoma manifested as a spectrum of histologic subtypes. *Blood* 97:3902-3909
- Zinonos I, Labrinidis A, Lee M, Liapis V, Hay S, Ponomarev V, Diamond P, Findlay DM, Zannettino AC, Evdokiou A (2010) Anticancer efficacy of Apo2L/TRAIL is retained in the presence of high and biologically active concentrations of osteoprotegerin in vivo. *J Bone Miner Res*
- Zinonos I, Labrinidis A, Lee M, Liapis V, Hay S, Ponomarev V, Diamond P, Zannettino AC, Findlay DM, Evdokiou A (2009) Apomab, a fully human agonistic antibody to DR5, exhibits potent antitumor activity against primary and metastatic breast cancer. *Mol Cancer Ther* 8:2969-2980
- Zisman A, Ng CP, Pantuck AJ, Bonavida B, Belldegrun AS (2001) Actinomycin D and gemcitabine synergistically sensitize androgen-independent prostate cancer cells to Apo2L/TRAIL-mediated apoptosis. *J Immunother* 24:459-471