

UNIVERSITÉ PARIS-SUD

ÉCOLE DOCTORALE 418 :
DE CANCÉROLOGIE

Laboratoire : UMR8126

THÈSE DE DOCTORAT SUR TRAVAUX

SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

par

Benjamin VERILLAUD

PROPRIETES BIOLOGIQUES DU RECEPTEUR TLR3 DANS LES
CARCINOMES DES VOIES AERODIGESTIVES SUPERIEURES :
CONTRIBUTION A L'ONCOGENESE ET INTERET COMME CIBLE
THERAPEUTIQUE

Date de soutenance : 06/02/2015

Composition du jury :

Président du jury :	Professeur Fabrice ANDRE
Directeur de thèse :	Docteur Pierre BUSSON
Rapporteurs :	Docteur Sabine COLNOT Professeur Serge LEBECQUE
Examinateurs :	Docteur Salem CHOUAIB Professeur Philippe HERMAN

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier le Docteur Pierre Busson, qui m'a accueilli dans son équipe, conseillé, guidé, accompagné tout au long de cette thèse et de l'année de Master qui l'a précédée. Je le remercie pour sa patience, pour ses explications, et pour son aide dans toutes les étapes de ce travail. Je remercie également le Professeur Philippe Herman, qui m'a offert une place dans son service à l'Hôpital Lariboisière, et qui m'a permis de m'engager dans ce parcours de recherche auprès de Pierre.

Je remercie chaleureusement le Docteur Joëlle Wiels et le Docteur Marc Lipinski de m'avoir accueilli au sein de l'unité et soutenu au cours de la thèse.

Je remercie le Professeur Fabrice André pour l'honneur qu'il me fait en acceptant de présider le jury de thèse.

Je remercie le Docteur Sabine Colnot et le Professeur Serge Lebecque d'avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse. Je remercie également le Professeur Serge Lebecque pour ses conseils et ses suggestions lors de la réunion du comité de mi-thèse.

Je remercie le Docteur Salem Chouaib qui me fait l'honneur d'être membre du jury de thèse, et qui m'a permis d'effectuer les expériences en conditions hypoxiques dans son unité, avec l'aide précieuse du Docteur Muhammad Zaeem Noman.

Je remercie le Docteur Paule Opolon, le Docteur Michel Wassef et Olivia Bawa pour leur aide dans la réalisation et l'interprétation des études immunohistochimiques, ainsi que Sofia Vikström et Alain Omasson pour les expériences de mesure de la glycolyse. Je remercie également David Enot, Sylvère Durand, Marie Scoazec et Nazanine Modjtahedi pour leur aide dans la réalisation et l'interprétation des études métabolomiques.

Je remercie le Docteur Serge Manié, le Docteur Evelyne Segal et le Professeur Michel Arock d'avoir participé au comité de mi-thèse.

Je remercie le Docteur François Janot et toute son équipe pour leur aide au cours la thèse, ainsi que tous mes collègues à l'Hôpital Lariboisière.

Je remercie Anne-Sophie Jimenez, Aurore Gelin, et Clément Barjon qui m'ont accueilli avec tant de gentillesse à mon arrivée dans l'équipe, et qui m'ont guidé dans mes premiers pas au laboratoire. Leur aide et leur bonne humeur ont été précieuses.

Je remercie également Mélanie, Claire Gourzones et Claire Lhuillier, Anaïs, Aude, Justine, Loëtitia, François-Régis, Nikiforos, Eugénie, Sonia, Natalie, et Mathieu pour leur gentillesse et la convivialité qu'ils ont su entretenir tout au long de ces quatre années non seulement au laboratoire, mais aussi en dehors de l'Institut.

Je remercie Romain, Chloé, Charles-Henry, Muriel, Petr, Licia, Andrei, Cécile, Jihène, Anamarija, Yara, Jérémy et tous les membres de l'UMR8126 que j'ai eu l'opportunité de connaître au cours de la thèse : travailler auprès d'eux a été un vrai plaisir. Je remercie également Muriel Nicoletti et Brigitte Cyrille pour leur aide dans les différentes étapes administratives auprès de l'Ecole Doctorale.

Je remercie mes amis, mes parents, mon frère Mathieu, ma sœur Mathilde, et tout le reste de ma famille.

Chloë, merci.

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS	2
SOMMAIRE	4
LISTE DES ABREVIATIONS	6
LISTE DES FIGURES	9
RESUME	10
INTRODUCTION	
I Carcinomes des voies aérodigestives supérieures : généralités	12
I.1 Carcinomes nasopharyngés	12
I.1.a Aspects généraux, épidémiologiques et cliniques	12
I.1.b Aspects biologiques : oncogénèse virale	14
I.1.c Aspects biologiques : oncogénèse cellulaire	14
I.1.d Aspects biologiques : synthèse	23
I.2 Carcinomes épidermoïdes des VADS	24
I.2.a Aspects généraux, épidémiologiques et cliniques	24
I.2.b Aspects biologiques	26
II Le récepteur « Toll-like 3 », ou TLR3	27
II.1 Structure et liaison aux ligands	27
II.2 Distribution	29
II.3 Fonctions physiologiques	29
II.4 TLR3 et cancer	31
II.4.a Généralités	31
II.4.b TLR3, EBV et carcinomes nasopharyngés	32

II.4.c TLR3 et carcinomes épidermoïdes des VADS	34
II.4.d TLR3 et cIAP2	34
III Métabolisme des cellules cancéreuses	35
III.1 L'effet Warburg	35
III.2 Hypoxie et carcinomes des VADS	37
III.3 TLR3 et hypoxie	38

RESULTATS

Article 1 : <i>BMC Infectious Agents and Cancer</i>	39
“Toll-like receptor 3 in Epstein-Barr virus-associated nasopharyngeal carcinomas: consistent expression and cytotoxic effects of its synthetic ligand poly(A:U) combined to a Smac-mimetic”	
Article 2 : <i>Soumis - Cancer Research</i>.....	44
“Stimulation of the Toll-like receptor 3 promotes metabolic reprogramming and resistance to hypoxia in Head and Neck carcinoma cells”	

DISCUSSION

Statut de TLR3 dans les carcinomes des VADS	48
Etudes envisagées concernant de possibles ligands endogènes de TLR3	49
TLR3 et résistance à la radiothérapie	50
Agonistes de TLR3 : action pro ou anti-tumorale ?	51
Un pont entre les études biologiques des CNP et des CE des VADS ?	52
BIBLIOGRAPHIE	53
ANNEXES	62

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN : acide désoxyribonucléique

Apobec : apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like

ARID : AT-rich interaction domain

ARN : acide ribonucléique

ATP : Adenoside triphosphate

BHRF1 : BamH1-A Reading Frame-1

BIRC3 : baculoviral IAP repeat containing 3

c-IAP2 : cellular Inhibitor of Apoptosis Protein 2

c-Myc : myelocytomatosis cellular oncogene

CA IX : Carbonic anhydrase IX

CASP8 : Caspase 8, Apoptosis-Related Cysteine Peptidase

CDKN2A : cyclin-dependant kinase inhibitor 2A

CE : carcinomes épidermoïdes

CIMP : CpG island methylator

CNP : carcinomes nasopharyngés

DAMP : Damage-Associated Molecular Pattern

DLL4 : Delta like ligand 4

DNMT : DNA methyltransferase

EBER : Epstein-Barr encoded RNA

EBNA1 : Epstein-Barr nuclear antigen 1

EBV : virus d'Epstein-Barr

EGF : Epidermal Growth Factor

EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor

FADD : Fas-Associated protein with Death Domain

FAT1 : FAT atypical cadherin 1

FBXW7 : F-box/WD repeat-containing protein 7

HHV4 : Human Herpes Virus 4

HIF-1 α : Hypoxia Inducible Factor-1 α

HPV : human papilloma virus

HRAS : Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog

HRE : Hypoxia Response Element

IRF : interferon regulatory transcription factor

JNK/AP1 : c-Jun N-terminal kinase /activator protein-1

LIGHT : homologous to lymphotoxin, exhibits inducible expression, and competes with HSV glycoprotein D for herpes virus entry mediator, a receptor expressed by T lymphocytes

LMP : latent membran protein

LRR : Leucine-Rich Repeat

LT β R : lymphotoxin- β receptor

MDA5 : melanoma differentiation-associated gene 5

MDM2 : Mouse double minute 2 homolog

miR-BARTs : micro-RNAs BamH1-A Rightward Transcript

NF-kB : nuclear factor-kappa B

Notch3 : Neurogenic locus notch homolog protein 3

p19/ARF Alternate Reading Frame of the CDKN2A/ARF locus

PAMP : Pathogen associated molecular pattern

PHD2 : Propyl Hydroxylase Domain Protein 2

PI3-kinase : phosphoinositide 3-kinase

PKM : pyruvate kinase isoenzyme M2

PKR : protein kinase R

poly(A :U) : acide polyadénylique-polyuridylique

poly(I :C) : acide polyinosidique-polycytidylique

PUMA : p53 upregulated modulator of apoptosis

RASSF1A : Ras Association Domain Family 1A

RIG-I : retinoic acid-inducible gene 1

RIP1 : Receptor-interacting protein 1

ROCK : Rho-associated protein kinase

STAT3 : Signal transducer and activator of transcription 3

TEP-FDG/TDM : tomographie par émission de positons au fluorodéoxyglucose marqué au 18F couplée à une tomodensitométrie

TIR : Toll/IL-1 receptor

TLR3 : Toll-like Receptor 3

TNFR : tumor necrosis factor receptor

TRADD : Tumor necrosis factor receptor type 1-associated DEATH domain protein

TRAF : TNF receptor associated factor

TRIF : TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β

UBR5 : ubiquitin protein ligase E3 component n-recognin 5

UNC93B1 : Unc-93 homolog B1

USP7 : Ubiquitin-specific-processing protease 7

VADS : voies aérodigestives supérieures

VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor

VHL : Von Hippel-Lindau

ZNF 423 : zinc finger protein 423

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Incidence du NPC au niveau mondial

Figure 2. Schéma d'EBV dans sa forme circulaire libre

Figure 3. Structure en « trèfle » d'EBER1

Figure 4. Incidence des carcinomes épidermoïdes de la cavité buccale/oropharynx au niveau mondial

Figure 5. Principales voies altérées dans les carcinomes épidermoïdes des VADS et thérapies ciblées correspondantes

Figure 6. Activation de TLR3 lors de sa liaison au ligand

Figure 7. Ligands de TLR3 et des autres récepteurs d'ARN double-brin

Figure 8. Effet protumoral du blocage de la PKR par les EBERs dans un modèle d'infection maligne liée à EBV

Figure 9. Signalisation proapoptotique médiée par TLR3

Figure 10. Rendement énergétique selon le type de glycolyse

Figure 11. Représentation possible des échanges entre zones de nécrose et front d'invasion dans les CE des VADS

RESUME

Contexte. Les carcinomes des voies aérodigestives supérieures (VADS) arrivent en 6ème position parmi les cancers les plus fréquents au niveau mondial. La fonction du récepteur TLR3 dans les cellules de carcinomes des VADS est encore très mal comprise.

Objectifs et méthodes. 1) Déterminer le niveau d'expression du récepteur TLR3 dans les lignées et les biopsies de carcinomes des VADS par western blot et par immunohistochimie. 2) Etudier le rôle de TLR3 dans la croissance tumorale de ces tumeurs, en utilisant notamment des lignées invalidées de façon conditionnelle pour TLR3. 3) Evaluer *in vitro* les effets cytotoxiques de ligands artificiels de TLR3 soit seuls, soit utilisés en combinaisons avec un inhibiteur d'IAP (inhibitor of apoptosis protein).

Résultats. La protéine TLR3 est détectée à un niveau élevé en western blot dans les lignées de carcinomes des VADS étudiées, comparativement à un panel d'autres tumeurs épithéliales humaines. TLR3 est également constamment détecté en immunohistochimie dans les biopsies. TLR3 semble jouer un rôle dans la croissance tumorale des carcinomes des VADS : dans certaines conditions de culture (culture en hypoxie ou en milieu pauvre en SVF et en nutriments), la stimulation de TLR3 par un ligand exogène, le poly(A:U), favorise la croissance des cellules tumorales. Nous avons étudié l'effet de la stimulation de TLR3 sur le métabolisme glucidique dans ces mêmes cellules en utilisant un appareil de type Seahorse® qui mesure la consommation d'oxygène et la production de protons à partir de cellules cultivées en microplaques. Ces expériences montrent que la stimulation de TLR3 fait augmenter l'activité des voies du métabolisme cellulaire anaérobie (glycolyse extra-mitochondriale). Une étude métabolomique a mis en évidence des différences significatives dans le profil métabolique des cellules tumorales stimulées par le poly(A:U) comparativement aux cellules non traitées. Par ailleurs, nous avons montré que la stimulation de TLR3 permettait de détecter le facteur de transcription HIF1 en Western blot, même en conditions normoxiques. Sachant que des ARN libérés par des cellules en état de nécrose peuvent stimuler TLR3, il est tentant de penser que ce récepteur pourrait favoriser la survie des cellules malignes en zone hypoxique au voisinage de cellules nécrotiques. Néanmoins, l'expression de TLR3 représente aussi un facteur de vulnérabilité pour les cellules de carcinomes des VADS : en effet les ligands artificiels de TLR3 utilisés en combinaison avec un inhibiteur d'IAP (Inhibitor of Apoptosis Protein) produisent des effets cytotoxiques sur les lignées de carcinomes des VADS étudiées.

INTRODUCTION

INTRODUCTION

I Carcinomes des voies aérodigestives supérieures : généralités

CNP et carcinomes épidermoïdes : des entités distinctes sur bien des points

Dans le champ de la cancérologie des voies aérodigestives supérieures, carcinomes nasopharyngés et carcinomes épidermoïdes ont toujours été considérés comme des entités très distinctes. Cette distinction tient d'abord à leurs particularités épidémiologiques : le carcinome nasopharyngé indifférencié est exceptionnel chez les caucasiens, et touche avant tout les populations d'Asie du sud-est, d'Afrique du nord, et de certaines régions d'Afrique tropicale ; les carcinomes épidermoïdes, classiquement liés à l'alcool et au tabac, peuvent toucher toutes les ethnies, tout en étant plus fréquents dans les zones où les habitudes culturelles rendent la consommation d'alcool et de tabac plus élevée. Par ailleurs, CNP et carcinomes épidermoïdes n'ont pas le même profil d'évolution clinique et de réponse aux agents antitumoraux : schématiquement, les CNP sont des tumeurs indifférenciées à fort potentiel métastatique et relativement sensibles à la chimiothérapie et aux radiations ionisantes ; le pronostic des carcinomes épidermoïdes est le plus souvent lié au contrôle local, et la résistance aux radio-chimiothérapies est fréquente. Pour toutes ces raisons, CNP et carcinomes épidermoïdes ont presque toujours été étudiés séparément. L'une des originalités de ce travail est d'établir un lien biologique, avec des répercussions cliniques potentielles, entre ces deux types de tumeurs.

I.1 Carcinomes nasopharyngés

I.1.a Aspects généraux, épidémiologiques et cliniques

Histologie

Les carcinomes nasopharyngés se développent dans le nasopharynx, c'est-à-dire la partie haute du pharynx, qui se projette en arrière des fosses nasales. L'OMS a proposé en 2005 une classification des carcinomes nasopharyngés qui distingue 3 sous-types : CNP de type kératinisant, CNP de type non kératinisant, et CNP de type basaloïde, le dernier sous-type restant exceptionnel (Chan, Pilch et al. 2005). Cette classification fait suite à des classifications plus anciennes qui intégraient déjà le caractère kératinisant de la tumeur, mais également son degré de différenciation (Shanmugaratnam 1991) : on parlait ainsi fréquemment d'UCNT, « Undifferentiated Carcinoma of Nasopharyngeal Type ». Les CNP de type kératinisant sont peu fréquents à l'échelle mondiale : liés à l'alcool et au tabac, ils se rapprochent des carcinomes épidermoïdes des VADS, et concernent presque uniquement les rares patients originaires de pays occidentaux ; l'association à EBV est alors possible mais pas systématique, hormis pour les exceptionnels cas survenant en zone d'endémie (Nicholls,

Agathanggelou et al. 1997). Dans tous les autres cas, les CNP sont liés au virus d'Epstein-Barr, sans rôle causal de l'alcool ni du tabac.

Epidémiologie

L'une des principales caractéristiques des CNP est leur répartition géographique particulière. Comme le montre la figure 1, l'incidence des CNP au niveau mondial est très inégale (Curado MP 2007) : les incidences les plus élevées (de l'ordre de 10 à 30 nouveaux cas pour 100 000 habitants et par an) sont retrouvées en Chine du Sud, dans la région de Canton, et à Hong-Kong. Il existe des zones de risque intermédiaire (4 à 10/100 000 habitants/an), notamment en Afrique du Nord, dans de nombreux pays d'Asie du Sud-Est, certains pays d'Afrique tropicale, et les zones polaires arctiques du Groenland, du Canada et d'Alaska. En revanche, il s'agit d'une tumeur rare (<1/100 000 habitants/an) chez les populations caucasiennes des pays occidentaux et d'Amérique, même si l'arrivée de migrants originaires des zones d'endémie a contribué à la rendre moins exceptionnelle dans des pays comme la France.

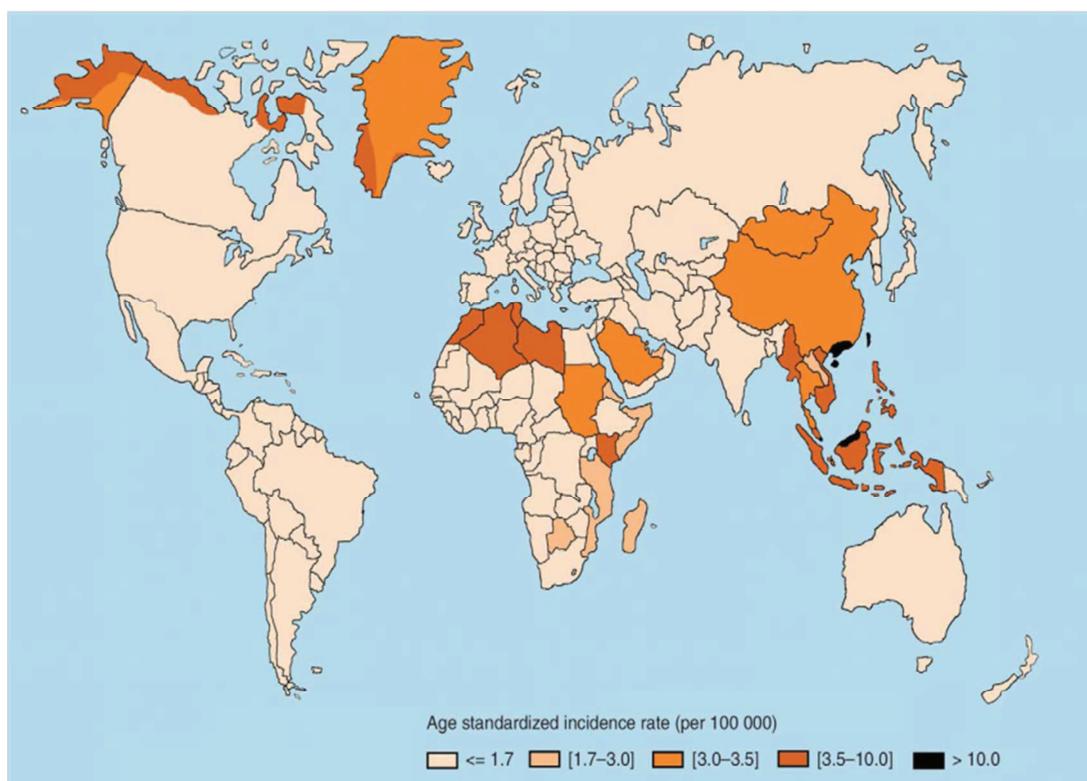


Figure 1. Incidence du CNP au niveau mondial (M. Corbex, Médecine et Sciences 2004)

Cette répartition géographique s'explique probablement par l'existence de susceptibilités génétiques, mais également par des facteurs environnementaux, notamment alimentaires (Jeannel, Bouvier et al. 1999). Il a ainsi été montré que certains modes de conservation des aliments, comme le

fumage des poissons en Chine du sud, ou la conservation dans la graisse de mouton en Afrique du Nord, contribuaient à l'apparition de carcinogènes alimentaires en cause dans le développement des CNP. Les changements des modes de vie liés au développement économique dans les années 1950 dans des zones comme Hong-Kong, Taiwan et Singapour pourraient d'ailleurs constituer un élément d'explication à la baisse de l'incidence des CNP observée depuis la fin des années 1980 dans ces régions : on estime en effet qu'un délai d'une trentaine d'année est nécessaire avant de mesurer les effets de l'éviction d'un facteur de risque environnemental (Chang and Adami 2006).

Aspects cliniques

Dans la mesure où les CNP se développent dans une zone anatomique d'accès peu aisé (il faut en effet pratiquer un examen nasofibroscopique pour visualiser le nasopharynx), et où les symptômes initiaux sont soit peu spécifiques (obstruction nasale, rhinorrhée, épistaxis ou saignement de nez), soit complètement absents, il est rare que la tumeur soit dépistée à un stade précoce. De fait, on estime que plus de la moitié des cas sont découverts à un stade d'envahissement ganglionnaire ou de métastase à distance (Skinner, Van Hasselt et al. 1991; Prasad and Pua 2000). Le diagnostic est affirmé par l'examen anatomopathologique d'une biopsie, puis un bilan d'extension est pratiqué, avec en particulier une imagerie métabolique du corps entier par tomographie par émission de positons au fluorodéoxyglucose marqué au 18F couplée à une tomodensitométrie (TEP-FDG/TDM) (Ng, Chan et al. 2009). Le traitement curatif repose sur la radiothérapie, le plus souvent associée à une chimiothérapie à base de sels de platine (Al-Sarraf, LeBlanc et al. 1998). Les taux de contrôle locaux sont bons, notamment avec les techniques d'irradiations récentes, de type IMRT (Intensity-modulated radiation therapy) ou radiothérapie conformationnelle : des taux de contrôle local supérieurs à 90% ont ainsi été rapportés (Kam, Teo et al. 2004). Néanmoins, l'évolution de la maladie est marquée dans bon nombre de cas par la survenue de récidives locales et surtout de métastases à distance (Lee, Poon et al. 1992).

I.1.b Aspects biologiques : oncogenèse virale

EBV comme facteur étiologique des CNP

Lorsqu'on parle de l'étiologie des CNP, il est encore fréquent de rencontrer deux attitudes opposées également erronées. L'une qui met l'accent presque uniquement sur l'activité oncogénique du virus d'Epstein-Barr, l'autre qui tend à nier complètement la contribution d'EBV à l'oncogenèse des CNP. Pour dissiper ces confusions, il est utile de préciser que les CNP sont une maladie d'étiologie multifactorielle dont l'une des composantes est l'infection par EBV. Les principaux arguments en faveur du rôle étiologique d'EBV sont contraignants même s'ils sont indirects: 1) constance de l'association entre l'infection latente par EBV et les deux principaux types histologiques de CNP (non-kératinisants indifférenciés ou différenciés) ; 2) présence régulière sinon constante dans

les cellules malignes de produits viraux – ARN non-traduits et protéines – ayant une activité oncogénique prouvée dans un large éventail de systèmes expérimentaux ; 3) présence sélective dans les isolats viraux intra-tumoraux de polymorphismes conférant aux protéines virales un caractère furtif vis-à-vis du système immunitaire de l'hôte ; 4) précession de modifications dans le profil des anticorps anti-EBV circulants précédents la mise en place d'une tumeur visible (Edwards, Sitki-Green et al. 2004), (Yu, Hsu et al. 2011). Il n'en reste pas moins que le développement des CNP requiert d'autres facteurs étiologiques, indépendants du virus, notamment des facteurs de prédisposition génétique et des facteurs environnementaux, particulièrement alimentaires. Ceux-ci sont aussi déterminants sinon plus déterminants que le facteur viral.

La constance de l'association avec le virus d'Epstein-Barr (EBV) indépendamment de l'origine des patients a été démontrée dès les années 70 (Andersson-Anvret, Forsby et al. 1977). Cette règle ne souffre que de très rares exceptions. Il y a tout d'abord une petite frange de CNP de type kératinisant qui sont EBV-négatifs dans les pays occidentaux et qui se rencontrent chez des patients sujets à une intoxication alcooloo-tabagique. En revanche, en zone d'endémie, par exemple en Chine du sud, les CNP kératinisants qui sont très minoritaires sont liés à EBV et indépendants de l'intoxication alcooloo-tabagique (Nicholls, Agathanggelou et al. 1997). Une nouvelle exception concernant l'association EBV/CNP est en train d'apparaître. Il s'agit de cas de CNP associés à un virus HPV (human papilloma virus). Ces cas ont été rapportés surtout aux Etats-Unis et en Angleterre, chez des sujets d'origine européenne sans intoxication alcooloo-tabagique. Le type histologique est variable : non kératinisants indifférenciés ou différenciés, kératinisants (Lewis and Chernock 2014), (Robinson, Suh et al. 2013). Trois caractéristiques biologiques essentielles de ces CNP HPV-positifs sont l'absence du génome d'EBV dans les cellules tumorales, la présence d'un fragment du génome HPV le noyau des cellules tumorales et une forte expression de la p16 (protéine codée par CDKN2A) détectée dans les cellules tumorales. Dans certains cas, il s'agirait en réalité de l'extension par contiguïté de lésion méconnues ayant pris naissance dans l'oropharynx mais on ne peut exclure l'existence d'authentiques CNP ayant réellement débuté dans la cavité nasopharyngée. Ces cas de CNP HPV-positifs ne seront plus envisagés dans la suite de ce mémoire de thèse.

Virus d'Epstein-Barr : notions générales sur les relations virus-cellules et virus-organisme

EBV (ou HHV4, Human Herpes Virus 4) est un membre de la famille des Herpesviridae et plus précisément de la sous-famille des gamma-Herpesvirinae, du genre lymphocryptovirus. Il s'agit d'un virus à ADN double-brin, enveloppé. Des virus homologues existent dans la plupart des espèces de primates. Comme pour tous les virus Herpès, tout sujet faisant une primo-infection reste infecté la vie durant, fort heureusement le plus souvent en tant que porteur sain. Cette persistance repose à la fois sur une capacité d'infection latente dans une variété de cellules qui constitue le gîte viral et sur des réactivations périodiques avec production de particules virales. Dans le cas du virus Herpes simplex de

type 1, le gîte viral est constitué par les neurones du nerf trijumeau. Comme leur nom l'indique, les lymphocryptovirus ont pour gîte des sous-populations lymphocytaires disséminés dans le sang, la moelle osseuse et les organes lymphoïdes primaires ou secondaires. L'infection latente par EBV s'opère principalement dans les lymphocytes B mémoires. Lorsque ces lymphocytes se différencient en plasmocytes, il y a rupture de la latence et production de particules virales, avec *ipso facto*, mort de la cellule productrice (c'est pourquoi on parle d'infection lytique et productive). Les particules d'EBV libérées par les plasmocytes peuvent à leur tour infecter des lymphocytes B ou des cellules épithéliales. A l'état physiologique, les cellules épithéliales n'offrent pas un contexte cellulaire favorable à la latence. Une fois infectée, elles entrent directement en cycle lytique. Chez le porteur sain d'EBV, les amygdales semblent constituer le principal site anatomique pour la production de particules virales à partir des cellules lymphocytaires ou épithéliales. Avec deux conséquences : la réinfection de nouvelles cellules B qui peuvent à leur tour entrer en latence et la libération de particules virales dans la salive qui est le vecteur des contaminations interindividuelles (Hadinoto, Shapiro et al. 2009). Il faut noter dès maintenant que les cellules de CNP ainsi que les cellules des carcinomes gastriques associés à EBV ont cette propriété apparemment unique de pouvoir « s'accorder » d'une infection latente par EBV (Tsang, Yip et al. 2012). Quelque soit la région du monde considéré, plus de 95% des individus adultes de l'espèce humaine sont infectés par EBV. (Murray and Young 2000). La primo-infection se produit le plus souvent dans l'enfance de façon inapparente. Dans les milieux socio-économiques élevés, ayant une hygiène stricte, la primo-infection se produit fréquemment chez l'adolescent ou le jeune adulte. Elle peut alors s'accompagner d'un ensemble de manifestations pathologiques qui constituent la mononucléose infectieuse. A l'instar d'autres virus Herpès, tout se passe comme si, dans la maturation du système immunitaire, il y avait avant l'adolescence un âge optimal pour être infecté par EBV (Fafi-Kremer, Morand et al. 2005). L'immense majorité des sujets infectés par EBV restent des porteurs sains d'un bout à l'autre de leurs vies. Cependant cet état de porteur sain résulte d'un équilibre dynamique entre les poussées sporadiques de réactivation virale et la pression du système immunitaire. On estime que chez le porteur un lymphocyte T mémoire circulant sur 10 000 est spécifique d'antigènes d'EBV. Il n'est donc pas étonnant que les sujets soumis à une immunodépression, par exemple les sujets traités par immunosuppresseurs pour une greffe d'organe soit exposé à un risque élevé de lymphomes associés à EBV. Même chez le sujet sans déficit immunitaire patent, certains facteurs de risque favorisent la survenue d'une infection maligne associée à EBV. Ainsi le lymphome de Burkitt endémique africain associé à EBV est favorisé par la conjonction d'une primo-infection massive par EBV et du paludisme holoendémique. Concernant les CNP, nous avons mentionné la contribution des facteurs génétiques et alimentaires. Pour d'autres affections malignes associées à EBV, les facteurs de risque sont moins clairs (maladie de Hodgkin, carcinomes gastriques).

Virus d'Epstein-Barr : génome et produits viraux en rapport avec le CNP

Le génome viral est un ADN double brin d'environ 170 kb. Il comporte environ 80 phases de lecture ouvertes. Dans les particules virales, le génome est sous forme linéaire. En revanche il est sous forme circulaire libre, ou épisomale, dans les cellules infectées de façon latente et notamment dans les cellules malignes de CNP (figure 2). Le nombre de copies du génome peut varier de une à plusieurs dizaines.

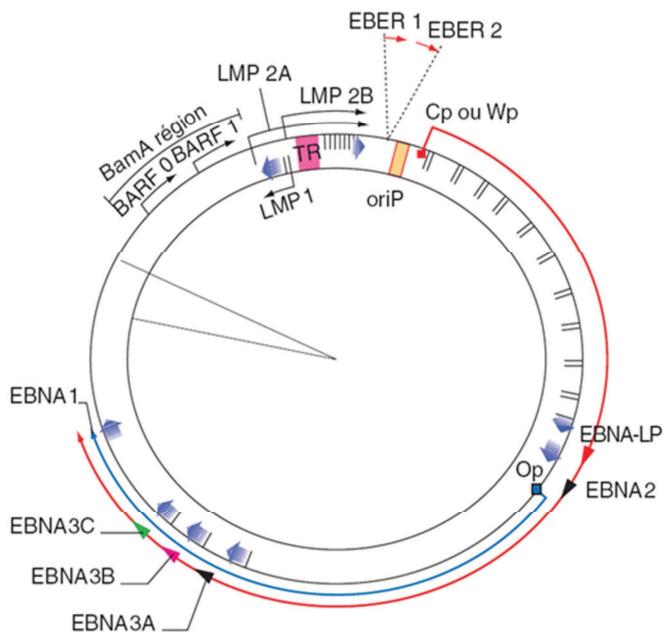


Figure 2. Schéma d'EBV dans sa forme circulaire libre. EBNA : Epstein-Barr virus nuclear antigen ; LMP : latent membran protein ; EBER : Epstein-Barr encoded RNA. (D'après Murray et al. Expert Reviews in Molecular Medicine 2001)

Bien que la question était peu étudiée, l'existence de copies du génome viral intégrées à l'ADN chromosomique co-existant avec les épisomes a été rapportée (Kripalani-Joshi and Law 1994). On ignore s'il existe une quelconque spécificité d'intégration et si l'intégration peut avoir des effets mutagènes.

Dans les cellules malignes de CNP, le génome d'EBV code un nombre limité de d'ARN non traduits et de protéines virales. On a maintenant la preuve de l'activité oncogénique de la plupart de ces produits viraux. Au cours des dernières années, on a pris conscience du rôle déterminant des ARN viraux non-traduits. Ceux-ci sont de deux types : les EBERs (Esptein-Barr encoded RNAs) et les microARN viraux, en particulier les miR-BARTs (micro-RNAs BamH1-A Rightward Transcript).

Les EBERs 1 et 2 sont de petits ARN partiellement double-brin d'environ 170 nucléotides, qui adoptent une forme tridimensionnelle particulière, avec une structure en « trèfle » (figure 3).

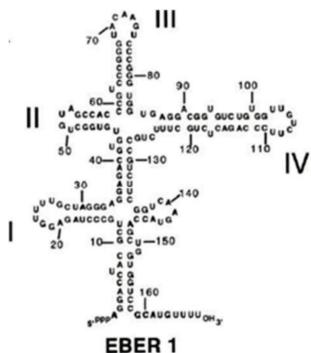


Figure 3. Structure en « trèfle » d'EBER1. Fok V et al. *RNA* 2006;12:872-882

Ils sont détectés dans 100% des CNP et ils sont très abondamment transcrits, leur nombre étant de l'ordre de 10^6 copies par cellule (Wu, Mann et al. 1991). Ils sont pour la plupart localisés dans le noyau mais une fraction d'entre eux peut passer dans le cytoplasme, voire dans le milieu extracellulaire, avec alors la possibilité d'exercer une fonction de signalisation (Samanta, Iwakiri et al. 2006; Iwakiri, Zhou et al. 2009). Les EBERs peuvent se fixer sur plusieurs types de récepteurs des ARN double-brin, comme PKR (protein kinase RNA-dependent), RIG-I (Retinoic acid-Inducible Gene I), ou TLR3 (Toll-like Receptor 3), avec des effets variés pro ou anti-tumoraux. L'activation de la PKR fait partie de la réponse cellulaire aux interférons et aboutit normalement à un arrêt de la synthèse protéique. La liaison EBERs/PKR bloque sa phosphorylation et neutralise au moins une partie de la réponse aux interférons (Nanbo, Inoue et al. 2002). Du point de vue diagnostique, les EBERs ont l'avantage d'être très stables en raison de leur association à des protéines nucléaires ; ils représentent donc une bonne cible pour l'hybridation in situ.

Comme les autres virus Herpès, EBV produit des microARN notamment en situation d'infection latente (Pfeffer, Zavolan et al. 2004). Les microARN d'EBV sont transcrits à partir de 2 segments du génome d'EBV, qui porte les noms de BHRF1 et BARF0 dans la nomenclature classique du génome viral. Les microARN de BHRF1 sont absents ou très peu abondants dans les cellules de CNP. En revanche, ceux du segment BARF0 appelés miR-BARTs (pour micro-RNAs BamH1-A Rightward Transcripts) sont extrêmement abondants. On estime que dans certains spécimens de CNP, ils représentent jusqu'à 50% des microARN contenus dans les cellules malignes (N. Raab-Traub, communication personnelle). Comme tous les microARN, les miR-BARTs sont des ARN de 20 à 25 nucléotides capables d'interagir avec des ARN messagers cibles dont ils déclenchent la dégradation ou dont ils ralentissent la transcription. Ils sont d'une grande diversité puisque on en dénombre actuellement plus de 40 (Cosmopoulos, Pegtel et al. 2009). Ils dérivent d'une famille de transcrits

primaires de la région BARF0 eux-mêmes très abondants et très divers, en raison de la multiplicité des sites d'initiation de la transcription et de la complexité des épissages alternatifs. La région BARF0 est de loin la plus transcrète du génome d'EBV dans la grande majorité des spécimens de CNP. Les fonctions des miR-BARTs sont encore loin d'être complètement élucidées. A l'heure actuelle, au moins trois catégories d'ARN messagers ont été identifiés comme cibles des miR-BARTs : des ARNm cellulaires codant des protéines pro-apoptotiques notamment PUMA, des ARNm viraux codant des protéines du cycle lytique et des ARNm viraux codant des oncoprotéines virales notamment LMP1 (Lo, To et al. 2007; Barth, Pfuhl et al. 2008; Choy, Siu et al. 2008). L'effet des miR BARTs sur les protéines cellulaires pro-apoptotiques ou sur les protéines du cycle lytique paraît cohérent avec l'activité oncogénique d'EBV. Les effets sur l'expression de la LMP1 peuvent paraître paradoxaux mais il faut avoir présent à l'esprit que la marge entre les effets oncogéniques et les effets toxiques de la LMP1 est très étroite. En modulant son expression, les miR BARTs peuvent contribuer significativement au maintien de l'état transformé. A noter, les miR-BARTs peuvent être excrétés dans le milieu extracellulaire en association à divers transporteurs notamment des exosomes tumoraux. Ils sont détectés de façon assez spécifique dans le plasma des patients porteurs de CNP (Gourzones, Gelin et al. 2010; Gourzones, Ferrand et al. 2013).

EBNA1 (Epstein-Barr nuclear antigen 1) est la protéine virale dont l'expression est la plus constante dans les CNP. Comme son nom l'indique, elle est entièrement localisée dans le noyau. Elle a des fonctions oncogéniques à la fois directes et indirectes. En effet, EBNA1 joue un rôle irremplaçable pour la conservation du génome viral dans les cellules malignes car à chaque mitose EBNA1 est nécessaire à la réplication des épisomes viraux et à leur ségrégation équilibrée dans les cellules filles. A ce titre, EBNA1 est indirectement oncogénique. A cela s'ajoute une activité de signalisation intra-nucléaire qui est probablement directement oncogénique. En se liant à la protéine USP7 (ubiquitin specific protease 7) EBNA1 entraîne des modifications de la structure nucléaire, notamment une disparition des corps PML qui ont globalement un effet antagoniste de la croissance cellulaire et du phénotype transformé (Frappier 2012).

La LMP1 (latent membrane protein 1) est une protéine intégrale de membrane comportant 6 segments transmembranaires. Les extrémités N- et C-terminales sont intra-cytoplasmiques. Au cours de son cycle métabolique, elle circule dans le réseau membranaire interne et transitoirement dans la membrane plasmique. La LMP1 est exprimée de façon très hétérogène dans les cellules de CNP avec une abondance très variable suivant les tumeurs. Avec les méthodes d'immunohistologie utilisées en routine, suivant la plupart des auteurs, elle n'est visible que dans 40% des cas environ. Si l'on emploie des méthodes très sensibles (« tyramine enhancement »), elle devient détectable dans presque tous les cas de CNP (Dietz, Logothetis et al. 2004). La LMP1 possède un grand domaine c-terminal intra-cytoplasmique qui peut recruter de nombreux adaptateurs de signalisation de la famille des récepteurs de type TNF-R. Ces adaptateurs sont TRAF3, TRAF2 et TRADD. Dans les systèmes expérimentaux

in vitro, les effets de la LMP1 sont extrêmement pléomorphes et variables en fonction de la nature de l'hôte cellulaire. Elle peut activer de nombreuses voies de signalisation dont les voies NF-κB, JNK/AP1 et PI3-kinase. Au niveau de la cellule entière, la LMP1 peut augmenter le potentiel de prolifération et de clonogénérité, favoriser la transition épithélio-mésenchymateuse, induire certains récepteurs aux facteurs de croissance comme l'EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) et de nombreux facteurs de transcription, dont HIF-1 α (Hypoxia Inducible Factor-1 α) (Hu, Chen et al. 1993; Miller, Earp et al. 1995; Kondo, Seo et al. 2006; Horikawa, Yang et al. 2007). Faute d'un système expérimental permettant d'invalider l'expression de la LMP1 dans une cellule de CNP qui l'exprimerait naturellement, on ne sait pas bien lesquels de ces effets sont prépondérants pour le phénotype transformé des cellules de CNP.

La LMP2 est également une protéine intégrale de membrane existant sous deux isoformes A et B. Chacune des deux isoformes a douze segments transmembranaires avec des extrémités N et C-terminales intra-cytoplasmiques. L'extrémité N-terminale est plus courte pour la LMP2B. Pendant longtemps l'expression de la LMP2 dans les CNP n'a été possible qu'au niveau transcriptionnel par RT-PCR. L'obtention d'anticorps monoclonaux performants par l'équipe de Musheng Zeng à Canton a permis de détecter l'isoforme A dans environ 55% des biopsies (Kong, Hu et al. 2010). Celle-ci est plus abondante au niveau du front d'invasion des tumeurs. L'une des principales voies de signalisation activées par la LMP2A est la voie PI3kinase/Akt (ibid.). Comme la LMP1, la LMP2 favorise la transition mésenchymo-épithéliale et l'établissement d'un phénotype de cellules souches tumorales ou cellules initiatrices de tumeur (ibid.).

Une autre protéine relativement abondante dans les CNP est appelée BARF1 (Bam H1 Reading Frame 1). Elle présente des propriétés transformantes dans certains systèmes expérimentaux et elle est abondamment secrétée (Tarbouriech, Ruggiero et al. 2006). Son rôle dans les CNP demeure controversé (Wei and Ooka 1989; Sivachandran, Sarkari et al. 2008; Kong, Hu et al. 2010)

I.1.c Aspects biologiques : oncogenèse cellulaire

Altérations génétiques et épigénétiques dans les CNP

Les avancées dans le domaine de la biologie moléculaire ont permis de mettre en évidence un nombre croissant d'altérations génétiques dans les CNP. Dès les premières études effectuées par cytogénétique classique sur des cellules malignes provenant de xénogreffes de CNP à la fin des années 1980, des anomalies structurelles récurrentes des chromosomes 1, 3p, 11q, 12 et 17 ont été rapportées (Huang, Ho et al. 1989; Bernheim, Rousselet et al. 1993). Dans une seconde étape, des pertes de matériel génétique – pertes homozygotes ou hétérozygotes - ont été mises en évidence par PCR dans des lignées xénogreffées de CNP ou dans des biopsies fraîches, principalement par l'équipe de Dolly Huang à Hong-Kong (Huang, Lo et al. 1994; Lo, Huang et al. 1995). A partir du début des années

2000, l'avènement des méthodes de CGH-array a beaucoup accéléré la description des altérations génétiques quantitatives pour les CNP comme pour les autres affections malignes humaines. Il faut noter qu'aucune de ces altérations n'est constante dans les CNP et qu'elles ne sont pas, dans leur grande majorité, spécifiques des CNP. La plupart se rencontrent dans de nombreux autres cancers humains. Les pertes de matériel chromosomique peuvent - à elles seules - entraîner l'invalidation de gènes suppresseurs de tumeurs (TSG) lorsque les deux allèles sont perdus. Il est plus fréquent de voir l'extinction d'un TSG résulter de la perte d'un seul allèle conjugué à l'hyperméthylation des îlots CpG du promoteur de l'allèle restant. Au niveau de la région 9p21.3, deux gènes TSG sont fréquemment invalidés soit par délétion des 2 allèles, soit par délétion d'un allèle conjugué à une hyperméthylation (Huang, Lo et al. 1994; Lo, Huang et al. 1995).. Il s'agit du gène *CDKN2A* appelée antérieurement *INK4* et codant la protéine p16 inhibitrice de « cyclin-dependent kinases », Il est invalidé dans plus de 60% des cas. Très proche de *CDKN2A* dans la région chromosomique 9P21.3, le gène codant p19/ARF (Alternate Reading Frame of the CDKN2A/ARF locus) est invalidé dans environ 50% des cas (Lo, Chung et al. 2013). Les pertes de matériel chromosomique souvent conjuguées à des hyperméthylation sont également fréquentes en 3p21.3, avec pour conséquence l'inactivation de gènes tels que *RASSF1A* (Ras Association Domain Familiy 1A). La protéine RASSF1A intervient dans la régulation de multiples mécanismes cellulaires en relation notamment avec le cycle cellulaire et la régulation de la survie cellulaire. Le pourcentage d'invalidation de RASSF1 dans les tumeurs primaires de CNP pourrait dépasser 70% (Chow, Lo et al. 2004). D'autres gènes suppresseurs de tumeur appartenant à la région 3p21 sont invalidés dans les CNP. Ainsi une étude de 2014 met en exergue l'implication fréquente du TSG *BLU/ZMYND10* lui aussi situé au niveau du chromosome 3p21.3 (Cheng, Ho et al. 2014). Les gains ou les amplifications de gènes contribuent au phénotype malin lorsqu'elles concernent des oncogènes. Parmi les oncogènes fréquemment amplifiés, on peut citer *CCND1*, codant pour la protéine régulatrice du cycle cellulaire Cycline D1 (Hui, Or et al. 2005). Il s'agit typiquement d'une altération non-spécifique du CNP puisqu'elle se rencontre fréquemment dans de nombreux types de carcinomes humains, notamment dans les carcinomes épidermoïdes des VADS (Leemans, Braakhuis et al. 2011). Par contre, on note dans une fraction des CNP (7 à 50% ?) des amplifications du gène *LT β R*, codant un récepteur de la famille des TNF-R dont les deux ligands sont la LT α 1 β 2 et LIGHT (Or, Chung et al. 2010; Chung, Lou et al. 2013; Lo, Chung et al. 2013). Dans des cellules épithéliales de la muqueuse nasopharyngée non transformées, la simple expression constitutive de ce récepteur suffit à entraîner une activation permanente des voies de signalisation NF-kB (Lo, Chung et al. 2013). Depuis quelques années, l'emploi des techniques de séquençage à haut débit a donné une nouvelle accélération à l'étude des altérations génétiques acquises des CNP. L'application des techniques de RNA-seq sur des lignées xénogreffées de CNP a permis de mettre en évidence des gènes de fusion qui n'avaient pas été décrits jusque-là dans d'autres tumeurs malignes humaines. En particulier la fusion du gène *UBR5* (ubiquitin protein ligase E3 component n-recognin 5) et *ZNF423* (zinc finger 423) (Chung, Lung et al. 2013). La

protéine hybride qui résulte de cette fusion ne contient que deux acides aminés provenant de l'extrémité N-terminale d'*UBR5* et 92 acides aminés correspondant à l'extrémité C-terminale du facteur de transcription *ZNF423*. Ces 92 acides aminés suffisent à conférer à la protéine hybride une activité stimulant la transcription semblable à celle de la protéine entière. A la différence de la protéine *ZNF423* sauvage, l'expression de la protéine hybride est commandée par le promoteur d'*UBR5* qui est actif de façon permanente dans de nombreux types cellulaires. D'où un excès de la protéine *ZNF423* tronquée. Le gène *UBR5/ZNF423* est transformant lorsqu'il est transfété dans des fibroblastes murins de type NIH3T3 (Chung, Lung et al. 2013). Il a été décrit au départ dans une seule lignée xénogreffée de CNP. Sur une série de 102 patients, il n'a été retrouvé que dans 8 biopsies toutes en provenance de lésions très évoluées (stade III ou IV) (Chung, Lung et al. 2013). Par conséquent, il ne s'agit probablement pas d'une altération déterminante au stade initial de l'oncogenèse. D'autres gènes de fusion ont été décrits par la même équipe de Hong-Kong. Les premières études tendent à prouver qu'ils n'ont qu'un faible taux de récurrence et qu'ils se voient préférentiellement dans des lésions évoluées (K.W. Lo et Natalie Oker, communications personnelles).

En 2014, Lin et al. ont rapporté les données d'une étude de l'exome par séquençage haut débit sur plusieurs dizaines de biopsies de CNP. Un des mérites de cette étude a été de confirmer un taux relativement faible de mutations ponctuelles affectant les parties codantes des gènes en comparaison d'autres tumeurs (Lin, Meng et al. 2014). L'un des gènes les plus fréquemment délétés ou mutés est *ARID1A* qui code un facteur de remodelage de la chromatine et qui semble avoir les propriétés d'un gène suppresseur de tumeur. Le taux de récurrence ne dépasse pas 10% dans les CNP mais il faut noter que ce gène est très souvent inactivé dans les carcinomes gastriques associés à EBV (Wang, Kan et al. 2011; 2014). Les auteurs ont noté qu'il n'y avait pas, dans les spécimens de CNP, une signature mutationnelle évocatrice de l'enzyme Apobec 3B. Apobec 3B est une cytidine déaminase qui induit au niveau de l'ADN le changement des cytidines en uridines. Il s'agit en principe d'un mécanisme de défense anti-virale ciblant principalement les ADN viraux. Cependant Apobec 3B peut aussi modifier l'ADN cellulaire et exercer sur lui ses effets mutagènes et favoriser ainsi l'oncogenèse (Burns, Lackey et al. 2013). L'absence de signature mutationnelle évocatrice d'Apobec 3B dans les CNP contraste avec les données obtenues dans les carcinomes associés à HPV au niveau du col utérin ou de l'oropharynx (Lin, Meng et al. 2014).

La rareté des mutations du gène *TP53* est un des caractères qui distinguent le plus nettement les CNP des carcinomes épidermoïdes des VADS. Dans l'étude précédemment citée basée sur le séquençage haut débit de l'exome des CNP, cette fréquence est estimée à 10%, Ce qui est probablement surestimé si l'on en croit des études antérieures, notamment celles qui ont impliqué mon équipe d'accueil (Effert, McCoy et al. 1992). En tout état de cause, cette fréquence est de toute façon beaucoup plus faible que celle qui s'observe dans les carcinomes des VADS en dehors des cas associés à HPV (Leemans, Braakhuis et al. 2011).

Nous avons mentionné le rôle important des phénomènes d'hyperméthylation des promoteurs à propos de l'inactivation des TSG (Lo, Cheung et al. 1996; Lo, Kwong et al. 2001). Les CNP font partie des tumeurs humaines qui ont un phénotype CIMP (CpG island methylator) (Issa 2004). Ceci est à rapprocher du fait que les carcinomes gastriques associés à EBV ont le phénotype CIMP le plus marqué de toutes les tumeurs humaines analysées jusqu'ici. Ce phénotype contraste avec celui des carcinomes gastriques indépendants d'EBV qui ont un taux de méthylation beaucoup plus faible (2014). Il est possible que certains produits codés par le génome d'EBV contribuent à activer les « DNA methyltransferases » (DNMTs) cellulaires (Li, Zhang et al. 2014).

I.1.d Essai de synthèse sur les altérations des grandes voies de signalisation dans les CNP en relation avec l'oncogenèse virale ou cellulaire.

Bien que ce point ait été peu étudié, il semble que les invalidations directes du gène Rb soient rares dans les CNP (Hoe, Lee et al. 2009). En revanche, plusieurs altérations peuvent contribuer à une inactivation fonctionnelle de Rb et à une levée des barrières au niveau des transitions G0/G1 et G1/S : 1) l'inhibition de l'expression de *CDKN2A* déjà mentionnée à plusieurs reprises, en lien avec des pertes de matériel génétique et/ou une hyper-méthylation du promoteur survenant dans environ 60% des cas ; 2) l'hyperexpression du gène *CCND1* en rapport avec des gains de la région 11q13 (Hui, Or et al. 2005); 3) un possible effet inactivateur direct de l'oncoprotéine LMP1 sur la protéine Rb (Ohtani, Brennan et al. 2003).

Comme indiqué ci-dessus, les mutations de *TP53* sont rares dans les CNP. Plusieurs mécanismes d'inactivation indirecte sont suspectés. On s'attend à ce que l'inactivation de *p19/ARF* en 9p21.23 entraîne l'activation de la protéine MDM2 et la dégradation de la p53 (Lo, Chung et al. 2013). L'inactivation de USP7 par la protéine EBNA1 devrait aussi favoriser la dégradation de p53 (Frappier 2012). Cependant, bien que n'étant pas mutée, la p53 est détectée à un concentration élevée dans les cellules tumorales dans la plupart des biopsies (Khabir, Sellami et al. 2000). Il reste donc beaucoup de phénomènes à élucider pour avoir une idée claire sur les mécanismes de l'inactivation fonctionnelle. Comme noté précédemment, un des microARN de la famille BART, miR BART5 inhibe l'expression de la protéine pro-apoptotique PUMA dont le gène est activé par la p53.

Les voies NF-κB canoniques et non-canoniques sont activées de façon quasi-constante dans les CNP. Chung et al. ont montré que cette activation peut être réalisée de façon très variable suivant les spécimens tumoraux (Chung, Lou et al. 2013). Elle peut résulter de mutations faux-sens dans les gènes codant des régulateurs de NF-κB comme TRAF3, TRAF2, NFKBIA et A20, mutations observées dans 16% des cas. L'hyper-expression du récepteur LTβR souvent secondaire à une amplification du gène correspondant entraîne aussi l'activation des voies NF-κB. La LMP1 est bien connue pour agir dans le même sens. On s'attend également à un effet stimulant les voies NF-κB lié à l'action des EBERs sur

le récepteur TLR3 (Iwakiri, Zhou et al. 2009) . Il faut mentionner la présence très régulière dans les cellules de CNP d'un complexe NF-κB activateur très particulier comportant les trois sous-unités suivantes : Bcl3/p50/p50. Ce complexe est impliquée dans la transactivation du gène codant le récepteur de l'EGF (Gourzones, Busson et al. 2013) .

La voie STAT3 est souvent activée dans les CNP (Ho, Tsao et al. 2013). La LMP1 peut y contribuer par un voie de signalisation qui reste pour une large part à explorer et qui implique la PKC (Gourzones, Busson et al. 2013). Là encore les EBERs ont sans doute une action médiée par la stimulation de TLR3 et l'action de l'interféron gamma (Ho and Ivashkiv 2006).

On peut supposer que, comme dans beaucoup de tumeurs malignes, la voie PI3-kinase est souvent activée dans les CNP mais elle a encore été peu étudiée dans des lignées vraiment représentative en particulier des lignées EBV-positives (Yip and Seow 2012). Comme mentionné ci-dessus, aussi bien la LMP1 que la LMP2, peuvent activer la voie PI3-kinase.

Enfin Man et al. ont mis en évidence des altérations des voies Notch dans les cellules de CNP. Celles-ci sont marquées par une expression élevée du récepteur Notch3 et des ligands JAG1 et DLL4. L'inhibition de l'expression de Notch3 par interférence ARN diminue le pouvoir tumorigène des cellules de CNP et les sensibilise aux effets cytotoxiques du cis-platine. On ignore encore quels sont les déterminants génétiques, épigénétiques ou viraux de la surexpression de Notch3.

I.2 Carcinomes épidermoïdes des VADS

I.2.a Aspects généraux, épidémiologiques et cliniques

Histologie

Les carcinomes épidermoïdes des VADS se développent aux dépens de la muqueuse de la cavité buccale, du pharynx, et du larynx. Il est parfois possible de détecter des lésions « précancéreuses », qui correspondent histologiquement à des dysplasies de bas grade, de grade intermédiaire, ou de haut grade, selon la profondeur de l'extension au sein de l'épithélium. La différenciation malpighienne, caractéristique des carcinomes épidermoïdes, se traduit par la présence de ponts d'union entre les cellules tumorales et la production de kératine. Selon le nombre de mitoses et d'atypies cellulaires et la quantité de dépôts de kératine, il est décrit des CE bien, moyennement ou peu différenciés (Cardesa, Gale et al. 2005). Les principaux agents impliqués dans l'oncogénèse des CE des VADS sont l'alcool, le tabac et, pour les localisations oropharyngées et de base de langue, les virus HPV (Gillison 2004). Alcool et tabac agissent de façon synergique dans l'augmentation du risque de CE des VADS (Brownson and Chang 1987; Hashibe, Brennan et al. 2009).

Epidémiologie

En termes d'incidence au niveau mondial, les CE des VADS arrivent en 6^{ème} position, avec environ 600 000 nouveaux cas chaque année (IARC 2012). Un exemple de leur répartition géographique (celui des CE de la cavité buccale et de l'oropharynx) est représenté sur la figure 4.

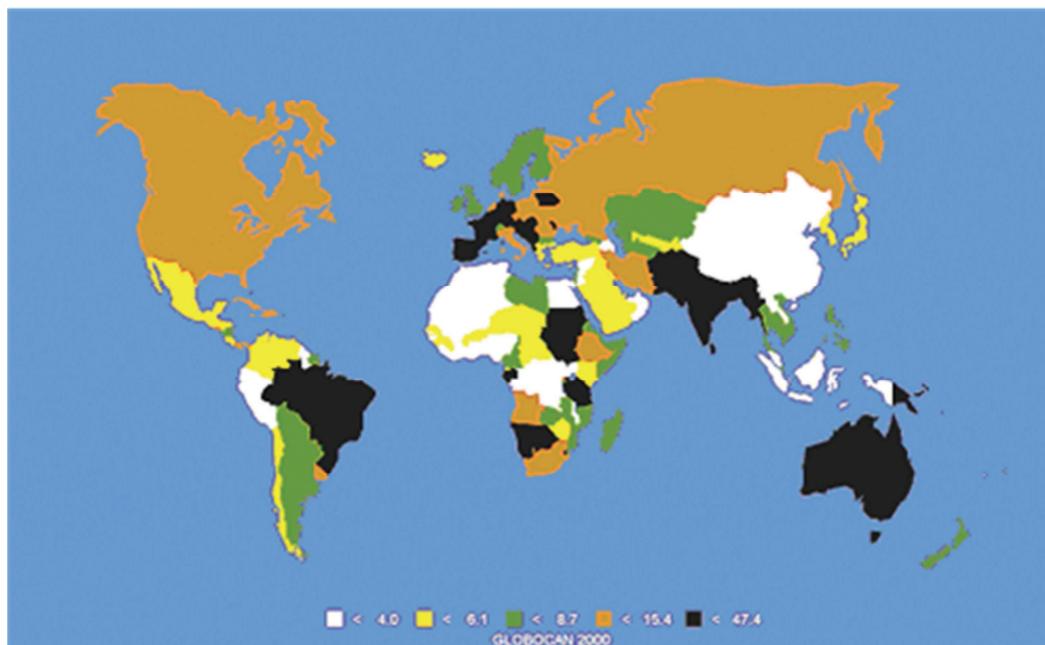


Figure 4. Incidence des carcinomes épidermoïdes de la cavité buccale/oropharynx au niveau mondial (Nouveaux cas/100000 habitants/an ; données Globocan, 2000)

En France, ils touchent plus fréquemment les hommes entre 50 et 60 ans. Il semblerait qu'en ce qui concerne les CE oropharyngés liés à HPV, l'incidence soit plus élevée dans les pays industrialisés (Chaturvedi, Anderson et al. 2013).

Aspects cliniques

Comme les CNP, les CE des VADS sont fréquemment découvert à un stade tardif (Edge, Byrd et al. 2010). Dans une étude récente réalisée en France, plus de la moitié des patients étaient ainsi pris en charge à un stade T3 ou T4 (Adrien, Bertolus et al. 2014). L'envahissement ganglionnaire est souvent présent d'emblée ; en revanche, les métastases à distance surviennent dans moins de 9% des cas (Spector, Sessions et al. 2001). Les modes de révélation sont variables : douleur, gène à la déglutition, modification de la voix, voire saignements buccaux ou gène respiratoire. C'est parfois l'apparition d'un ganglion cervical métastatique qui fait découvrir la tumeur primitive. Il n'est pas rare d'observer chez un même patient deux localisations tumorales (voire plus) : on parle de tumeurs synchrones lorsque les lésions sont découvertes en même temps, et de tumeurs métachrones lorsqu'une 2^{ème} tumeur est découverte plus de 6 mois après la première (Haughey, Gates et al. 1992).

Le bilan initial comprend un examen complet des VADS sous anesthésie générale (panendoscopie), associé à un examen endoscopique de l’œsophage ; une imagerie par scanner cervico-thoracique, parfois complété par une IRM ; la TEP-FDG/TDM est indiquée dans les tumeurs à haut risque métastatique (stades ganglionnaires $\geq N2b$, adénopathies dans les secteurs IV et V), ou à la recherche d’un primitif dans les cas des métastases ganglionnaires sans primitif évident (SFORL 2012). Le diagnostic repose sur l’examen anatomopathologique d’une biopsie.

Le traitement curatif repose sur la chirurgie, la radiothérapie, ou sur l’association des deux dans les tumeurs localement avancées. Il semblerait que les tumeurs induites par HPV répondent mieux à la radiothérapie. La chimiothérapie trouve sa place soit en néo-adjuvant, soit en association avec la radiothérapie. Les inhibiteurs du récepteur à l’EGF (Epidermal Growth Factor) sont utilisés dans les tumeurs localement avancées, récidivantes, ou métastatiques (Vermorken, Mesia et al. 2008; Liu, Cao et al. 2010). Le pronostic varie avec le stade et le site tumoral, mais la survie globale à 5 ans ne dépasse pas 60%, le plus souvent du fait de récidives locales (Gregoire, Lefebvre et al. 2010). Par ailleurs, si les progrès de la chirurgie reconstructrice et des techniques d’irradiation ont sans nul doute amélioré le pronostic fonctionnel dans le traitement des CE des VADS, la survie n’a en revanche que peu ou pas progressé, et pourrait même avoir diminué dans certaines localisations au cours des 40 dernières années (Chen, Fedewa et al. 2011; Newman, Connolly et al. 2014)

I.2.b Aspects biologiques

Par comparaison avec d’autres tumeurs malignes, la biologie des CE des VADS a été relativement peu étudiée. Des altérations génétiques ont été mises en évidence dans une proportion variable de tumeurs : des mutations somatiques des gènes *TP53* (47% à 72%), *NOTCH1* (14% à 19%), *CDKN2A* (9% à 22%), *PIK3CA* (6% à 21%), *FBXW7* (5%), *HRAS* (4% à 8%), *FAT1* (23%), et *CASP8* (8%) ont ainsi été rapportées (résultats rapportés dans une revue de Machiels et al (Machiels, Lambrecht et al. 2014)). Les mutations semblent donc toucher plus fréquemment des gènes suppresseurs de tumeur. Ces mutations concernent plutôt les tumeurs négatives pour HPV. Dans les tumeurs HPV+, il existe un mécanisme d’oncogénèse virale spécifique, qui repose sur la capacité des oncoprotéines virales E6 et E7 à inactiver les protéines P53 et pRb, respectivement (Dyson, Howley et al. 1989; Werness, Levine et al. 1990). De manière générale, les protéines virales E6 et E7 participent à l’oncogénèse en interférant avec les mécanismes de régulation du cycle cellulaire, de contrôle de l’apoptose, et de réparation de l’ADN.

La fréquence des tumeurs surexprimant EGFR ou comportant un grand nombre de copies du gène d’EGFR a justifié le développement de molécules inhibitrices de l’EGFR : ce récepteur joue en effet un rôle important dans la croissance tumorale, les capacités d’invasion, d’angiogénèse et de métastase des CE des VADS (cf revue de Kalyankrishna et al (Kalyankrishna and Grandis 2006)). Les

résultats souvent décevants des études cliniques limitent actuellement les indications de ces traitements à certaines tumeurs très évoluées.

D'autres mécanismes biologiques ont été étudiés dans les CE des VADS, et ont soutenu le développement de plusieurs thérapies ciblées. Ils sont résumés dans la figure 5.

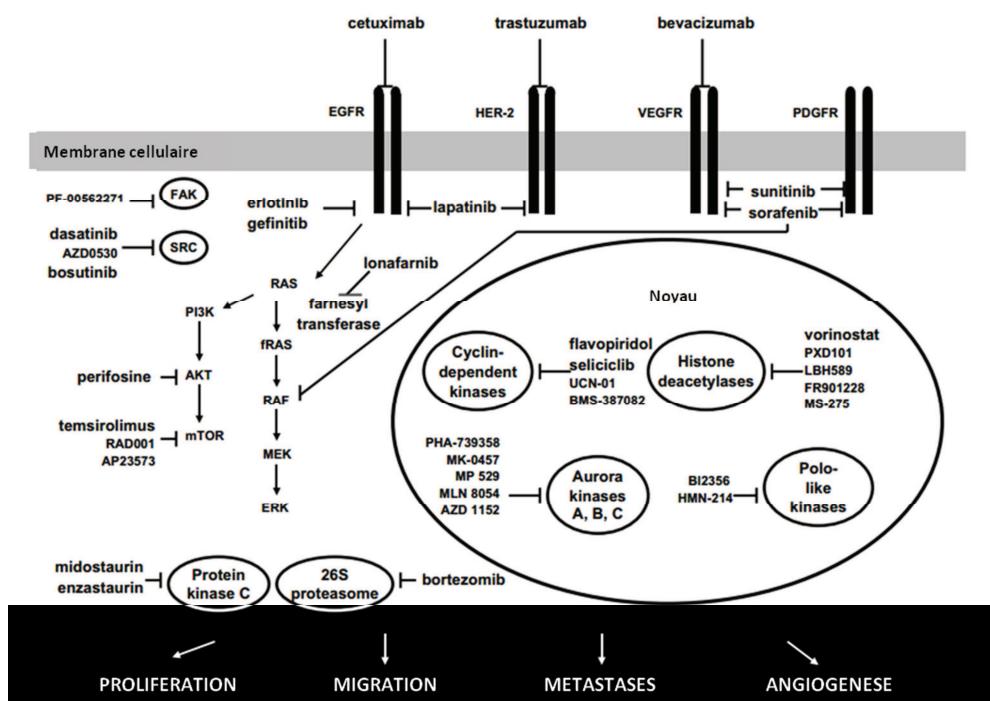


Figure 5. Principales voies altérées dans les carcinomes épidermoïdes des VADS et thérapies ciblées correspondantes. D'après Kalyankrishna et al. J Clin Oncol 2006 ; 24(17): 2666-2672

En particulier, les relations entre oncogénèse, hypoxie et néoangiogénèse ont fait l'objet de nombreux travaux. Cet aspect de la biologie des CE des VADS sera développé dans la troisième partie de cette introduction.

II Le récepteur « Toll-like 3 », ou TLR3

TLR3 est l'un des 10 membres de la famille des récepteurs « Toll-like » (TLR) identifiés chez l'homme. Les gènes de mammifères codant les TLR sont des orthologues du gène « Toll » de la drosophile (Gay and Keith 1991; Taguchi, Mitcham et al. 1996).

II.1 Structure et liaison aux ligands (figure 6)

TLR3 est une glycoprotéine transmembranaire de type 1 composée d'un ectodomaine, d'un domaine transmembranaire, et d'un domaine intracytoplasmique. Il se lie spécifiquement aux

fragments d'ARN double brin (Alexopoulou, Holt et al. 2001). TLR3 peut être localisé à la surface de la cellule ou dans la membrane de l'endosome (Matsumoto, Funami et al. 2003; Nishiya and DeFranco 2004) : L'interaction de TLR3 avec son ligand se fait probablement à l'intérieur de la cellule avec des ARN qui sont soit produits dans la cellule soit internalisés par endocytose (Kalali, Kollisch et al. 2008).

L'ectodomaine de TLR3 est constitué de 25 motifs "LRR" (Leucine-Rich Repeat) : une étude cristallographique a permis de lui décrire la forme d'un « fer à cheval », dont l'une des faces n'est pas glycosylée et présente 2 zones chargées positivement, à même de se lier à un fragment d'ARN double brin (Choe, Kelker et al. 2005). Le clivage de l'ectodomaine par les cathepsines lysosomales génère 2 fragments qui restent néanmoins associés : ce clivage permet aux ectodomains de 2 récepteurs TLR3 adjacents d'adopter une conformation adaptée à la liaison à un fragment d'ARN double-brin (Toscano, Estornes et al. 2013). Cette forme dimérisée est encore stabilisée par un point de contact intermoléculaire (Liu, Botos et al. 2008). Il est probable que la dimérisation des ectodomains s'accompagne d'un rapprochement des fragments intracytoplasmiques : ces fragments sont caractérisés par la présence d'un domaine Toll/IL-1 receptor (TIR). La forme dimérisée de TLR3 recrute ensuite l'adaptateur TRIF, également porteur d'un domaine TIR, et qui participe à l'activation des facteurs de transcription IRF3 et 7 (interferon regulatory transcription factor), NF- κ B et AP1 (Matsumoto, Funami et al. 2004; Bouttier, Goncalves et al. 2008).

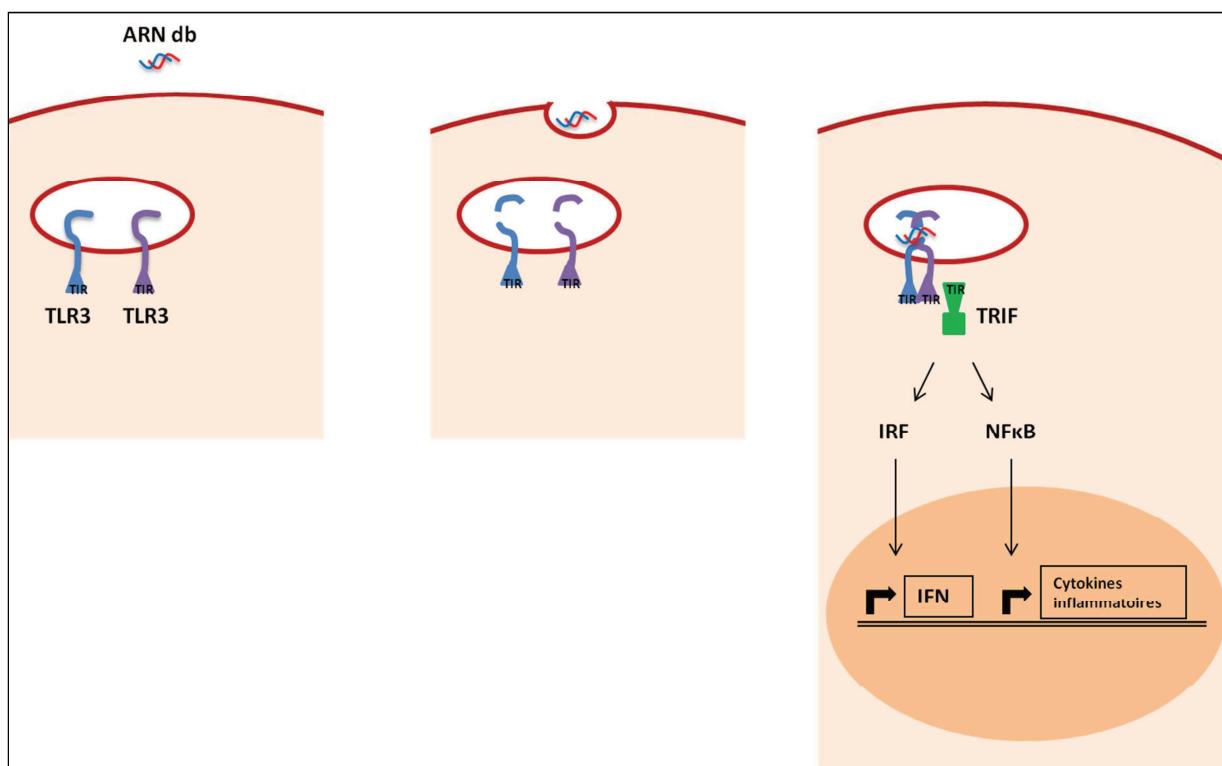


Figure 6. Activation de TLR3 lors de sa liaison au ligand

II.2 Distribution

Les TLRs sont préférentiellement exprimés par les cellules du système immunitaire, comme les macrophages, les cellules dendritiques, les lymphocytes B et certains lymphocytes T. (Muzio, Bosisio et al. 2000; Akira, Uematsu et al. 2006). Ils peuvent aussi être détectés dans d'autres types de cellules, comme les fibroblastes et les cellules épithéliales, notamment dans les tissus exposés aux agents pathogènes (alvéoles pulmonaires, tube digestif, hépatocytes, kératinocytes) (Guillot, Le Goffic et al. 2005; Kollisch, Kalali et al. 2005; Li, Chen et al. 2005). Leur expression est modulée rapidement par la production de diverses cytokines dans un contexte d'agression microbienne (Akira, Uematsu et al. 2006).

Certains TLRs sont exprimés à la surface de la cellule, tandis que d'autres, comme TLR3, sont présents dans leur forme activée dans le compartiment endosomal. Plusieurs étapes sont alors indispensables à la reconnaissance du ligand par le TLR : le ligand doit être reconnu à la surface de la cellule et internalisé (Limmon, Arredouani et al. 2008), tandis que la localisation du TLR au compartiment endosomal est elle-même régulée par la protéine chaperonne UNC93B1 (Kim, Brinkmann et al. 2008) ; enfin, une étape de clivage par les cathepsines endolysosomales est nécessaire à l'activation des TLRs (Park, Brinkmann et al. 2008; Garcia-Cattaneo, Gobert et al. 2012; Toscano, Estornes et al. 2013).

II.3 Fonctions physiologiques

Le récepteur Toll de la drosophile a été découvert lors d'études sur la polarisation de l'embryon (Anderson, Jurgens et al. 1985). Son rôle dans la réponse immunitaire n'a été mis en évidence qu'en 1996 (Lemaitre, Nicolas et al. 1996). Il est maintenant bien établi que les TLR jouent un rôle essentiel chez les vertébrés supérieurs dans le déclenchement de la réponse immunitaire innée. Débutée à un stade très précoce de l'invasion par des agents pathogènes (virus, bactéries, parasites), la réponse immunitaire innée n'est pas basée sur la reconnaissance d'une espèce microbienne particulière. Cependant, elle constitue une première ligne de défense et joue un rôle essentiel pour préparer la réponse immunitaire adaptative, cette dernière étant basée sur la reconnaissance spécifique de motifs antigéniques soit par des anticorps, soit par des lymphocytes T cytotoxiques. La réponse immunitaire innée se manifeste d'une part par la production d'interférons par les cellules de différents organes ou tissus (cellules épithéliales, hépatocytes etc...) et d'autre part par l'activation de cellules spécialisées du système immunitaire, cellules NK, monocytes et cellules dendritiques. La plupart des TLR participent à ces deux composantes de la réponse immunitaire innée. Ils sont exprimés dans la plupart des tissus à un niveau faible en conditions basales et à un niveau beaucoup plus élevé dans un contexte d'agression microbienne et/ou d'inflammation.

Les TLR ont pour ligands spécifiques des « Pathogen associated molecular patterns » ou PAMPs, c'est-à-dire des structures moléculaires caractéristiques des organismes microbiens et normalement absentes de l'organisme en bonne santé. Ainsi le TLR4 reconnaît des composants des parois bactériennes (liposaccharides ou LPS) (Poltorak, He et al. 1998). Le TLR3, quant à lui, reconnaît de façon spécifique les segments d'ARN double brin, et joue un rôle essentiel dans la réponse antivirale précoce. Des travaux plus récents ont permis de faire émerger un concept nouveau, celui de « Damage-Associated Molecular Patterns » (DAMPs) : les produits de dégradation libérés lors de certains dommages tissulaires sont en effet capables de stimuler les récepteurs Toll-like (Seong and Matzinger 2004; Pradere, Dapito et al. 2014). Il a ainsi été montré que TLR3 pouvait être stimulé par des fragments d'ARN double-brin libérés par les cellules en nécrose (Kariko, Ni et al. 2004; Brentano, Schorr et al. 2005; Cavassani, Ishii et al. 2008; Seya, Shime et al. 2012).

Les facteurs de transcription IRF3 et 7, NF- κ B et AP1, activés après recrutement de TRIF par TLR3, sont capables de moduler l'expression de nombreux gènes et d'entraîner de nombreuses modifications du phénotype cellulaire ; ils concourent à la production des interférons de type I. Fait essentiel les modifications résultant de l'activation de TLR3 sont multiples et contrastées pouvant jouer soit dans le sens de la mort cellulaire - qui dans un contexte d'infection virale classique limite la propagation virale - soit dans un sens prolifératif favorable à la réparation tissulaire (Salaun, Romero et al. 2007; Chen, Alvero et al. 2008; Lin, Wang et al. 2012). C'est l'activation simultanée d'autres récepteurs et la présence de diverses cytokines qui fait pencher la balance dans un sens ou dans l'autre.

Dans certaines conditions, l'activation aberrante du récepteur TLR3 peut jouer un rôle dans le développement de pathologies inflammatoires, auto-immunes ou tumorales (Chen, Alvero et al. 2008). À noter, TLR3 n'est pas le seul récepteur des ARN double-brin. Trois autres récepteurs sont les protéines RIG-I (retinoic acid-inducible gene 1), MDA5 (melanoma differentiation-associated gene 5) et PKR (protein kinase R) (Kalali, Kollisch et al. 2008). Les agonistes artificiels de TLR3 les plus utilisés en pratique expérimentale courante sont le poly(A:U) (acide polyadénylique-polyuridylique) et surtout le poly(I :C) (acide polyinosidique-polycytidylique). Il a été montré que seul le poly(A :U) stimulait spécifiquement TLR3 (Perrot, Deauvieau et al. 2010) : nous avons donc utilisé uniquement le poly(A :U) dans les expériences décrites plus bas (figure 7).

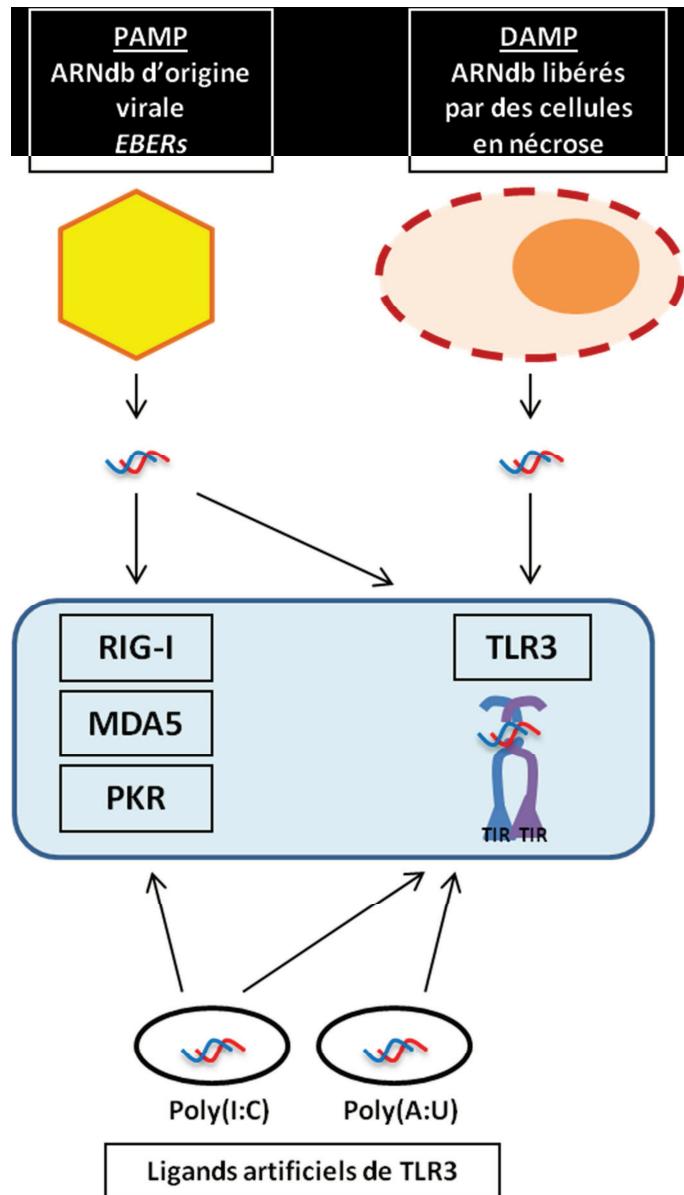


Figure 7. Ligands de TLR3 et des autres récepteurs d'ARN double-brin

II.4 TLR3 et cancer

II.4.a Généralités

Les agonistes artificiels de TLR3 sont connus et ont été utilisés dans des essais cliniques depuis de nombreuses années. Le poly(A :U) a ainsi été testé dans des essais de phase III dès les années 1980 dans plusieurs tumeurs solides, seul ou en association avec la chimiothérapie et/ou les radiations ionisantes (Lacour, Laplanche et al. 1992). Les récepteurs Toll-like n'avaient alors pas encore été décrits, et seules les propriétés immunomodulatrices du poly(A:U) étaient connues, sans que leur mécanisme précis n'ait été élucidé. Ce n'est d'ailleurs que rétrospectivement que le rôle de

TLR3 a été mis en évidence dans le sous-groupe des patients « répondeurs », dans le cas du cancer du sein (Salaun, Zitvogel et al. 2011).

Au cours des dernières années, plusieurs publications ont rapporté une surexpression du récepteur Toll-Like 3 (TLR3) dans différentes tumeurs solides. Cette observation, associée à la découverte du potentiel cytotoxique de la stimulation directe de TLR3 sur les cellules tumorales, a servi de base à plusieurs études *in vitro* testant les effets du principal agoniste de TLR3, le poly(I:C), sur diverses lignées tumorales (Morikawa, Sugiyama et al. 2007; Salaun, Romero et al. 2007; Rydberg, Mansson et al. 2009; Chuang, Chuang et al. 2011; Salaun, Zitvogel et al. 2011). Il faut cependant signaler que dans la plupart de ces études le poly(I:C) est utilisé à des doses élevées, de l'ordre de 10 à 100 μ g/mL, ce qui ne correspond vraisemblablement pas à des doses pharmacologiquement acceptables.

Par ailleurs, la surexpression de TLR3 par les cellules tumorales soulève la question de son rôle potentiel dans l'oncogénèse et la croissance tumorale. De façon paradoxale, la stimulation de TLR3 peut en effet avoir un effet pro-tumoral, en augmentant les capacités de prolifération et d'invasion des cellules malignes (Chiron, Jego et al. 2010; Chuang, Huang et al. 2012).

II.4.b TLR3, EBV et carcinomes nasopharyngés

Au cours des dernières années, plusieurs travaux ont mis en exergue le rôle du récepteur TLR3 dans certaines affections malignes associées à EBV. Ceci grâce à des connaissances nouvelles concernant les EBERs (Iwakiri, Zhou et al. 2009). Ces ARN viraux non-traduits non-polyadénylés sont extrêmement abondants dans les cellules infectées de façon latente par EBV. Ils ont une structure partiellement double-brin. Ils sont concentrés dans le noyau des cellules qui peuvent en contenir un nombre très élevé (plusieurs centaines de milliers de copies). Une fraction d'entre eux passe dans le cytoplasme et même dans le milieu extra-cellulaire (Iwakiri, Zhou et al. 2009). Ils ont la capacité d'interagir avec les trois récepteurs cellulaires des ARN double brins PKR, RIG-I et TLR3 (Nanbo, Inoue et al. 2002; Samanta, Iwakiri et al. 2006; Iwakiri, Zhou et al. 2009). Une publication du groupe de K. Takada suggère un rôle prépondérant de TLR3 dans des lymphocytes B tumoraux infectés par EBV (Iwakiri, Zhou et al. 2009). Les EBERs libérés par ces cellules stimulent le TLR3 de façon autocrine ce qui entraîne la production d'interféron. Cependant l'effet cytostatique de l'interféron est neutralisé par les EBERs eux-mêmes. En effet, ceux-ci inhibent la PKR et empêchent un blocage de la synthèse protéique (Nanbo, Inoue et al. 2002). Des résultats préliminaires montrent que la stimulation autocrine du TLR3 par les EBERs existe aussi pour les cellules de CNP ; cette stimulation entraîne la production d'interféron – là aussi sans effet cytostatique – et la production d'IGF1 qui stimule la croissance cellulaire (K. Takada, communication personnelle) (figure 8).

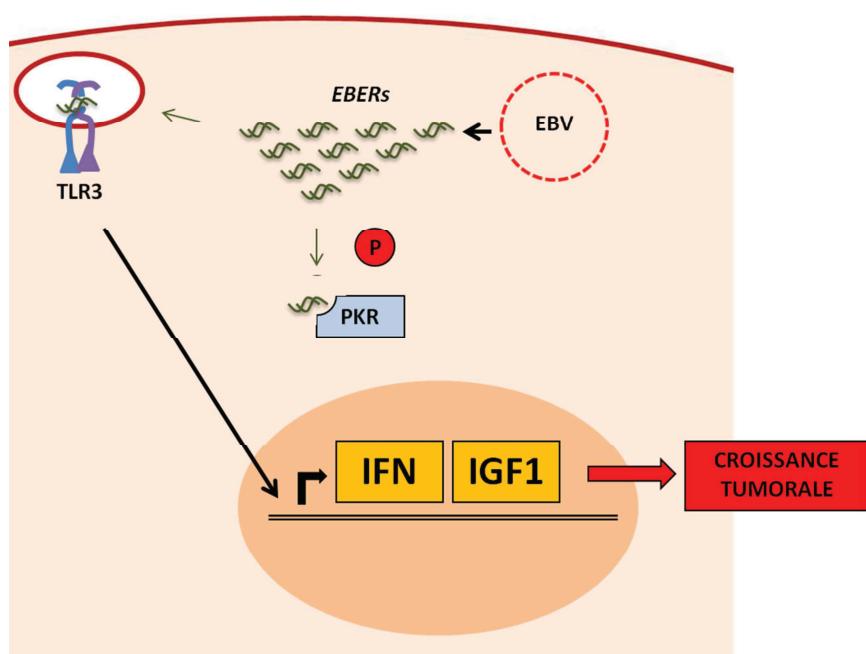
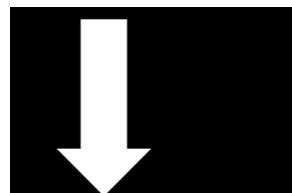
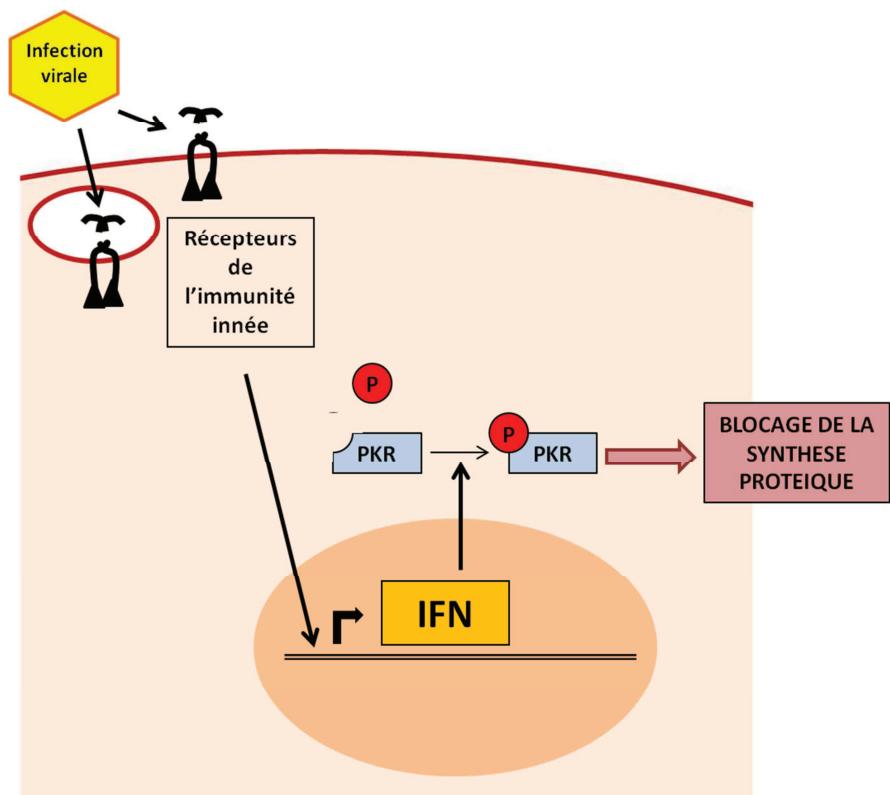


Figure 8. Effet protumoral du blocage de la PKR par les EBERs dans un modèle d'infection maligne liée à EBV

Nous avons été les premiers à publier des données sur l'expression de TLR3 dans le CNP associé à EBV. Ces données figurent dans l'article présenté à la section « résultats ». Cette étude s'imposait doublement, en raison de l'abondance des EBERs dans les cellules de CNP et en raison de l'abondance et de la constance de l'infiltrat inflammatoire caractéristique des CNP. A noter enfin, plusieurs études ont rapporté une association entre certains polymorphismes génétiques de TLR3 et un risque accru de CNP (He, Jia et al. 2007; Moumad, Lascorz et al. 2013).

II.4.c TLR3 et carcinomes épidermoïdes des VADS

Il n'existe que peu d'études sur le rôle de TLR3 dans les CE des VADS. La détection de la protéine TLR3 à un niveau élevé dans l'ensemble des lignées et dans 80% des biopsies étudiées a été rapportée par Pries et al. en 2008 ; les auteurs suggéraient qu'il existait un effet oncogénique de TLR3 mettant en jeu l'oncoprotéine c-Myc (Pries, Hogrefe et al. 2008). L'expression quasi constante de TLR3 dans les lignées et biopsies de CE des VADS a été confirmée par la suite dans des études s'intéressant à son potentiel thérapeutique : la stimulation de TLR3 par des agonistes comme le poly(I :C) utilisés à forte dose avait ainsi un effet cytotoxique *in vitro* (Rydberg, Mansson et al. 2009; Nomi, Kodama et al. 2010). Inversement, il a été montré qu'une forte expression de TLR3 était associée à faible degré de différenciation et à un pouvoir d'invasion accru dans les CE de la cavité buccale (Chuang, Huang et al. 2012).

Les liens entre TLR3 et adaptation métabolique dans les carcinomes des VADS, qui font l'objet du deuxième article présenté dans la partie « Résultats », ont été également étudiés durant la même période par une chercheuse du Rudjer Boskovic Institute de Zagreb, Tanja Matijevic : ses principaux résultats sont décrits plus bas, dans la dernière partie de l'introduction.

II.4.d TLR3 et cIAP2

Notre équipe a montré que la stimulation de TLR3 entraîne une augmentation rapide et intense de l'expression de la protéine anti-apoptotique c-IAP2 (cellular Inhibitor of Apoptosis Protein 2), essentiellement par un effet activateur de la transcription du gène *BIRC3* qui code c-IAP2 (Friboulet, Pioche-Durieu et al. 2008; Friboulet, Gourzones et al. 2010). Cet effet est aboli si l'on supprime l'expression de TLR3 par ARN-interférence ; il a été observé dans tous les types de cellules malignes étudiés (carcinomes de divers localisations, mélanomes etc...). Du point de vue fonctionnel, il semble que l'augmentation de c-IAP2 masque une composante apoptotique dans les voies de signalisation activées par TLR3. En effet, dans plusieurs types tumoraux, notamment dans les cellules de CNP, on déclenche l'apoptose lorsqu'on combine la stimulation de TLR3 à l'inhibition de c-IAP2 (que cette inhibition soit réalisée par ARN-interférence ou par addition d'un inhibiteur pharmacologique, le RMT 5265). Le point de rencontre entre les signaux induits par TLR3 et ceux induits par c-IAP2 se

situe sans doute au niveau de la protéine RIP1 (Friboulet, Pioche-Durieu et al. 2008; Friboulet, Gourzones et al. 2010). Il a en effet été montré que la stimulation de TLR3 était susceptible de générer la formation d'un « complexe de mort » associant RIP1, FADD et la caspase 8 (Feoktistova, Geserick et al. 2011), et lié physiquement à TLR3 (Estornes, Toscano et al. 2012) ; l'ubiquitination de RIP1 par c-IAP2 entraîne sa dégradation, et bloque donc l'assemblage de ce complexe de mort (figure 9).

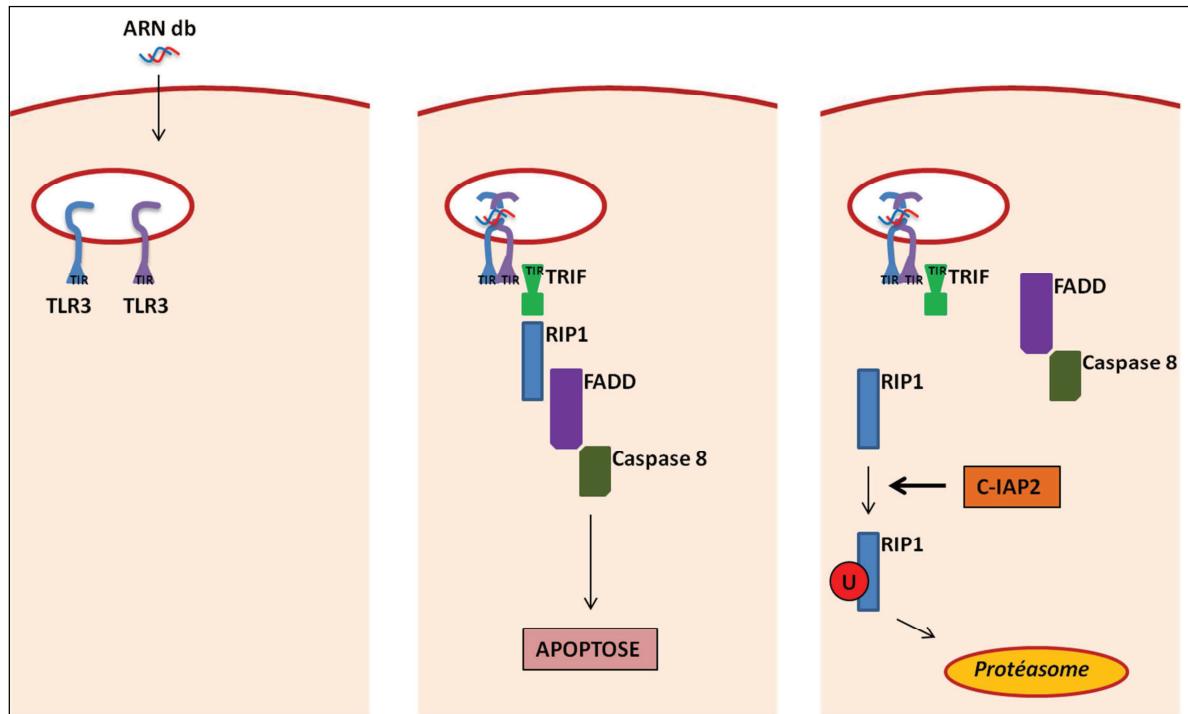


Figure 9. Signalisation proapoptotique médiée par TLR3

III Métabolisme des cellules cancéreuses

III.1 L'effet Warburg

La production d'énergie à partir du glucose repose sur des voies différentes selon que la cellule se trouve exposée à l'oxygène (on parle de conditions aérobie) ou non (conditions anaérobies). Le glucose capté par la cellule est dégradé par glycolyse : l'oxydation d'une molécule de glucose aboutit à la production de 2 molécules de pyruvate et de 2 ATP. En conditions aérobie, le pyruvate entre dans le cycle du citrate (ou cycle de Krebs) et permet, grâce à la phosphorylation oxydative effectuée par la chaîne respiratoire dans la mitochondrie, de générer environ 36 molécules d'ATP par molécule de glucose. En conditions anaérobies (ou en conditions aérobie lorsque le cycle du citrate est dépassé par l'excès de glucose) le pyruvate est oxydé avec production d'acide lactique : le

rendement énergétique est alors largement inférieur, puisqu'à partir d'une molécule de glucose, seuls 2 ATP sont produits. La production de lactate s'accompagne quant à elle d'une acidification du milieu.

L'effet Warburg correspond à la capacité des cellules cancéreuses d'adopter un métabolisme de type anaérobie, même en présence d'oxygène (Warburg, Posener et al. 1924). La phosphorylation oxydative ne disparaît pas complètement mais devient largement minoritaire. On estime que cette « glycolyse aérobie » permet de produire 4 ATP à partir d'une molécule de glucose (Vander Heiden, Cantley et al. 2009) (figure 10).

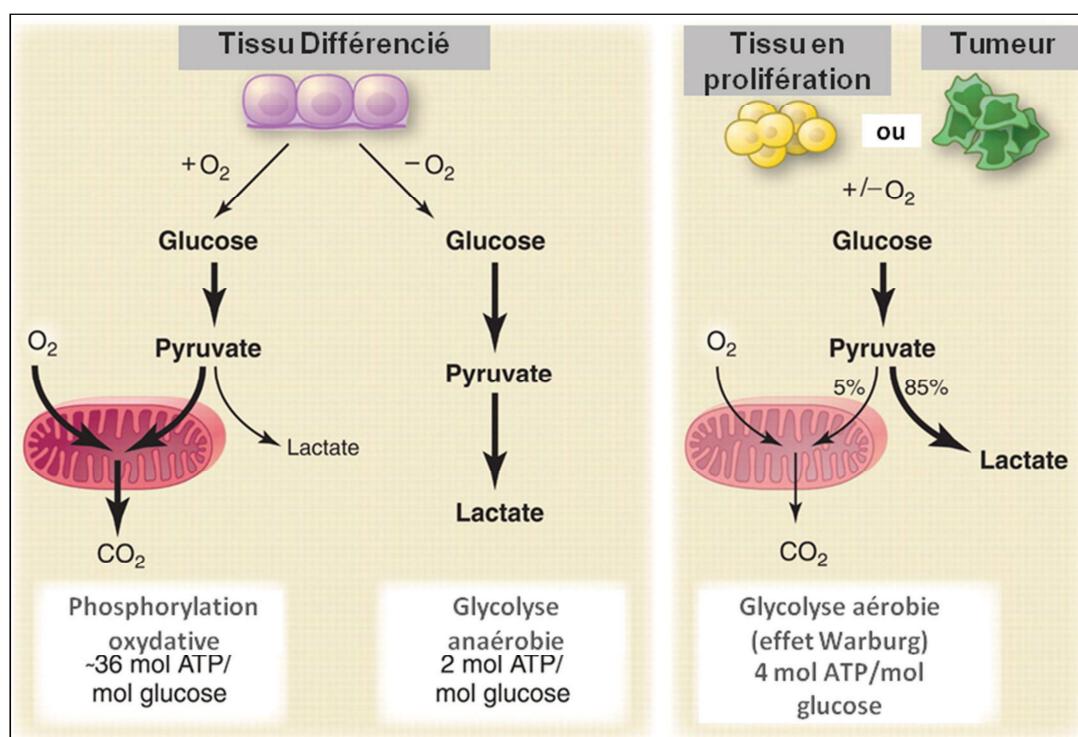


Figure 10. Rendement énergétique selon le type de glycolyse D'après Matthew et al. *Science* 2009;324:1029-33

Les cellules malignes doivent donc consommer une quantité importante de glucose pour subvenir à ses besoins énergétiques. Ce qui pourrait apparaître comme un facteur de vulnérabilité présente en fait plusieurs avantages pour la cellule tumorale (Kroemer and Pouyssegur 2008) : la possibilité de fonctionner en conditions anaérobies constitue un facteur de stabilité dans des tumeurs où les apports en oxygène sont souvent compromis par une néovascularisation anarchique et une hémodynamique perturbée (Pouyssegur, Dayan et al. 2006) ; l'acidification du milieu par les lactates favorise l'invasion tumorale (Koukourakis, Giatromanolaki et al. 2006; Swietach, Vaughan-Jones et al. 2007) ; enfin, les produits de cette glycolyse anaérobie sont utilisés pour des réactions anaboliques

permettant par exemple la synthèse d'acides nucléiques et des phospholipides nécessaires à la formation des membranes cellulaires (Gatenby and Gillies 2004).

L'un des éléments clés mis en jeu dans l'apparition de l'effet Warburg est le facteur de transcription HIF-1 α (Hypoxia Inducible Factor-1 α). La famille des facteurs de transcription HIF comprend 3 membres (HIF 1,2 et 3), constitués chacun par un hétérodimère d'une sous-unité α dont le niveau est régulé par le niveau d'oxygénation, et d'une sous-unité β de niveau stable quelles que soient les conditions d'oxygénation (Wang, Jiang et al. 1995). La sous-unité α est en effet produite constitutivement, mais dégradée en conditions normoxiques : l'hydroxylation de HIF-1 α par PHD2 (Propyl Hydroxylase Domain Protein 2) entraîne sa liaison à la protéine VHL (Von Hippel-Lindau) puis sa polyubiquitylation par une E3 ubiquitine-ligase et sa dégradation par le protéasome (Salceda and Caro 1997). En conditions hypoxiques, l'inhibition de l'hydroxylation permet l'accumulation de HIF-1 α , qui est alors transloqué dans le noyau et se lie à HIF-1 β pour activer la transcription des gènes cibles, caractérisés par la présence d'une séquence HRE (Hypoxia Response Element) dans leur promoteur. Parmi ces gènes cibles, il existe de nombreux gènes codant pour des protéines impliquées dans le métabolisme cellulaire, mais aussi dans la néoangiogénèse, ce qui revêt une importance particulière en pathologie cancéreuse. On peut en particulier citer VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), CA IX (Carbonic anhydrase IX), PKM (pyruvate kinase isoenzyme M2), et les transporteurs de glucose Glut1 et Glut3. Des liens entre l'expression de HIF et l'échappement immunitaire ont également été mis en évidence (Chouaib, Messai et al. 2012).

III.2 Hypoxie et carcinomes des VADS

Les carcinomes des VADS, qu'il s'agisse des CNP ou des CE des VADS, sont des tumeurs fréquemment hypoxiques, tant au niveau de la lésion primitive que des localisations secondaires ganglionnaires ou à distance (Nordström, Overgaard et al. 1996; Yeh, Liu et al. 1996). La forte consommation glucidique qui accompagne ce métabolisme de type anaérobiose est d'ailleurs le fondement de l'imagerie métabolique par TEP-TDM (Tomographie par Emission de Positons) au glucose marqué (18-Fluorodéoxyglucose), indiquée en première intention dans le bilan initial des CNP, et déjà très largement utilisée dans les CE des VADS. Il a été montré que la présence de zones hypoxiques au sein de la tumeur était un facteur de mauvaise réponse à l'irradiation, à la chimiothérapie, et plus généralement de mauvais pronostic global (Nordström, Overgaard et al. 1996; Hui, Chan et al. 2002; Koukourakis, Giatromanolaki et al. 2002; Karar and Maity 2009). L'impact de l'hypoxie sur l'effet des radiations ionisantes est connu de longue date (Gray, Conger et al. 1953). Par ailleurs, le défaut de vascularisation s'oppose à la diffusion des agents médicamenteux au sein de la tumeur, et s'accompagne de l'apparition de facteurs de résistance à la chimiothérapie (Comerford, Wallace et al. 2002; Munn 2003).

III.3 TLR3 et hypoxie

Les liens entre TLR3 et métabolisme hypoxique ont très peu été étudiés. A notre connaissance, seules 2 équipes ont rapporté leurs résultats dans le domaine de la cancérologie. Paone et al. ont montré dans un modèle de carcinome prostatique que la stimulation de TLR3 par des ligands artificiels permettait de stabiliser HIF-1 α et d'induire une synthèse accrue de VEGF (Paone, Galli et al. 2010). Tanja Matijevic et al ont publié en 2012 les résultats d'une étude des modifications protéomiques induites par la stimulation de TLR3 dans une lignée de CE des VADS (Matijevic and Pavelic 2012). Parmi les 15 protéines différemment exprimées, 10 étaient reliées au métabolisme cellulaire (et notamment PKM). Ces travaux, effectués au Rudjer Boskovic Institute de Zagreb, ont d'ailleurs suscité une collaboration avec notre équipe, et Tanja Matijevic a pu conforter certains de ses résultats à l'aide d'outils expérimentaux décrits dans la deuxième partie des résultats.

RESULTATS

Article 1

BMC INFECTIOUS AGENTS AND CANCER

“Toll-like receptor 3 in Epstein-Barr virus-associated nasopharyngeal carcinomas: consistent expression and cytotoxic effects of its synthetic ligand poly(A:U) combined to a Smac-mimetic”

PRESENTATION DE L'ARTICLE 1

Toll-like receptor 3 in Epstein-Barr virus-associated nasopharyngeal carcinomas: consistent expression and cytotoxic effects of its synthetic ligand poly(A:U) combined to a Smac-mimetic

Au cours de travaux antérieurs, l'équipe d'accueil avait analysé le profil transcriptionnel de plusieurs lignées tumorales de CNP et mis en évidence une surexpression du gène *BIRC3* codant la protéine c-IAP2. Les membres de l'équipe avaient alors émis l'hypothèse d'une dépendance des cellules de CNP vis-à-vis de c-IAP2, soit pour leur survie, soit pour leur prolifération. Cette hypothèse était notamment encouragée par une observation particulière. Dans les lignées xénogreffées de CNP C17, C19 et C66, on observait à la fois une réduction des allèles du gène *BIRC3* à une seule copie dans le cadre d'une perte d'hétérozygotie de la région chromosomique et une expression très forte de ce même gène *BIRC3*. Tout se passait comme si la cellule maligne de CNP devait à tout prix maintenir une expression forte de c-IAP2. Pour confirmer cette hypothèse, l'équipe a utilisé un inhibiteur pharmacologique des IAP, le RMT 5265, qui s'est avéré partiellement毒ique pour les cellules de CNP. Pour aller plus loin, l'équipe a tenu compte du fait que dans les souris KO pour *BIRC3* les monocytes ont une fragilité particulière vis-à-vis des agonistes de TLR4 (Conte, Holcik et al. 2006). Luc Friboulet et al. ont donc soumis les cellules de CNP à un traitement par le RMT 5265 combiné aux agonistes de différents TLR. Contrairement à ce qui était attendu, la combinaison la plus toxique fut la combinaison du RMT 5265 avec l'agoniste de TLR3 et non avec l'agoniste de TLR4. Des résultats similaires ont été obtenus avec un siRNA anti-c-IAP2 qui avait le pouvoir de sensibiliser *in vitro* les cellules de CNP à l'action des agonistes de TLR3 (Friboulet, Gourzones et al. 2010). Par la suite, Luc Friboulet a étendu ses conclusions à des lignées cellulaires sans surexpression permanente de c-IAP2, comme la lignée HeLa ou les lignées de carcinomes ovariens Skov3 et IGR/Ov1. Il a montré que l'expression de c-IAP2 augmentait sous l'effet d'une stimulation par un ligand de TLR3, et que la combinaison de ce ligand avec un inhibiteur de c-IAP2 était très cytotoxique (Friboulet, Gourzones et al. 2010).

Ces observations ont pris un intérêt particulier à la lumière des travaux de l'équipe de Kenzo Takada qui ont montré que les EBERs peuvent être des agonistes de TLR3 (Iwakiri, Zhou et al. 2009). La synthèse des données de l'équipe et des données publiées par Takada conduisait à penser que les cellules de CNP étant soumises à l'action permanente de ligands endogènes de TLR3, en l'occurrence les EBERs, elles devaient exprimer fortement c-IAP2 pour inhiber la cascade de signalisation pro-apoptotique déclenchée par TLR3. Cependant à mon arrivée dans l'équipe, plusieurs points restaient à clarifier sur ce sujet, notamment les deux points suivants : 1) personne n'avait encore vérifié l'expression de la protéine TLR3 par les cellules malignes de CNP ni dans les lignes xénogreffées, ni dans les biopsies fraîches ; 2) le poly(I/C) avait été utilisé dans tous les travaux de l'équipe comme

agoniste de TLR3 bien qu'on connaisse son manque de spécificité vis-à-vis de TLR3 (Perrot, Deauvieau et al. 2010).

Dans ce contexte, mes premiers travaux ont eu pour objectifs : 1) d'étudier l'expression de TLR3 dans les cellules de CNP ; 2) de vérifier qu'il y avait la même synergie dans l'induction de l'apoptose entre poly(A:U) et inhibiteurs de c-IAP2 qu'entre poly(I/C) et inhibiteurs de c-IAP2.

Un des résultats marquants a été le fait que même des concentrations très faibles de l'inhibiteur de c-IAP2, en présence de poly(A:U) ont un effet cytotoxiques très marqué avec une bonne spécificité puisque les cellules NP69 dérivées de l'épithélium nasopharyngé non-tumoral sont beaucoup moins affectées. Dans le cadre de ce travail, nous avons en particulier utilisé la lignée de CNP EBV-positive C17, propagée pour la première fois *in vitro* : le passage *in vitro* de cette lignée habituellement propagée sous forme de xénogreffe a été possible grâce à un protocole décrit par Liu et al (Liu, Ory et al. 2012), qui repose sur l'utilisation d'un feeder cellulaire et d'un inhibiteur de ROCK. La possibilité de manipuler C17 *in vitro* est particulièrement intéressante dans la mesure où il n'existe jusqu'à présent qu'une lignée de CNP EBV-positive propagée *in vitro*, C666-1.

RESEARCH ARTICLE

Open Access

Toll-like receptor 3 in Epstein-Barr virus-associated nasopharyngeal carcinomas: consistent expression and cytotoxic effects of its synthetic ligand poly(A:U) combined to a Smac-mimetic

Benjamin Véritaud^{1,2*}, Mélanie Gressette¹, Yannis Morel³, Carine Paturel³, Philippe Herman², Kwok Wai Lo⁴, Sai Wah Tsao⁵, Michel Wassef⁶, Anne-Sophie Jimenez-Pailhes¹ and Pierre Busson¹

Abstract

Background: Nasopharyngeal carcinomas (NPC) are consistently associated with the Epstein-Barr virus (EBV). Though NPCs are more radiosensitive and chemosensitive than other tumors of the upper aero-digestive tract, many therapeutic challenges remain. In a previous report, we have presented data supporting a possible therapeutic strategy based on artificial TLR3 stimulation combined to the inhibition of the IAP protein family (Inhibitor of Apoptosis Proteins). The present study was designed to progress towards practical applications of this strategy pursuing 2 main objectives: 1) to formally demonstrate expression of the TLR3 protein by malignant NPC cells; 2) to investigate the effect of poly(A:U) as a novel TLR3-agonist more specific than poly(I:C) which was used in our previous study.

Methods: TLR3 expression was investigated in a series of NPC cell lines and clinical specimens by Western blot analysis and immunohistochemistry, respectively. The effects on NPC cells growth of the TLR3 ligand poly(A:U) used either alone or in combination with RMT5265, an IAP inhibitor based on Smac-mimicry, were assessed using MTT assays and clonogenic assays.

Results: TLR3 was detected at a high level in all NPC cell lines and clinical specimens. Low concentrations of poly(A:U) were applied to several types of NPC cells including cells from the C17 xenograft which for the first time have been adapted to permanent propagation *in vitro*. As a single agent, poly(A:U) had no significant effects on cell growth and cell survival. In contrast, dramatic effects were obtained when it was combined with the IAP inhibitor RMT5265. These effects were obtained using concentrations as low as 0.5 µg/ml (poly(A:U)) and 50 nM (RMT5265).

Conclusion: These data confirm that TLR3 expression is a factor of vulnerability for NPC cells. They suggest that in some specific pathological and pharmacological contexts, it might be worth to use Smac-mimetics at very low doses, allowing a better management of secondary effects. In light of our observations, combined use of both types of compounds should be considered for treatment of nasopharyngeal carcinomas.

Keywords: Toll-Like Receptor 3, Nasopharyngeal cancer, Epstein-Barr virus, Poly(A:U), Smac-mimetic, Inhibitor of Apoptosis Protein

* Correspondence: benjamin.verillaud@noos.fr

¹CNRS-UMR 8126, Institut de Cancérologie Gustave Roussy, University Paris-Sud 11, 39 rue Camille Desmoulins, 94805, Villejuif cedex, France

²Department of Head and Neck surgery, Lariboisière Hospital, AP-HP, University Paris-Diderot Paris 7, Paris, France

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

Background

The TLRs are type-I transmembrane proteins which play a key role in the detection of pathogens and in triggering inflammation and immune response to microbial infections [1]. The stimulation of TLRs by their respective ligands initiates well-characterized signaling cascades that enhance cellular resistance against pathogens. TLRs are expressed not only by immune cells, but also by various cell types including normal and malignant epithelial cells [2,3]. TLR3 is one category of TLR which interact specifically with double-stranded RNA (dsRNA) of viral origin. This binding leads in turn to MAPKs, NF- κ B and IRF-3 activation and to IFN- α induction via the adaptor proteins TRIF and RIPK1 [1,4-6]. Activation of these pathways results in the establishment of an anti-viral phenotype. Many additional changes are induced by TLR3 stimulation. Their overall consequences are dependent on the intensity of the stimulation, on the cell context and on concomitant extra-cellular signals. Depending on these conditions, they can result in apoptotic cell death as well as enhancement of proliferation [7-10].

Nasopharyngeal carcinoma (NPC) is a malignant tumor arising from the epithelial lining of the nasopharynx. Consistently associated with the Epstein-Barr virus (EBV), NPC is the third most frequent virus-associated malignancy in humans [11,12]. Foci of high incidence (25 cases per 100,000 individuals per year) are localized in South-East Asia, especially in the Guangdong and Guangxi provinces of Southern China. There are also large areas of intermediate incidence (3 to 8 cases) in South-East Asia (Indonesia) and Northern Africa (Tunisia, Algeria and Morocco) [12]. The multifactorial pathogenesis of NPC relies on germ-line genetic susceptibility, acquired cellular genetic and epigenetic alterations - especially under the influence of diet carcinogens - and EBV infection [12-14]. Although most viral genes are silent in NPC cells, some are consistently expressed including those encoding the nuclear protein EBNA1 (Epstein-Barr Nuclear Antigen 1), two membrane proteins named LMP1 and LMP2 (Latent Membrane Proteins 1 and 2) and the short untranslated RNAs EBER1 and EBER2. Of the very large amounts of EBERs produced and present in the nuclei of NPC cells, some are exported in the cytoplasm and possibly in the extra-cellular space [15]. Local inflammation is also suspected to play a major role in NPC cell growth because of the consistent presence of a massive lymphoid infiltrate in the primary tumor and the intense local production of inflammatory cytokines [16,17]. Surprisingly, to our knowledge, there has been no report so far about the expression of TLR3 in EBV-related nasopharyngeal carcinomas.

In a previous publication, we have reported that malignant NPC cells are highly sensitive to a treatment combining a TLR3 artificial ligand (poly(I:C)) and a Smac-mimetic, RMT5265 which inhibits several proteins of the IAP family

(Inhibition of Apoptosis Proteins; namely c-IAP1, c-IAP2 and XIAP) [18]. However poly(I:C) is not strictly specific of TLR3; it interacts with other cellular receptors of double-strand RNAs, especially RIG-I and MDA5 [19]. This lack of specificity might result in undesirable side-effects when used in humans. Therefore, we undertook to investigate the anti-tumoral effects of poly(A:U) in the same experimental context. Poly(A:U) is a TLR3 agonist which does not interact with RIG-I and MDA5 and which is believed to be better tolerated in medical use [19].

The aims of the present study were to confirm the expression of the TLR3 protein in NPC cells and to assess their sensitivity to poly(A:U) as a single agent and in combination with RMT5265. We report that TLR3 is consistently detected in all investigated NPC cell lines and specimens. We also show that various NPC cell lines are exquisitely sensitive to this combined treatment in both high density cultures and clonogenic assays.

Materials and methods

Xenografts and cell lines

The following NPC cell lines were used throughout the study: C666-1, C15, C17, C18 (EBV positive cell lines), CNE1 and HONE1 (EBV negative cell lines). A panel of non-NPC epithelial malignant and non malignant cell lines was used as control for TLR3 expression assessment: FaDu and SQ20B (head and neck squamous cell carcinoma, HNSCC), HeLa (cervical carcinoma), A431 (vulvar squamous carcinoma), A549 (non-small cell lung cancer), C33 and CaSki (cervical carcinomas), NP69 and NP460 (derived from non-malignant nasopharyngeal epithelial cells immortalized by SV-40 infection and stable transfection of the gene encoding the telomerase catalytic subunit hTert, respectively) [20-26]. The non-malignant nasopharyngeal NP69 cell line was also used as a control for proliferation assays.

C666-1 cells are EBV-positive NPC cells which have been grown for a long time either as xenografted tumors or *in vitro* cultures [27]. Through this study, we used C666-1 cells stably transfected with the luciferase 1 gene which were kindly provided by Dr Fei-Fei Liu (university of Toronto, Ontario, Canada) [27,28]. These cells retain the EBV genome and intense expression of the EBER viral non-coding RNAs (see the result section). Because the luciferase gene is very stable in these cells both *in vitro* and *in vivo*, it allows *in vivo* imaging of the xenografted tumors. Therefore, we chose to use them from the beginning in anticipation of future *in vivo* studies about the effects of TLR3 agonists on NPC cells. C666-1 cells were routinely propagated *in vitro* using RPMI 1640 medium (Gibco-Invitrogen, Carlsbad, CA) supplemented with 25 mM HEPES and 7.5% fetal calf serum (FCS), in plastic flasks coated with collagen I (Biocoat; Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ). C15,

C17 and C18 are EBV-positive NPC xenografts propagated by subcutaneous passages into nude mice [29]. For a long time, it has not been possible to derive long-term *in vitro* cultures from any of these three xenografts. However, we recently adapted C17 cells to permanent *in vitro* propagation using a protocol inspired from Liu et al. [30]. Briefly, C17 xenografted tumors were minced and treated with type II collagenase for cell dispersion as previously reported [16]. Cells were then plated on a non-irradiated feeder layer of Normal Human Dermal Fibroblasts (NHDF; Promocell, Heidelberg, Germany) and grown in RPMI 1640 medium (Gibco-Invitrogen) supplemented with 25 mM HEPES, 7.5% fetal calf serum (FCS), and 7 µmol/L of the Rho kinases I and II inhibitor Y-27632 (Y-27632; Enzo Life Sciences, Lausen, Switzerland) [31]. Feeder cells became rapidly senescent. Most of them were already eliminated beyond the third *in vitro* passage. For cytological analysis, C17 cells were stained with hematoxilin and eosin safran (HES) after cytocentrifugation preparation. Detection of the EBERs by *in situ* hybridization on C666-1, HeLa, and C17 cell pellets was performed using the INFORM EBER Probe (Ref 800-2842) and the ISH iVIEW Blue Detection Kit (Ref 800-092) from Ventana-Roche (Tucson, AZ). EBV-negative cell lines CNE1 and HONE1 were grown in RPMI 1640 medium (Gibco-Invitrogen) supplemented with 5% FCS [32,33]. NP69 cells were grown in keratinocyte serum-free medium (Gibco) supplemented with 10% FCS.

Clinical specimens and immunohistochemistry

Biopsies were obtained from 10 patients referred to the Lariboisière hospital (Paris, France). All patients had non-keratinizing undifferentiated (or type III) NPC according to the WHO classification (2005). Biopsies were fixed in formaldehyde and paraffin-embedded. Tissue sections were microwaved at 98°C for 30 minutes in citrate buffer (10 mM, pH 7.3) and then incubated with an antihuman TLR3 mouse monoclonal antibody (40 F9.6, Innate Pharma, Marseille). Binding of the primary antibody was detected with the CSA II kit from Dako (based on a tyramide amplification system; DakoCytomation, Glostrup, Denmark). C666-1 and NP69 cell pellets embedded in paraffin were used for positive and negative control of TLR3 immunostaining. All the clinical samples were obtained and processed according to the guidelines of Lariboisière hospital institutional review board, requiring written informed consent from patients for publication.

Treatments of cells with pharmacological reagents

The polycyclic C2-symmetric (40 carbon atoms) compound RMT5265 mimics the three-dimensional structure of the N-terminal tetrapeptide of Smac/Diablo (second mitochondria-derived activator of caspases) [34]. This compound was kindly provided by Xiaodong Wang,

Dallas. It was dissolved in DMSO. The TLR3 agonists - poly(I:C) and poly(A:U) - were obtained from InvivoGen (San Diego, CA). Cisplatin was purchased from Sigma Aldrich (St. Quentin Fallavier, France).

Cell growth and viability assays

Cell viability was determined in a short-term assay based on the reduction of MTT (CNE1, HONE1, NP69, C17) or WST (a soluble form of MTT; C666-1). MTT and WST were purchased from Sigma Aldrich. For this assay, cells were seeded in 96-well plates at a density of 2×10^3 (CNE1, HONE1, NP69) or 3×10^4 (C666-1, C17) cells per well. The MTT/WST reaction was performed after 72 hours of culture. The absorbance (Optical Density (OD)) was measured at 550 nm and 450 nm for MTT and WST assays, respectively. The percentage of inhibition was determined based on the difference of OD between treated and untreated cells, after subtraction of the optical background.

Alternatively, *in vitro* growth assays at low density were performed to evaluate the clonogenic potential of NPC cells. HONE1, CNE1 and NP69 cells were plated in six-well plates (5×10^2 cells per well) and treated at day 1 with RMT5265 and/or poly(I:C) / poly(A:U). After 2 weeks of culture, cell colonies were stained with a solution of Crystal Violet (Sigma Aldrich) in methanol. The clonal growth of C666-1 NPC cells was assessed using a feeder layer of Normal Human Dermal Fibroblasts (NHDF, Promocell). The first day of clonogenic assay, NHDF were plated in six-well plates (1.5×10^5 per well). 24 hours later, they were irradiated (40 Gy) and C666-1 NPC cells were added at a density of 5×10^3 cells per well. After 24 hours, once the epithelial cells had firmly adhered to the plate, RMT5265 and/or poly(I:C) / poly(A:U) were added to the culture medium. Replacement by fresh medium was done once a week. After 2 to 4 weeks of culture, cell colonies were stained with a solution of Rhodanile Blue (Sigma Aldrich) in ethanol. Dried plates were then scanned and digitized to allow optical magnification and precise counting of cell colonies.

We used the Bliss additivity model to quantify the level of synergy in our drug-combination experiments [35]. The predictive Bliss additive effect C of two single compounds with effects A and B is: $C = A + B - A \cdot B$. The excess over Bliss additivity (EOBA) was calculated by subtracting the predicted Bliss additive effect from the experimentally observed inhibition. It is expressed as a percentage, and represents the excess of inhibition over the predicted response that was obtained when 2 compounds were used in combination.

Assessment of PARP cleavage

Apoptosis was evaluated by the detection of the cleavage of poly(ADP-ribose)polymerase (PARP) by Western blot

analysis performed on total cell protein extracts (see next paragraph).

Cell protein extraction and western blot analysis

Proteins from cultured cells or xenografts were extracted by lysis in RIPA buffer (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.5% sodium deoxycholic acid, 0.5% NP-40, 0.1% SDS) supplemented with a protease inhibitor cocktail (Complete; Roche Molecular, Neuilly sur Seine, France). They were separated by SDS-PAGE and transferred to polyvinylidene difluoride membranes (Immobilon, Millipore, Billerica, CA) by electroblot at 4°C for 90 minutes at 90 V or overnight at 45 V. The antibodies used for Western blot analysis were mouse monoclonal antibodies directed against the human TLR3 (clone 512505, ref. MAB1487, R&D Systems), PARP (C-2-10, ref. 53643; Santa Cruz Biotechnology), β-Actin (AC-74; Sigma Aldrich) and α-Tubulin (B-5-1-2; Sigma Aldrich). Blotted membranes were incubated with a secondary peroxidase-conjugated antibody, and chemiluminescent detection was done using the Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore, Billerica, CA). Specific protein bands were quantified using Image-Quant TL software (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden) when the acquisition was performed with ImageQuant LAS 4000 mini biomolecular imager (GE Healthcare Bio-Sciences AB), and a GS-710 calibrated imaging densitometer with Quantity One software (Biorad, Marnes la Coquette, France) when detection was performed on chemiluminescence films.

Results

TLR3 is constitutively expressed by NPC cells

We investigated expression of TLR3 by western blot analysis in cell extracts from EBV-positive NPC tumor cells propagated *in vitro* (C666-1) or as xenografts (C15, C17, C18, C666-1) and in EBV-negative HONE1 and CNE1 cell lines comparatively to a panel of malignant and non malignant epithelial cell lines. Malignant cell lines were derived from HNSCC (SQ20B, FaDu), colon carcinoma (SW613), cervical carcinoma (HeLa, C33, CaSki), vulvar squamous carcinoma (A431), and non-small cell lung cancer (A549). NP69 and NP460 are immortalized non-tumorigenic cell lines derived from human nasopharyngeal epithelial cells. As shown in Figure 1A and 1B, TLR3 was consistently detected in NPC cell lines and xenografts, either EBV-positive (Figure 1A) or EBV-negative (Figure 1B). Its abundance was at a maximal level in extracts from NPC cells and xenografts followed by extracts from HNSCC cells (SQ20B and FaDu); in contrast, TLR3 was undetectable or at a low level in extracts from other carcinoma cells or from non-tumorigenic nasopharyngeal epithelial cells (Figure 1C). Modest levels of TLR3 were detected in CaSki and A431 malignant cell-lines, and in the non malignant nasopharyngeal cell-line NP460. On the other hand, we analyzed the *in situ* expression of TLR3 by immunohistochemistry in ten biopsies from primary NPC tumors. Positive and negative controls were C666-1 and NP69 cell pellets, respectively (Figure 2A). The TLR3 protein was consistently detected in NPC biopsies. In six out of ten specimens, most malignant cells were positive. In contrast, TLR3 staining was

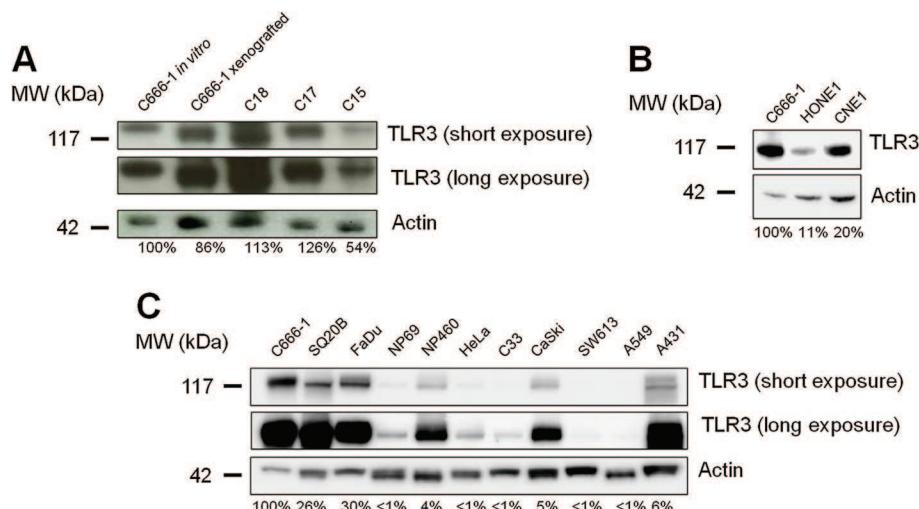


Figure 1 TLR3 is highly expressed in NPC cell lines and xenografts. Western blot analysis reveals intense expression of TLR3 in EBV-positive C666-1, C18, C17 and C15 xenografts/cell lines (A), and in EBV-negative HONE1 and CNE1 NPC cell lines (B). To better characterize the status of TLR3 in NPC cells, its expression was simultaneously assessed in C666-1, in the non NPC head and neck squamous cell carcinoma cell lines SQ20B and FaDu, and in a panel of non malignant and malignant epithelial cell-lines, namely NP69 and NP460 (non tumorigenic immortalized nasopharyngeal cell lines), HeLa, C33 and CaSki (cervical carcinoma), SW613 (colon carcinoma), A549 (non-small cell lung cancer), and A431 (vulvar squamous carcinoma) (C). The same blotted membranes were stained with anti-actin for protein loading controls.

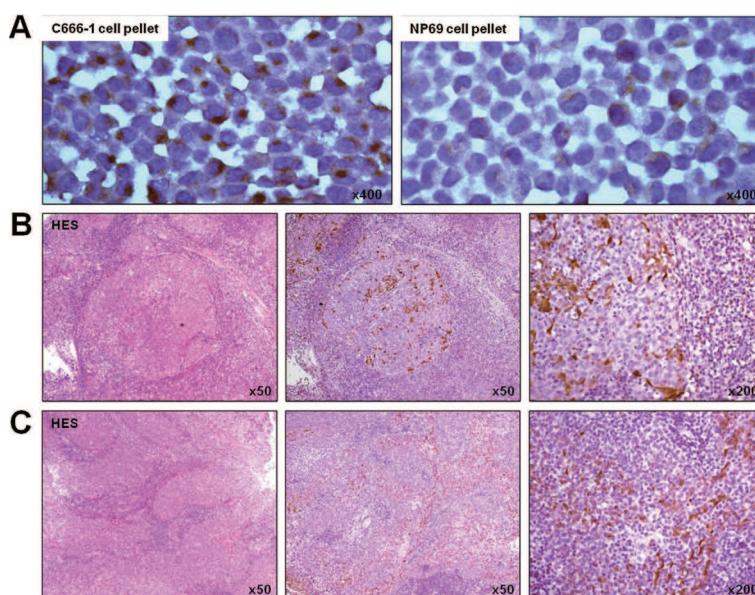


Figure 2 TLR3 is consistently detected by immunohistochemistry on tissue sections from NPC biopsies. (A) C666-1 and NP69 cell pellets were used as positive and negative controls for TLR3 immunostaining, respectively; note the strong juxtanuclear staining in C666-1 cells (suggestive of endosomal TLR3 localization) and the low level of staining in NP69 cells, consistent with western blot data displayed in figure 1C. (B,C) NPC biopsy sections (B = patient#6; C = patient#8) were stained with hematoxilin and eosin safran (HES), or immunostained with antihuman TLR3 antibody (40 F9.6, Innate Pharma, Marseille). TLR3 was detected in all biopsies in a substantial fraction of cells, although with heterogeneous levels of intensity.

absent or weaker in stromal cells and tumor infiltrating lymphocytes. In the remaining four specimens, only a fraction of malignant cells scored positive, again with absence of staining or very low staining of infiltrating cells (Figure 2B, 2C and Table 1).

The TLR3 agonist poly(A:U) and the Smac mimetic RMT5265 have synergistic cytotoxic effects on NPC cells

In a previous study, we reported the antiproliferative effects of a combination of the synthetic TLR3 agonist poly(I:C) and the Smac-mimetic RMT5265 on various types of malignant epithelial cells including NPC cells [36]. However, as already mentioned, poly(I:C) is known to stimulate not only TLR3, but also MDA5 and RIG-I, two cytoplasmic receptors of dsRNAs [19]. This is not the case for another TLR3 agonist, poly(A:U) [19]. Therefore, both TLR3 agonists were used, either alone or in combination with a Smac-mimetic (RMT5265), to assess their cytotoxic effects on NPC cells. Target cells were NPC cell lines (C666-1, HONE1 and CNE1) and non-malignant nasopharyngeal epithelial cells (NP69). They were treated for 72 hours with pharmaceutical agents used at low concentrations, ie less than 1 µg/mL for TLR3 agonists and 50 nM for RMT5265, and cell viability was subsequently assessed with WST/MTT assays. Poly(A:U) and poly(I:C) had similar cytotoxic effects on NPC cells when used in combination with the Smac-mimetic RMT5265 (Figure 3A). For example, in

C666-1 cells, concentrations of RMT5265 as low as 5nM combined to poly(I:C) or poly(A:U) (0.5 µg/ml) were sufficient to achieve major cytotoxic effects. The combination of poly(A:U) with cisplatin, namely the most widely used pharmacological agent in NPC treatment, revealed by contrast no more than an additive effect (data not shown). The TLR3 agonist/Smac-mimetic

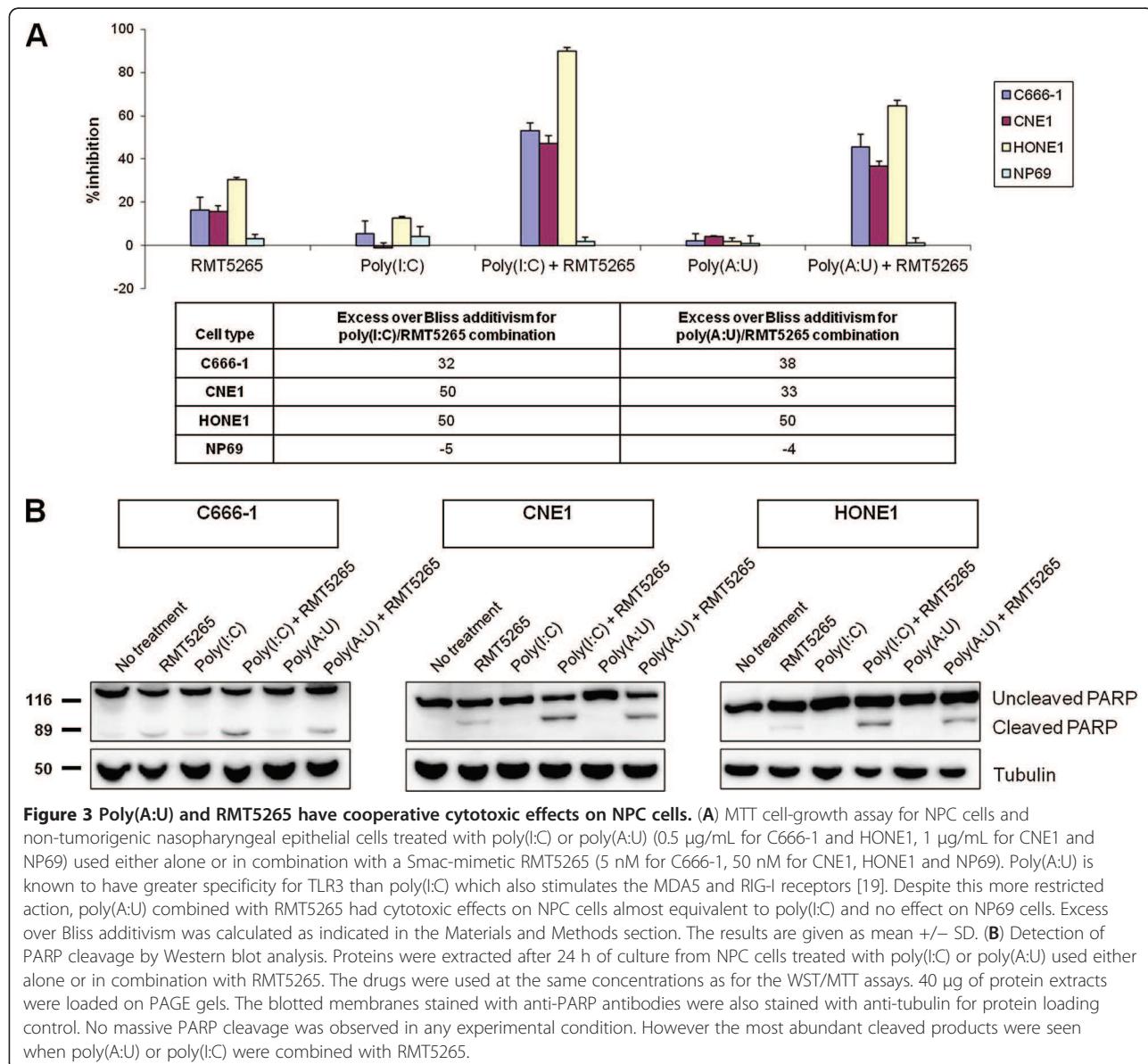
Table 1 Detection of the TLR3 protein by immunohistochemistry on tissue sections from NPC biopsies

Patient N°	Origin	Gender/age	Clinical stage	TLR3 staining	
				Distribution	Intensity
1	Tunisia	M/48	T4N3bM1	Homogeneous	Faint
2	Romania	F/34	T2bN0M0	Heterogeneous	Moderate
3	Cameroon	M/62	T4N2M0	Heterogeneous	Moderate
4	France	M/63	T4N0Mx	Homogeneous	Strong
5	France	M/62	T3N2M0	Heterogeneous	Strong
6	Portugal	F/84	T4N2M0	Heterogeneous	Strong
7	Algeria	M/40	T4N2M0	Homogeneous	Faint
8	Turkey	M/57	T1N0M0	Homogeneous	Moderate
9	China	F/31	T4N0M0	Homogeneous	Moderate
10	France	M/48	T1N2M0	Homogeneous	Faint

All specimens were of the non-keratinizing undifferentiated histologic subtype of the WHO classification (2005).

Images for cases 6 and 8 are displayed in Figure 2.

M0 indicates absence of extranodal metastases; M1, presence of extranodal metastases at the time of diagnosis; Mx, no assessment of distant metastases.



combination had no effect on NP69 non malignant nasopharyngeal epithelial cells (Figure 3A). To evaluate the contribution of apoptosis to the cytotoxic effects of the TLR3 agonists/Smac-mimetic combinations, PARP cleavage was assessed in treated cells. Malignant cells were exposed for 24 hours to poly(I:C)/poly(A:U) and/or RMT5265 at concentrations similar to those used for survival assays. No massive PARP cleavage was observed in any experimental condition, suggesting that the cytotoxic effects of treatment by single agents or combinations of two agents were only partially accounted for by apoptosis (Figure 3B). Nevertheless, a PARP cleavage of low intensity was detected in NPC cells treated with RMT5265 as a single agent. This cleavage was substantially enhanced when RMT5265 was combined to poly(A:U) or poly(I:C).

Additional investigations were subsequently performed on C17 cells. These EBV-positive NPC cells which have been propagated as xenografts for many years were recently adapted to permanent *in vitro* propagation in our laboratory using a protocol described by Liu et al. (see Materials and Methods sections) [30]. This protocol which is proposed for primary cultures of a wide range of epithelial cell types, either malignant or non-malignant, has two main characteristic features: use of a feeder layer of non-transformed fibroblasts and addition of a Rho kinase inhibitor (Y-27632) to the culture medium. After the third *in vitro* passage of the C17 cells, we observed that the feeder layer was no longer required. In contrast, any attempt to withdraw the Rho kinase inhibitor resulted in a very rapid growth arrest (Figure 4A).

The morphological aspect of C17 cells under optical microscopy is displayed in Figure 4B. The kinship of C17 cells propagated *in vitro* with C17 xenograft was confirmed by genotyping of HLA-A (HLA-A*02, *26) and HLA-B (HLA-B*44, *51) alleles. The EBV status of C17 cells propagated *in vitro* was assessed by EBERs hybridization on C17 cell pellets embedded in paraffin. HeLa and C666-1 cell pellets were used as negative and positive control, respectively. EBERs hybridization was positive, confirming that C17 cells retained the EBV genome when they were propagated *in vitro* (Figure 4C). Like all other NPC cells, C17 cells propagated in the presence of Y-27633 were exquisitely sensitive to the combination of TLR3 agonists with RMT5265 as shown by MTT assays (Figure 4D).

Finally, we assessed the effects of the poly(A:U)/RMT5265 combination on NPC cells clonogenic growth: concordantly with previous results, this therapeutic combination strongly inhibited the clonal growth of NPC cells, and had no effect on NP69 cells (Figure 5).

Discussion

TLR3 overexpression has been reported in a number of human malignancies, such as melanoma, breast cancer, clear cell carcinoma, neuroblastoma, or head and neck squamous cell cancer [2,37-40]. To our knowledge, this is the first report of TLR3 expression in EBV-related NPC. The fact that TLR3 is strongly expressed by malignant NPC cells *in vitro* suggests that its expression is not a consequence of intra and peritumoral inflammation but is a constitutive feature of NPC cell phenotype. However, its expression is probably modulated by the tumor microenvironment. Investigations on tissue sections show that, in some fresh tumors *in situ*, TLR3 expression is homogeneous through all malignant cells whereas in some other tumors it is restricted to a subset of malignant NPC cells. Additional investigations will be required to determine whether TLR3-positive and TLR3-negative cells have distinct features in terms of proliferation and cell cycling, adaptation to hypoxia or influence of immune infiltrating cells.

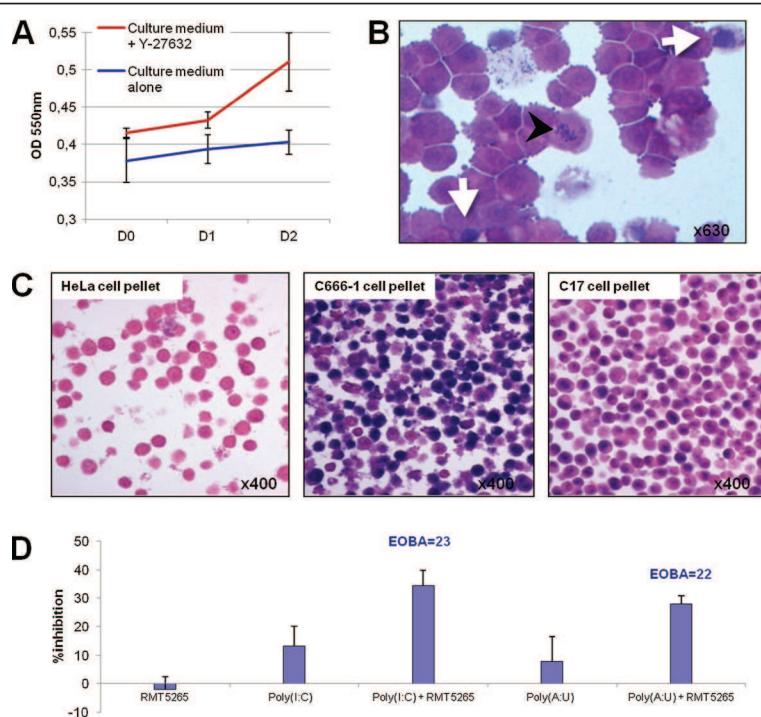
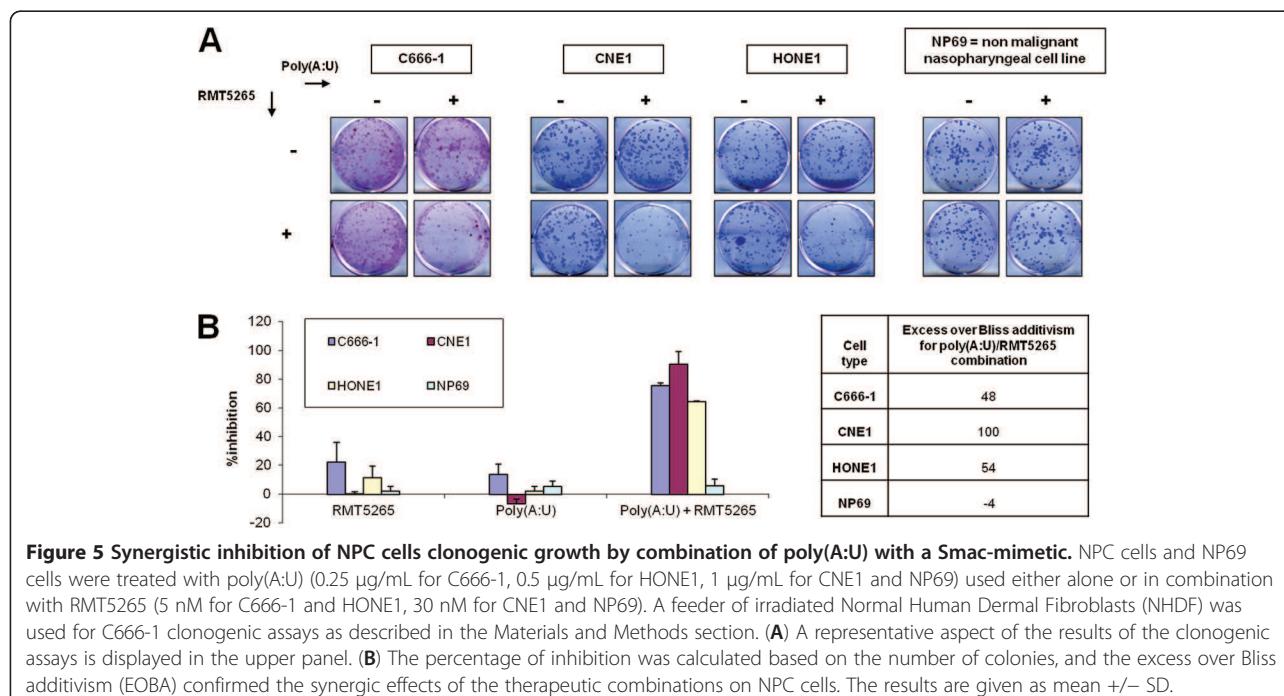


Figure 4 *In vitro* propagation of C17 cells and sensitivity to TLR3 agonists combined to RMT5265. C17 NPC cells were dispersed from xenografted tumors and their propagation *in vitro* was made possible for the first time by adding a Rho kinase inhibitor (Y-27632) to the culture medium. (A) MTT assay was used to determine the growth characteristics of C17 cells cultured in media containing the Rho kinase inhibitor Y-27632 or not. (B) Morphological aspect of C17 cells propagated *in vitro* under optical microscopy. The aspect of some cells is evocative of mitosis (black arrowheads) and apoptosis (white arrows). C17 cells were stained with H&E after cytocentrifuge preparation (passage 5 *in vitro*). (C) The positive EBV status of C17 cells was confirmed by EBERs hybridization, using HeLa and C666-1 cell pellets as negative and positive control, respectively. (D) MTT cell-growth assay on C17 cells treated with poly(I:C) or poly(A:U) (0.25 µg/mL) used either alone or in combination with the Smac-mimetic RMT5265 (200 nM). Excess over Bliss additivism (EOBA) confirms the synergic effects of these combinations. The results are given as mean +/- SD.



The fact that TLR3 is consistently expressed by NPC cells suggests that it plays a role in NPC tumour growth. There are several potential natural endogenous ligands for TLR3 in NPC tumors. EBER RNAs are the first candidates. These viral non-coding RNAs are extremely abundant in NPC cells as in other types of latently EBV-infected cells; most of them are contained in the nucleus but a fraction of them can diffuse to the cytoplasm and the extra-cellular medium. In EBV-transformed B-lymphocytes, these extra-nuclear EBERs have been shown to bind TLR3 and to induce the production of inflammatory cytokines [41]. In NPC cells, the EBERs are known to induce the production of Insulin Growth Factor 1 (IGF1) which is itself an autocrine growth factor for NPC cells [42]. There is a suspicion that this effect is mediated, at least in part, by TLR3 [43]. That point will deserve further investigations. Beside the EBER RNAs, there are other potential ligands of TLR3 in tumor tissues. Messenger RNAs released by necrotic cells are known to bind and stimulate TLR3 probably as a consequence of the formation of secondary structures containing double strand domains [44,45]. The influence of necrotic messenger RNAs on NPC cell growth will also deserve investigations.

In an apparent paradox, several *in vitro* studies have underlined the potential of TLR3 as a therapeutic target for various types of human malignant cells [2,37,46,47]. However, the cytotoxic effects of TLR3 stimulation in the absence of another pharmacological agent, usually require extremely high concentrations of agonists, for example 10 to 100 µg/ml of poly(I:C). More recently, we

and others have shown that it is possible to achieve a cytotoxic effect with much lower concentrations of poly(I:C) (in the range of 1 µg/ml) provided that the TLR3 agonist is combined with a Smac-mimetic [18,36,48]. Recently, the molecular rationale of this combination has been partially understood. Feoktistova et al. have described the "Ripoptosome", an intracellular signaling platform containing caspase 8, caspase-10, RIPK1, FADD, and FLIP isoforms (short isoform FLIP-S or long isoform FLIP-L) that regulates cell death by apoptosis or programmed necrosis (necroptosis) in response to TLR3 ligands [48,49]. In this model, the c-IAPs prevent the formation and stabilization of the ripoptosome by ubiquitination and subsequent proteasomal degradation of a fraction of RIPK1 whereas FLIP-L inhibits the entry of RIPK1 and FADD into the ripoptosome following TLR3 stimulation. According to this model, the inhibition of the c-IAPs is believed to promote TLR3-induced cell death, either by caspase 8-mediated apoptosis or by RIPK1-RIPK3-mediated necroptosis, depending on the pre-existing levels of FLIP-S and FLIP-L.

In this study, we report that the combination of the poly(A:U) with the Smac-mimetic is as efficient as the combination involving poly(I:C). We also demonstrate that extremely low concentrations of both compounds - below 1 µg/mL for poly(A:U) and 50 nM for RMT5265 - are sufficient to achieve a significant cytotoxic effect. These data have important practical implications because poly(A:U) has distinctive characteristics which might be better suited for some patients than poly(I:C). It has a higher specificity for TLR3 and is believed to induce less

systemic inflammatory effects [19]. It has already been evaluated in association with standard treatment in 5 phase III clinical trials [50–54]. Salaun et al. have reported that adjuvant treatment with poly(A:U) was associated with a significant decrease in the risk of metastatic relapse in TLR3 positive breast cancers [37]. In summary our data might have important implications not only for NPC treatment but also for other malignancies.

Conclusion

We report that TLR3 is consistently expressed by malignant cells in NPC cell lines and clinical specimens. Low concentrations of the specific TLR3 agonist poly(A:U) combined to low concentrations of an IAP inhibitor have cytotoxic effects on NPC cells. These data confirm that TLR3 expression is a factor of vulnerability for NPC cells as it is the case for other head and neck carcinomas [40,55]. Additional investigations will be required to understand which type of growth advantage is associated with the consistent expression of TLR3 by NPC cells.

Abbreviations

NPC: Nasopharyngeal carcinoma; HNSCC: Head and neck squamous cell carcinoma; TLR3: Toll-like receptor 3; RIG-I: Retinoic acid inducible gene I; PKR: Protein kinase R; Smac: Second mitochondria-derived activator of caspases; c-IAP: Cellular inhibitor of apoptosis Xprotein; XIAP: X-linked inhibitor of apoptosis protein; FLIP-L: Long isoform of the FLICE-like inhibitory protein.

Competing interests

YM and CP are employed by Innate Pharma, a company developing a TLR3 agonist. All other authors certify that they have no conflict of interest.

Authors' contribution

BV and MG have performed most of the experiments. ASJP carried out NPC xenografts and shared her expertise in cell culture and Western blot analysis. YM and CP contributed the antihuman TLR3 mouse monoclonal antibody (40 F9.6, Innate Pharma, Marseille) for detection of TLR3 by immunohistochemistry. MW and PH have provided pathological samples for immunohistochemistry. MW, BV and PB have analyzed and interpreted stained tissue sections. KWL has provided the C666-1 cell line. SWT has provided the NP460 and NP69 cell lines. BV and PB designed the study, and drafted the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

This work was supported by a grant from the "Fondation Gustave Roussy" (Research on Head and Neck tumors, 2011) and the Ligue Nationale contre le Cancer (comité du Val de Marne). BV was the recipient of a fellowship from the Institut National du Cancer (FOR – 2010-INCa_3113) and from the APHP-CNRS (RAFCNR11). We thank Dr Fei-Fei Liu (University of Toronto, Ontario, Canada) and Pr Xiaodong Wang (University of Texas, Dallas, USA) for generous gift of the C666-1 cells [27,28] and RMT5265 compound [34] respectively.

Author details

¹CNRS-UMR 8126, Institut de Cancérologie Gustave Roussy, University Paris-Sud 11, 39 rue Camille Desmoulins, 94805, Villejuif cedex, France.

²Department of Head and Neck surgery, Lariboisière Hospital, AP-HP, University Paris-Diderot Paris 7, Paris, France. ³Innate Pharma, Marseille, France. ⁴Department of Anatomical and Cellular Pathology, State Key Laboratory in Oncology in South China, Prince of Wales Hospital, The Chinese University of Hong Kong, Ma Liu Shui, Hong Kong. ⁵Department of Anatomy, the University of Hong Kong, Pok Fu Lam, Hong Kong.

⁶Department of Pathology, Lariboisière Hospital, AP-HP, University Paris-Diderot Paris 7, Paris, France.

Received: 18 September 2012 Accepted: 20 November 2012

Published: 3 December 2012

References

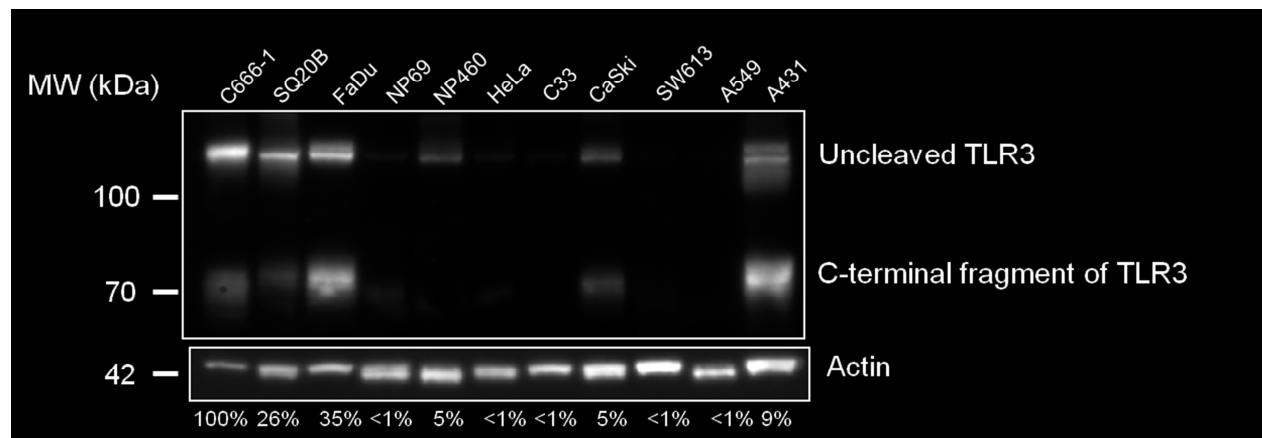
- Kanzler H, Barrat FJ, Hessel EM, Coffman RL: Therapeutic targeting of innate immunity with Toll-like receptor agonists and antagonists. *Nat Med* 2007, **13**(5):552–559.
- Salaun B, Romero P, Lebecque S: Toll-like receptors' two-edged sword: when immunity meets apoptosis. *Eur J Immunol* 2007, **37**(12):3311–3318.
- Huang B, Zhao J, Unkeless JC, Feng ZH, Xiong H: TLR signaling by tumor and immune cells: a double-edged sword. *Oncogene* 2008, **27**(2):218–224.
- Han KJ, Su X, Xu LG, Bin LH, Zhang J, Shu HB: Mechanisms of the TRIF-induced interferon-stimulated response element and NF-κappaB activation and apoptosis pathways. *J Biol Chem* 2004, **279**(15):15652–15661.
- Meylan E, Burns K, Hofmann K, Blancheteau V, Martinon F, Kelliher M, Tschoop J: RIP1 is an essential mediator of Toll-like receptor 3-induced NF-κappa B activation. *Nat Immunol* 2004, **5**(5):503–507.
- Brown J, Wang H, Hajishengallis GN, Martin M: TLR-signaling networks: an integration of adaptor molecules, kinases, and cross-talk. *J Dent Res* 2011, **90**(4):417–427.
- Salaun B, Coste I, Rissoan MC, Lebecque SJ, Renno T: TLR3 can directly trigger apoptosis in human cancer cells. *J Immunol* 2006, **176**(8):4894–4901.
- Lin Q, Wang L, Lin Y, Liu X, Ren X, Wen S, Du X, Lu T, Su SY, Yang X, et al: Toll-Like Receptor 3 Ligand Polyinosinic: Polycytidyl Acid Promotes Wound Healing in Human and Murine Skin. *J Invest Dermatol* 2012, **132**(8):2085–2092.
- Bernard JJ, Cowing-Zitron C, Nakatsuji T, Muehleisen B, Muto J, Borkowski AW, Martinez L, Greidinger EL, Yu BD, Gallo RL: Ultraviolet radiation damages self noncoding RNA and is detected by TLR3. *Nat Med* 2012, doi:10.1038/nm.2861.
- Matijevic T, Pavelic J: Toll-like receptors: cost or benefit for cancer? *Curr Pharm Des* 2010, **16**(9):1081–1090.
- Chang ET, Adamo HO: The enigmatic epidemiology of nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006, **15**(10):1765–1777.
- Feng B: Descriptive, Environmental and Genetic Epidemiology of Nasopharyngeal Carcinoma. In *Nasopharyngeal Carcinoma: Keys for Translational Medicine and Biology*. Edited by Busson P. New York: Austin, Tex :Landes Bioscience / Springer; 2012.
- Gourzanes C: Epstein-Barr Virus and the Pathogenesis of Nasopharyngeal Carcinomas. In *Nasopharyngeal Carcinoma: Keys for Translational Medicine and Biology*. Edited by Busson P. New York: Austin, Tex :Landes Bioscience / Springer; 2012.
- Lo KW: Acquired Genetic and Epigenetic Alterations in Nasopharyngeal Carcinoma. In *Nasopharyngeal Carcinoma: Keys for Translational Medicine and Biology*. Edited by Busson P. New York: Austin, Tex :Landes Bioscience / Springer; 2012.
- Samanta M, Iwakiri D, Kanda T, Imaizumi T, Takada K: EB virus-encoded RNAs are recognized by RIG-I and activate signaling to induce type I IFN. *EMBO J* 2006, **25**(18):4207–4214.
- Sbih-Lammali F, Clausse B, Ardia-Osorio H, Guerry R, Talbot M, Havouis S, Ferradini L, Bosq J, Tursz T, Busson P: Control of apoptosis in Epstein Barr virus-positive nasopharyngeal carcinoma cells: opposite effects of CD95 and CD40 stimulation. *Cancer Res* 1999, **59**(4):924–930.
- Tang KF, Tan SY, Chan SH, Chong SM, Loh KS, Tan LK, Hu H: A distinct expression of CC chemokines by macrophages in nasopharyngeal carcinoma: implication for the intense tumor infiltration by T lymphocytes and macrophages. *Hum Pathol* 2001, **32**(1):42–49.
- Friboulet L, Pioche-Durieu C, Rodriguez S, Valent A, Souquere S, Riposte H, Khabir A, Tsao SW, Bosq J, Lo KW, et al: Recurrent overexpression of c-IAP2 in EBV-associated nasopharyngeal carcinomas: critical role in resistance to Toll-like receptor 3-mediated apoptosis. *Neoplasia* 2008, **10**(11):1183–1194.
- Perrot I, Deauvieau F, Massacrier C, Hughes N, Garrone P, Durand I, Demaria O, Viaud N, Gauthier L, Blery M, et al: TLR3 and Rig-like receptor on myeloid dendritic cells and Rig-like receptor on human NK cells are both mandatory for production of IFN-gamma in response to double-stranded RNA. *J Immunol* 2010, **185**(4):2080–2088.
- Tsao SW, Wang X, Liu Y, Cheung YC, Feng H, Zheng Z, Wong N, Yuen PW, Lo AK, Wong YC, et al: Establishment of two immortalized

- nasopharyngeal epithelial cell lines using SV40 large T and HPV16E6/E7 viral oncogenes. *Biochim Biophys Acta* 2002, **1590**(1–3):150–158.
21. Rangan SR: A new human cell line (FaDu) from a hypopharyngeal carcinoma. *Cancer* 1972, **29**(1):117–121.
 22. Weichselbaum RR, Dahlberg W, Beckett M, Garrison T, Miller D, Clark J, Ervin TJ: Radiation-resistant and repair-proficient human tumor cells may be associated with radiotherapy failure in head- and neck-cancer patients. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986, **83**(8):2684–2688.
 23. Scherer WF, Syverton JT, Gey GO: Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix. *J Exp Med* 1953, **97**(5):695–710.
 24. Lieber M, Smith B, Szakal A, Nelson-Rees W, Todaro G: A continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells. *Int J Cancer* 1976, **17**(1):62–70.
 25. Auersperg N: Long-term cultivation of hypodiploid human tumor cells. *J Natl Cancer Inst* 1964, **32**:135–163.
 26. Pattiillo RA, Hussa RO, Story MT, Ruckert AC, Shalaby MR, Mattingly RF: Tumor antigen and human chorionic gonadotropin in CaSkI cells: a new epidermoid cervical cancer cell line. *Science* 1977, **196**(4297):1456–1458.
 27. Cheung ST, Huang DP, Hui AB, Lo KW, Ko CW, Tsang YS, Wong N, Whitney BM, Lee JC: Nasopharyngeal carcinoma cell line (C666-1) consistently harbouring Epstein-Barr virus. *Int J Cancer* 1999, **83**(1):121–126.
 28. Mocanu JD, Yip KW, Alajez NM, Shi W, Li JH, Lunt SJ, Moriyama EH, Wilson BC, Milosevic M, Lo KW, et al: Imaging the modulation of adenoviral kinetics and biodistribution for cancer gene therapy. *Mol Ther* 2007, **15**(5):921–929.
 29. Busson P, Ganem G, Flores P, Mugneret F, Clausse B, Caillou B, Braham K, Wakasugi H, Lipinski M, Tursz T: Establishment and characterization of three transplantable EBV-containing nasopharyngeal carcinomas. *Int J Cancer* 1988, **42**(4):599–606.
 30. Liu X, Ory V, Chapman S, Yuan H, Albanese C, Kallakury B, Timofeeva OA, Nealon C, Dakic A, Simic V, et al: ROCK inhibitor and feeder cells induce the conditional reprogramming of epithelial cells. *Am J Pathol* 2012, **180**(2):599–607.
 31. Ishizaki T, Uehata M, Tamechika I, Keel J, Nonomura K, Maekawa M, Narumiya S: Pharmacological properties of Y-27632, a specific inhibitor of rho-associated kinases. *Mol Pharmacol* 2000, **57**(5):976–983.
 32. Glaser R, Zhang HY, Yao KT, Zhu HC, Wang FX, Li GY, Wen DS, Li YP: Two epithelial tumor cell lines (HNE-1 and HONE-1) latently infected with Epstein-Barr virus that were derived from nasopharyngeal carcinomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989, **86**(23):9524–9528.
 33. Lin CT, Chan WY, Chen W, Huang HM, Wu HC, Hsu MM, Chuang SM, Wang CC: Characterization of seven newly established nasopharyngeal carcinoma cell lines. *Lab Invest* 1993, **68**(6):716–727.
 34. Li L, Thomas RM, Suzuki H, De Brabander JK, Wang X, Harran PG: A small molecule Smac mimetic potentiates TRAIL- and TNF α -mediated cell death. *Science* 2004, **305**(5689):1471–1474.
 35. Berenbaum MC: Criteria for analyzing interactions between biologically active agents. *Adv Cancer Res* 1981, **35**:269–335.
 36. Friboulet L, Gourzane C, Tsao SW, Morel Y, Paturel C, Temam S, Uzan C, Busson P: Poly(I:C) induces intense expression of c-IAP2 and cooperates with an IAP inhibitor in induction of apoptosis in cancer cells. *BMC Cancer* 2010, **10**:327.
 37. Salaun B, Zitvogel L, Asselin-Paturel C, Morel Y, Chemin K, Dubois C, Massacrier C, Conforti R, Chenard MP, Sabourin JC, et al: TLR3 as a biomarker for the therapeutic efficacy of double-stranded RNA in breast cancer. *Cancer Res* 2011, **71**(5):1607–1614.
 38. Morikawa T, Sugiyama A, Kume H, Ota S, Kashima T, Tomita K, Kitamura T, Kodama T, Fukayama M, Aburatani H: Identification of Toll-like receptor 3 as a potential therapeutic target in clear cell renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2007, **13**(19):5703–5709.
 39. Chuang JH, Chuang HC, Huang CC, Wu CL, Du YY, Kung ML, Chen CH, Chen SC, Tai MH: Differential toll-like receptor 3 (TLR3) expression and apoptotic response to TLR3 agonist in human neuroblastoma cells. *J Biomed Sci* 2011, **18**:65.
 40. Rydberg C, Mansson A, Uddman R, Riesbeck K, Cardell LO: Toll-like receptor agonists induce inflammation and cell death in a model of head and neck squamous cell carcinomas. *Immunology* 2009, **128**(1 Suppl):e600–e611.
 41. Iwakiri D, Zhou L, Samanta M, Matsumoto M, Ebihara T, Seya T, Imai S, Fujieda M, Kawa K, Takada K: Epstein-Barr virus (EBV)-encoded small RNA is released from EBV-infected cells and activates signaling from Toll-like receptor 3. *J Exp Med* 2009, **206**(10):2091–2099.
 42. Iwakiri D, Sheen TS, Chen JY, Huang DP, Takada K: Epstein-Barr virus-encoded small RNA induces insulin-like growth factor 1 and supports growth of nasopharyngeal carcinoma-derived cell lines. *Oncogene* 2005, **24**(10):1767–1773.
 43. Takada K: Role of EBER and BARF1 in nasopharyngeal carcinoma (NPC) tumorigenesis. *Semin Cancer Biol* 2012, **22**(2):162–165.
 44. Kariko K, Ni H, Capodici J, Lamphier M, Weissman D: mRNA is an endogenous ligand for Toll-like receptor 3. *J Biol Chem* 2004, **279**(13):12542–12550.
 45. Cavassani KA, Ishii M, Wen H, Schaller MA, Lincoln PM, Lukacs NW, Hogaboam CM, Kunkel SL: TLR3 is an endogenous sensor of tissue necrosis during acute inflammatory events. *J Exp Med* 2008, **205**(11):2609–2621.
 46. Weber A, Krajczyk Z, Besch R, Potthoff S, Leverkus M, Hacker G: Proapoptotic signalling through Toll-like receptor-3 involves TRIF-dependent activation of caspase-8 and is under the control of inhibitor of apoptosis proteins in melanoma cells. *Cell Death Differ* 2010, **17**(6):942–951.
 47. Matijevic T, Pavelic J: The dual role of TLR3 in metastatic cell line. *Clin Exp Metastasis* 2011, **28**(7):701–712.
 48. Feoktistova M, Geserick P, Kellert B, Dimitrova DP, Langlais C, Hupe M, Cain K, MacFarlane M, Hacker G, Leverkus M: cIAPs block Ripoptosome formation, a RIP1/caspase-8 containing intracellular cell death complex differentially regulated by cFLIP isoforms. *Mol Cell* 2011, **43**(3):449–463.
 49. Imre G, Larisch S, Rajalingam K: Ripoptosome: a novel IAP-regulated cell death-signalling platform. *J Mol Cell Biol* 2011, **3**(6):324–326.
 50. Lacour J, Lacour F, Spira A, Michelson M, Petit JY, Delage G, Sarrazin D, Contesso G, Viguier J: Adjuvant treatment with polyadenylic-polyuridylic acid (PolyA.PolyU) in operable breast cancer. *Lancet* 1980, **2**(8187):161–164.
 51. Lacour J, Laplanche A, Malafosse M, Gallot D, Julien M, Rotman N, Guivarc'h M, Rouillet-Audry JC, Lasser P, Hautefeuille P, et al: Polyadenylic-polyuridylic acid as an adjuvant in resectable colorectal carcinoma: a 6 1/2 year follow-up analysis of a multicentric double blind randomized trial. *Eur J Surg Oncol* 1992, **18**(6):599–604.
 52. Pawlicki M, Jonca M, Krzemieniecki K, Zuchowska-Vogelgesang B: Results of adjuvant therapy with the preparation Poly-a Poly-u in patients with malignant melanoma during a 10-year observation. *Wiad Lek* 1993, **46**(23–24):912–914.
 53. Laplanche A, Alzieu L, Delozier T, Berlie J, Veyret C, Fargeot P, Luboinski M, Lacour J: Polyadenylic-polyuridylic acid plus locoregional radiotherapy versus chemotherapy with CMF in operable breast cancer: a 14 year follow-up analysis of a randomized trial of the Federation Nationale des Centres de Lutte contre le Cancer (FNCLCC). *Breast Cancer Res Treat* 2000, **64**(2):189–191.
 54. Jeung HC, Moon YW, Rha SY, Yoo NC, Roh JK, Noh SH, Min JS, Kim BS, Chung HC: Phase III trial of adjuvant 5-fluorouracil and adriamycin versus 5-fluorouracil, adriamycin, and polyadenylic-polyuridylic acid (poly A:U) for locally advanced gastric cancer after curative surgery: final results of 15-year follow-up. *Ann Oncol* 2008, **19**(3):520–526.
 55. Umemura N, Zhu J, Mburu YK, Forero A, Hsieh PN, Muthuswamy R, Kalinski P, Ferris RL, Sarkar SN: Defective NF- κ B signaling in metastatic head and neck cancer cells leads to enhanced apoptosis by double-stranded RNA. *Cancer Res* 2012, **72**(1):45–55.

doi:10.1186/1750-9378-7-36

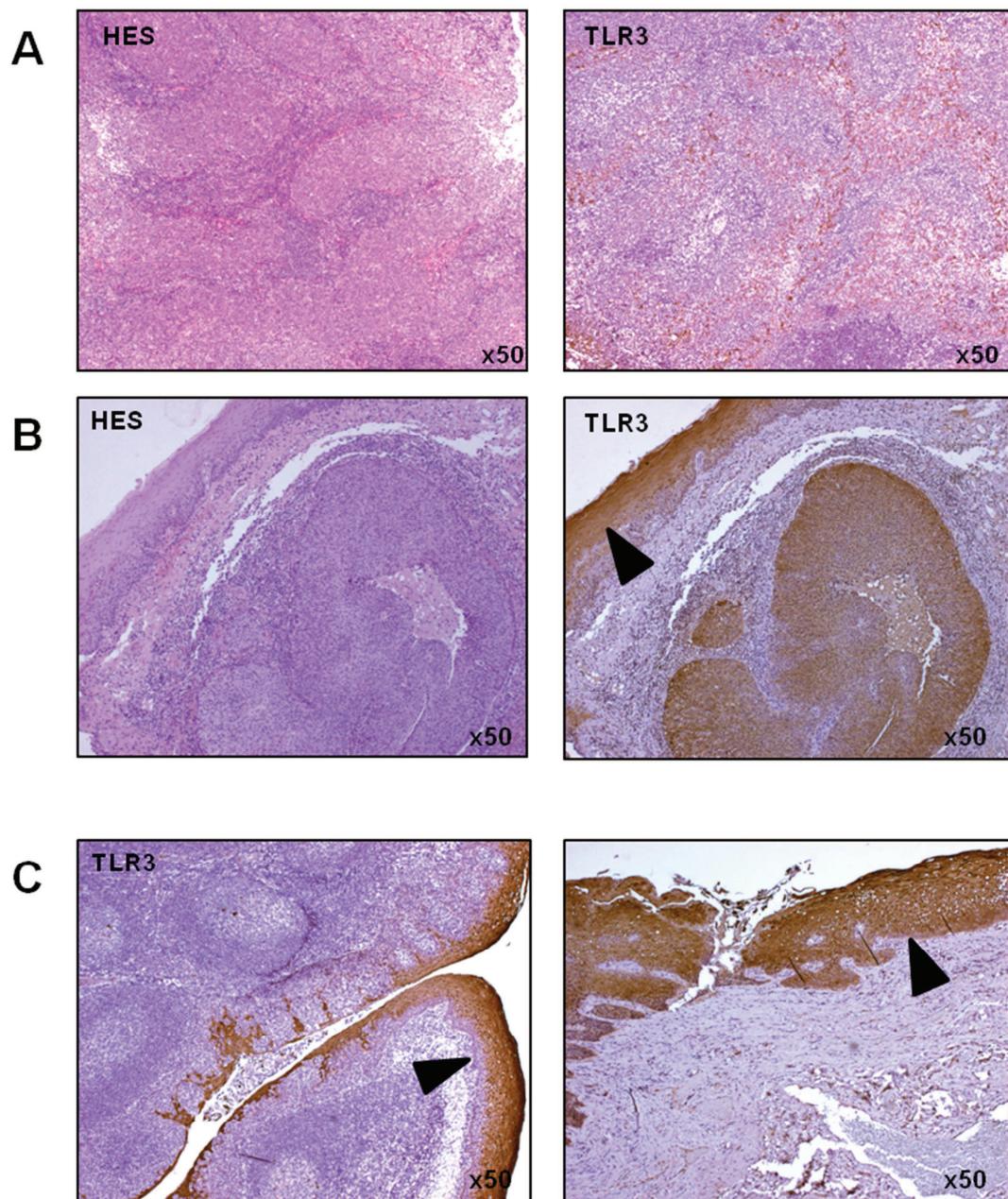
Cite this article as: Véryaud et al.: Toll-like receptor 3 in Epstein-Barr virus-associated nasopharyngeal carcinomas: consistent expression and cytotoxic effects of its synthetic ligand poly(A:U) combined to a Smac-mimetic. *Infectious Agents and Cancer* 2012 **7**:36.

Figure supplémentaire 1



Détection de TLR3 en western blot dans un panel de lignées cellulaires d'origine épithéliale (malignes et non malignes) avec l'anticorps MAB1487, R&D Systems. La bande présente aux alentours de 120KDa correspond à la forme clivée de TLR3, et la bande présente à 70 Kda au fragment C-terminal, après clivage. Noter l'absence de forme clivée dans la lignée non maligne NP460.

Figure supplémentaire 2



Détection de TLR3 en immunohistochimie avec l'anticorps 40F9.6 (Innate Pharma) sur des biopsies de CNP (A), de CE des VADS (B) et de muqueuse oropharyngée normale (C). Noter le marquage des cellules tumorales, mais également de la muqueuse saine (flèches noires).

Article 2

SOUMIS – CANCER RESEARCH

“Stimulation of the Toll-like receptor 3 promotes metabolic reprogramming and resistance to hypoxia in Head and Neck carcinoma cells”

PRESENTATION DE L'ARTICLE 2

Stimulation of the Toll-like receptor 3 promotes metabolic reprogramming and resistance to hypoxia in Head and Neck carcinoma cells

A l’issue des travaux présentés dans l’article 1, nous avions abouti à deux conclusions : 1) Le récepteur TLR3 est exprimé de façon régulière non seulement par les cellules malignes de CNP mais aussi par les cellules malignes d’autres carcinomes des VADS ; 2) pour ces cellules malignes, particulièrement les cellules de CNP, TLR3 apparaît comme un facteur de vulnérabilité dans la mesure où en présence d’inhibiteurs de c-IAP2, on démasque une toxicité des ligands de TLR3. Cependant, il ne nous paraissait pas satisfaisant d’envisager les fonctions de TLR3 uniquement sous cet angle. Au contraire, nous avons fait l’hypothèse que la stimulation de TLR3 par ses ligands agissant à des concentrations physiologiques pouvait favoriser certains aspects du phénotype malin (prolifération, survie cellulaire, invasivité, stimulation de l’angiogenèse).

Pour tenter de vérifier cette hypothèse, je me suis inspiré de la publication de Iwakiri et al. qui avaient mis en évidence un effet oncogénique des EBERs sur des lignées épithéliales en situation de carence (Iwakiri, Sheen et al. 2005). Pour des raisons pratiques, j’ai utilisé des lignées EBV-négatives, représentatives de carcinomes épidermoïdes des VADS non-CNP. Au terme de plusieurs semaines de tâtonnement, j’ai pu mettre en évidence un effet du poly(A/U) qui stimule la croissance in vitro de ces lignées en situation de carence en milieu de culture ou en sérum de veau fœtal. Un des éléments décisifs fut l’utilisation du comptage cellulaire à la place des tests MTT : de fait, les résultats ultérieurs, en montrant que la stimulation de TLR3 impacte le métabolisme cellulaire, expliquent qu’un test fondé sur la respiration cellulaire n’est pas adapté au comptage cellulaire dans ces conditions expérimentales.

C’est une observation expérimentale simple qui m’a incité à explorer les liens entre TLR3 et effet Warburg : lors des tests de croissance cellulaire, le milieu des flasques « traitées » par le poly(A :U) jaunissait plus rapidement, traduisant une acidification accrue. Pour comprendre si cette acidification était réellement due à une modification du métabolisme cellulaire ou si elle était simplement en rapport avec un épuisement du milieu par des cellules de croissance plus rapide, j’ai utilisé le XF24 Analyzer, développé par la société Seahorse Bioscience : cet appareil permet d’obtenir des mesures successives de la production de lactates et de la consommation d’oxygène de cellules cultivées en plaque, et ce dans diverses conditions (Privation ou saturation en glucose, blocage de la chaîne de l’ATP par l’oligomycine...). Nous avons ainsi confirmé que TLR3 contribuait à la mise en œuvre de l’effet Warburg dans les cellules de carcinome des VADS. L’étude métabolomique a confirmé par une approche expérimentale différente le lien entre stimulation de TLR3 et adaptation métabolique.

HIF est probablement le principal facteur de transcription impliqué dans la mise en jeu de l'effet Warburg : il nous a donc paru logique d'étudier son rôle dans les effets métaboliques de la stimulation de TLR3. Rétrospectivement, il avait déjà été rapporté dans une étude publiée en 2010 que la stimulation de TLR3 par le poly(I:C) dans une lignée de carcinome prostatique permettait de détecter HIF-1 α en WB en normoxie, et d'induire une production accrue de VEGF (Paone, Galli et al. 2010). La dernière partie de mon travail avait pour but de rechercher un mécanisme similaire dans nos modèles de carcinomes des VADS.

DISCUSSION

DISCUSSION

La discussion portera successivement sur le statut de TLR3 dans les carcinomes des VADS, sur l'existence de possibles ligands endogènes, et sur les conséquences de l'expression de TLR3 par les cellules tumorales en termes de résistance à la radiothérapie, mais aussi de ciblage thérapeutique potentiel.

Statut de TLR3 dans les carcinomes des VADS

Lorsque nous avons étudié l'expression de TLR3 par Western blot, nous avons été frappés par sa détection constante à des niveaux élevés dans les lignées de carcinomes de VADS, qu'il s'agisse de CNP ou de CE des VADS. Initialement, nous nous étions limités à la détection de la protéine TLR3 dans sa forme glycosylée non clivée, correspondant à un poids moléculaire de l'ordre de 130KDa. Plus récemment le groupe de Serge Lebecque a montré que la forme activée de TLR3 correspond en fait à une forme clivée comportant 2 fragments C et N-terminaux de poids moléculaire respectif 72 et 60KDa. Ces fragments restent associés et permettent la signalisation lors de la liaison au ligand (Toscano, Estornes et al. 2013). En analysant rétrospectivement les Western blot, il apparaît qu'une 2^{ème} bande de l'ordre de 72KDa était également détectée par l'anticorps que nous avons utilisé (clone 512505 R&D Systems, Figure supplémentaire 1, présentée à la suite du 1^{er} article). Cette forme clivée de TLR3 était globalement présente à des niveaux constants pour chaque lignée lors d'expériences successives, et la stimulation de TLR3 par le poly(A:U) s'accompagnait d'une augmentation de la détection des bandes de 130 et 72KDa dans une proportion à peu près équivalente. Dans ces conditions, il nous est difficile d'évaluer l'état d'activation de TLR3 uniquement sur la base de ces données de Western. On peut supposer qu'il existe un niveau basal constitutif d'activation de TLR3 lié à des ligands endogènes (voir ci-dessous). On se demande pourquoi la stimulation par un ligand artificiel comme le poly(A:U) n'augmente pas la proportion de TLR3 clivé. Il est possible que l'augmentation d'expression de la forme native du TLR3 compense l'augmentation du clivage. Nous avons montré, en effet, que dans de nombreux types cellulaires, la stimulation du TLR3 fait augmenter sa propre expression (Friboulet, Gourzones et al. 2010).

En ce qui concerne la détection de TLR3 dans les biopsies en immunohistochimie, l'anticorps que nous avons utilisé (40F9.6 Innate Pharma) permettait de mettre en évidence un profil d'expression de TLR3 assez différent entre CNP et CE des VADS : dans les biopsies de CNP, le marquage était constant sur les 10 biopsies étudiées, mais avec une grande hétérogénéité dans le pourcentage de cellules tumorales marquées, dans l'intensité du marquage, et ce parfois au sein même d'une seule tumeur. Dans les 6 biopsies de CE, le marquage était plus homogène, et assez intense. On notait enfin un marquage quasi constant et homogène de l'épithélium de surface tant dans les CNP que dans les

CE des VADS (Figure supplémentaire 2). A l'heure actuelle, nous ne pouvons pas trancher entre deux hypothèses. Soit ce marquage correspond bien à une expression réelle de TLR3 (avec peut-être des niveaux d'expression hétérogènes dans le CNP, correspondant à des zones plus ou moins hypoxiques de la tumeur ?). Soit l'anticorps manque de spécificité avec par exemple un marquage non spécifique de la kératine, présente de façon plus abondante dans l'épithélium et les CE que dans le CNP. Pour trancher, nous nous proposons d'utiliser d'autres anticorps anti-TLR3 plus performants en immunohistochimie.

Etudes envisagées concernant de possibles ligands endogènes de TLR3

Les récepteurs Toll-like reconnaissent des motifs moléculaires caractéristiques de différentes catégories de pathogènes, les PAMPs. Ainsi TLR3 reconnaît les fragments d'ARN double brin qui correspondent fréquemment à des intermédiaires de la réPLICATION virale. L'une de nos premières hypothèses était qu'il pouvait exister un effet de stimulation autocrine de TLR3 par les EBERs produits dans les cellules de CNP infectées par EBV, stimulation jouant potentiellement un rôle dans la croissance tumorale. Cette hypothèse s'appuyait sur des résultats publiés par l'équipe de Kenzo Takada dans plusieurs modèles de pathologies bénignes ou malignes associées à EBV (Iwakiri, Zhou et al. 2009). Le fait que TLR3 soit également fortement exprimé dans des lignées de CE des VADS non infectées par un virus (il s'agit de lignées HPV négatives), et surtout que la stimulation de TLR3 favorise la croissance des cellules malignes de CE des VADS dans certaines conditions carentielles nous conduit à envisager d'autres types de stimulation endogène. De fait, il a été montré que TLR3 pouvait reconnaître des fragments d'ARN double brin libérés par des cellules en nécrose, et captés dans le compartiment endolysosomal (Kariko, Ni et al. 2004; Cavassani, Ishii et al. 2008). Pour désigner de tels ligands, on parle alors de DAMPs (Damage-Associated Molecular Patterns) (Seong and Matzinger 2004). On sait que les nodules tumoraux ont souvent une organisation concentrique avec un foyer de nécrose au centre, une couronne de plusieurs couches de cellules hypoxiques mais encore vivantes autour de ce foyer et enfin en périphérie un front d'invasion au contact des cellules saines avec une pression en oxygène élevée. Il est tentant d'imaginer un système où les cellules des foyers de nécrose libéreraient en direction des cellules de la couronne hypoxique des fragments d'ARN stimulant TLR3. Cette stimulation favoriserait la reprogrammation métabolique des cellules tumorales, leur résistance à l'hypoxie et peut-être leur croissance (figure 11). L'expression de TLR3 elle-même pourrait être augmentée du fait de cette stimulation (Friboulet, Gourzones et al. 2010).

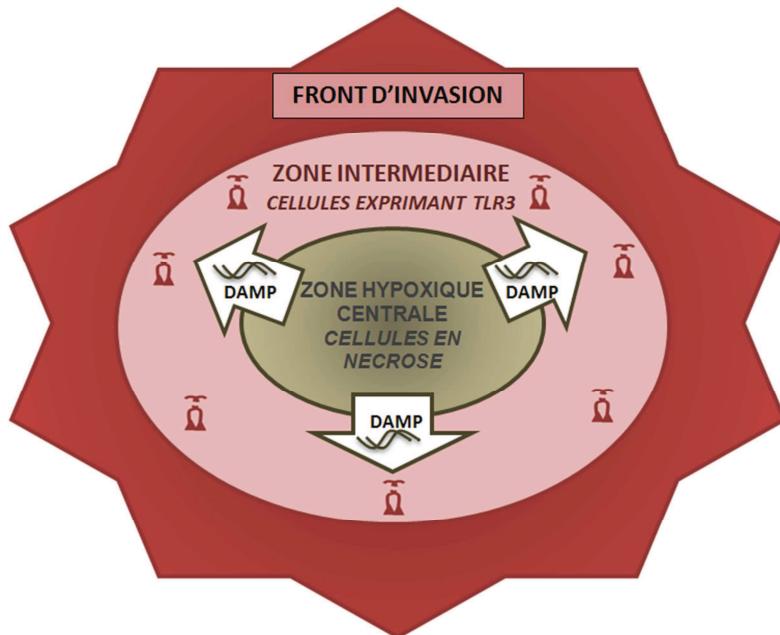


Figure 11. Représentation possible des échanges entre zones de nécrose et front d'invasion dans les CE des VADS

Pour explorer plus avant cette hypothèse, nous aurons à mener des travaux dans plusieurs directions. Nous envisageons par exemple d'étudier en immunohistochimie, sur des coupes de tumeurs, de façon comparative, la distribution des foyers de nécrose et du marquage TLR3. Une proximité des foyers de nécrose et des zones d'expression intense de TLR3 plaiderait en faveur de son rôle dans les interactions entre DAMPs et cellules hypoxiques. Nous envisageons également des expériences *in vitro* pour déterminer si certaines fractions des liquides de nécrose sont riches en ligands de TLR3. Dans ce but, nous prévoyons d'utiliser des lignées « rapporteuses » de TLR3, telle que la lignée HEK-Blue hTLR3 d'Invivogen. Cette lignée est co-transférée de façon stable avec le gène du TLR3 humain et un gène rapporteur codant une phosphatase alcaline secrétée sous la dépendance d'un promoteur artificiel composite (le promoteur minimal du gène de l'interféron beta fusionné à 5 éléments de réponse NF-KB et AP1).

TLR3 et résistance à la radiothérapie

Si les CNP sont des tumeurs globalement radiosensibles, la sensibilité à la radiothérapie est en revanche variable d'une tumeur à l'autre dans les CE des VADS. On estime que l'adaptation du traitement en fonction de la radiosensibilité individuelle d'une tumeur permettrait d'augmenter la survie de plus de 10% (West and Hendry 1992). Les conséquences thérapeutiques sont multiples : adaptation de dose, en diminuant les doses pour les tumeurs les plus sensibles ou à l'inverse en les augmentant pour les tumeurs résistantes ; épargne d'une chimiothérapie associée pour les tumeurs les plus sensibles ; choix d'une chirurgie plutôt que d'une radiothérapie pour les tumeurs résistantes. Or il n'existe actuellement aucun marqueur en routine pour prédire la sensibilité des tumeurs des VADS à

la radiothérapie, hormis peut-être le statut HPV (Weinberger, Yu et al. 2006). L'une des perspectives ouvertes par ce travail serait d'établir un lien entre expression de TLR3, néoangiogénèse et résistance à l'hypoxie. Une application directe serait donc de disposer d'un outil prédictif de la sensibilité à la radiothérapie : une forte expression de TLR3 en immunohistochimie traduirait une tendance des cellules tumorales à adopter un métabolisme de type anaérobie, et donc une tendance à la résistance aux radiations ionisantes. Cette hypothèse mérite d'être testée par des études de corrélation entre expression de TLR3 (en immunohistochimie sur des biopsies tumorales) et réponse thérapeutique à la radiothérapie (mais également à la chimiothérapie).

Agonistes de TLR3 : action pro ou anti-tumorale ?

Les agonistes artificiels de TLR3 sont connus et ont été utilisés dans des essais cliniques depuis de nombreuses années. Le poly(A:U) a ainsi été testé dans des essais de phase III dès les années 1980 dans plusieurs tumeurs solides, seul ou en association avec la chimiothérapie et/ou les radiations ionisantes (Lacour, Laplanche et al. 1991). Les récepteurs Toll-like n'avaient alors pas encore été décrits, et seules les propriétés immunomodulatrices du poly(A:U) étaient connues, sans que leur mécanisme précis n'ait été élucidé. Les essais plus récents se fondent principalement sur 2 justifications : les uns s'appuient sur le rôle immunostimulateur des agonistes de TLR3, utilisés en association avec des vaccins thérapeutiques ; les autres sur leurs effets cytotoxiques directs, décrits dans plusieurs modèles tumoraux *in vitro* et *in vivo*. Dans ce contexte, il nous paraît particulièrement important de mieux comprendre le rôle potentiel de TLR3 dans l'oncogénèse : nos résultats suggèrent en effet que TLR3 pourrait favoriser dans certaines conditions la croissance tumorale et la résistance au traitement ; ces résultats incitent à une grande prudence dans l'utilisation des agonistes de TLR3 en pratique clinique. De fait, l'un des essais menés dans les années 1980 et comparant le poly(A :U) à un placebo en adjuvant après résection chirurgicale dans les cancers du colon concluait à une survie inférieure dans le groupe recevant le poly(A :U) (Lacour, Laplanche et al. 1992).

Néanmoins nous pensons que TLR3 a bien un avenir en tant que cible thérapeutique. En effet, en conjuguant les agonistes de TLR3 à un inhibiteur d'IAP, nous avons pu observer des effets cytotoxiques considérables pour des doses très faibles d'agents pharmacologiques (article 1). Cette capacité des inhibiteurs d'IAP à dévoiler la composante proapoptotique de TLR3 avait été rapportée pour la première fois par Luc Friboulet, doctorant dans l'équipe (Friboulet, Pioche-Durieu et al. 2008). Des travaux publiés par d'autres groupes permettent de mieux comprendre le mécanisme mis en œuvre : c-IAP1 et c-IAP2 participent à l'ubiquitination de la protéine RIP1, bloquant sa liaison au complexe proapoptotique initié par TLR3. Le blocage des IAPs permet la formation d'un complexe de mort associant TLR3, TIR, FADD, RIP1 et la caspase 8 (Estornes, Toscano et al. 2012) : le terme de « RIPtosome » a été proposé pour désigner ce complexe formé après stimulation de TLR3 (Feoktistova, Geserick et al. 2011). L'existence d'une stimulation permanente de TLR3 par des

ligands endogènes dans les cellules malignes de carcinomes des VADS serait un argument pour tester l'activité antitumorale d'inhibiteurs d'IAP dans ces cancers, soit seuls, soit en association avec des agonistes de TLR3 à faible dose.

Un pont entre les études biologiques des CNP et des CE des VADS ?

En conclusion, les principaux résultats obtenus dans le cadre de ce travail de thèse peuvent se résumer ainsi : TLR3 est fortement exprimé par les cellules malignes de carcinomes des VADS, et joue un rôle dans la croissance tumorale en favorisant l'effet Warburg ; néanmoins, la manipulation pharmacologique des voies de signalisation de TLR3 permet, en associant un inhibiteur d'IAP aux agonistes de TLR3, d'en dévoiler la composante proapoptotique et donc de s'en servir comme d'une cible thérapeutique.

L'une des originalités de ce travail est d'établir ainsi un lien inédit entre CNP et CE des VADS : même s'ils se développent tous deux dans des zones anatomiques proches (voire communes), tout semble pourtant opposer ces deux types de cancer : données épidémiologiques, évolution clinique, stratégies thérapeutiques... En biologie, ils ont pratiquement toujours été étudiés par des équipes différentes, selon des axes de travail souvent divergents. Le caractère fréquemment hypoxique avait été rapporté dans les CNP comme dans les CE des VADS : nos résultats mettent en évidence un mécanisme commun d'oncogénèse médié par TLR3, qui rapproche ces tumeurs dans leur physiopathologie, et potentiellement dans leur traitement (Bose, Brockton et al. 2013; Hong, Lui et al. 2013)

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

- "Institut de veille sanitaire " www.invs.sante.fr/surveillance/cancers.
- (2014). "Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma." *Nature* **513**(7517): 202-209.
- Adrien, J., C. Bertolus, et al. (2014). "Why are head and neck squamous cell carcinoma diagnosed so late? Influence of health care disparities and socio-economic factors." *Oral Oncol* **50**(2): 90-97.
- Akira, S., S. Uematsu, et al. (2006). "Pathogen recognition and innate immunity." *Cell* **124**(4): 783-801.
- Al-Sarraf, M., M. LeBlanc, et al. (1998). "Chemoradiotherapy versus radiotherapy in patients with advanced nasopharyngeal cancer: phase III randomized Intergroup study 0099." *J Clin Oncol* **16**(4): 1310-1317.
- Alexopoulou, L., A. C. Holt, et al. (2001). "Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3." *Nature* **413**(6857): 732-738.
- Anderson, K. V., G. Jurgens, et al. (1985). "Establishment of dorsal-ventral polarity in the Drosophila embryo: genetic studies on the role of the Toll gene product." *Cell* **42**(3): 779-789.
- Andersson-Anvret, M., N. Forsby, et al. (1977). "Relationship between the Epstein-Barr virus and undifferentiated nasopharyngeal carcinoma: correlated nucleic acid hybridization and histopathological examination." *Int J Cancer* **20**(4): 486-494.
- Barth, S., T. Pfuhl, et al. (2008). "Epstein-Barr virus-encoded microRNA miR-BART2 down-regulates the viral DNA polymerase BALF5." *Nucleic Acids Res* **36**(2): 666-675.
- Bernheim, A., G. Rousselet, et al. (1993). "Cytogenetic studies in three xenografted nasopharyngeal carcinomas." *Cancer Genet Cytogenet* **66**(1): 11-15.
- Bose, P., N. T. Brockton, et al. (2013). "Head and neck cancer: from anatomy to biology." *Int J Cancer* **133**(9): 2013-2023.
- Bouttier, M., C. Goncalves, et al. (2008). "Virus et interféron : mécanismes d'induction et stratégies d'échappement." *Virologie* **12**(3): 159-173.
- Brentano, F., O. Schorr, et al. (2005). "RNA released from necrotic synovial fluid cells activates rheumatoid arthritis synovial fibroblasts via Toll-like receptor 3." *Arthritis and rheumatism* **52**(9): 2656-2665.
- Brownson, R. C. and J. C. Chang (1987). "Exposure to alcohol and tobacco and the risk of laryngeal cancer." *Arch Environ Health* **42**(4): 192-196.
- Burns, M. B., L. Lackey, et al. (2013). "APOBEC3B is an enzymatic source of mutation in breast cancer." *Nature* **494**(7437): 366-370.
- Cardesa, A., N. Gale, et al. (2005). Squamous cell carcinoma. *Pathology & Genetics of Head and Neck Tumours*. L. Barnes, J. Eveson, P. Reichart and D. Sidransky. Lyon, IARC Press.
- Cavassani, K. A., M. Ishii, et al. (2008). "TLR3 is an endogenous sensor of tissue necrosis during acute inflammatory events." *The Journal of experimental medicine* **205**(11): 2609-2621.
- Cavassani, K. A., M. Ishii, et al. (2008). "TLR3 is an endogenous sensor of tissue necrosis during acute inflammatory events." *J Exp Med* **205**(11): 2609-2621.
- Chan, J. K. C., B. Z. Pilch, et al. (2005). Tumours of the nasopharynx. *Pathology & Genetics of Head and Neck Tumours*. L. Barnes, J. W. Eveson, P. Reichart and D. Sidransky. Lyon, IARC Press.
- Chang, E. T. and H. O. Adami (2006). "The enigmatic epidemiology of nasopharyngeal carcinoma." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **15**(10): 1765-1777.
- Chaturvedi, A. K., W. F. Anderson, et al. (2013). "Worldwide trends in incidence rates for oral cavity and oropharyngeal cancers." *J Clin Oncol* **31**(36): 4550-4559.

- Chen, A. Y., S. Fedewa, et al. (2011). "Temporal trends in the treatment of early- and advanced-stage laryngeal cancer in the United States, 1985-2007." *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* **137**(10): 1017-1024.
- Chen, R., A. B. Alvero, et al. (2008). "Cancers take their Toll--the function and regulation of Toll-like receptors in cancer cells." *Oncogene* **27**(2): 225-233.
- Cheng, Y., R. L. Ho, et al. (2014). "Anti-angiogenic pathway associations of the 3p21.3 mapped BLU gene in nasopharyngeal carcinoma." *Oncogene*.
- Chiron, D., G. Jego, et al. (2010). "Toll-like receptors: expression and involvement in multiple myeloma." *Leuk Res* **34**(12): 1545-1550.
- Choe, J., M. S. Kelker, et al. (2005). "Crystal structure of human toll-like receptor 3 (TLR3) ectodomain." *Science* **309**(5734): 581-585.
- Chouaib, S., Y. Messai, et al. (2012). "Hypoxia promotes tumor growth in linking angiogenesis to immune escape." *Front Immunol* **3**: 21.
- Chow, L. S., K. W. Lo, et al. (2004). "RASSF1A is a target tumor suppressor from 3p21.3 in nasopharyngeal carcinoma." *Int J Cancer* **109**(6): 839-847.
- Choy, E. Y., K. L. Siu, et al. (2008). "An Epstein-Barr virus-encoded microRNA targets PUMA to promote host cell survival." *J Exp Med* **205**(11): 2551-2560.
- Chuang, H. C., C. C. Huang, et al. (2012). "Toll-like receptor 3-mediated tumor invasion in head and neck cancer." *Oral Oncol* **48**(3): 226-232.
- Chuang, J. H., H. C. Chuang, et al. (2011). "Differential toll-like receptor 3 (TLR3) expression and apoptotic response to TLR3 agonist in human neuroblastoma cells." *J Biomed Sci* **18**: 65.
- Chung, G. T., R. W. Lung, et al. (2013). "Identification of a recurrent transforming UBR5-ZNF423 fusion gene in EBV-associated nasopharyngeal carcinoma." *J Pathol* **231**(2): 158-167.
- Chung, G. T., R. W. Lung, et al. (2013). "Identification of a recurrent transforming UBR5-ZNF423 fusion gene in EBV-associated nasopharyngeal carcinoma." *J Pathol* **231**(2): 158-167.
- Chung, G. T. Y., W. P. K. Lou, et al. (2013). "Constitutive activation of distinct NF- κ B signals in EBV-associated nasopharyngeal carcinoma." *J Pathol* **231**(3): 311-322.
- Comerford, K. M., T. J. Wallace, et al. (2002). "Hypoxia-inducible factor-1-dependent regulation of the multidrug resistance (MDR1) gene." *Cancer Res* **62**(12): 3387-3394.
- Conte, D., M. Holcik, et al. (2006). "Inhibitor of apoptosis protein cIAP2 is essential for lipopolysaccharide-induced macrophage survival." *Mol Cell Biol* **26**(2): 699-708.
- Cosmopoulos, K., M. Pegtel, et al. (2009). "Comprehensive profiling of Epstein-Barr virus microRNAs in nasopharyngeal carcinoma." *J Virol* **83**(5): 2357-2367.
- Curado MP, E. B., Shin HR, Storm H, Ferlay J, Heanue M, Boyle P (2007). *Cancer Incidence in Five Continents Volume IX*. Lyon, IARC Scientific Publications No. 160.
- Dietz, A., C. A. Logothetis, et al. (2004). "Prognostic Impact of EBV-Related LMP-1, Histologic Type, and Environmental Factors in Nasopharyngeal Carcinoma in a German Population." *Onkologie* **27**(4): 345-350.
- Dyson, N., P. M. Howley, et al. (1989). "The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product." *Science* **243**(4893): 934-937.
- Edge, S., D. Byrd, et al. (2010). Head and Neck Cancers. *AJCC Cancer Staging Manual*. S. Edge, D. Byrd, C. Compton et al. New-York, Springer.
- Edwards, R. H., D. Sitki-Green, et al. (2004). "Potential selection of LMP1 variants in nasopharyngeal carcinoma." *J Virol* **78**(2): 868-881.
- Effert, P., R. McCoy, et al. (1992). "Alterations of the p53 gene in nasopharyngeal carcinoma." *J Virol* **66**(6): 3768-3775.
- Estornes, Y., F. Toscano, et al. (2012). "dsRNA induces apoptosis through an atypical death complex associating TLR3 to caspase-8." *Cell Death Differ* **19**(9): 1482-1494.
- Estornes, Y., F. Toscano, et al. (2012). "dsRNA induces apoptosis through an atypical death complex associating TLR3 to caspase-8." *Cell Death Differ*.
- Fafi-Kremer, S., P. Morand, et al. (2005). "Long-term shedding of infectious epstein-barr virus after infectious mononucleosis." *J Infect Dis* **191**(6): 985-989.

- Feoktistova, M., P. Geserick, et al. (2011). "cIAPs block Ripoptosome formation, a RIP1/caspase-8 containing intracellular cell death complex differentially regulated by cFLIP isoforms." *Mol Cell* **43**(3): 449-463.
- Frappier, L. (2012). "Contributions of Epstein-Barr nuclear antigen 1 (EBNA1) to cell immortalization and survival." *Viruses* **4**(9): 1537-1547.
- Friboulet, L., C. Gourzones, et al. (2010). "Poly(I:C) induces intense expression of c-IAP2 and cooperates with an IAP inhibitor in induction of apoptosis in cancer cells." *BMC Cancer* **10**: 327.
- Friboulet, L., C. Pioche-Durieu, et al. (2008). "Recurrent overexpression of c-IAP2 in EBV-associated nasopharyngeal carcinomas: critical role in resistance to Toll-like receptor 3-mediated apoptosis." *Neoplasia* **10**(11): 1183-1194.
- Garcia-Cattaneo, A., F. X. Gobert, et al. (2012). "Cleavage of Toll-like receptor 3 by cathepsins B and H is essential for signaling." *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**(23): 9053-9058.
- Gatenby, R. A. and R. J. Gillies (2004). "Why do cancers have high aerobic glycolysis?" *Nat Rev Cancer* **4**(11): 891-899.
- Gay, N. J. and F. J. Keith (1991). "Drosophila Toll and IL-1 receptor." *Nature* **351**(6325): 355-356.
- Gillison, M. L. (2004). "Human papillomavirus-associated head and neck cancer is a distinct epidemiologic, clinical, and molecular entity." *Semin Oncol* **31**(6): 744-754.
- Gourzones, C., P. Busson, et al. (2013). *Epstein-Barr Virus and the Pathogenesis of Nasopharyngeal Carcinomas. Nasopharyngeal Carcinoma : Keys for Translational Medicine and Biology*. P. Busson. Austin/New-York, Landes/Springer: 42-60.
- Gourzones, C., F. R. Ferrand, et al. (2013). "Consistent high concentration of the viral microRNA BART17 in plasma samples from nasopharyngeal carcinoma patients--evidence of non-exosomal transport." *Virol J* **10**: 119.
- Gourzones, C., A. Gelin, et al. (2010). "Extra-cellular release and blood diffusion of BART viral microRNAs produced by EBV-infected nasopharyngeal carcinoma cells." *Virol J* **7**: 271.
- Gray, L. H., A. D. Conger, et al. (1953). "The concentration of oxygen dissolved in tissues at the time of irradiation as a factor in radiotherapy." *Br J Radiol* **26**(312): 638-648.
- Gregoire, V., J. L. Lefebvre, et al. (2010). "Squamous cell carcinoma of the head and neck: EHNS-ESMO-ESTRO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up." *Ann Oncol* **21 Suppl 5**: v184-186.
- Guillot, L., R. Le Goffic, et al. (2005). "Involvement of toll-like receptor 3 in the immune response of lung epithelial cells to double-stranded RNA and influenza A virus." *J Biol Chem* **280**(7): 5571-5580.
- Hadinoto, V., M. Shapiro, et al. (2009). "The dynamics of EBV shedding implicate a central role for epithelial cells in amplifying viral output." *PLoS pathogens* **5**(7): e1000496.
- Hashibe, M., P. Brennan, et al. (2009). "Interaction between tobacco and alcohol use and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **18**(2): 541-550.
- Haughey, B. H., G. A. Gates, et al. (1992). "Meta-analysis of second malignant tumors in head and neck cancer: the case for an endoscopic screening protocol." *Ann Otol Rhinol Laryngol* **101**(2 Pt 1): 105-112.
- He, J. F., W. H. Jia, et al. (2007). "Genetic polymorphisms of TLR3 are associated with Nasopharyngeal carcinoma risk in Cantonese population." *BMC Cancer* **7**: 194.
- Ho, H. H. and L. B. Ivashkiv (2006). "Role of STAT3 in type I interferon responses. Negative regulation of STAT1-dependent inflammatory gene activation." *The Journal of biological chemistry* **281**(20): 14111-14118.
- Ho, Y., S. W. Tsao, et al. (2013). "STAT3 as a therapeutic target for Epstein-Barr virus (EBV)-associated nasopharyngeal carcinoma." *Cancer letters* **330**(2): 141-149.
- Hoe, S. L., E. S. Lee, et al. (2009). "Lack of Rb2/p130 genetic alteration in Malaysian nasopharyngeal carcinoma." *The Malaysian journal of pathology* **31**(1): 53-56.

- Hong, B., V. W. Lui, et al. (2013). "Targeting tumor hypoxia in nasopharyngeal carcinoma." *Head Neck* **35**(1): 133-145.
- Horikawa, T., J. Yang, et al. (2007). "Twist and epithelial-mesenchymal transition are induced by the EBV oncoprotein latent membrane protein 1 and are associated with metastatic nasopharyngeal carcinoma." *Cancer Res* **67**(5): 1970-1978.
- Hu, L. F., F. Chen, et al. (1993). "Clonability and tumorigenicity of human epithelial cells expressing the EBV encoded membrane protein LMP1." *Oncogene* **8**(6): 1575-1583.
- Huang, D. P., J. H. Ho, et al. (1989). "Cytogenetics of undifferentiated nasopharyngeal carcinoma xenografts from southern Chinese." *Int J Cancer* **43**(5): 936-939.
- Huang, D. P., K. W. Lo, et al. (1994). "A region of homozygous deletion on chromosome 9p21-22 in primary nasopharyngeal carcinoma." *Cancer Res* **54**(15): 4003-4006.
- Hui, A. B., Y. Y. Or, et al. (2005). "Array-based comparative genomic hybridization analysis identified cyclin D1 as a target oncogene at 11q13.3 in nasopharyngeal carcinoma." *Cancer Res* **65**(18): 8125-8133.
- Hui, E. P., A. T. Chan, et al. (2002). "Coexpression of hypoxia-inducible factors 1alpha and 2alpha, carbonic anhydrase IX, and vascular endothelial growth factor in nasopharyngeal carcinoma and relationship to survival." *Clin Cancer Res* **8**(8): 2595-2604.
- IARC (2012). Estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012. <http://globocan.iarc.fr/>, Globocan.
- Issa, J. P. (2004). "CpG island methylator phenotype in cancer." *Nat Rev Cancer* **4**(12): 988-993.
- Iwakiri, D., T. S. Sheen, et al. (2005). "Epstein-Barr virus-encoded small RNA induces insulin-like growth factor 1 and supports growth of nasopharyngeal carcinoma-derived cell lines." *Oncogene* **24**(10): 1767-1773.
- Iwakiri, D., L. Zhou, et al. (2009). "Epstein-Barr virus (EBV)-encoded small RNA is released from EBV-infected cells and activates signaling from Toll-like receptor 3." *J Exp Med* **206**(10): 2091-2099.
- Jeannel, D., G. Bouvier, et al. (1999). "Nasopharyngeal Carcinoma: an epidemiological approach to carcinogenesis." *Cancer Surveys* **33**: 125-155.
- Kalali, B. N., G. Kollisch, et al. (2008). "Double-stranded RNA induces an antiviral defense status in epidermal keratinocytes through TLR3-, PKR-, and MDA5/RIG-I-mediated differential signaling." *J Immunol* **181**(4): 2694-2704.
- Kalyankrishna, S. and J. R. Grandis (2006). "Epidermal growth factor receptor biology in head and neck cancer." *J Clin Oncol* **24**(17): 2666-2672.
- Kam, M. K., P. M. Teo, et al. (2004). "Treatment of nasopharyngeal carcinoma with intensity-modulated radiotherapy: the Hong Kong experience." *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **60**(5): 1440-1450.
- Karar, J. and A. Maity (2009). "Modulating the tumor microenvironment to increase radiation responsiveness." *Cancer Biol Ther* **8**(21): 1994-2001.
- Kariko, K., H. Ni, et al. (2004). "mRNA is an endogenous ligand for Toll-like receptor 3." *The Journal of biological chemistry* **279**(13): 12542-12550.
- Kariko, K., H. Ni, et al. (2004). "mRNA is an endogenous ligand for Toll-like receptor 3." *J Biol Chem* **279**(13): 12542-12550.
- Khabir, A., A. Sellami, et al. (2000). "Contrasted frequencies of p53 accumulation in the two age groups of North African nasopharyngeal carcinomas." *Clinical cancer research* **6**(10): 3932-3936.
- Kim, Y. M., M. M. Brinkmann, et al. (2008). "UNC93B1 delivers nucleotide-sensing toll-like receptors to endolysosomes." *Nature* **452**(7184): 234-238.
- Kollisch, G., B. N. Kalali, et al. (2005). "Various members of the Toll-like receptor family contribute to the innate immune response of human epidermal keratinocytes." *Immunology* **114**(4): 531-541.

- Kondo, S., S. Y. Seo, et al. (2006). "EBV latent membrane protein 1 up-regulates hypoxia-inducible factor 1alpha through Siah1-mediated down-regulation of prolyl hydroxylases 1 and 3 in nasopharyngeal epithelial cells." *Cancer Res* **66**(20): 9870-9877.
- Kong, Q. L., L. J. Hu, et al. (2010). "Epstein-Barr virus-encoded LMP2A induces an epithelial-mesenchymal transition and increases the number of side population stem-like cancer cells in nasopharyngeal carcinoma." *PLoS Pathog* **6**(6): e1000940.
- Kong, Q. L., L. J. Hu, et al. (2010). "Epstein-Barr virus-encoded LMP2A induces an epithelial-mesenchymal transition and increases the number of side population stem-like cancer cells in nasopharyngeal carcinoma." *PLoS Pathog* **6**(6): e1000940.
- Koukourakis, M. I., A. Giatromanolaki, et al. (2006). "Comparison of metabolic pathways between cancer cells and stromal cells in colorectal carcinomas: a metabolic survival role for tumor-associated stroma." *Cancer Res* **66**(2): 632-637.
- Koukourakis, M. I., A. Giatromanolaki, et al. (2002). "Hypoxia-inducible factor (HIF1A and HIF2A), angiogenesis, and chemoradiotherapy outcome of squamous cell head-and-neck cancer." *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **53**(5): 1192-1202.
- Kripalani-Joshi, S. and H. Y. Law (1994). "Identification of integrated Epstein-Barr virus in nasopharyngeal carcinoma using pulse field gel electrophoresis." *Int J Cancer* **56**(2): 187-192.
- Kroemer, G. and J. Pouyssegur (2008). "Tumor cell metabolism: cancer's Achilles' heel." *Cancer Cell* **13**(6): 472-482.
- Lacour, J., A. Laplanche, et al. (1991). "Polyadenylic-polyuridylic acid plus locoregional and pelvic radiotherapy versus chemotherapy with CMF as adjuvants in operable breast cancer. A 6 1/2 year follow-up analysis of a randomized trial of the French Federation of Cancer Centers (F.F.C.C.)." *Breast Cancer Res Treat* **19**(1): 15-21.
- Lacour, J., A. Laplanche, et al. (1992). "Polyadenylic-polyuridylic acid as an adjuvant in resectable colorectal carcinoma: a 6 1/2 year follow-up analysis of a multicentric double blind randomized trial." *Eur J Surg Oncol* **18**(6): 599-604.
- Lee, A. W., Y. F. Poon, et al. (1992). "Retrospective analysis of 5037 patients with nasopharyngeal carcinoma treated during 1976-1985: overall survival and patterns of failure." *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **23**(2): 261-270.
- Leemans, C. R., B. J. Braakhuis, et al. (2011). "The molecular biology of head and neck cancer." *Nat Rev Cancer* **11**(1): 9-22.
- Lemaitre, B., E. Nicolas, et al. (1996). "The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in Drosophila adults." *Cell* **86**(6): 973-983.
- Lewis, J. S., Jr. and R. D. Chernock (2014). "Human papillomavirus and Epstein Barr virus in head and neck carcinomas: suggestions for the new WHO classification." *Head and neck pathology* **8**(1): 50-58.
- Li, K., Z. Chen, et al. (2005). "Distinct poly(I-C) and virus-activated signaling pathways leading to interferon-beta production in hepatocytes." *J Biol Chem* **280**(17): 16739-16747.
- Li, L., Y. Zhang, et al. (2014). "Oncogenic induction of cellular high CpG methylation by Epstein-Barr virus in malignant epithelial cells." *Chinese journal of cancer*.
- Limmon, G. V., M. Arredouani, et al. (2008). "Scavenger receptor class-A is a novel cell surface receptor for double-stranded RNA." *FASEB J* **22**(1): 159-167.
- Lin, D. C., X. Meng, et al. (2014). "The genomic landscape of nasopharyngeal carcinoma." *Nature genetics* **46**(8): 866-871.
- Lin, Q., L. Wang, et al. (2012). "Toll-like receptor 3 ligand polyinosinic:polycytidylic acid promotes wound healing in human and murine skin." *J Invest Dermatol* **132**(8): 2085-2092.
- Liu, L., I. Botos, et al. (2008). "Structural basis of toll-like receptor 3 signaling with double-stranded RNA." *Science* **320**(5874): 379-381.
- Liu, L., Y. Cao, et al. (2010). "Cetuximab-based therapy versus non-cetuximab therapy for advanced cancer: a meta-analysis of 17 randomized controlled trials." *Cancer Chemother Pharmacol* **65**(5): 849-861.

- Liu, X., V. Ory, et al. (2012). "ROCK inhibitor and feeder cells induce the conditional reprogramming of epithelial cells." *The American journal of pathology* **180**(2): 599-607.
- Lo, A. K., K. F. To, et al. (2007). "Modulation of LMP1 protein expression by EBV-encoded microRNAs." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(41): 16164-16169.
- Lo, K., G. T. Chung, et al. (2013). Acquired genetic and epigenetic alterations in nasopharyngeal carcinomas. *Nasopharyngeal carcinoma - Keys for Translational Medicine and Biology*. P. Busson. Austin/New-York, Landes/Springer: 61-81.
- Lo, K. W., S. T. Cheung, et al. (1996). "Hypermethylation of the p16 gene in nasopharyngeal carcinoma." *Cancer Res* **56**(12): 2721-2725.
- Lo, K. W., D. P. Huang, et al. (1995). "p16 gene alterations in nasopharyngeal carcinoma." *Cancer Res* **55**(10): 2039-2043.
- Lo, K. W., J. Kwong, et al. (2001). "High frequency of promoter hypermethylation of RASSF1A in nasopharyngeal carcinoma." *Cancer Res* **61**(10): 3877-3881.
- Machiels, J. P., M. Lambrecht, et al. (2014). "Advances in the management of squamous cell carcinoma of the head and neck." *F1000Prime Rep* **6**: 44.
- Matijevic, T. and J. Pavelic (2012). "Poly(I:C) treatment influences the expression of calreticulin and profilin-1 in a human HNSCC cell line: a proteomic study." *Tumour Biol* **33**(4): 1201-1208.
- Matsumoto, M., K. Funami, et al. (2004). "Toll-like receptor 3: a link between toll-like receptor, interferon and viruses." *Microbiol Immunol* **48**(3): 147-154.
- Matsumoto, M., K. Funami, et al. (2003). "Subcellular localization of Toll-like receptor 3 in human dendritic cells." *J Immunol* **171**(6): 3154-3162.
- Miller, W. E., H. S. Earp, et al. (1995). "The Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 induces expression of the epidermal growth factor receptor." *J Virol* **69**(7): 4390-4398.
- Morikawa, T., A. Sugiyama, et al. (2007). "Identification of Toll-like receptor 3 as a potential therapeutic target in clear cell renal cell carcinoma." *Clin Cancer Res* **13**(19): 5703-5709.
- Moumad, K., J. Lascorz, et al. (2013). "Genetic polymorphisms in host innate immune sensor genes and the risk of nasopharyngeal carcinoma in North Africa." *G3 (Bethesda)* **3**(6): 971-977.
- Munn, L. L. (2003). "Aberrant vascular architecture in tumors and its importance in drug-based therapies." *Drug Discov Today* **8**(9): 396-403.
- Murray, P. G. and L. S. Young (2000). "Themed issue: the biology and pathology of the Epstein-Barr virus." *Mol Pathol* **53**(5): 219-221.
- Muzio, M., D. Bosisio, et al. (2000). "Differential expression and regulation of toll-like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells." *J Immunol* **164**(11): 5998-6004.
- Nanbo, A., K. Inoue, et al. (2002). "Epstein-Barr virus RNA confers resistance to interferon-alpha-induced apoptosis in Burkitt's lymphoma." *Embo J* **21**(5): 954-965.
- Newman, J. R., T. M. Connolly, et al. (2014). "Survival trends in Hypopharyngeal cancer: A population-based review." *Laryngoscope*.
- Ng, S. H., S. C. Chan, et al. (2009). "Staging of untreated nasopharyngeal carcinoma with PET/CT: comparison with conventional imaging work-up." *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **36**(1): 12-22.
- Nicholls, J. M., A. Agathangelou, et al. (1997). "The association of squamous cell carcinomas of the nasopharynx with Epstein-Barr virus shows geographical variation reminiscent of Burkitt's lymphoma." *J Pathol* **183**(2): 164-168.
- Nishiya, T. and A. L. DeFranco (2004). "Ligand-regulated chimeric receptor approach reveals distinctive subcellular localization and signaling properties of the Toll-like receptors." *J Biol Chem* **279**(18): 19008-19017.
- Nomi, N., S. Kodama, et al. (2010). "Toll-like receptor 3 signaling induces apoptosis in human head and neck cancer via survivin associated pathway." *Oncol Rep* **24**(1): 225-231.
- Nordström, M., M. Overgaard, et al. (1996). "Pretreatment oxygenation predicts radiation response in advanced squamous cell carcinoma of the head and neck." *Radiother Oncol* **41**(1): 31-39.
- Ohtani, N., P. Brennan, et al. (2003). "Epstein-Barr virus LMP1 blocks p16INK4a-RB pathway by promoting nuclear export of E2F4/5." *J Cell Biol* **162**(2): 173-183.

- Or, Y. Y., G. T. Chung, et al. (2010). "Identification of a novel 12p13.3 amplicon in nasopharyngeal carcinoma." *J Pathol* **220**(1): 97-107.
- Paone, A., R. Galli, et al. (2010). "Toll-like receptor 3 regulates angiogenesis and apoptosis in prostate cancer cell lines through hypoxia-inducible factor 1 alpha." *Neoplasia* **12**(7): 539-549.
- Park, B., M. M. Brinkmann, et al. (2008). "Proteolytic cleavage in an endolysosomal compartment is required for activation of Toll-like receptor 9." *Nat Immunol* **9**(12): 1407-1414.
- Perrot, I., F. Deauvieau, et al. (2010). "TLR3 and Rig-like receptor on myeloid dendritic cells and Rig-like receptor on human NK cells are both mandatory for production of IFN-gamma in response to double-stranded RNA." *Journal of immunology* **185**(4): 2080-2088.
- Pfeffer, S., M. Zavolan, et al. (2004). "Identification of virus-encoded microRNAs." *Science* **304**(5671): 734-736.
- Poltorak, A., X. He, et al. (1998). "Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene." *Science* **282**(5396): 2085-2088.
- Pouyssegur, J., F. Dayan, et al. (2006). "Hypoxia signalling in cancer and approaches to enforce tumour regression." *Nature* **441**(7092): 437-443.
- Pradere, J. P., D. H. Dapito, et al. (2014). "The Yin and Yang of Toll-like receptors in cancer." *Oncogene* **33**(27): 3485-3495.
- Prasad, U. and K. C. Pua (2000). "Nasopharyngeal carcinoma: a delay in diagnosis." *Med J Malaysia* **55**(2): 230-235.
- Pries, R., L. Hogrefe, et al. (2008). "Induction of c-Myc-dependent cell proliferation through toll-like receptor 3 in head and neck cancer." *Int J Mol Med* **21**(2): 209-215.
- Robinson, M., Y. E. Suh, et al. (2013). "Oncogenic human papillomavirus-associated nasopharyngeal carcinoma: an observational study of correlation with ethnicity, histological subtype and outcome in a UK population." *Infectious agents and cancer* **8**(1): 30.
- Rydberg, C., A. Mansson, et al. (2009). "Toll-like receptor agonists induce inflammation and cell death in a model of head and neck squamous cell carcinomas." *Immunology* **128**(1 Suppl): e600-611.
- Salaun, B., P. Romero, et al. (2007). "Toll-like receptors' two-edged sword: when immunity meets apoptosis." *Eur J Immunol* **37**(12): 3311-3318.
- Salaun, B., L. Zitvogel, et al. (2011). "TLR3 as a biomarker for the therapeutic efficacy of double-stranded RNA in breast cancer." *Cancer Res* **71**(5): 1607-1614.
- Salceda, S. and J. Caro (1997). "Hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. Its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes." *J Biol Chem* **272**(36): 22642-22647.
- Samanta, M., D. Iwakiri, et al. (2006). "EB virus-encoded RNAs are recognized by RIG-I and activate signaling to induce type I IFN." *Embo J* **25**(18): 4207-4214.
- Seong, S. Y. and P. Matzinger (2004). "Hydrophobicity: an ancient damage-associated molecular pattern that initiates innate immune responses." *Nat Rev Immunol* **4**(6): 469-478.
- Seya, T., H. Shime, et al. (2012). "TLR3/TICAM-1 signaling in tumor cell RIP3-dependent necroptosis." *Oncoimmunology* **1**(6): 917-923.
- SFORL (2012). "Bilan préthérapeutique des carcinomes des VADS." *Référentiel SFORL Société Française ORL & CCF*.
- Shanmugaratnam, K. (1991). Histological typing of tumors of the upper respiratory tract and ear. *International histological classifications of tumours*, 2nd ed Geneva: 32-33.
- Sivachandran, N., F. Sarkari, et al. (2008). "Epstein-Barr nuclear antigen 1 contributes to nasopharyngeal carcinoma through disruption of PML nuclear bodies." *PLoS Pathog* **4**(10): e1000170.
- Skinner, D. W., C. A. Van Hasselt, et al. (1991). "Nasopharyngeal carcinoma: modes of presentation." *Ann Otol Rhinol Laryngol* **100**(7): 544-551.
- Spector, J. G., D. G. Sessions, et al. (2001). "Delayed regional metastases, distant metastases, and second primary malignancies in squamous cell carcinomas of the larynx and hypopharynx." *Laryngoscope* **111**(6): 1079-1087.

- Swietach, P., R. D. Vaughan-Jones, et al. (2007). "Regulation of tumor pH and the role of carbonic anhydrase 9." *Cancer Metastasis Rev* **26**(2): 299-310.
- Taguchi, T., J. L. Mitcham, et al. (1996). "Chromosomal localization of TIL, a gene encoding a protein related to the *Drosophila* transmembrane receptor Toll, to human chromosome 4p14." *Genomics* **32**(3): 486-488.
- Tarbouriech, N., F. Ruggiero, et al. (2006). "Structure of the Epstein-Barr Virus Oncogene BARF1." *J Mol Biol* **359**(3): 667-678.
- Toscano, F., Y. Estornes, et al. (2013). "Cleaved/associated TLR3 represents the primary form of the signaling receptor." *J Immunol* **190**(2): 764-773.
- Tsang, C. M., Y. L. Yip, et al. (2012). "Cyclin D1 overexpression supports stable EBV infection in nasopharyngeal epithelial cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**(50): E3473-3482.
- Vander Heiden, M. G., L. C. Cantley, et al. (2009). "Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation." *Science* **324**(5930): 1029-1033.
- Vermorken, J. B., R. Mesia, et al. (2008). "Platinum-based chemotherapy plus cetuximab in head and neck cancer." *N Engl J Med* **359**(11): 1116-1127.
- Wang, G. L., B. H. Jiang, et al. (1995). "Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(12): 5510-5514.
- Wang, K., J. Kan, et al. (2011). "Exome sequencing identifies frequent mutation of ARID1A in molecular subtypes of gastric cancer." *Nature genetics* **43**(12): 1219-1223.
- Warburg, O., K. Posener, et al. (1924). "Uber den Stoffwechsel der Tumoren." *Biochem. Z.* **152**: 319-344.
- Wei, M. X. and T. Ooka (1989). "A transforming function of the BARF1 gene encoded by Epstein-Barr virus." *EMBO J* **8**(10): 2897-2903.
- Weinberger, P. M., Z. Yu, et al. (2006). "Molecular classification identifies a subset of human papillomavirus--associated oropharyngeal cancers with favorable prognosis." *J Clin Oncol* **24**(5): 736-747.
- Werness, B. A., A. J. Levine, et al. (1990). "Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53." *Science* **248**(4951): 76-79.
- West, C. M. and J. H. Hendry (1992). "Intrinsic radiosensitivity as a predictor of patient response to radiotherapy." *BJR Suppl* **24**: 146-152.
- Wu, T. C., R. B. Mann, et al. (1991). "Abundant expression of EBER1 small nuclear RNA in nasopharyngeal carcinoma. A morphologically distinctive target for detection of Epstein-Barr virus in formalin-fixed paraffin-embedded carcinoma specimens." *Am J Pathol* **138**(6): 1461-1469.
- Yeh, S. H., R. S. Liu, et al. (1996). "Fluorine-18 fluoromisonidazole tumour to muscle retention ratio for the detection of hypoxia in nasopharyngeal carcinoma." *Eur J Nucl Med* **23**(10): 1378-1383.
- Yip, W. K. and H. F. Seow (2012). "Activation of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling by EGF downregulates membranous E-cadherin and beta-catenin and enhances invasion in nasopharyngeal carcinoma cells." *Cancer letters* **318**(2): 162-172.
- Yu, K. J., W. L. Hsu, et al. (2011). "Prognostic utility of anti-EBV antibody testing for defining NPC risk among individuals from high-risk NPC families." *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **17**(7): 1906-1914.

ANNEXES

ANNEXES

Mon travail de thèse portait sur l'étude du récepteur TLR3 dans les carcinomes des VADS, et notamment du carcinome nasopharyngé. A partir de 2012, je me suis également engagé dans un autre projet mené au laboratoire : il s'agissait d'une étude préclinique qui visait à évaluer le potentiel thérapeutique de l'Abexinostat, un inhibiteur d'histone déacétylase (HDACi) développé par les laboratoires Servier. L'objectif était de tester l'Abexinostat soit seul, soit en association avec le cisplatine ou les radiations ionisantes dans le carcinome nasopharyngé, d'abord sur des lignées propagées *in vitro*, puis *in vivo* sur des lignées propagées sous forme de xénogreffes murines. Les résultats obtenus ont confirmé l'efficacité de l'Abexinostat utilisé en monothérapie, et surtout la synergie avec les autres agents thérapeutiques. Il était également observé une diminution de la protéine RAD51, impliquée dans la réparation de l'ADN, dans les cellules traitées par l'Abexinostat. Ce travail a abouti à la publication d'un article en co-premier auteur dans la revue PLOS ONE en 2013, présenté ici en annexe.

Treatment of Nasopharyngeal Carcinoma Cells with the Histone-Deacetylase Inhibitor Abexinostat: Cooperative Effects with Cis-platin and Radiotherapy on Patient-Derived Xenografts

Mélanie Gressette^{1,2}, Benjamin Vérillaud^{1,3}, Anne-Sophie Jimenez-Pailhès¹, Hélène Lelièvre², Kwok-Wai Lo³, François-Régis Ferrand⁴, Charles-Henry Gattoliat¹, Anne Jacquet-Bescond², Laurence Kraus-Berthier², Stéphane Depil², Pierre Busson^{1*}

1 Université Paris-sud, CNRS-UMR 8126 and Gustave Roussy, Villejuif, France, **2** Institut de Recherches Internationales Servier, Suresnes, France, **3** The Chinese University of Hong-Kong, Hong Kong SAR, China, **4** Hôpital du Val de Grâce, Paris, France

Abstract

EBV-related nasopharyngeal carcinomas (NPCs) still raise serious therapeutic problems. The therapeutic potential of the histone-deacetylase (HDAC) inhibitor Abexinostat was investigated using 5 preclinical NPC models including 2 patient-derived xenografts (C15 and C17). The cytotoxicity of Abexinostat used either alone or in combination with cis-platin or irradiation was assessed *in vitro* by MTT and clonogenic assays using 2 EBV-negative (CNE1 and HONE1) and 3 EBV-positive NPC models (C15, C17 and C666-1). Subsequently, the 3 EBV-positive models were used under the form of xenografts to assess the impact of systemic treatments by Abexinostat or combinations of Abexinostat with cis-platin or irradiation. Several cell proteins known to be affected by HDAC inhibitors and the small viral non-coding RNA EBER1 were investigated in the treated tumors. Synergistic cytotoxic effects of Abexinostat combined with cis-platin or irradiation were demonstrated *in vitro* for each NPC model. When using xenografts, Abexinostat by itself (12.5 mg/kg, BID, 4 days a week for 3 weeks) had significant anti-tumor effects against C17. Cooperative effects with cis-platin (2 mg/kg, IP, at days 3, 10 and 17) and irradiation (1Gy) were observed for the C15 and C17 xenografts. Simultaneously two types of biological alterations were induced in the tumor tissue, especially in the C17 model: a depletion of the DNA-repair protein RAD51 and a stronger *in situ* detection of the small viral RNA EBER1. Overall, these results support implementation of phase I/II clinical trials of Abexinostat for the treatment of NPC. A depletion of RAD51 is likely to contribute to the cooperation of Abexinostat with DNA damaging agents. Reduction of RAD51 combined to enhanced detection of EBER 1 might be helpful for early assessment of tumor response.

Citation: Gressette M, Vérillaud B, Jimenez-Pailhès A-S, Lelièvre H, Lo K-W, et al. (2014) Treatment of Nasopharyngeal Carcinoma Cells with the Histone-Deacetylase Inhibitor Abexinostat: Cooperative Effects with Cis-platin and Radiotherapy on Patient-Derived Xenografts. PLoS ONE 9(3): e91325. doi:10.1371/journal.pone.0091325

Editor: Maria G. Masucci, Karolinska Institutet, Sweden

Received November 8, 2013; **Accepted** February 9, 2014; **Published** March 11, 2014

Copyright: © 2014 Gressette et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: Research carried by Pierre Busson's group has been supported by a contract linking Servier, a company developing Abexinostat, and Institut Gustave Roussy. Benjamin Verillaud was the recipient of a fellowship from the Institut National du Cancer (FOR – 2010-INCa_3113) and from the APHP-CNRS (RAFCNR11). Hélène Lelièvre, Anne Jacquet-Bescond, Laurence Kraus-Berthier, and Stéphane Depil are employed by Servier, and had a role in study design, data analysis, decision to publish, and preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors confirm that Hélène Lelièvre, Anne Jacquet-Bescond, Laurence Kraus-Berthier and Stéphane Depil are employed by Servier, a company developing Abexinostat. This does not alter the authors' adherence to PLOS ONE policies on sharing data and materials. Pierre Busson is a PLOS ONE Editorial Board member. This does not alter the authors' adherence to PLOS ONE Editorial policies and criteria.

* E-mail: pbusson@igr.fr

• These authors contributed equally to this work.

Introduction

Nasopharyngeal carcinoma (NPC) is a malignant tumor arising from the epithelial lining of the nasopharynx. NPC represent a major public health problem worldwide [1]. In order of frequency, it is the third leading cause of virus-related human malignancy, ranking just behind hepatocellular carcinoma linked to HBV and HCV and cervix carcinoma associated with HPV. Incidence of NPC is particularly high in South China, especially in the Guangdong province (approximately 25 cases per 100 000 persons per year). In addition, there are areas of intermediate incidence whose extension has long been underestimated. These areas

include much of Southeast Asia (Philippines, Indonesia, Thailand and Vietnam) and North Africa. Regardless of patient geographical origin, NPCs are constantly associated with the Epstein Barr Virus (EBV) (except for a very small number of highly differentiated atypical forms related to tobacco and alcohol which are observed in Europe and North America) [2]. No viral particles are detected in the tumor but the EBV genome is present in the nucleus of all malignant cells, encoding for a number of latent gene products, particularly non-translated RNAs (EBERs) and nuclear (EBNA1) or membrane proteins (LMP1 and LMP2). NPC is clearly a multifactorial disease, non-viral risk factors are germline genetic susceptibility and diet carcinogens which probably account

for multiple acquired cellular genetic and epigenetic alterations [1].

The 5-year overall survival (OS) range from 60 to 95% for localized disease depending on the stage, while median OS is 24 months in case of metastatic disease [3,4]. On average, NPCs are more radiosensitive and chemosensitive than other head and neck tumors and radiotherapy is the cornerstone of curative treatments. However, they still raise serious therapeutic concerns [5].

In the curative setting, because NPCs are often diagnosed at an advanced stage, the challenge is to reduce the rate of local and distant failures while reducing toxicities associated with radiotherapy. These aims have been partially met by advances in radiotherapy techniques and combination of radiotherapy with systemic treatments. The advent of Intensity Modulated Radiotherapy and 3-dimensional conformational radiotherapy now allow to limit the dose delivered to at-risk organs, and have been shown to lower the risk of xerostomia [6]. However, although xerostomia and other functional sequelae have become less frequent they have not been completely eliminated. Concomitant cis-platin based chemo-radiotherapy has proven to improve the disease-free and overall survival. Nevertheless, metastatic relapses and even locoregional failures still occur.

In the palliative setting, although NPCs are initially highly sensitive to chemotherapy, they often escape from treatment control after a few months and treatment options remain poor. Currently the main agents are cis-platin (CDDP), taxanes, gemcitabine and 5FU. Despite promising results obtained through *in vitro* studies, the use of targeted therapeutic agents is still limited. Additional progress will require the diversification of therapeutic agents available for systemic treatments. High expression of Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) and Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) in NPC has supported the rationale for clinical trials involving EGFR inhibitors (Cetuximab, gefitinib, and erlotinib) and VEGF inhibitors (bevacizumab, sunitinib; pazopanib)[7,8,9]. There have been several phase II trials using these compounds either alone or in combination with conventional treatment, with variable results and sometimes at the cost of severe toxicities (for instance hemorrhagic events with sunitinib)[10,11,12,13]. To date, to our knowledge, there is no phase III trial of molecular targeted therapy in NPC.

Previous laboratory studies have reported a significant anti-tumor effect of a histone-deacetylase (HDAC) inhibitor Vorinostat using the C666-1 NPC cell line as the main experimental target [14]. The aim of our study was to use several NPC models, including patient-derived xenografts, to explore the therapeutic potential of a novel pan-HDAC inhibitor, Abexinostat. This compound is currently in Phase I/II clinical trials and being developed for the treatment of solid tumors as well as hematologic malignancies; the dose-limiting toxicity is the observation of thrombocytopenia [15,16]. One important aim of our preclinical study was to investigate cooperative anti-tumor effects of Abexinostat combined with either CDDP or radiotherapy. We here report that such cooperative anti-tumor effects were found in several of our models especially the two patient-derived xenografts (PDX) C15 and C17. Two types of biological alterations induced by Abexinostat were observed in these PDX: a decrease in the concentration of the DNA-repair protein RAD51 and enhanced *in situ* detection of the viral RNA EBER 1.

Materials And Methods

Ethics statement

The C15 and C17-PDX (patient-derived xenografts) tumor lines were derived from biopsies of patients admitted at the Institut

Gustave Roussy. Some fragments of these biopsies which were in excess of what was required for diagnostic procedures were used to make xenografts. This was done with the approval of the multidisciplinary “Gustave Roussy NPC study group”, a structure gathering all leaders and several members of clinical departments/services and research laboratories involved in NPC treatment and research along with experts from other institutions. At that time, there was no ethics committee or IRB in Gustave Roussy. However the “Gustave Roussy NPC study group” was regarded as competent for medical, scientific and ethical matters. Members were meeting bi-monthly. Oral informed consent was given by the patients - and their parents for minor patients - to the Head of the ENT surgery service. According to the laws in force at that time (1983 to 1987), oral informed consent was sufficient for this procedure. Participant consent was recorded in the bi-monthly report of the “Gustave Roussy NPC study group”. The C15 and C17-PDX tumor lines have been initially described in 1988 [17]. Since this publication, they have been used in several studies (for example Sbih-Lammali et al., Cancer Research 1999; Klibi et al., Blood, 2009) [18,19].

Procedures for nude mouse experiments were approved by the animal experimentation ethics committee of the Institut Gustave Roussy (CEEA-26 - decision # 2012-079).

Xenografts and cell lines

We used a unique set of NPC models, including two EBV-negative cell lines (CNE1 and HONE1), one EBV-positive cell line (C666-1), and two patient-derived NPC EBV-positive xenografts (C15, C17) [20].

The C666-1 cells can be propagated *in vitro* as well as under the form of culture-derived xenografted tumors, while retaining the EBV genome [21,22]. *In vitro*, C666-1 cells were grown in plastic flasks coated with collagen I (Biocoat; Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ) using RPMI 1640 medium (Gibco-Invitrogen, Carlsbad, CA) supplemented with 25 mM HEPES and 7.5% foetal calf serum (FCS).

The C15- and C17-PDX (patient-derived xenografts) tumor lines are also EBV-positive. In brief C15 was derived from a primary tumor biopsy taken prior to any treatment from a 13-year old female patient from Morocco with a T4N3M0 NPC. She was initially treated with 3 cycles of COPAD (cyclophosphamide, vincristine, prednisolone, doxorubicin) resulting in 70% regression of the primary tumor and cervical lymph nodes. This neo-adjuvant chemotherapy was completed by external radiotherapy. However, bone metastases became symptomatic and visible on the CT scan immediately after the completion of radiotherapy. They were not stopped despite six cycles of vincristine, cyclophosphamide and CDDP. The patient died one year after her first admission. C17 was derived from the biopsy of a cutaneous metastasis taken from a multi-treated 38 year old male patient from France with a T3N3M0 NPC. The primary tumor and cervical lymph nodes were initially treated by radiotherapy. Multiple lung and skin metastases were discovered one year later. Complete remission was achieved after 6 cycles of chemotherapy combining CDDP, doxorubicin, bleomycin, vindesine and cyclophosphamide (six cycles). However two months later, lung and skin metastatic lesions were reactivated and found to be resistant to chemotherapy combining CDDP, bleomycin and 5-FU (4 cycles). The C17 xenograft was derived from a specimen obtained at this last stage of the disease.

The C15- and C17-PDX propagated by serial passages into nude mice were used between passages 250 and 270 and 230 and 250 respectively. For short-term *in vitro* experiments, single-cell suspensions were derived from C15 and C17 tumor fragments by

collagenase cell dispersion as previously reported [23]. These cell preparations were designated C15 and C17 cells *ex vivo*.

The p53 status is known for all these NPC models. CNE1 and HONE 1 have a G to C transversion at codon 280 [24,25]. C15 and C666-1 have retained wild-type on both alleles whereas C17 has a deletion of both alleles of the p53 gene [26].

Pharmacological reagents

Abexinostat (Code: S78454-1; also coded PCI-24781-HCl by Pharmacyclics®) was provided by Technologie Servier (Orléans, France). For *in vitro* experiments, Abexinostat was solubilized at 10^{-2} M in DMSO, aliquoted and stored at -20°C . The frozen stock was thawed only once. Intermediate and final dilutions were prepared extemporaneously in complete culture medium protected from intensive light. For *in vivo* experiments, Abexinostat was diluted every two days in a sterile aqueous solution of 200 mM (2-hydroxypropyl)-beta-cyclodextrin (HPCD) protected from light. For example, to treat 25 mice weighing 25 g with a dose of 25 mg/kg for 2 days, 32 mg of compound were diluted in 20 ml of HPCD.

Cis-diammineplatinum (II) dichloride, named CDDP hereafter, was purchased from Sigma Aldrich (St. Quentin Fallavier, France). For *in vitro* experiments, CDDP was solubilized at 5 mM in DMSO, aliquoted and stored at -80°C . For *in vivo* experiments, CDDP was diluted in a 200 mM (2-hydroxypropyl)-beta-cyclodextrin (HPCD) sterile aqueous solution, aliquoted and stored at -20°C . For studies combining Abexinostat with CDDP, cell viability was assessed after concomitant treatment. For studies combining Abexinostat with irradiation, cells were pretreated with Abexinostat for at least 24 h prior to delivery of irradiation which was performed using an IBL 637 Cesium irradiator (Cis Bio International, Gif/Yvette, France).

Cell viability assays

Cell viability was determined in short-term assays based on the reduction of MTT (CNE1, HONE1) or WST (a soluble form of MTT for C666-1, C15 and C17 *ex vivo*). MTT and WST were purchased from Sigma Aldrich. For these assays, cells were seeded in 96-well plates directly on the plastic at a density of 2×10^3 (CNE1, HONE1), 3×10^4 (C666-1) or 6×10^4 (C15 and C17 *ex vivo*) cells per well using triplicates for each experimental conditions. Abexinostat and/or CDDP were added 1 to 4 hours after NPC cell plating. Overall, the total duration of cell incubation with Abexinostat and/or CDDP was about 48 h prior to MTT or WST assays. For studies combining Abexinostat with irradiation, Abexinostat treatment started on D1 with irradiation delivered 24 hours later (D2). The MTT/WST reaction was performed at least 24 hours post-irradiation. The calculation of the percentage of inhibition was based on the difference of OD between treated and untreated cells, after subtraction of the optical background.

Alternatively, *in vitro* growth assays were performed at low cell density to evaluate the effect of Abexinostat and combinations on the clonogenic potential of the most robust NPC cell lines (HONE1, CNE1 and C666-1). Assays were performed in six-well plates. HONE1 and CNE1 were seeded directly on the plastic at 2.5×10^2 cells per well. C666-1 cells were seeded at 5×10^3 cells per well on a feeder of irradiated normal human dermal fibroblasts (NHDF; Promocell, Heidelberg, Germany). Treatment with Abexinostat and/or CDDP was started 24 hours following cell plating. For experiments dealing with the combination of Abexinostat with radiotherapy, irradiation was performed 48 h after plating (i.e. 24 h after starting Abexinostat for cells treated by both agents). Treated and control cells were maintained in culture for time intervals allowing colonies of control cells to reach the

adequate size for staining and counting. On average, 3 weeks were required for sufficient growth of the colonies. Two thirds of the culture medium was changed each 10 days without novel addition of the pharmacological compounds. At the completion of the incubation time, cell colonies were stained with a solution of Crystal Violet (Sigma Aldrich) in methanol (HONE1, CNE1) or a solution of Rhodanile Blue (Sigma Aldrich) in ethanol (C666-1) which is more specific for epithelial cells. Dried plates were then scanned and digitized to allow optical magnification and precise counting of cell colonies.

We used the Bliss additivism model to quantify the level of synergy in these drug-combination experiments [27]. The predicted Bliss additive effect C of two single compounds with effects A and B is: $C = A+B-A \cdot B$ (where A, B and C are percentages of inhibition). The excess over Bliss additivism (EOBA) was calculated by subtracting the predicted Bliss additive effect from the experimentally observed inhibition; it represents the excess of inhibition over the predicted response when 2 compounds are used in combination. Values greater than 10 are indicative of a synergy between the 2 compounds.

Cell Protein Extraction and Western Blot Analysis

Proteins from cultured cells were extracted after 48 hours of treatment by lysis in RIPA buffer (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.5% sodium deoxycholic acid, 0.5% NP-40, 0.1% SDS) supplemented with a protease inhibitor cocktail (Complete; Roche Molecular, Neuilly sur Seine, France). They were separated by SDS-PAGE and transferred to PolyVinylDene diFluoride membranes (Immobilon, Millipore, Billerica, CA) by electroblot at 4°C for 90 minutes at 90 V or overnight at 45 V. Primary antibodies were mouse monoclonal antibodies directed against acetylated α -Tubulin (6-11B-1; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), PARP 1 (C-2-10; Calbiochem, San Diego, CA), β -actin and α -Tubulin (AC-74 and B-5-1-2, respectively; Sigma), rabbit polyclonal antibodies directed against RAD51 and RAD23B (sc-8349 and sc-67226, respectively; Santa Cruz Biotechnology). Blotted membranes were incubated with a secondary peroxidase-conjugated antibody, and chemiluminescent detection was done using the Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore, Billerica, CA).

Nude mice experiments

Procedures for nude mouse experiments were approved by the animal experimentation ethics committee of the Institut Gustave Roussy (CEEA-26 - decision # 2012-079). Female swiss nude mice (nu/nu) at 6-8 weeks of age were xenografted by subcutaneous insertion of tumor fragments (average diameter of fragments 3 mm). The amount of grafted fragments was weighted for each mouse to ensure as much as possible equal tumor load in all treated and control mice (350 mg of wet fragments per mouse). Treatments started 10 to 15 days later depending on the type of xenograft (average volume of 100 mm^3 at this stage). Groups of 10 mice were used for each therapeutic condition (vehicle—Abexinostat—vehicle+other modality—Abexinostat + other modality). Abexinostat was given from D1 to D4, D8 to D11 and D15 to D17 (intra-peritoneal (IP) injections of 12.5 mg/kg twice a day, with an interval of 6 to 8 hours). CDDP was given IP at a dose of 2 mg/kg at D3, D10 and D17. Treatment by external irradiation was done at D3, D10 and D17. Selective tumor irradiation was delivered using a Varian NDI 226 X-ray tube (0.87 Gy/mn) under a tension of 200 KV at 15 mA, with a 0.2 mm cooper filter and a skin-source distance of 21 cm. Mice were sacrificed at day 18 following the onset of the treatment. Caliper tumor measurements and weighing of the animals were done at least three days a week.

Animals with weight losses greater than 20% were sacrificed. Drug doses were adapted to weigh losses of less than 20%. In all cases, animals were sacrificed at day 18 following the onset of the treatment. For biochemical assays performed on tumor material treated *in vivo*, xenografted mice were treated for 48 hours prior to animal sacrifice and tumor collection.

Statistical analysis of xenografted tumor growth

The statistical analysis was done on Log [tumor weight (mg) +1]. The synergy was analyzed by a two-way [Abexinostat x PI (proposed interactor)(CDDP or irradiation)] analysis of variance. When the (Abexinostat x PI) interaction was significant, complementary analyses of Abexinostat effect was done at fixed levels of PI. Otherwise a profile analysis was performed: REML method and Satterthwaite degrees of freedom were used. Threshold: 10% for interaction term, 5% for principal effects.

When the (Treatment x Time) interaction was significant, complementary analyses of Treatment effect was done at fixed levels of Time, otherwise an analysis of all time points taken together was performed. Each two-by-two comparison was performed, using a Tukey correction for multiplicity (REML method, Satterthwaite degrees of freedom, ARH variance-covariance matrix). Threshold: 10% for interaction term, 5% for principal effects.

RNA extraction and transcript assessment by real-time RT-PCR

Total RNA from cultured cells and xenografted tumors was extracted using the mirVana isolation kit (Life Technologies, Saint-Aubin, France) skipping the procedure for separation of small RNAs. Real time RT-PCR was done using the “TaqMan RNA to C_T 1-Step” kit from Life Technologies where RNA is processed in the same tube for reverse transcription and subsequent PCR amplification of one specific RNA target template. In each tube, the same oligo-nucleotide is used as an RT primer and a PCR anti-sense primer, successively. For each RNA target, RT-PCR reactions were done in duplicate or triplicate. The TaqMan primers/probe oligonucleotide mixes were from Life Technologies. For RAD51, GAPDH and TFRC1 we used standard oligonucleotide sets, Hs00153418, Hs03929097 and Hs00174609, respectively. For EBER1 we used custom made oligonucleotides and internal probe (“custom gene expression Taqman assay”; forward primer: 5'-GGACCTACGCTGCC-TAGA-3’, reverse primer: 5'- GGGACGGGTGGCTACAG-3'; internal probe: 5'-CCTCCCTAGCAAAACC-3'). For one single reaction, the following reagents were mixed: 0.31 µl RT enzyme mix (containing Arrayscript reverse transcriptase), 6.25 µl PCR mix (containing AmpliTaq Gold DNA polymerase) and 0.63 µl primers/probe mix (final concentration of the primers and FAM-labeled probe: 0.9 and 0.25 µM respectively), 5.31 µl RNA solution (containing 5 or 20 ng of RNA) for a total reaction volume of 12.5 µl. Reaction were run in a StepOnePlus thermal cycler (Life Technologies) beginning by one step at 45°C for 30 min (RT reaction) and one step at 95°C for 10 min (release of single strand DNA and activation of the DNA polymerase). These initial steps were followed by 40 cycles including one step at 95°C for 15 sec and one step at 60°C for one min. Results were analyzed using the StepOne software.

EBER1 *in situ* hybridization

Pieces of C666-1 and C17 xenografts were fixed in 4% paraformaldehyde, paraffin-embedded and cut in 4 µM sections. EBER detection was performed by *in situ* hybridization using the

INFORM EBER Probe (specific of the EBER1 RNA) and the i-VIEW Blue Detection Kit from Ventana-Roche (Ref 800-2842 and 800-092 respectively)(Tucson, AZ, USA).

Results

Abexinostat exerts significant cytotoxic effects on EBV-positive NPC cells treated *in vitro*

The cytotoxicity of Abexinostat on NPC cells was investigated using target cells from EBV-negative (HONE1, CNE1) and EBV-positive (C666-1, C15 and C17) NPC models. The human diploid lung fibroblasts MRC5 were used as a non-malignant reference [28]. Cells were treated with various concentrations of the pharmaceutical agents during 48 hours. Dose-response curves were determined using short-term assays based on high density cultures and final measurements by reduction of MTT (HONE1 and CNE1) or WST (C666-1, C17 and C15). As shown in Table 1, MRC5 was relatively resistant to Abexinostat (IC50 of 500 nM). The IC50 for the EBV-negative NPC models was in the same range. In contrast, the EBV-positive NPC models were much more sensitive, especially C17 (IC50 = 150 nM). The cytotoxicity of CDDP was investigated in parallel experiments resulting in IC50 values about 10-fold higher, in the range of 3 to 10 µM. In contrast with our observations about Abexinostat, the EBV-positive NPC cells were somehow more resistant to CDDP than the 2 EBV-negative cell-lines. Clonogenic assays for Abexinostat were performed for three cell lines able to sustain prolonged growth at low density, HONE1, CNE1 and C666-1. For the EBV-negative HONE1 cell-line, values of IC50 derived from the clonogenic assays were identical to those obtained using high density cell cultures. In contrast, they were reduced for CNE1 (EBV-negative). A greater reduction was recorded for C666-1 (EBV-positive), from 220 (high density culture) to 70 nM (clonogenic assay) (Table 1). This suggests that homologous cellular interactions have a special role in the resistance of C666-1 cells to Abexinostat.

Cooperative cytotoxic effects of Abexinostat combined with CDDP or irradiation on NPC cells treated *in vitro*

CDDP is a major standard therapeutic agent for the treatment of nasopharyngeal carcinomas. Therefore, our next aim was to investigate a possible cooperative effect of Abexinostat and CDDP against NPC cells treated *in vitro*. NPC cells were treated for 48 h with low concentrations of Abexinostat or/and CDDP. These concentrations were in the range of IC50/8 to IC50/2, in other words, 25 to 150 nM (Abexinostat) and 0.5 to 2 µM (CDDP). The impact of single or combined agents was first measured by MTT

Table 1. Sensitivity of NPC cells treated *in vitro* with Abexinostat or CDDP used as single agents.

Cell type	Abexinostat IC50		CDDP IC50	
	MTT/WST	Clonogenic assay	MTT/WST	Clonogenic assay
MRC5	500 nM		15 µM	
HONE1	400 nM	400 nM	3 µM	1.8 µM
CNE1	700 nM	300 nM	3 µM	1.8 µM
C666-1	220 nM	70 nM	10 µM	4 µM
C15	200 nM		5 µM	
C17	150 nM		8 µM	

doi:10.1371/journal.pone.0091325.t001

or WST assays. Levels of cooperation between the 2 agents were assessed using the Bliss additivism model [27]. Results obtained with the most successful combinations of drug dosages are displayed in Figure 1. The combination of the 2 compounds was qualified as synergistic when the excess over Bliss additivism (EOBA) was above a threshold of 10. The best synergies were recorded for C17 and to a lesser extent HONE1 and C15 (Figure 1). In contrast, there was almost no cooperation of the two agents when treating C666-1 and CNE1. For HONE1, CNE1 and C666-1, the cooperation between Abexinostat and CDDP was further investigated using clonogenic assays. Results obtained with the most successful combinations of drug dosages are displayed in Figure 2. Synergistic effects greater than those observed with MTT/WST assays were recorded for HONE1 and C666-1. A cooperative effect which was not apparent when using the MTT assay was also demonstrated for CNE1.

External irradiation is another major therapeutic arm for the treatment of nasopharyngeal carcinomas. Therefore, we investigated the potential synergistic effects of Abexinostat combined with external irradiation. Abexinostat was applied for 48 h at concentrations in the range of IC₅₀/8 to IC₅₀/2, in other words, 25 to 150 nM. Irradiation was delivered 24 h after the onset of Abexinostat at doses of 1, 2 or 4 Gy. The impact of single or combined agents was first measured by MTT or WST assays. Results obtained with the most successful combinations of treatment dosages are displayed in Figure 3. The best cooperative effects were obtained for C15 and C17. When using high density cultures only minimal cooperation was recorded for C666-1 and no synergy was observed for the EBV-negative cell lines, HONE1 and CNE1. However, synergistic effects were demonstrated for

HONE1, CNE1 and C666-1 cells when making clonogenic assays (Figure 4).

In summary, C17 cells were highly sensitive to both modalities of combined treatments. On the other hand, C15 cells were highly sensitive to the combination of Abexinostat with irradiation but only mildly sensitive to the combination of Abexinostat with CDDP. For HONE-1, CNE1 and C666-1 a robust synergy was observed only when using clonogenic assays.

Cooperative tumor growth reduction of NPC xenografts treated with Abexinostat combined with CDDP or external irradiation

On the basis of preliminary experiments, we adopted the following regimen for administration of Abexinostat to nude mice bearing xenografted tumors: 12.5 mg/kg IP BID 4 days a week for 3 weeks. With regards to CDDP, preliminary experiments were done on all three types of NPC xenografts to evaluate the magnitude of tumor growth reduction under various doses (2, 4 and 8 mg/kg, once a week for 3 weeks) (Fig S1, S2 and S3). At the dose of 2 mg/kg, no growth reduction was observed; on the contrary, we consistently noted a small increase in tumor growth under treatment for all three xenografts. At 4 mg/kg, the rate of tumor growth was reduced but not to the same extent in C17 (2.8 fold reduction at day 18 post-treatment), C15 (1.7 fold) and C666-1 (1.3 fold). At 8 mg/kg – the maximum tolerated dose – tumor growth was virtually blocked for C15 and C17 and only mildly reduced for C666-1. In summary, the C15 and C17 xenografts were sensitive to CDDP whereas C666-1 was poorly sensitive.

For the combined treatment with Abexinostat, we chose the lightest regimen: CDDP 2 mg/kg once a week for three weeks (days 3, 10 and 17) (Figure 5). The result was a dramatic tumor growth reduction for C17 and a still substantial reduction for C15 and to a lesser extent for C666-1 xenograft. In all cases, the combined treatment was more efficient than each drug used as a single agent.

For the combined treatment with radiotherapy, selective tumor irradiation was given at a dose of 1 Gy once a week for three weeks. This combination resulted in a major reduction of tumor growth for C15 and C17. In contrast, for C666-1 no benefit was demonstrated by statistical analysis.

In summary, the sensitivity to both modalities of combined treatment was high for C17, average for C15 and low or absent for the C666-1 xenograft.

Protein modifications induced by Abexinostat in NPC cells treated *in vitro*

Protein modifications induced by Abexinostat were investigated *in vitro* in order to better understand molecular mechanisms underlying the response of EBV-positive NPC cells. C666-1 cells (permanently propagated *in vitro*) and cells resulting from collagenase dispersion of C15- and C17-PDX were subjected to *in vitro* treatment by increasing doses of Abexinostat for 48 h. For all three models, an increase in α -tubulin acetylation was obvious for concentrations of Abexinostat above 100 nM (approximately IC₅₀/2) (Figure 6). It was of larger magnitude for C15 and C17 cells with more obvious dose dependency by comparison with C666-1 cells. Higher concentrations of Abexinostat were required to observe a PARP cleavage indicative of caspase-dependent apoptosis (in the range of 400 nM, approximately IC₅₀ X 2). We sought to detect a depletion of RAD51 in NPC cells treated with Abexinostat as previously reported for the human colonic carcinoma cells HCT116 and multiple myeloma cell lines treated by HDAC inhibitors [29,30]. RAD51 protein concentrations were

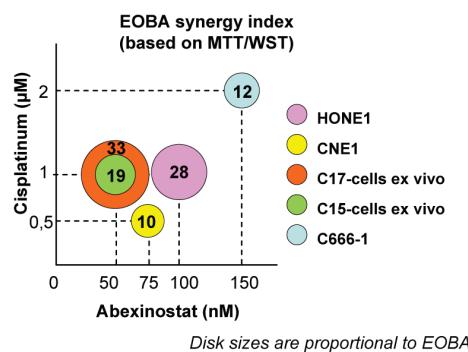


Figure 1. Short term culture assays on NPC cells treated *in vitro* with Abexinostat plus CDDP. The best combinations of drug dosages are represented graphically. EBV-negative (HONE1 and CNE1) and EBV-positive NPC cells (C15 cells *ex vivo*, C17 cells *ex vivo* and C666-1 cells) were treated for 48 h with combinations involving various concentrations of Abexinostat (25, 50, 75 and 150 nM) and CDDP (0.5, 1 and 2 μ M). Cell viability was determined in short term assays based on the reduction of MTT (CNE1, HONE1) or WST (C15 *ex vivo*, C17 *ex vivo* and C666-1) using triplicates for each experimental conditions. For each NPC model, the result of the most successful combination of drug dosages is depicted as a color disk whose size is proportional to the EOBA index. This index mentioned as a two-digit number reflects the level of synergy for the combined treatment: values greater than 10 are indicative of a synergy between the 2 compounds (see the Materials and Methods section for additional explanations). The X and Y coordinates of the disk stand for the corresponding concentrations of Abexinostat and CDDP respectively. For CNE1 and C666-1, the effects of the combined treatment were only additive. The highest levels of synergy were recorded for C17-cells *ex vivo*, HONE1 and C15-cells *ex vivo*.
doi:10.1371/journal.pone.0091325.g001

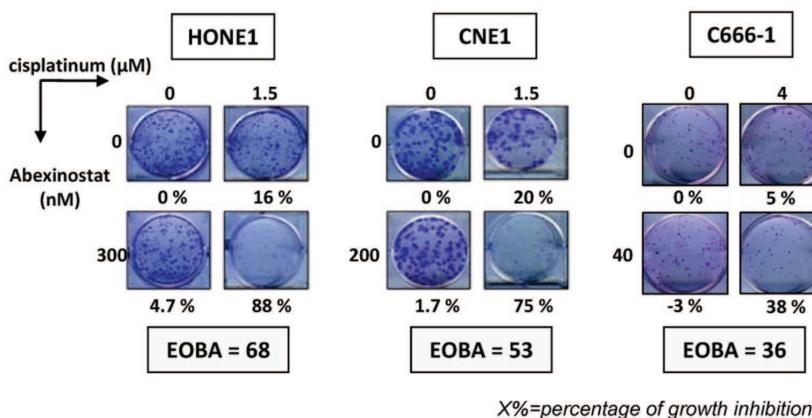


Figure 2. Clonogenic assays on NPC cells treated *in vitro* with Abexinostat combined with CDDP. The experiments corresponding to the most successful combinations of drug dosages are presented for HONE1, CNE1 and C666-1. Cells were plated as explained in the Materials and Methods section. Simultaneous treatment by Abexinostat and CDDP was started 24 hours following cell plating. About 3 weeks later, cell clones were numbered for calculation of the percentages of growth inhibition (which are mentioned under the picture of each well). For C666-1 cells treated with Abexinostat by itself (40 nM), clonal growth was slightly enhanced instead of being inhibited. The “excess over Bliss additivism” (EOBA) which reflects the level of synergy for the combined treatment is mentioned for each NPC model (see the Materials and Methods section for the explanation of this index). Values greater than 10 are indicative of a synergy between the 2 compounds. The panel of each NPC model is representative of 3 similar experiments.

doi:10.1371/journal.pone.0091325.g002

indeed decreased by Abexinostat in C666-1, C15 and C17 cells (Figure 6). However dose/response relationships were somehow variable depending on the model and even in a given model through various experiments (Figure 3 and 4 and data not shown). In summary, while in C15 and C17 cells RAD51 protein abundance was consistently reduced by at least 50% under Abexinostat at 200 nM for 48 h, its depletion was often less marked for C666-1 cells. There was also a trend toward a

depletion of RAD23B under treatment by Abexinostat. In a report by Fotheringham et al. (2009), it has been shown that high amounts of pre-treatment RAD23B in myeloma and cutaneous T-cell lymphoma cells are predictive of a high sensitivity to HDAC inhibitors [31]. Therefore pre-treatment concentrations of RAD23B were compared in the C666-1, C15 and C17 models prior to any treatment (Figure S4). We found no relationships with tumor response to Abexinostat.

In the next step, we investigated RAD51 protein depletion in C666-1 and C17 cells treated *in vitro* with Abexinostat combined to irradiation. Irradiation was delivered to NPC cells 24 h after the onset of Abexinostat. The depletion of RAD51 was at least as intense under Abexinostat plus irradiation as under Abexinostat alone (Figure 7A). The same trend was observed when Abexinostat was combined to CDDP (see Figure S5). It was also observed in C666-1 and C17 xenografts treated *in vivo* with systemic injections of Abexinostat and selective tumor irradiation. However, to improve the consistency of RAD51 reductions, we had to increase the doses of Abexinostat and irradiation to 25 mg/kg BID and 2 Gy respectively. Nevertheless, through numerous experiments, regardless of the doses that were used, the decrease in the amount of RAD51 was more marked for C17-PDX (highly sensitive to Abexinostat plus radiotherapy in terms of growth reduction) than for C666-1 xenograft (not sensitive). The amount of RAD51 protein was reduced by 70 and 30%, respectively (Figure 7B). Although relatively modest, this difference was highly consistent. Next, we intended to determine whether RAD51 protein depletion was related to altered transcription as previously reported for HCT116 cells treated with Abexinostat [29]. The RAD51 messenger RNA was investigated by real time RT-PCR in C666-1 and C17 xenografts treated with Abexinostat, radiotherapy or the combination of both. Only mild variations were observed which were not consistent with observed RAD51 protein reduction (Figure 7C). For example, for the C17-PDX, the reduction of the mRNA was only 20% to be compared with a 70% reduction of the protein. This suggests that, to some extent, the amount of RAD51 protein was decreased independently of alterations in transcription for example by enhanced protein

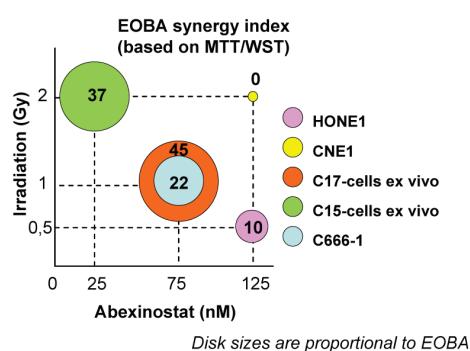


Figure 3. Short term culture assays on NPC cells treated *in vitro* with Abexinostat plus external irradiation. The best combinations of treatment dosages are represented graphically. EBV-negative (HONE1 and CNE1) and EBV-positive NPC cells (C15 cells *ex vivo*, C17 cells *ex vivo* and C666-1 cells) were treated for 48 hours with combinations involving various concentrations of Abexinostat (25, 50, 75 and 150 nM) and doses of irradiation (1, 2 and 4 Gy 24 h after cell plating). Cell viability was determined in short term assays based on the reduction of MTT (CNE1, HONE1) or WST (C15 *ex vivo*, C17 *ex vivo* and C666-1). For each NPC model, the result obtained with the most successful combination of treatment dosages is depicted as a color disk whose size is proportional to the EOBA index (mentioned as a two-digit number). The X and Y coordinates of the disk stand for the corresponding concentration of Abexinostat and dose of irradiation, respectively. Note that for HONE1 and CNE1, the effects of the combined treatment were only additive. The highest levels of synergy were recorded for C15 and C17 cells *ex vivo*.

doi:10.1371/journal.pone.0091325.g003

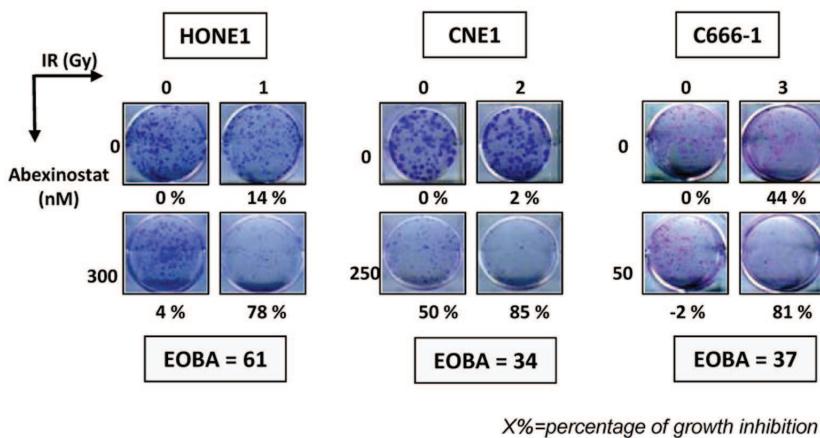


Figure 4. Clonogenic assays on NPC cells treated *in vitro* with Abexinostat combined with external irradiation. The experiments corresponding to the most successful combinations of treatment dosages are presented for HONE1, CNE1 and C666-1. Cells were plated as explained in the Materials and Methods section. Treatment by Abexinostat was started 24 hours following cell plating and irradiation was done 24 h after the onset of Abexinostat. About 3 weeks later cell clones were numbered for calculation of the percentages of growth inhibition (which are mentioned under the picture of each well). For C666-1 cells treated with Abexinostat by itself (50 nM), clonal growth was slightly enhanced instead of being inhibited. The EOBA which reflects the level of synergy for the combined treatment is mentioned for each NPC model. The panel of each model is representative of 3 similar experiments.

doi:10.1371/journal.pone.0091325.g004

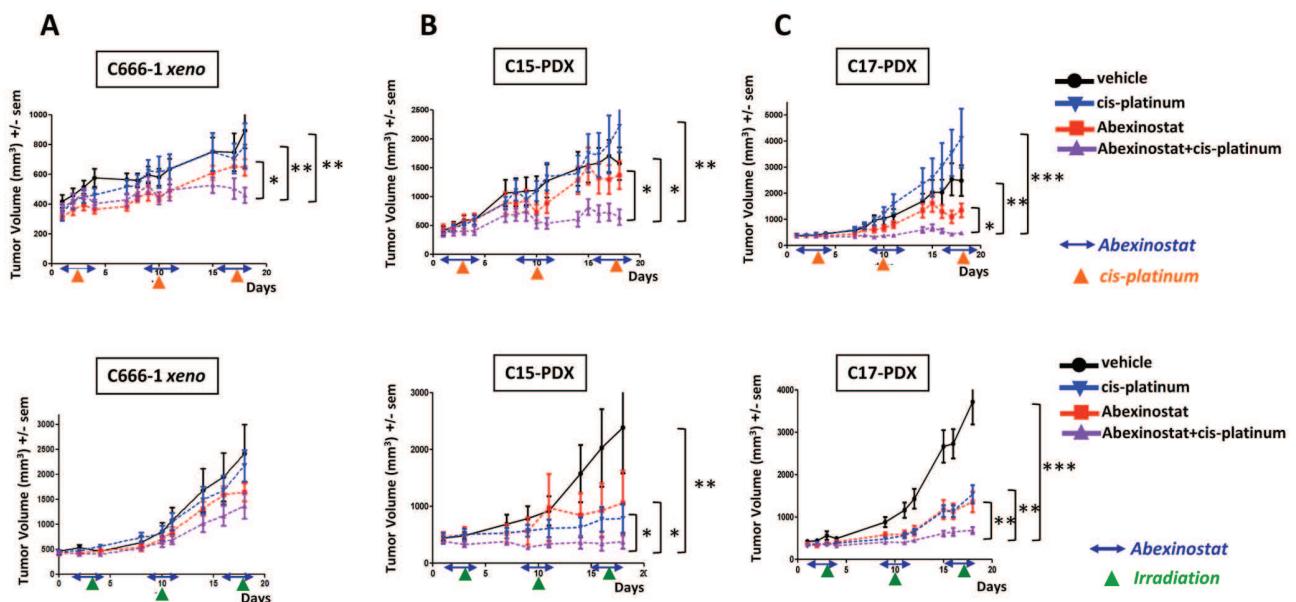


Figure 5. Cooperative cytotoxic effects of Abexinostat combined with CDDP or external irradiation on xenografted NPC tumors. Treatment was started 12 days following subcutaneous graft of tumor fragments (350 mg per mouse). Groups of 10 mice were used for each therapeutic condition (vehicle—Abexinostat—vehicle + CDDP or irradiation—Abexinostat + CDDP or irradiation). Abexinostat was given from D1 to D4, D8 to D11 and D15 to D17 (two intra-peritoneal (IP) injections of 12.5 mg/kg per day with an interval of 6 to 8 hours). CDDP was given IP at a dose of 2 mg/kg at D3, D10 and D17 (upper panel). Selective irradiation of the tumor volume was done at D3, D10 and D17 (lower panel). Caliper tumor measurements and weighing of the animals were done at least 3 days a week. Mice were sacrificed at day 18 following the onset of the treatment. Error bars are based on SEM. **A - Cooperative tumor growth reduction of C666-1 NPC xenografts when treated with Abexinostat combined with CDDP but not with irradiation.** Tumor growth reduction is statistically significant at day 18 for the combination of Abexinostat with CDDP by comparison with tumors treated with the vehicle, Abexinostat alone or CDDP alone (upper graph). The combination of Abexinostat with irradiation has no statistically significant effects using this NPC model (lower graph). **B - Cooperative tumor growth reduction of C15 NPC xenografts treated with Abexinostat combined with CDDP or irradiation.** Tumor growth reductions are statistically significant for the combinations of Abexinostat with CDDP (upper graph) or with irradiation (lower graph) by comparison with tumors treated with the vehicle, Abexinostat, CDDP or irradiation used as single agents. **C - Cooperative tumor growth reduction of C17 NPC xenografts treated with Abexinostat combined with CDDP or irradiation.** Tumor growth reductions are statistically significant for the combinations of Abexinostat with CDDP (upper graph) or with irradiation (lower graph) by comparison with tumors treated with the vehicle, Abexinostat, CDDP or irradiation used as a single agent.

doi:10.1371/journal.pone.0091325.g005

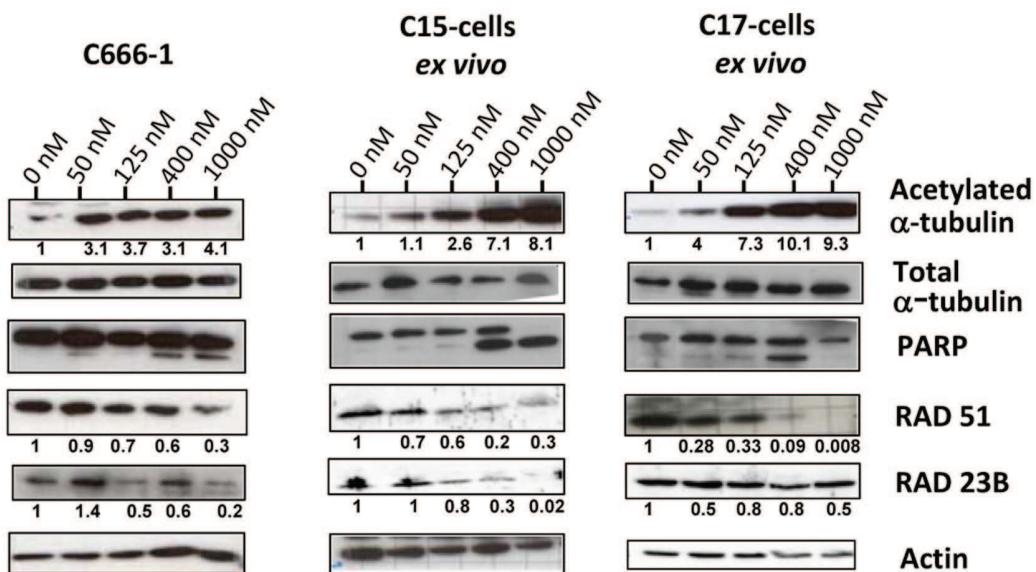


Figure 6. Protein modifications induced by Abexinostat in EBV-positive NPC cells treated *in vitro*. These experiments were done on C666-1 cells routinely propagated *in vitro* (C666-1) and on cells resulting from collagenase dispersion of C15 and C17 patient-derived xenografts (C15 and C17 cells *ex vivo*). Treatment with Abexinostat at various concentrations (0, 50, 125, 400 and 1000 nM) was applied continuously for two days (D1 and D2). Cell proteins were then extracted and separated on PAGE gels (20 µg/lane). Parallel Western blots were done for acetylated α-tubulin, α-tubulin, PARP1, RAD51, RAD23B and actin. Protein abundance in each lane was evaluated by densitometry. For loading normalization, all proteins were referred to actin except acetylated α-tubulin which was referred to total α-tubulin. Protein abundance in lanes corresponding to untreated samples was arbitrarily set at 1. Surprisingly PARP cleavage is observed for C17 cells treated with 400 nM but not 1000 nM Abexinostat. Because C17 cells were very sensitive to Abexinostat, we suspect that when treated with a high concentration of the compound they died by a non-apoptotic mechanism possibly related to necrosis.

doi:10.1371/journal.pone.0091325.g006

degradation as reported for myeloma cells treated with Vorinostat and irradiation [30].

Modifications of *in situ* EBER 1 detection

In situ hybridizations of the viral RNA EBER1 were done on tissue sections of NPC xenografts following treatment with the vehicle or Abexinostat in order to improve our description of its anti-tumor effects. We found a consistent increase in the intensity of EBER1 staining in xenografts treated with Abexinostat. This is depicted in Figure 8A for the C15 and C17 xenografts. Regarding C666-1 xenografts, the effect of Abexinostat on EBER1 staining was difficult to assess because staining is already quite intense in basal conditions. Finally, we investigated the amount of EBER1 RNA by tumor extraction of total RNA and real time RT-PCR (Fig 8B). By this procedure, we found no changes parallel to what was observed by *in situ* hybridization. This suggests that the increase in staining intensity on tissue sections does not result from a greater amount of target RNAs but from their better accessibility to the hybridizing probe.

Discussion

Biological and pharmacological investigations of NPC cells have long been hampered by the lack of genuinely representative cell lines, especially cell lines permanently propagated *in vitro* and retaining the EBV genome. One unique feature of this study is that it has investigated the tumor suppressive effect of a novel HDAC inhibitor simultaneously on 5 NPC models including 2 patient-derived xenografts (PDX; C15 and C17). Because two classical EBV-negative NPC cell lines, HONE1 and CNE1, have been often used in previous publications, they were included in our study at the stage of *in vitro* investigations. Overall when combining

high density cell culture assays and the more sensitive clonogenic assays we have found a cytotoxic effect of Abexinostat on all five NPC cell lines. However, cells from the C17-PDX were the most sensitive in most assays using either Abexinostat alone or in combination with CDDP or irradiation. Systemic treatments were performed on xenografted NPC tumors using C666-1 (culture-derived xenograft) as well as C15 and C17 (patient-derived xenografts). Again the C17 model was the most sensitive to treatment combining Abexinostat with CDDP or external irradiation whereas the C666-1 model was poorly sensitive or unsensitive.

With regard to NPC therapy in the palliative setting, it is noteworthy that the C17 xenograft was derived from a metastatic NPC which had acquired secondary resistance to CDDP. However our study shows that the corresponding PDX has retained sensitivity to high doses of CDDP as well as to low doses of CDDP combined to Abexinostat (Fig S1, S2, S3 and Fig 5). This suggests that in patients with secondary resistance to CDDP, it might be worth to use a combination of Abexinostat with relatively low doses of CDDP in order to overcome resistance with acceptable tolerance for patients often highly pretreated.

With regard to NPC therapy in the curative setting, the synergy with irradiation demonstrated for the C15- and C17-PDX is another very interesting finding. Indeed, one major challenge for upfront NPC therapy is to achieve treatment of the primary tumor and cervical metastases as well as of the distant micro-metastatic disease. This probably explains the better outcome achieved by concomitant chemoradiotherapy demonstrated by meta-analyses in endemic and non-endemic populations [32,33]. Several groups are now moving forward to achieve even better prevention of distant metastatic relapses. They intend to add neoadjuvant or adjuvant chemotherapy prior or following chemoradiotherapy.

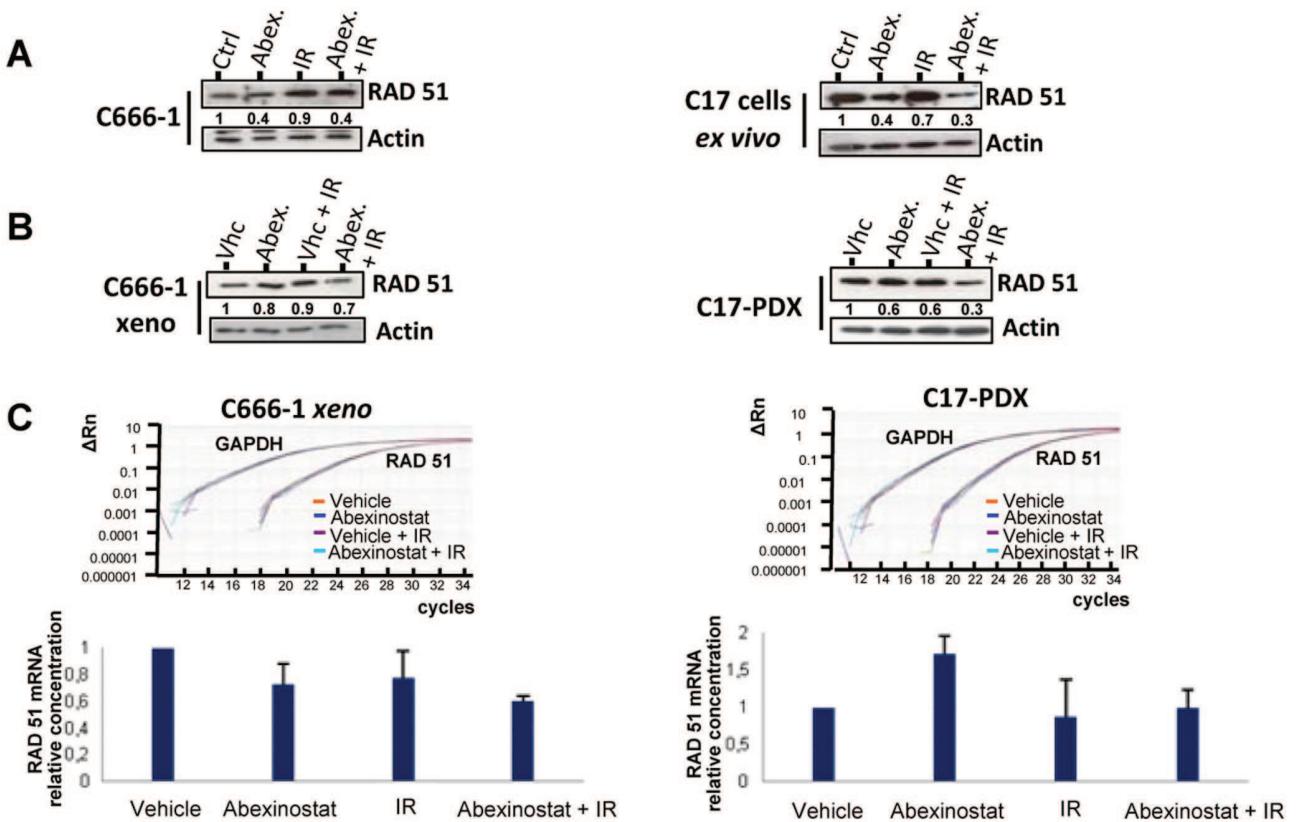


Figure 7. RAD51 protein and mRNA in NPC cells treated with Abexinostat combined with irradiation. A – RAD51 protein concentrations in NPC cells treated *in vitro*. Experiments were performed on cells resulting from collagenase dispersion of the C17 patient-derived xenograft (C17 cells *ex vivo*) and on C666-1 cells routinely grown *in vitro* (C666-1). Treatment with Abexinostat (200 nM in culture medium) was applied continuously for two days (D1 and D2). Irradiation was given early on D2. Protein extracts were prepared from untreated cells (Ctrl), cells treated with Abexinostat alone (Abex.), irradiation alone (1Gy) (IR) and combination of both (Abex.+IR). Protein extracts (20 µg/lane) were subjected to PAGE gel separation. Western blotting was performed for detection of RAD51 and actin. RAD51 protein abundance was evaluated by densitometry with normalization on the actin bands detected on the same blotted membrane. It was arbitrarily set at one in lanes corresponding to untreated samples (Ctrl). In C17 and C666-1 cells, RAD51 concentration was decreased to almost the same extent by Abexinostat or Abexinostat plus irradiation. These data are representative of three similar experiments. B – RAD51 protein concentrations in xenografted NPC cells treated *in vivo*. Mice bearing C17-PDX tumors or xenografted C666-1 cells (C666-1 xeno) were treated during two days (D1 and D2) with vehicle alone, Abexinostat (25 mg/kg BID), vehicle + selective tumor irradiation (2Gy early on D2) or Abexinostat + irradiation. Tumors were collected at D3 and split in fragments used either for protein or RNA extraction (see Figure 4C). Tumor protein extracts were subjected to Western blot and densitometry as reported for *in vitro* cell extracts in the legend of Figure 4A. For the C17-PDX, we could observe a reduction in the tumor concentration of RAD51 under treatment by Abexinostat. This reduction was even more marked when Abexinostat was combined to irradiation. In contrast, the depletion of RAD51 was modest for C666-1 xeno. These data are representative of three similar experiments. C – RAD51 mRNA concentrations in xenografted NPC cells treated *in vivo*. Total RNA was extracted from fragments of xenografted tumors subjected to various treatments in order to investigate the abundance of the RAD51 messenger RNA by real time RT-PCR. Examples of amplification curves are given for RAD51 and GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) mRNA which was used as an internal reference. The relative concentrations of RAD51 mRNA obtained for each type of treatment were calculated by the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. RNAs from the tumors treated with the vehicle only (vhc) were used as external references or calibrators. Values given in the histogram are means of two distinct experiments. The impact of Abexinostat on RAD51 mRNA was modest and not consistent for C666-1 and C17. For example, it was decreased in the C666-1 xenograft treated with Abexinostat only whereas it was mildly increased in the corresponding C17-PDX. In the C17-PDX treated with Abexinostat combined to irradiation the depletion of the RAD51 mRNA was modest in comparison with the protein depletion in the same tumor fragments (Figure 5B).

doi:10.1371/journal.pone.0091325.g007

Unfortunately, these groups often have to deal with unacceptable secondary effects that may impair the relative dose-intensity of treatment. For example, CDDP is often ill-tolerated when it is used for adjuvant chemotherapy consecutively to chemoradiotherapy [34]. In the light of our results, one can imagine using Abexinostat in combination with radiotherapy to save the benefit of CDDP for neoadjuvant/adjuvant treatment or maybe to attempt the opposite sequence. In concurrent chemoradiotherapy, systemic agents are expected to provide a radiosensitizing effect in addition to a direct, general anti-tumor effect. Abexinostat appears

to be able to fulfill both requirements, at least when dealing with NPCs that would behave like the C17-PDX.

The above-conclusion underlines the importance of the identification of markers monitoring the tumor response to Abexinostat. Publications from other groups have reported modifications of signaling pathways related to DNA-repair, cell cycle regulation or control of cell survival in various types of malignant cells treated with HDAC inhibitors, including the enhanced degradation of RAD51 and FLIP or the enhanced expression of CDKN1A [30,35,36]. In our investigation of NPC cells treated with Abexinostat, we have found no evidence of

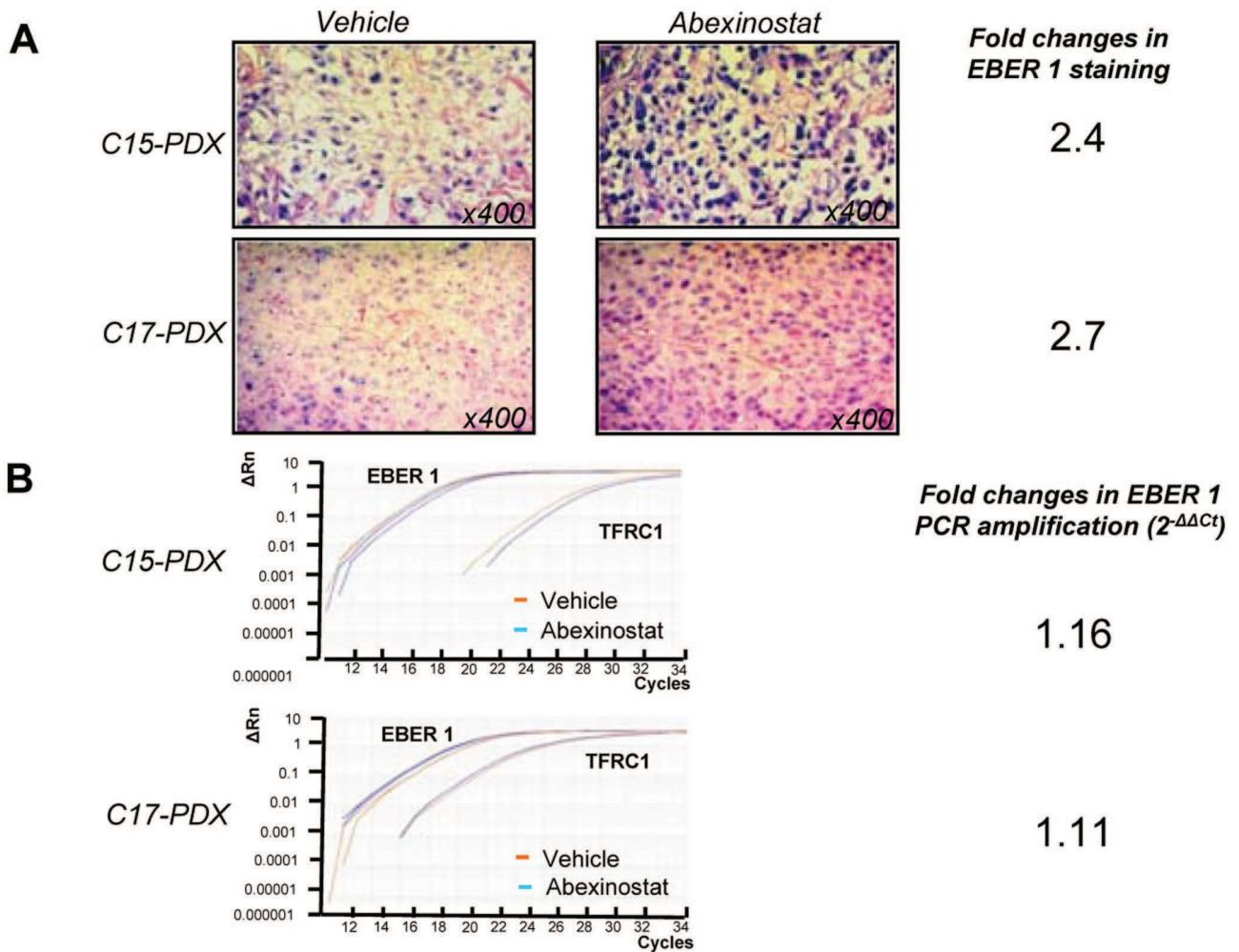


Figure 8. Detection of EBER1 in NPC patient-derived xenografts (PDX) treated with Abexinostat. Xenografted C15 and C17 tumors of mice treated for 2 days (D1 and D2) with Abexinostat (12.5 mg/kg BID) or vehicle were harvested early on D3. Fragments from the same tumors were split for detection of EBER1 either by *in situ* hybridization on tissue sections or tumor RNA extraction and real time RT-PCR. **A - Detection by *in situ* hybridization.** Quantification of staining was made using the Image J software following acquisition of data from tissue sections with the Axovision digital image processing software from Zeiss (Le Pecq, France). Regions of interest (ROI) with comparable cell densities were defined in sections from tumors treated with Abexinostat or the vehicle. A threshold of minimal staining was set at the same value for these two experimental conditions. The percentage of stained areas inside the ROIs was taken as a staining index. Using this parameter we found that treatment with Abexinostat resulted in a 2.4 and 2.7 fold increases in the amount of EBER staining in the C15 and C17 xenografts, respectively. **B - Detection by real time RT-PCR.** Examples of amplification curves are given for EBER1 and TFRC1. EBER1 RNA fold-changes were calculated by the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method using RNA from the tumors treated with the vehicle (vhc) as the external reference whereas the TFRC1 mRNA was used as the internal reference. On the basis of these data, the impact of Abexinostat on the total amount of EBER1 RNA contained in NPC xenografts was apparently marginal.

doi:10.1371/journal.pone.0091325.g008

changes in the amount of FLIP or CDKN1A (data not shown). In contrast with Fotheringham et al. (2009) we did not observe a relationship with the pre-treatment level of RAD23B (Figure S4) [31]. Overall, the decrease in the cell concentration of RAD51 was the strongest and most consistent change (Figure 6 and data not shown). Moreover, our results suggest that Abexinostat can cooperate with irradiation (IR) in the degradation of RAD51. This might be explained in light of a report by Chen et al. [30]. They have shown that Vorinostat inhibits the chromatin binding of RAD51 induced by irradiation in myeloma cells and simultaneously blocks its accumulation in treated cells. One can speculate that Abexinostat alters the mobilization of RAD51 induced by irradiation and blocks its accumulation or even favors its degradation.

The RAD51 protein is a key effector for repair of DNA double-strand breaks by homologous recombination, a mode of repair

which is very important in cell responses to chemotherapy or radiotherapy. In this regard, it is interesting to observe a consistent depletion of the RAD51 protein in NPC xenografts treated with Abexinostat combined to radiotherapy, especially in the C17 model which was the most sensitive to this treatment. One can speculate that assessment of RAD51 depletion in tumor cells after two or three days of combined treatment might be useful for early prediction of tumor responses in NPC patients. For this aim, one would need sensitive and quantitative detection of the RAD51 protein in tumor cell aspirates or brushings, based for example on immuno-cyto-chemistry or imaging mass spectrometry [37].

We also observed that detection of EBER1 by *in situ* hybridization was enhanced in the C15- and C17- PDX under systemic administration of Abexinostat. In contrast, the amount of EBER1 detected by tumor RNA extraction and real time PCR was almost

unaffected. EBER1 and 2 are untranslated EBV-encoded RNAs of 167 and 170 nucleotides in length which are consistently and abundantly expressed in malignant cells latently infected by EBV, especially NPC cells [2]. They are suspected to contribute to the malignant phenotype in several manners, including antagonism of interferon pathways and induction of IGF1 production [38]. They are especially abundant in the nucleoplasm where they interact with several proteins like L22 [39,40]. The discrepancy between *in situ* and RT-PCR detection might be explained by a better accessibility of the hybridizing probe to the target RNA, possibly related to a change in nuclear protein acetylation. In this perspective, it would be interesting to know whether the interactome and functional activity of EBER 1 is modified by Abexinostat. On a translational point of view, in line with the above suggestion concerning quantitative imaging of RAD51 in tumor cells, it might become useful to combine EBER1 with RAD51 detection.

Supporting Information

Figure S1 Impact on the tumor growth of C666-1-xeno of three different dose regimens of CDDP used as a single agent.

(TIF)

References

- Feng BJ (2013) Descriptive, environmental and genetic epidemiology of nasopharyngeal carcinoma. In: Busson P, editor. Nasopharyngeal carcinoma: Keys for Translational Medicine and Biology. Austin/New-York: Landes/Springer. pp. 23–41.
- Gourzoni C, Busson P, Raab-Traub N (2013) Epstein-Barr Virus and the Pathogenesis of Nasopharyngeal Carcinomas. In: Busson P, editor. Nasopharyngeal Carcinoma: Keys for Translational Medicine and Biology. Austin/New-York: Landes/Springer. pp. 42–60.
- Jin Y, Ye X, Shao L, Lin BC, He CX, et al. (2013) Serum lactic dehydrogenase strongly predicts survival in metastatic nasopharyngeal carcinoma treated with palliative chemotherapy. European journal of cancer 49: 1619–1626.
- Su SF, Han F, Zhao C, Huang Y, Chen CY, et al. (2011) Treatment outcomes for different subgroups of nasopharyngeal carcinoma patients treated with intensity-modulated radiation therapy. Chinese journal of cancer 30: 565–573.
- Hui EP, Chan ATC (2013) The evolving role of systemic therapy in nasopharyngeal carcinoma: Current strategies and perspectives. In: Busson P, editor. Nasopharyngeal carcinoma: Keys for Translational Medicine and Biology. Austin and New-York: Landes and Springer. pp. 149–172.
- Pow EH, Kwong DL, McMillan AS, Wong MC, Sham JS, et al. (2006) Xerostomia and quality of life after intensity-modulated radiotherapy vs. conventional radiotherapy for early-stage nasopharyngeal carcinoma: initial report on a randomized controlled clinical trial. International journal of radiation oncology, biology, physics 66: 981–991.
- Hui EP, Chan AT, Pezzella F, Turley H, To KF, et al. (2002) Coexpression of hypoxia-inducible factors 1alpha and 2alpha, carbonic anhydrase IX, and vascular endothelial growth factor in nasopharyngeal carcinoma and relationship to survival. Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research 8: 2595–2604.
- Chua DT, Nicholls JM, Sham JS, Au GK (2004) Prognostic value of epidermal growth factor receptor expression in patients with advanced stage nasopharyngeal carcinoma treated with induction chemotherapy and radiotherapy. International journal of radiation oncology, biology, physics 59: 11–20.
- Lim WT, Ng QS, Ivy P, Leong SS, Singh O, et al. (2011) A Phase II study of pazopanib in Asian patients with recurrent/metastatic nasopharyngeal carcinoma. Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research 17: 5481–5489.
- Bonner JA, Harari PM, Giralt J, Azarnia N, Shin DM, et al. (2006) Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck. The New England journal of medicine 354: 567–578.
- Chan AT, Hsu MM, Goh BC, Hui EP, Liu TW, et al. (2005) Multicenter, phase II study of cetuximab in combination with carboplatin in patients with recurrent or metastatic nasopharyngeal carcinoma. Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology 23: 3568–3576.
- Xiao X, Wu J, Zhu X, Zhao P, Zhou J, et al. (2007) Induction of cell cycle arrest and apoptosis in human nasopharyngeal carcinoma cells by ZD6474, an inhibitor of VEGFR tyrosine kinase with additional activity against EGFR tyrosine kinase. International journal of cancer Journal international du cancer 121: 2095–2104.
- Hui EP, Ma BB, King AD, Mo F, Chan SL, et al. (2011) Hemorrhagic complications in a phase II study of sunitinib in patients of nasopharyngeal carcinoma who has previously received high-dose radiation. Annals of oncology 22: 1280–1287.
- Hui KF, Ho DN, Tsang CM, Middeldorp JM, Tsao GS, et al. (2012) Activation of lytic cycle of Epstein-Barr virus by suberoylanilide hydroxamic acid leads to apoptosis and tumor growth suppression of nasopharyngeal carcinoma. International journal of cancer Journal international du cancer 131: 1930–1940.
- Salvador MA, Wicinski J, Cabaud O, Toiron Y, Finetti P, et al. (2013) The histone deacetylase inhibitor abexinostat induces cancer stem cells differentiation in breast cancer with low Xist expression. Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research 19: 6520–6531.
- Ali A, Bluteau O, Messaoudi K, Palazzo A, Boukour S, et al. (2013) Thrombocytopenia induced by the histone deacetylase inhibitor abexinostat involves p53-dependent and -independent mechanisms. Cell death & disease 4: e738.
- Busson P, Ganem G, Flores P, Mugneret F, Clausse B, et al. (1988) Establishment and characterization of three transplantable EBV-containing nasopharyngeal carcinomas. Int J Cancer 42: 599–606.
- Sbih-Lammali F, Clausse B, Ardila-Osorio H, Guerry R, Talbot M, et al. (1999) Control of apoptosis in Epstein Barr virus-positive nasopharyngeal carcinoma cells: opposite effects of CD95 and CD40 stimulation. Cancer research 59: 924–930.
- Klibi J, Niki T, Riedel A, Pioche-Durieu C, Souquere S, et al. (2009) Blood diffusion and Th1-suppressive effects of galectin-9-containing exosomes released by Epstein-Barr virus-infected nasopharyngeal carcinoma cells. Blood 113: 1957–1966.
- Chan SY, Choy KW, Tsao SW, Tao Q, Tang T, et al. (2008) Authentication of nasopharyngeal carcinoma tumor lines. International journal of cancer Journal international du cancer 122: 2169–2171.
- Friboulet L, Pioche-Durieu C, Rodriguez S, Valent A, Souquere S, et al. (2008) Recurrent overexpression of c-IAP2 in EBV-associated nasopharyngeal carcinomas: critical role in resistance to Toll-like receptor 3-mediated apoptosis. Neoplasia 10: 1183–1194.
- Cheung ST, Huang DP, Hui AB, Lo KW, Ko CW, et al. (1999) Nasopharyngeal carcinoma cell line (C666-1) consistently harbouring Epstein-Barr virus. Int J Cancer 83: 121–126.
- Sbih-Lammali F, Clausse B, Ardila-Osorio H, Guerry R, Talbot M, et al. (1999) Control of apoptosis in Epstein Barr virus-positive nasopharyngeal carcinoma cells: opposite effects of CD95 and CD40 stimulation. Cancer Res 59: 924–930.
- Weinrib L, Li JH, Donovan J, Huang D, Liu FF (2001) Cisplatin chemotherapy plus adenoviral p53 gene therapy in EBV-positive and -negative nasopharyngeal carcinoma. Cancer gene therapy 8: 352–360.
- Cheng Y, Stanbridge EJ, Kong H, Bengtsson U, Lerman MI, et al. (2000) A functional investigation of tumor suppressor gene activities in a nasopharyngeal carcinoma cell line HONE1 using a monochromosome transfer approach. Genes, chromosomes & cancer 28: 82–91.
- Effert P, McCoy R, Abdel-Hamid M, Flynn K, Zhang Q, et al. (1992) Alterations of the p53 gene in nasopharyngeal carcinoma. J Virol 66: 3768–3775.
- Berenbaum MC (1981) Criteria for analyzing interactions between biologically active agents. Adv Cancer Res 35: 269–335.

Figure S2 Impact on the tumor growth of C15-PDX of three different dose regimens of CDDP used as a single agent.

(TIF)

Figure S3 Impact on the tumor growth of C17-PDX of three different dose regimens of CDDP used as a single agent.

(TIF)

Figure S4 Status of the RAD23B protein in xenografted NPC tumors prior to any treatment.

(TIF)

Figure S5 Impact of CDDP combined to Abexinostat on the concentration of RAD51 in C17 cells treated *ex vivo*.

(TIF)

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: MG BV HL AJB LKB SD PB. Performed the experiments: MG BV ASJP CHG PB. Analyzed the data: MG BV ASJP CHG HL AJB LKB SD PB. Contributed reagents/materials/analysis tools: ASJP KWL FRF CHG. Wrote the paper: MG BV FRF PB.

28. Jacobs JP, Jones CM, Baille JP (1970) Characteristics of a human diploid cell designated MRC-5. *Nature* 227: 168–170.
29. Adimoolam S, Sirisawad M, Chen J, Thiemann P, Ford JM, et al. (2007) HDAC inhibitor PCI-24781 decreases RAD51 expression and inhibits homologous recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 19482–19487.
30. Chen X, Wong P, Radany EH, Stark JM, Laulier C, et al. (2012) Suberoylanilide hydroxamic acid as a radiosensitizer through modulation of RAD51 protein and inhibition of homology-directed repair in multiple myeloma. *Molecular cancer research: MCR* 10: 1052–1064.
31. Fotheringham S, Epping MT, Stimson L, Khan O, Wood V, et al. (2009) Genome-wide loss-of-function screen reveals an important role for the proteasome in HDAC inhibitor-induced apoptosis. *Cancer Cell* 15: 57–66.
32. Zhang L, Zhao C, Ghimire B, Hong MH, Liu Q, et al. (2010) The role of concurrent chemoradiotherapy in the treatment of locoregionally advanced nasopharyngeal carcinoma among endemic population: a meta-analysis of the phase III randomized trials. *BMC Cancer* 10: 558.
33. Baujat B, Audry H, Bourhis J, Chan AT, Onat H, et al. (2006) Chemotherapy in locally advanced nasopharyngeal carcinoma: an individual patient data meta-analysis of eight randomized trials and 1753 patients. *International journal of radiation oncology, biology, physics* 64: 47–56.
34. Chen L, Hu CS, Chen XZ, Hu GQ, Cheng ZB, et al. (2012) Concurrent chemoradiotherapy plus adjuvant chemotherapy versus concurrent chemoradiotherapy alone in patients with locoregionally advanced nasopharyngeal carcinoma: a phase 3 multicentre randomised controlled trial. *The lancet oncology* 13: 163–171.
35. Kerr E, Holohan C, McLaughlin KM, Majkut J, Dolan S, et al. (2012) Identification of an acetylation-dependant Ku70/FLIP complex that regulates FLIP expression and HDAC inhibitor-induced apoptosis. *Cell death and differentiation* 19: 1317–1327.
36. Chen S, Zhao Y, Gou WF, Zhao S, Takano Y, et al. (2013) The anti-tumor effects and molecular mechanisms of suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) on the aggressive phenotypes of ovarian carcinoma cells. *PLoS One* 8: e79781.
37. Balluff B, Rauser S, Meding S, Elsner M, Schone C, et al. (2011) MALDI imaging identifies prognostic seven-protein signature of novel tissue markers in intestinal-type gastric cancer. *The American journal of pathology* 179: 2720–2729.
38. Takada K (2012) Role of EBER and BARF1 in nasopharyngeal carcinoma (NPC) tumorigenesis. *Seminars in cancer biology* 22: 162–165.
39. Lee N, Pimienta G, Steitz JA (2012) AUF1/hnRNP D is a novel protein partner of the EBER1 noncoding RNA of Epstein-Barr virus. *RNA* 18: 2073–2082.
40. Toczyski DP, Matera AG, Ward DC, Steitz JA (1994) The Epstein-Barr virus (EBV) small RNA EBER1 binds and relocates ribosomal protein L22 in EBV-infected human B lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91: 3463–3467.