



HAL
open science

Étude de l'origine moléculaire de l'hétérogénéité de réponse cellulaire à TRAIL et son rôle dans la résistance non-génétique

Mickaël Meyer

► To cite this version:

Mickaël Meyer. Étude de l'origine moléculaire de l'hétérogénéité de réponse cellulaire à TRAIL et son rôle dans la résistance non-génétique. Biologie moléculaire. Université Côte d'Azur, 2020. Français. NNT : 2020COAZ6046 . tel-03245709

HAL Id: tel-03245709

<https://theses.hal.science/tel-03245709>

Submitted on 2 Jun 2021

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

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

THÈSE DE DOCTORAT

Etude de l'origine moléculaire de l'hétérogénéité de
réponse cellulaire à TRAIL et son rôle dans la
résistance non-génétique

Mickaël MEYER

Institut de Recherche sur le Cancer et le Vieillessement de Nice,
CNRS UMR 7284, Inserm U1081

Présentée en vue de l'obtention du grade de
docteur en Interactions moléculaires et
cellulaires d'Université Côte d'Azur.

Dirigée par : Jérémie ROUX
Co-encadrée par : Paul HOFMAN
Soutenue le : 11/12/2020

Devant le jury, composé de :

Dr. Jean-Ehrland RICCI, Président du jury, Univ. Côte d'Azur
Dr. Olivier MICHEAU, Rapporteur, Univ. de Bourgogne
Dr. Yves COLLETTE, Rapporteur, Univ. Aix-Marseille
Pr. Diane DAMOTTE, Examinatrice, Univ. Paris-Descartes
Dr. Jérémie ROUX, Co-directeur de thèse, Univ. Côte d'Azur
Pr. Paul HOFMAN, Co-directeur de thèse, Univ. Côte d'Azur

Résumé

L'hétérogénéité phénotypique observée dans des populations de cellules isogéniques est une cause immédiate de résistance non-génétique aux anticancéreux qui reste difficile à définir en raison de sa nature transitoire. Dans une première partie, nous avons étudié l'origine moléculaire de l'hétérogénéité phénotypique de réponse au TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). Pour cela nous avons développé une méthode permettant d'isoler les cellules résistantes avant qu'elles n'engagent une induction génétique par le traitement, et les cellules sensibles avant qu'elles ne détériorent leur contenu lors de la mort cellulaire. La méthode emploie trois technologies en cellule unique : une mesure prédictive de réponse cellulaire par vidéo-microscopie, une isolation de chaque cellule *in situ* par capture laser, suivi d'un profilage transcriptomique. La prédiction de réponse thérapeutique permet alors d'isoler et profiler toutes les cellules, quelle que soit l'issue de leur réponse pharmacologique tardive (mort cellulaire pour les sensibles), et ainsi nous a permis d'identifier les gènes à l'origine de la différence d'efficacité de TRAIL dans une population de cellules clonales. Puis dans un second projet, nous avons étudié la résistance transitoire induite lors de traitement par TRAIL. Nous avons pu mettre en évidence le rôle de TAK-1 dans la mise en place de cette résistance transitoire. Il a été décrit que la voie apoptotique déclenchée par TRAIL pouvait aussi bifurquer sur la voie de la nécroptose, une mort cellulaire fortement immunogène. Nous avons pu démontrer une communication antagoniste de ces voies : la résistance induite lors de l'apoptose des cellules traitées par TRAIL permettait de sensibiliser les cellules survivantes au traitement nécroptotique. Ces travaux pourraient permettre de suggérer de nouvelles stratégies thérapeutiques afin de pallier les résistances inhérentes à ces voies de signalisations.

Mots clés : TRAIL ; Apoptose ; Hétérogénéité ; Résistance ; Nécroptose ; Cellule unique

Abstract

The phenotypic heterogeneity observed in populations of isogenic cells is an immediate cause of non-genetic resistance to anticancer drugs which remains difficult to profile due to its transient nature. In a first part of this work, we have studied the molecular origins of the phenotypic heterogeneity observed in response to TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). For that, we have developed a method to isolate resistant cells before they initiate genetic induction by the treatment, and sensitive cells before they deteriorate their content during cell death. The method is composed of three single-cell technologies: predictive measurement of cell response by video-microscopy, isolation of each cell *in situ* by laser capture, followed by transcriptomic profiling. The prediction of therapeutic response makes it possible to isolate and profile all the cells, regardless of the outcome of their late pharmacological response (cell death for sensitive cells), and thus enabled us to identify the genes at the origin of the difference in efficacy of TRAIL. Then in a second part of this work, we studied the transient resistance induced during treatment with TRAIL. We were able to demonstrate the role of TAK-1 in the establishment of this transient resistance. It has been described that the apoptotic pathway triggered by TRAIL could also branch off onto the pathway of necroptosis, a highly immunogenic cell death. We were able to demonstrate an antagonistic communication of these pathways: the resistance induced during apoptosis of cells treated with TRAIL made it possible to sensitize the surviving cells to the necroptotic treatment. This work could suggest new therapeutic strategies in order to overcome the resistance inherent in these signaling pathways.

Keywords : TRAIL ; Apoptosis ; Heterogeneity ; Resistance ; Necroptosis ; Single-cell

Remerciements

Vous ne pouvez pas savoir à quel point je vous suis reconnaissant, à vous tous, laborantins du Centre Antoine Lacassagne de tout ce que vous avez fait pour moi durant ces quatre années de thèse...

Je vous ai déjà expliqué à quel point l'environnement social est important pour moi, et si aujourd'hui je peux rendre mon rapport de thèse en vue de l'obtention du doctorat, c'est aussi grâce à vous. Vous m'avez soutenu, consolé et rassuré quand je me trouvais dans la difficulté. Vous m'avez permis de grandir en votre compagnie, et je vous en remercie.

Tout d'abord merci à vous messieurs/dames du jury, Jean-Ehrland RICCI, Yves COLLETTE, Diana DAMOTTE et Olivier MICHEAU d'avoir accepté l'invitation en tant que membre de mon jury. J'espère très sincèrement que le contenu de cette thèse vous plaira, et que nous passerons un bon moment à échanger ensemble lors de la soutenance.

Merci énormément à toi Paul HOFMAN de m'avoir accepté au sein de ton équipe et de m'avoir permis d'effectuer cette thèse avec vous tous. Je te remercie d'autant plus que vous avez réussi avec Jérémie à me prolonger durant six mois supplémentaires, six mois productifs qui m'ont permis de renforcer ma thèse et de me sentir en confiance aujourd'hui.

Jérémie, je te remercie pour ces quatre années que l'on a passées ensemble. Tu as réussi à me prendre avec mes défauts, et tu m'auras aidé à en corriger une grande partie. Tu m'as appris à m'organiser, à réfléchir, tu m'as accordé de l'indépendance et permis de développer mon projet en plus de m'avoir inclus dans le tien. Tu as réussi à me rassurer quand cela n'allait pas et tu m'auras aidé jusqu'au bout dans cette aventure. Alors bon, on se sera peut-être pris la tête une fois ou deux, mais franchement c'était rare (non ?), tu as été super ! Merci Jérémie !

Patrick... Tu vas beaucoup me manquer tu sais ! Tu m'as non seulement aidé au laboratoire, mais aussi dans ma vie privée ! Tu m'auras fait énormément rire, et tu n'as jamais mâché tes mots pour me dire quand je déconnais. Tu m'as conseillé, soutenu et tu as cru en moi en plus d'avoir été mon confident. Tu m'as motivé dans le travail, dans les activités sportives et la vie de tous les jours. Tu es quelqu'un de bien et d'altruiste. Je ne sais pas comment se passera le futur mais j'espère que l'on arrivera à se revoir et que l'on pourra se réorganiser des sorties.

Baharia, je te dois beaucoup. Ta gentillesse et tes phrases réconfortantes sont si apaisantes et optimistes que les problèmes s'envolent ensuite. Je sais ce que tu as fait pour moi et j'espère que je serai à même de te le rendre un jour, merci à toi.

Je veux remercier tous les autres chercheurs du centre. Gilles, Sandy, Roser, Philippe, Fred, Maeva, Sonia, Valérie. Par toutes nos discussions et tous vos conseils, vous m'avez tellement aidé dans mon travail et dans l'anticipation des épreuves, en plus d'avoir passé de si bons moments avec vous. Je vous dis merci de tout cœur.

Olivia, Marie et Manon, vous êtes des petites douceurs, j'aurais passé de merveilleux moments avec vous. Vous m'avez affublé de tellement de gentils surnoms tout aussi valorisants les uns que les autres que je ne pense pas avoir le droit de les citer ici sans risquer de choquer les lecteurs. Il y a intérêt que l'on se revoit ensuite, quand vous voulez pour une soirée et toi Marie je viendrai te chercher.

Clément, Julien, Anaïs, Iris, Olivia, Laurent, Barnabé, Titou merci d'avoir participé tous les jours à la bonne humeur du labo, d'avoir écouté mes plaintes et de m'avoir fait rire. J'espère que l'on aura tous l'occasion de se revoir et de toute façon on se fait une sortie ski dès que les pistes ouvrent !

Ludo, j'aurais tellement aimé que tu arrives plus tôt dans l'équipe ! Tu m'as aidé dans le travail et qu'est-ce que tu m'as fait rire ! J'espère que l'on se recroisera sur la côte atlantique !

Je n'aurais rien pu faire sans ma famille, qui m'ont assuré la sécurité et qui m'ont poussé tous les jours à m'améliorer. Vous étiez là pour moi quand cela n'allait pas, vous m'avez supporté durant les études et soutenu. Je sais que j'ai pu être absent ces dernières années mais maintenant je vais faire en sorte que l'on puisse se voir plus souvent, vous me manquez ! Je remercie mes frères Arnaud et Florian de m'apporter beaucoup de bonheur, vous êtes toujours là pour moi, merci !

Je voulais te dire à toi Juliette que tu m'as tellement apportée... J'ai grandi grâce à toi. Tu me manques.

A vous aussi, tous mes amis, vous m'êtes si chers. Je vous aime et il nous reste tellement de chose à faire ensemble ! Merci d'avoir été et d'être encore là pour moi.

Joffrey... Tu sais, c'est un peu grâce à toi que j'en suis là. Depuis le début de l'université je te suis redevable. Tu m'as forcé à réviser avec toi, malgré t'avoir demandé très gentiment au début de me laisser tranquille. Tu ne m'as pas lâché et tu m'as donné le gout du travail pour finalement

en arriver à des soirées endiablées où l'on se battait pour savoir qui de nous deux avait raison. Merci Jeff, et merci à toi Lucie, tu es en or ! Envoyer un protocole détaillé de la préparation administrative de la thèse en connaissant mon aversion pour ces documents, c'est juste merveilleux.

Il y a tellement d'autres personnes que je souhaiterais remercier. Je ne vais pas tous vous citer mais à vous que j'ai rencontré, vous me prouvez chaque jour que la vie est belle. Ces rencontres sont magnifiques et elles sont si intenses. J'ai la sensation que chacune de ces relations deviennent toujours de plus en plus belles.

Mais maintenant que je t'ai rencontré, toi qui me soutiens dans ces derniers moments et qui t'occupes de moi en ce moment pour me permettre de finir, et bien je crois franchement ne plus avoir envie de voir ce qu'il peut y avoir d'autre ensuite. Tu es magnifique.

Sommaire

Résumé	1
Abstract	1
Remerciements	2
Sommaire	5
Liste des figures.....	8
Liste des abréviations	10
Chapitre 1. Introduction	12
1.1 La superfamille des TNF.....	13
1.1.1 Rôle endogène du TRAIL	14
Rôle de TRAIL dans l'immunité.....	15
TRAIL impliqué dans l'immunité antitumorale.....	17
1.1.2 TRAIL en thérapie.....	20
Résultats préliminaires thérapeutiques de TRAIL.....	21
Echec thérapeutique.....	22
Développements en cours.....	23
1.2 Apoptose induite par TRAIL.....	26
Apoptose voie extrinsèque (TRAIL).....	26
Les récepteurs au TRAIL	27
Formation du DISC	30
Amplification mitochondriale	32
1.3 Résistance à l'apoptose induite par TRAIL.....	36
1.3.1 Résistance à l'apoptose.....	36
Récepteurs	37
L'assemblage du DISC.....	39
La voie mitochondriale.....	41
Les voies de dégradation	42
La réponse génique : une résistance induite et transitoire	43
1.3.2 L'hétérogénéité de réponse au TRAIL	46
Hétérogénéité non-génétique.....	47
Impact sur la résistance thérapeutique au TRAIL, la réponse partielle ('fractional killing')... ..	51
1.4 Les voies non-canoniques engagées par TRAIL	57
1.4.1 TRAIL induit la survie : complexe 1 versus complexe 2 ?	58
Voie de signalisation de NF- κ B et des MAP Kinase induites par TRAIL : TRAIL versus TNF	58
1.4.2 Communication de modalité de morts cellulaires, TRAIL peut induire la nécroptose. ..	63

La nécroptose induite par TRAIL.....	64
Décision cellulaire entre survie et apoptose et nécroptose	68
Nécroptose en thérapie	71
1.5 Objectifs de la thèse	75
Quels sont les facteurs moléculaires à l'origine de la réponse hétérogène au traitement TRAIL ?	75
Quels sont les facteurs moléculaires responsables de la résistance transitoire à l'apoptose induite par TRAIL dans les cellules survivantes ? Ce contexte cellulaire induit ne pourrait-il pas sensibiliser ces cellules à la nécroptose ?	77
Chapitre 2. Une approche de pharmacogénomique fonctionnelle en cellule unique révèle les origines moléculaires de la résistance non-génétique à TRAIL	78
2.1 Introduction de l'article	79
2.2 Article.....	82
Chapitre 3. Un préconditionnement TRAIL sensibilise les cellules à la nécroptose	111
3.1 Introduction	112
3.2 Matériels et Méthodes	114
3.2.1 Clonage de RIPK3.....	114
Amplification PCR	114
Clonage par digestion / ligation.....	115
Maxi préparation	115
3.2.2 Stratégie virus.....	115
Production virale	115
Infection des cellules cibles.....	116
3.2.3 Enrichissement par cytométrie en flux de la population	116
3.2.4 Lignées cellulaires et matériel de cultures.....	116
3.2.5 Anticorps et Western Blot RIPK3	117
3.2.6 Inhibiteurs et ligands de mort	118
3.2.7 Viabilité cellulaire	119
Quantification de l'ATP	119
Crystal violet	119
3.2.8 Live Cell Microscopy	120
3.2.9 Induction de résistance (pour analyse Live Cell Microscopy)	121
3.2.10 Microscopie de cellules vivantes et Analyse d'image.....	122
3.2.11 Traitements MATLAB des analyses d'images.....	122
3.3 Résultats	124
3.3.1 TRAIL induit une résistance à l'apoptose lors d'un second traitement des cellules survivantes par la diminution de l'activité caspase-8.....	124
La résistance transitoire induite par TRAIL est médiée par une diminution de l'activité caspase-8.....	125
Inhiber TAK lors du préconditionnement bloque la mise en place de la résistance en restaurant l'activité caspase-8 lors du second traitement.	127
3.3.2 Caractérisation morphologique et induction de la nécroptose dans le modèle HeLa. .	131
Construction du modèle HeLa RIPK3-mCherry	134

Validation du modèle HeLa.....	135
3.3.3 L'induction de la nécroptose dépend de l'activité caspase-8 et du niveau protéique de RIPK3.	137
3.3.4 La nécroptose induit une résistance à un deuxième traitement pro-nécroptotique consécutif	140
Induction d'une résistance à la nécroptose dans le modèle HeLa IC RIPK3	140
Le niveau protéique de RIPK3 n'explique pas la résistance à la nécroptose.	142
3.3.5 La séquence des modalités de morts cellulaires induites à un impact différent sur la sensibilité cellulaire lors du second traitement.....	145
La nécroptose suivie de l'apoptose entraîne une résistance des cellules à la mort cellulaire..	145
L'apoptose suivie de la nécroptose entraîne une sensibilité des cellules à la mort cellulaire .	148
3.3.6 L'apoptose induit une sensibilisation au traitement nécroptotique successif par une augmentation de RIPK3.	150
3.3.7 La séquence des modalités de mort cellulaire induites impacte l'évolution de la réponse au traitement.	151
3.4 Discussion	154
TRAIL induit une résistance transitoire dans les cellules non-sensibles à un premier traitement par un mécanisme d'inhibition de l'activité caspase-8 via TAK-1.	154
Un préconditionnement nécroptotique permet de résister à un second challenge à la nécroptose.	156
L'apoptose sensibilise à la nécroptose par l'augmentation du niveau protéique de RIPK3	157
Chapitre 4. Conclusions et Perspectives	158
Conclusions	159
Notre méthode de prédiction basée sur l'activité caspase-8 a permis l'étude des états transcriptomiques à l'origine de la résistance et de la sensibilité au TRAIL.	160
La résistance induite par le traitement TRAIL est dépendante de TAK et sensibilise les cellules à la nécroptose par la stabilisation de la protéine RIPK3.	161
Perspectives	165
Chapitre 2	165
Chapitre 3	168
Références	170

Liste des figures

Figure 1-1 : Schéma des interactions ligands/récepteurs de la famille des TNF.	14
Figure 1-2 : Rôle de TRAIL dans la défense antivirale.	16
Figure 1-3 : Représentation des domaines structuraux des récepteurs au TRAIL.	29
Figure 1-4 : Formation du DISC en fonction des différentes formes de FLIP.....	31
Figure 1-5 : Schéma récapitulatif de la transduction du signal apoptotique par les récepteurs de TRAIL.	35
Figure 1-6 : Expression de la caspase-8 dans le cancer (versus le tissu sain).....	41
Figure 1-7 : Modèle de développement de la pharmacorésistance acquise.	45
Figure 1-8 : Exemple d'hétérogénéité de réponse masquée par les méthodes 'en population' moyennées.	49
Figure 1-9 : Hétérogénéité de population cellulaire.	50
Figure 1-10 Schéma de la sonde à activité caspase-8 IC-RP.	54
Figure 1-11 : Il existe un seuil de dynamique d'activation de la caspase-8 qui définit le destin cellulaire dans l'hétérogénéité de réponse observable durant un traitement TRAIL.	56
Figure 1-12 : Schéma de l'induction de l'apoptose et de la voie NF- κ B par le TNF.	59
Figure 1-13 : Différences et similitudes de l'induction de la voie de survie sous les récepteurs de TNF et de TRAIL.	63
Figure 1-14 : Schéma structurel de MLKL.	66
Figure 1-15 : Communication entre apoptose, nécroptose et autophagie.	67
Figure 1-16 : La voie NF- κ B et des MAP kinases sous le contrôle de TAK-1.....	70
Figure 1-17 : La nécroptose est impliquée dans plusieurs physiopathologies.	72
Figure 3-1 : Protocole de préconditionnement avant analyse LCM.....	122
Figure 3-2 : Mesure de la résistance au TRAIL lors d'un second traitement.	127
Figure 3-3 : Impact de l'inhibition de TAK et des voies en aval sur l'induction de la résistance au TRAIL.	131
Figure 3-4 : Caractérisation morphologique de la nécroptose et impact des inhibiteurs.	134
Figure 3-5 : Réexpression de la protéine RIPK3 dans le modèle cellulaire HeLa.	135
Figure 3-6 : Impact de la réexpression de RIPK3 dans la lignée HeLa.	137
Figure 3-7 : Suivi de l'activité caspase-8 et du niveau protéique RIPK3 associé au devenir cellulaire.	140
Figure 3-8 : Résistance au traitement nécroptotique lors d'un second traitement consécutif.	142

Figure 3-9 : Suivie de l'activité caspase-8 et niveau protéique RIPK3 en fonction du préconditionnement et de la sensibilité à la nécroptose.	145
Figure 3-10 : Résistance à l'apoptose induit par TRAIL des cellules préconditionnées à la nécroptose.....	148
Figure 3-11 : Sensibilité des cellules à la nécroptose après une induction apoptotique par TRAIL.	149
Figure 3-12 : Effet du préconditionnement par TRAIL sur les niveaux de RIPK3 des cellules survivantes.....	151
Figure 3-13 : L'apoptose suivie de la nécroptose permet une quasi-totale réduction de la densité cellulaire.	153
Figure 4-1 : Schéma de conclusion.	163

Liste des abréviations

5-AD : 5-aza-2'-deoxycytidine	EC-RP : Effector caspase reporter protein
5Z-7 : 5Z-7-Oxozeanol	EGFR : epidermal growth factor
ADN : acide désoxyribonucléique	E_{max} : effet maximal
AKT : murine thymoma viral oncogene homolog 1	ERK : extracellular signal-regulated kinases
APAF-1 : apoptotic peptidase activating factor 1	ESCRT-III : endosomal sorting complex required for transport III
ARN : acide ribonucléique	ROS : espèces réactives de l'oxygène
ATP : adénosine-triphosphate	FADD : Fas-associated protein with death domain
BAK : Bcl-2 homologous antagonist killer	FISH : fluorescence in situ hybridation
BAX : Bcl-2-associated X	5-Fu : fluorouracile
BCL2 : B-cell lymphoma 2	FRET : fluorescence resonance energy transfert
BID : BH3 interacting-domain death agonist	GPI : glycosylphosphatidylinositol
BIR : baculoviral IAP repeat	GSDMD : gasdermin D
BLOC1S1 : biogenesis of lysosomal organelles complex 1 subunit 1	GSDME/DFNA5 : gasdermin E
BRAF : V-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1	HMGB1 : high-mobility group box 1
Ca²⁺ : calcium	hnRNPA1 : heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1
CARD : caspase recruitment domain	HO 1-2 : hmox 1-2
Caspases : cysteine-aspartic protease	HPA : human protein atlas
CCL2 : C-C motif chemokine ligand 2	IAPs : inhibitors apoptosis proteins
c-FLIP : cellular FLICE-like inhibitory protein	IC-RP : initial caspase reporter protein
CHX : cycloheximide	ID : domaine intermédiaire
clAPI1/2 : E3 ubiquitin (Ub) ligases cellular inhibitor of apoptosis 1/2	IFN : interféron
CMH : complexe majeur d'histocompatibilité	IL 1b : interleukine-1b
CRD : cystein rich domain	IMS-RP : inter-membrane space red protein
CXCL1 : C-X-C motif chemokine ligand 1	JNK : c-Jun N-terminal kinase
CYLD : cylindromatosis	K⁺ : potassium
Cyt c : cytochrome C	KD : domaine kinase
CyTOF : cytometry by time of flight	KO : knockout
DcR : decoy receptors	KRAS : V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
DD : death domain	OMM : outer-mitochondrial membrane
DED : Death effector domain	LIGHT : ligand for herpesvirus entry mediator
DDF45 : 45 kDa DNA fragmentation factor	LCM : Live-Cell-Microscopy
DGCR8 : DiGeorge syndrome chromosomal region 8	LLPH : Long-Term Synaptic Facilitation Factor
DISC : death-inducing signaling complex	LPS : lipopolysaccharide
IC50 : La concentration inhibitrice médiane	LT : lymphocytes T
DR : death receptors	LUBAC : le complexe d'assemblage des chaînes linéaires de polyubiquitines
DRP1 : dynamin-related protein 1	MAPK : mitogen-activated protein kinases
DUBs : déubiquitinases	MCL-1 : myeloid cell leukemia 1
ECFP : enhanced cyan fluorescent protein	MDM2 : murine double minute 2

MDSC : myeloid-derived suppressor cells
Mg²⁺ : magnesium
MLKL : mixed lineage kinase domain like pseudokinase
MOMP : mitochondrial outer membrane permeabilization
MPD : membrane proximal domain
Na⁺ : sodium
Nec-1 : necrostatin-1
NEMO : NF- κ B essential modulator
NF45 : nuclear factor 45
NF- κ B : nuclear factor-kappa B
NGFR : nerve growth factor receptor
NK : natural killer
NLRP3 : NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3
NLS : nuclear localization signal
NSA : necrosulfonamide
OPG : ostéoprotégérine
PARP-1 : poly(ADP-ribose) polymérase 1
PBS : phosphate buffered saline
PI3K : phosphoinositide 3-kinase
PKM2 : pyruvate kinase isozyme M2
PLAD : pre-ligand binding assembly domain
PRSS56 : putative serine protease 56
PUMA : P53 upregulated modulator of apoptosis
Q-VD-OPH : quinoline-Val-Asp-Difluorophenoxymethyl Ketone
RAC1 : Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
RANK-L : receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand
PRRs : reconnaissance des agents pathogènes
RHIM : RIP homotypic interaction motifs
RIPK1 : Receptor-interacting protein kinase 1
RIPK3 : Receptor-interacting protein kinase 3
RNA-seq : RNA sequencing
ROCK1 : Rho-associated coiled-coil kinase 1
SIVA1 : SIVA1 Apoptosis Inducing Factor
SKY : spectral karyotype
SLC25A1 : solute carrier family 25 member 1
SMAC : second mitochondria-derived activator of caspases
SQSTM1 : sequestosome 1
TAB-2 : TGF-Beta Activated Kinase 1 (MAP3K7) Binding Protein 2
TAK-1/MAP3K7 : TGF β activated kinase1)
tBID : truncated BID
TCR : récepteur des cellules T
THD : TNF homology domain
TL1A : TNF-like molecule 1A
TLR4 : toll-like receptors 4
TP53 : tumor protein 53
TRAIL : TNF-related apoptosis-inducing ligand
Treg : lymphocytes T régulateurs
TRUNDD : truncated death domain
UBA : ubiquitin-associated domains
UBE2D4 : ubiquitin conjugating enzyme E2 D4
ULK1 : unc-51 like autophagy activating kinase 1
UQC33 : ubiquinol-cytochrome c reductase complex assembly factor 3
VEGF : vascular endothelial growth factor
WGA : whole genomic amplification
WT : wild type
WTA : whole transcriptomic amplification
XIAP : X-linked inhibitor of apoptosis protein
YFP : yellow fluorescent protein
ZBP1 : Z-DNA binding protein 1
Z-VAD-FMK : carbobenzoxy-V.A.D-[O-methyl]- fluoromethylketone

Chapitre 1. Introduction

1.1 La superfamille des TNF

La superfamille des récepteurs de TNF (Tumor Necrosis Factor) est constituée de protéines transmembranaires qui jouent un rôle crucial dans le contrôle de l'homéostasie du corps et dans la régulation du système immunitaire. Ce sont des récepteurs qui une fois stimulés par leurs ligands vont pouvoir transduire plusieurs voies dans la cellule, dont notamment celle de l'apoptose, une mort cellulaire programmée. Ces récepteurs peuvent être regroupés en deux groupes, en fonction de s'ils possèdent ou non le domaine de mort (death domain DD). Le DD est une séquence conservée de 80 acides aminés situé à l'extrémité de la queue C-terminal cytoplasmique, responsable du recrutement des protéines adaptatrices pour la transduction du signal apoptotique dans la cellule. L'apoptose n'est pas la seule fonction que peuvent remplir ces récepteurs : Ils peuvent en plus de leurs rôles de récepteur de mort réguler de nombreuses autres voies impliquées dans la réponse immunitaire, l'inflammation, mais aussi la prolifération, la différenciation ainsi que l'embryogenèse. Il existe actuellement 29 récepteurs de cette famille des TNF recensés à ce jour pour 19 ligands. Ces ligands de morts sont exprimés principalement à la membrane des cellules immunitaires afin d'induire la mort de leurs cellules cibles. Ces ligands sont principalement actifs sous forme de trimère et se lient à leurs récepteurs sous forme de protéine transmembranaire lors de contacts intercellulaires ou de cytokine soluble après clivage par protéolyse extracellulaire. Ces 19 membres possèdent tous une région commune, nommée le THD (TNF Homology Domain). Le THD est une séquence de 150 acides aminés, partageant une forme tertiaire identiques entre les membres leurs permettant de former des trimères stables (Bodmer et al., 2002; Hlodan and Pain, 1995). Les domaines THD du ligand permet la liaison aux CRD (cystein rich domain) de leurs récepteurs. La liaison du THD au CRD entraîne alors la trimérisation du récepteur pour la transduction du signal.

Le premier ligand qui a été identifié est la lymphotoxine lors de la recherche des acteurs moléculaires responsables de l'élimination de cellules cancéreuses par le système immunitaire (Kolb and Granger, 1968). Par la suite, la lymphotoxine a été renommé Tumor Necrosis Factor (TNF), et d'autres ligands de la famille TNF ont été identifiés par homologie de séquence, tel que FAS-L en 1989 (Yonehara et al., 1989) et TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) (Wiley et al., 1995). Ces ligands ont suscité beaucoup d'intérêts, car ils peuvent induire la mort des cellules tumorales *in vitro* sans affecter les cellules saines (Pitti et al., 1996). Parmi ces ligands, seul TRAIL a démontré des propriétés antitumorales sans induire de toxicité chez le

patient, contrairement aux autres membres (Ciesielski and Modzelewski, 1995; Ling et al., 2006; Ogasawara et al., 1993).

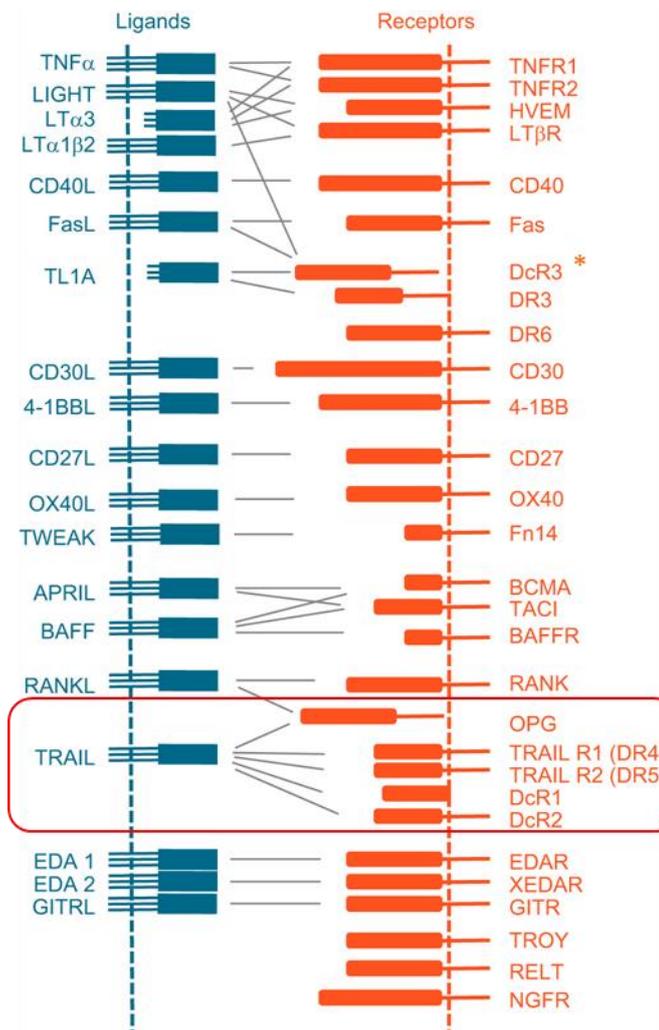


Figure 1-1 : Schéma des interactions ligands/récepteurs de la famille des TNF.

Modifié de (Dostert et al., 2019). * DcR3 a été recensé comme pouvant lier TRAIL avec une faible affinité.

1.1.1 Rôle endogène du TRAIL

TRAIL (ou Apo-2 L) fut découvert parallèlement par deux équipes en 1995 (Wiley et al., 1995) et 1996 (Pitti et al., 1996) par criblage ADN de la région commune au TNF, le THD. TRAIL est une cytokine de 281 acides aminés (32,5 kDa) qui fait partie de la superfamille des ligands de mort TNF. Comme les autres membres de cette superfamille, c'est une protéine transmembranaire de type 2 exprimée majoritairement par le système immunitaire inné et

adaptatif. TRAIL joue un rôle important dans la défense immunitaire aux infections, au contrôle de la réponse immunitaire ainsi que dans l'immunité antitumorale de par son aptitude à induire spécifiquement l'apoptose des cellules cancéreuses (Pitti et al., 1996).

TRAIL peut se lier à cinq récepteurs : DR4 (CD261, TRAIL-R1, *TNFRSF10A*), DR5 (CD262, TRAIL-R2, *TNFRSF10B*), DcR1 (CD263, TRAIL-R3, *TNFRSF10C*), DcR2 (CD264, TRAIL-R4, *TNFRSF10D*), et OPG (TRAIL-R5, *TNFRSF11B*). Seuls DR4 et DR5 possèdent le DD indispensable pour la transduction du signal de mort. Les autres récepteurs sont incapables d'induire l'apoptose de la cellule, ils sont généralement considérés comme des leurres qui entrent en compétition avec les récepteurs DR4/5 pour la liaison au ligand.

Rôle de TRAIL dans l'immunité

Lors de la réponse immunitaire, TRAIL joue un rôle crucial à de multiples niveaux de régulation : Il intervient dans l'éradication des cellules infectées par un agent pathogène, mais aussi dans le contrôle de la réponse immunitaire en éliminant les cellules immunitaires activées, ainsi qu'en permettant la prolifération des cellules T régulatrices afin de réguler l'inflammation.

TRAIL est constitutivement exprimé par la majorité des cellules immunitaires. Cela a été démontré aussi bien pour les cellules de l'immunité innée comme les macrophages, les neutrophiles, les cellules dendritiques et les « Natural Killer » (NK) que pour le système adaptatif comprenant les lymphocytes T (LT) CD4⁺ et CD8⁺ (Brincks et al., 2008; Dorothée et al., 2002; Fanger et al., 1999; Gandini et al., 2013). Les ligands TRAIL sont généralement localisés à la membrane plasmique des cellules du système immunitaire mais peuvent être aussi retrouvés dans des vésicules post-golgi, qui peuvent être délivrés à la membrane spécifiquement en réponse à des cytokines pro-inflammatoires tels que : l'IFN α et IFN β (Interféron) (Gandini et al., 2013). L'activation du TCR (Récepteur des cellules T), la reconnaissance des ARN (acide ribonucléique) doubles brins viraux (Vidalain et al., 2001) ou encore par la reconnaissance du LPS (lipopolysaccharide) par le récepteur TLR4 (Toll-like receptors 4) peuvent également induire la relocalisation de TRAIL à la membrane plasmique (Halaas et al., 2000).

Les cellules infectées par un agent pathogène libèrent alors des cytokines inflammatoires, dont l'IFN- α/β , attirant les cellules résidentes de l'immunité innée dont les NK. Celles-ci une fois au contact des cellules contaminées sont activées par l'IFN- α/β , permettant l'expression à la membrane du TRAIL. Parallèlement, les cellules contaminées voient leurs niveau de TRAIL-

R, DR4 et DR5, augmenter à la membrane (Sato et al., 2001; Sedger et al., 1999) les rendant plus sensibles à l'apoptose déclenchée par TRAIL. Cela souligne l'importance de TRAIL pour l'élimination des cellules infectées (Verma et al., 2014).

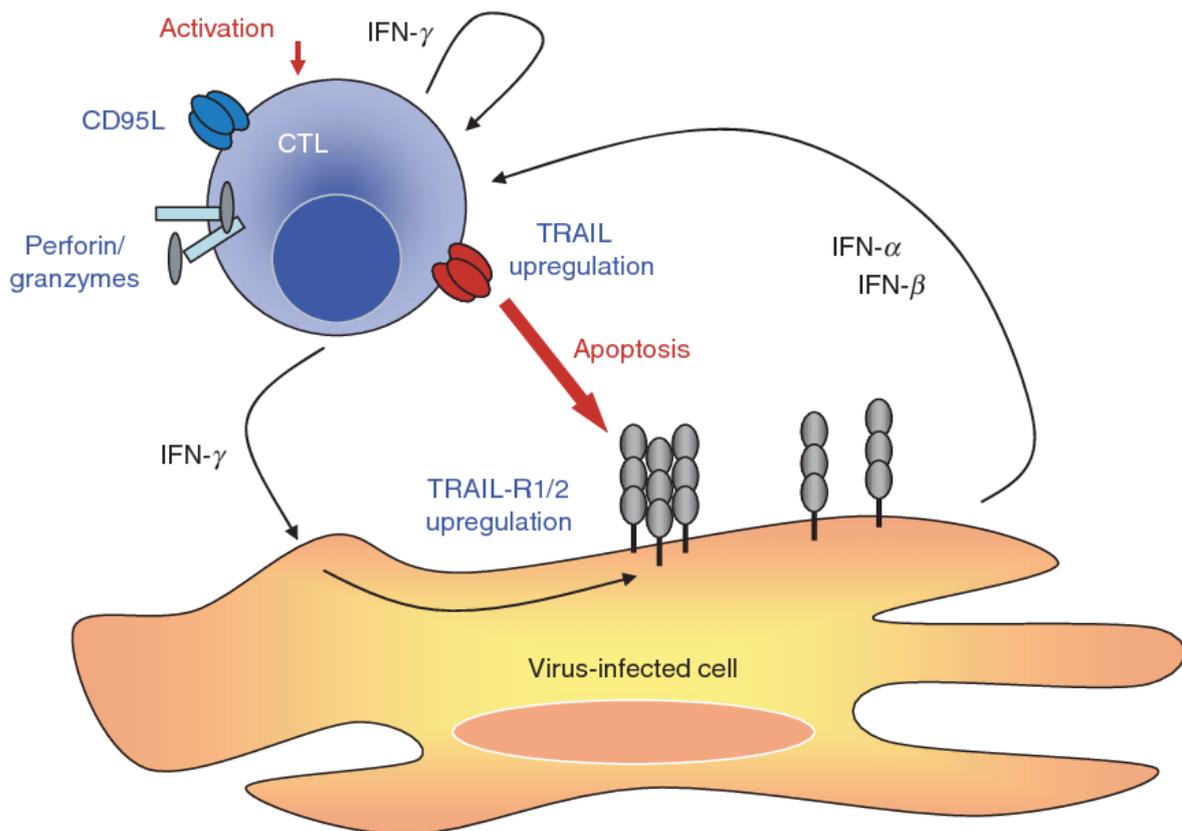


Figure 1-2 : Rôle de TRAIL dans la défense antivirale.

L'infection de la cellule saine augmente son expression à la membrane des récepteurs au TRAIL (TRAIL-R1/2) en plus d'induire la production des cytokines pro-inflammatoires IFN- α/β permettant l'activation du lymphocyte T cytotoxique (LT CD8⁺). La production autocrine de l'IFN- γ par le LT finalise l'activation et l'augmentation à la membrane du TRAIL ligand afin de médier l'apoptose de la cellule cible infectée. Figure provenant (Falschlehner et al., 2009).

TRAIL joue aussi un rôle dans le contrôle de la réponse immunitaire. Des souris KO (Knockout) pour TRAIL sont viables mais développent plus facilement des maladies auto-immunes (Chyuan et al., 2018; Lamhamedi-Cherradi et al., 2003). Un traitement de ces souris KO par TRAIL permet de supprimer l'inflammation liée à la suractivation du système immunitaire. En effet, lors de l'étape de résolution, à la fin de l'infection, les cellules LT CD4⁺ et CD8⁺ actives ont proliféré massivement dans le tissu contaminé. Après leurs maturations et d'autant plus durant leurs sénescences, on retrouve une augmentation de l'expression des TRAIL-R à leurs

membranes. Les LT pourront alors être éliminés par les cellules dendritiques et NK résidentes exprimant le ligand TRAIL afin de diminuer la réponse immunitaire et de calmer l'inflammation (Ikeda et al., 2010; Peppas et al., 2013). Dans ce sens, TRAIL va permettre la prolifération des Treg (Lymphocytes T régulateurs) CD4⁺ CD25⁺ qui sont en charge de l'immunosuppression lors de la phase de résolution (Ikeda et al., 2010), mais sera aussi employée par ces dernières pour déclencher la mort des LT actifs (Ren et al., 2007).

Il a été montré chez des patients atteints de la polyarthrite rhumatoïde, une maladie auto-immune, que les LT effecteurs exprimant un excès de TRAIL à la membrane conduisaient à la mort des Tregs entraînant une réponse immunitaire exacerbée. Certains virus exploitent la voie TRAIL à leurs avantages en induisant l'augmentation de l'expression du TRAIL à la membrane des cellules dendritiques afin que ces dernières éliminent par apoptose les cellules T effectrices (Vidalain et al., 2000).

De par leurs rôles divers, TRAIL et TRAIL-R doivent être très finement régulés, jouant un rôle crucial lors d'une infection par un agent pathogène. Mais leurs implications majeures résident dans l'immunosurveillance et l'éradication des cellules cancéreuses.

TRAIL impliqué dans l'immunité antitumorale

Le concept d'immunosurveillance est apparu il y a une centaine d'années et a été énoncé par le professeur Ehrlich. Il théorisait que des « germes aberrants » (les tumeurs) apparaissent tout au long du développement, et qu'il devait exister un mécanisme de défense afin de les détecter et de les éliminer (Strebhardt and Ullrich, 2008).

Il est maintenant établi que le système immunitaire joue un rôle crucial dans la suppression des cellules cancéreuses mais participe aussi au développement tumoral, notamment avec le concept des « EEE » : Elimination ; Equilibre ; Evasion. L'élimination consiste en la reconnaissance et la suppression des cellules cancéreuses par le système inné et adaptatif. L'équilibre correspond à l'apparition de mécanismes de résistances au sein de la tumeur engendrés par la pression de sélection qu'exerce le système immunitaire sur les cellules tumorales. Durant cette étape, les cellules sont maintenues sous contrôle sans pour autant être éliminées. Enfin, l'évasion correspond au moment où la tumeur échappe au contrôle du système immunitaire, allant même jusqu'à l'exploiter pour son développement (Swann and Smyth, 2007).

L'importance de TRAIL dans l'élimination des tumeurs a été démontrée à l'aide de souris KO pour TRAIL (Cretney et al., 2002; Zerafa et al., 2005). Ces souris sont viables et la proportion des différents types de cellules immunitaires est similaire à une souris sauvage. Cependant, les cellules NK des souris TRAIL KO ne sont plus en mesure de médier la cytotoxicité des cellules cancéreuses 4T1 (carcinome mammaire hautement tumorigène et métastatique) injectées aux souris. La progression tumorale est bien plus importante avec l'apparition de nombreuses métastases chez ces souris TRAIL KO en comparaison des souris WT.

Comme dit précédemment, toutes les cellules du système immunitaire peuvent exprimer TRAIL à la membrane, constitutivement ou sous condition de stimulation par interféron. Les deux types cellulaires dont l'expression est la plus importante sont les LT CD8⁺ de la réponse adaptative ainsi que les NK de l'immunité innée. Ils sont tous les deux associés à un facteur de bon pronostic chez les patients atteints de cancers lorsqu'ils sont retrouvés en quantité élevée dans l'environnement tumoral (Cursons et al., 2019; Galon et al., 2006; Melaiu et al., 2020). D'autres types cellulaires peuvent aussi médier l'apoptose des cellules tumorales, comme les cellules dendritiques (Fanger et al., 1999) même immatures (Lu et al., 2002).

La surveillance et la suppression des cellules transformées par les NK via TRAIL est le dernier rempart contre la progression tumorale. Au cours de la progression tumorale, les LT ne sont plus capables de détecter les cellules transformées contrairement aux NK. En effet, lorsqu'une cellule transformée apparaît dans l'organisme, elle va présenter des antigènes reconnus comme une signature spécifique par le système immunitaire, l'alarmant du danger. Ces antigènes sont présentés à la membrane de la cellule par le CMH de type I (complexe majeur d'histocompatibilité), une protéine membranaire permettant la reconnaissance du « soi ». Les lymphocytes T immatures sont ensuite activés lorsqu'ils reconnaissent via leurs TCR-2 (récepteur des cellules T) l'antigène présenté par le CMH-I, engageant la différenciation en lymphocyte T cytotoxique LT CD8⁺. Les LT CD8⁺ prolifèrent et commencent l'élimination des cellules tumorales par les effecteurs sécrétés tels que les granzymes, perforines et les ligands de mort de la famille du TNF dont TRAIL (Lai et al., 2019). Cependant, une des caractéristiques des cellules cancéreuses est de diminuer la quantité de CMH à leur membrane afin de limiter la reconnaissance par les LT CD8⁺.

En opposition, c'est l'absence de CMH à la membrane des cellules cancéreuses qui est reconnue comme une signature par les NK (Tu et al., 2016). Ces dernières vont alors assurer l'élimination des cellules cancéreuses par des stratégies similaires aux LT CD8⁺ en produisant de

nombreuses granzymes ainsi qu'en induisant l'apoptose des cellules cancéreuses par TRAIL. TRAIL lié à la membrane des cellules NK va pouvoir se lier au DR4 et 5 exprimés par les cellules tumorales afin d'induire l'apoptose. TRAIL peut aussi être clivé par une protéase encore inconnue à ce jour et relarguée sous forme de cytokine dans le milieu extracellulaire (Prager and Watzl, 2019).

Après la découverte du TRAIL, des expériences ont été réalisées afin de déterminer son efficacité à induire la mort des cellules cancéreuses en fonction de sa nature : transmembranaire ou de cytokine soluble (Schneider et al., 1998). Afin de déterminer quelle forme de TRAIL (transmembranaire ou la forme cytokine soluble) permettait d'induire le plus efficacement l'apoptose, ils ont utilisé des anticorps agonistes des récepteurs du TRAIL, portant une étiquette « FLAG » ou non. Les anticorps portant les étiquettes « FLAG » se regroupent en cluster et ont montré une efficacité d'induction de la voie apoptotique supérieure aux anticorps sans étiquette « FLAG ». Ces résultats montrent que TRAIL est efficace pour induire la mort dans les lignées JURKAT et BJAB (lignée cellulaire provenant de lymphomes) sous forme transmembranaire, et que sous forme de cytokine soluble celle-ci est peu efficace pour induire la mort (Schneider et al., 1998). La cytokine soluble TRAIL se lie sous forme de trimère aux récepteurs TRAIL-R mais cette activation n'est généralement pas suffisante pour déclencher une réponse apoptotique effective. Il semblerait que la forme transmembranaire du ligand TRAIL permet de former des agrégats de haut poids moléculaires (cluster) qui stabilisent leurs interactions avec des supra-clusters de récepteurs, permettant une accumulation spatiale de complexes récepteur-ligand afin de déclencher une forte réponse apoptotique (Naval et al., 2019).

C'est pourquoi TRAIL est retrouvé principalement à la membrane d'exosomes qui seront excrétés dans le milieu extracellulaire par de nombreux types de cellules immunitaires dont les lymphocytes T (Martínez-Lorenzo et al., 1999) et les neutrophiles (Simons et al., 2008) pour induire efficacement l'apoptose des cellules tumorales.

Malgré ses rôles anti-tumoraux, TRAIL peut aussi être détourné en faveur des cellules cancéreuses. TRAIL peut déclencher, en plus de la voie apoptotique, une voie de survie, de prolifération et d'invasion par l'induction de nuclear factor-kappa B (NF- κ B) et des Mitogen-activated protein kinases (MAPK). Il a été montré qu'un traitement TRAIL sur des cellules tumorales résistantes à l'apoptose favorise alors la migration, l'invasion et le développement de métastases via l'activation de la voie RAC1 et PI3K (Ehrhardt et al., 2003). De plus, un traitement TRAIL peut aussi entraîner la production de cytokines pro inflammatoires et

immunosuppressives via NF- κ B (Hartwig et al., 2017; Tang et al., 2009) telles que CCL2. CCL2 est une cytokine permettant la différenciation des monocytes en myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) et en M2-like macrophages, des types cellulaires pro-tumoraux qui vont supporter la tumeur au lieu de l'éliminer.

1.1.2 TRAIL en thérapie

La première chimiothérapie fut développée à partir d'observations faites durant la seconde guerre mondiale. Des personnes affectées par le gaz moutarde souffraient d'une considérable chute en concentration de globules blancs. Deux pharmaciens, Louis S. Goodman et Alfred Gilman ont alors étudié les propriétés de ce gaz, démontrant les effets cytotoxiques des composés chimiques d'hydrochlorure de méthyl-bis(bêta-chloroéthyl) amine et hydrochlorure de tris(bêta-chloroéthyl)amine pour le traitement de la maladie de Hodgkin, du lymphosarcome et de la leucémie. Ces traitements eurent pour effet de réduire les masses tumorales partiellement ou totalement et de soigner un patient en 1946, qui périt malgré tout en 1948 dû à la toxicité du traitement (Goodman, 1946, 1984).

Depuis, de nombreuses chimiothérapies ont été développées, mais restent généralement des traitements systémiques, c'est-à-dire affectant l'ensemble du corps. Ce sont des traitements lourds, hautement toxiques avec de nombreux effets secondaires et qui manquent de spécificité.

C'est dans le but d'améliorer ces traitements que la communauté scientifique s'est mise en quête de la « magic bullet ». Un traitement qui permettrait d'éliminer efficacement les cellules cancéreuses tout en épargnant les cellules saines. Les ligands de morts de la famille du TNF ont été des candidats de choix qui constitueraient un traitement efficace et spécifique du cancer. La propriété anti-tumorale du TNF a été observée pour la première fois chez des souris infectées par le Bacillus Calmette Guerin dont le sérum contenait le TNF et provoquait la mort de lignées cancéreuses de souris (Meth A sarcoma et Mouse L cells line) sans affecter les cellules saines (MEF Mouse Embryonic Fibroblast) (Carswell et al., 1975). Les tests sur souris ont révélé des résultats préliminaires encourageant quant à l'utilisation du TNF pour lutter contre le cancer, malgré une faible toxicité observée (Brouckaert et al., 1986). C'est lors des tests cliniques que le TNF s'est avéré très toxique, provoquant un syndrome de réponse inflammatoire systémique avec une forte hépatotoxicité chez l'homme (dommage au foie) (Ciesielski and Modzelewski, 1995). De la même façon, le FAS ligand s'est révélé hautement toxique lors d'injections intrapéritonéales dans des souris, qui sont rapidement décédées

d'hépatites (Ogasawara et al., 1993). Si ces études n'ont pas permis l'élaboration d'un traitement contre le cancer, elles ont permis de comprendre l'implication du TNF dans l'inflammation, entraînant le développement de thérapie efficace à base d'anti-TNF pour le traitement de réponse inflammatoire chronique.

Résultats préliminaires thérapeutiques de TRAIL

TRAIL a été nommée à l'origine Apo-2L de par l'homologie de séquence partagée avec le ligand FAS (Apo-1L). Il a été premièrement montré que le ligand TRAIL/Apo2-L déclenche l'apoptose par liaison à d'autres récepteurs que ceux activés par le ligand FAS. Des fibroblastes de souris sensibles à l'apoptose induite par le FAS-L dû à une surexpression des récepteurs FAS-R n'étaient pas plus sensibles au TRAIL que des fibroblastes de souris contrôles, ce qui a été confirmé en utilisant des anticorps bloquant du FAS récepteur. Il a été observé par la suite que TRAIL pouvait induire l'apoptose des cellules cancéreuses comme les autres membres de la famille TNF (Pitti et al., 1996). Parallèlement, des observations similaires ont confirmé que TRAIL possédait ses propres récepteurs. Ils ont aussi observé dans la souris que l'ARN messager de TRAIL était exprimé de façon ubiquitaire par les différents types cellulaires en comparaison des ARN messagers de FAS et du TNF, laissant supposer une tolérance plus grande pour les cellules saines au TRAIL. Ils ont démontré chez la souris que TRAIL induisait la mort par apoptose de cellules cancéreuses en épargnant les cellules B et T primaires (Wiley et al., 1995).

De nombreuses études sur TRAIL ont suivi afin de déterminer son efficacité en tant que traitement anti-cancéreux et sa potentiel toxicité sur l'organisme.

Tout d'abord, des traitements TRAIL se sont révélés efficaces pour induire l'apoptose des cellules cancéreuses humaines sans affecter les cellules saines *in vitro*. En effet il a été démontré que TRAIL humain (et murin) permettait d'induire la mort d'adénocarcinomes mammaire, alors que les cellules épithéliales mammaires, les fibroblastes de poumons, de prostates et les mélanocytes étaient eux résistants à l'apoptose induite par TRAIL (Ashkenazi et al., 1999; Walczak et al., 1999). Cependant, une sensibilité des astrocytes humains à l'apoptose induite par TRAIL était observée (Ashkenazi et al., 1999; Walczak et al., 1999).

Les premiers tests *in vivo* chez la souris ont montré qu'un traitement à base de TRAIL n'entraîne aucune toxicité. Les tissus du rein sont intacts après 24h de traitement par TRAIL en comparaison de dose similaire de FAS-L qui induit de la nécrose et la mort de la souris en 55

minutes seulement. Des souris transplantées par la lignée cancéreuse MDA-231 ont été traitées par des doses croissantes de TRAIL pendant 10 jours. Le traitement réduit significativement le développement tumoral, avec aucune tumeur visible avant la deuxième semaine. Des tumeurs émergent cependant après 4 semaines démontrant que le traitement TRAIL ne permet pas d'éliminer la totalité des cellules tumorales (Walczak et al., 1999).

Chez l'homme, comme chez la souris, l'ARN messager de TRAIL est retrouvé exprimé dans de nombreux tissus, contrairement aux transcrits de FAS et TNF, suggérant une tolérance des cellules humaines saines au TRAIL (Simons et al., 2008).

Echec thérapeutique

Malgré ces premières observations encourageantes sur l'efficacité du TRAIL à induire l'apoptose des cellules tumorales, d'autres études ont révélé une toxicité potentielle. En effet, il a été observé que TRAIL est toxique à haute concentration sur des hépatocytes humains (Jo et al., 2000), tandis que les premiers tests sur souris et singes n'avaient démontré aucun effet hépatotoxique (Ashkenazi et al., 1999; Walczak et al., 1999). Des traitements à 200 et 400 ng de TRAIL sur des hépatocytes de souris et de primates n'ont aucun effet observable, mais induisent la mort d'hépatocytes humains et de lignées tumorales (AKN-1 et A431) (Jo et al., 2000). Cependant il a été montré plus tard que la toxicité était liée à la préparation du TRAIL, trimérisé à l'aide d'étiquette TAG. Le monomère de TRAIL endogène possède un zinc sur la cystéine en position 230 qui permet sa trimérisation. Cet atome de zinc tient un rôle crucial pour la stabilité de la forme trimérique de TRAIL, impactant directement son efficacité à induire l'apoptose des cellules cibles. La mutation de la cystéine en position 230 en alanine réduit ainsi de près de 200 fois l'affinité de TRAIL à ses récepteurs (Bodmer et al., 2000). Ils ont reproduit la préparation du TRAIL en remplaçant les étiquettes FLAG par un atome de zinc pour trimériser TRAIL, sous cette forme, TRAIL est alors inoffensif pour les hépatocytes humains (Lawrence et al., 2001).

Les premiers tests cliniques chez l'homme ont révélés que l'injection de Dulanermin, première protéine recombinante agoniste des TRAIL Récepteur 1 et 2 développée et testée en clinique, était sans danger (Ling et al., 2006). Aucune toxicité importante ne fut constatée lors d'une administration quotidienne durant 5 jours toutes les 3 semaines, seules quelques nausées, vomissements et diarrhées ont été observées chez les patients sains traités (Herbst et al., 2010).

Cependant, les traitements à base de TRAIL n'ont pas permis la rémission des patients et l'élimination de la tumeur (Micheau et al., 2013). Tout d'abord la durée de vie de la protéine recombinante TRAIL est très faible dans l'organisme (environ 1h) due à une stabilité limitée dans le sang (Herbst et al., 2010). De plus, de nombreuses résistances au traitement TRAIL furent constatées au sein de la tumeur, que ce soit une résistance à l'origine du traitement ou induite par le traitement lui-même (Zhang and Fang, 2005).

De plus TRAIL peut induire la voie de survie, inflammation et prolifération par l'activation de la voie NF- κ B et des MAP Kinases en aval, tel que Pi3K connu pour accorder des propriétés métastatiques aux cellules tumorales. Des travaux ont ainsi montré qu'un traitement TRAIL induisait dans les cellules cancéreuses survivantes à l'apoptose alors migration, invasion et propriétés métastatiques (Ishimura et al., 2006; Trauzold et al., 2006). Il a aussi été montré que les cancers KRAS mutés, qui représentent une grande proportion de tous les cancers (25%), sont résistant à l'induction de l'apoptose par TRAIL et vont jusqu'à exploiter la voie TRAIL/TRAIL-R afin de promouvoir la survie et la prolifération (Hoogwater et al., 2010; Indarte et al., 2019).

Développements en cours

De nouvelles stratégies sont mises en place afin d'augmenter la sensibilité des cellules cancéreuses au TRAIL, de contourner les formes de résistances, de stabiliser le ligand dans le corps ou encore en combinaison avec des chimiothérapies et des inhibiteurs de la voie apoptotique.

En effet, le Dulanermin (ou AMG-951) semblait encourageant lors de son entrée en essais cliniques, mais n'a montré que peu d'efficacité en tant que molécule thérapeutique. Cela a été expliqué par 2 points importants. Premièrement que la molécule avait une faible durée de vie dans l'organisme (Kelley et al., 2001). Et deuxièmement, que le Dulanermin ne permettait pas une trimérisation efficace des récepteurs (Graves et al., 2014).

Pour l'instant, les molécules thérapeutiques basées sur TRAIL ont pris deux directions. Des protéines TRAIL recombinantes (Dulanermin) et des anticorps agonistes des récepteur DR4 ou DR5. Ces anticorps ont l'avantage d'avoir une durée de vie augmentée dans le corps. Les anticorps développés ont démontré des résultats encourageants lors des premiers tests de toxicité. Mais encore une fois, les traitements démontrent une faible capacité à induire l'apoptose des cellules cancéreuses (Forero-Torres et al., 2013; Merchant et al., 2012), que ce

soit seul ou en combinaison avec des chimiothérapies. Il a été constaté que les anticorps agonistes des récepteurs TRAIL manquaient d'efficacité à induire la trimérisation du récepteur, étape critique pour l'induction du signal apoptotique. De ce fait, des anticorps agonistes ont été développés, sous forme trimérisés au préalable afin d'augmenter l'efficacité d'induction d'apoptose. De ces molécules, une seule fut étudiée en clinique, le TAS266. Un tétramère d'anticorps spécifique du DR5 de TRAIL, qui démontra un potentiel apoptotique bien supérieur (Huet et al., 2014). Mais les tests durent être stoppés pour cause de rapide toxicité détecté chez les patients pris en charge (Papadopoulos et al., 2015).

Des observations ont été faites lors de test sur un double emploi de TRAIL, le Dulanermin avec un anticorps spécifique de DR5, le Conatumumab (AMG-655). Le co-traitement a démontré une efficacité grandement augmentée de par une meilleure trimérisation du récepteur DR5 et cela sans toxicité lors de test in-vivo chez la souris (Graves et al., 2014). Il est hypothétisé que cette combinaison entraîne un regroupement des récepteurs sous forme de structure « d'alvéole de ruche ». Cette accumulation spatiale de récepteurs entraîne localement un intense signal apoptotique permettant une forte induction apoptotique (Naval et al., 2019).

Actuellement, de nombreuses cibles thérapeutiques sont étudiées afin de permettre une augmentation de sensibilité au TRAIL par des co-traitements. Notamment les inhibiteurs endogènes de la voie apoptotique tel que la protéine c-FLIP (cellular FLICE-like inhibitory protein) (Safa and Pollok, 2011) ou les SMAC mimétiques qui inhibent les IAPs (inhibitors apoptosis proteins) et qui permettent d'augmenter la sensibilité au TRAIL (Metwalli et al., 2010). Un traitement par des SMAC mimétiques, même seuls, semblent avoir un fort effet antitumoral inhibant la prolifération de la tumeur. L'inhibition des IAPs dans les cellules cancéreuses les sensibilisent à l'apoptose induite par les cellules immunitaires infiltrants la tumeur (Abbas and Larisch, 2020; Shekhar et al., 2019).

Un test clinique en cours étudie l'injection de cellules mésenchymateuses du stroma modifiées pour surexprimer TRAIL à la membrane. Les cellules mésenchymateuses sont largement étudiées aujourd'hui pour de multiples applications thérapeutiques, et ont notamment la propriété d'être attirées par la tumeur lors d'injection par intraveineuse (Caplan et al., 2019). Sachant que TRAIL est bien plus efficace à la membrane que sous forme soluble, cette thérapie pourrait permettre de grandement augmenté l'efficacité du traitement tout en limitant les effets pro-tumoraux du TRAIL (Davies et al., 2019).

Des analogues synthétiques au TRAIL sont développés afin d'augmenter l'efficacité d'induction de la voie apoptotique. Une protéine chimérique de TRAIL fusionnée à des effecteurs polypeptides de VEGFA a permis l'inhibition à long terme du développement tumoral sans induire de toxicité chez la souris et le singe. En plus d'induire plus efficacement l'apoptose et d'inhiber l'angiogenèse, elle pourrait outre-passer la résistance au TRAIL de ces lignées. Fait étonnant, l'apoptose induite est dépendante des récepteurs TRAIL DR4 et DR5 mais pas de FADD (Fas-Associated protein with Death Domain), première molécule adaptatrice recrutée pour l'induction de l'apoptose sous TRAIL (Rozga et al., 2020).

Les traitements par TRAIL ne sont pas abandonnés malgré les premiers échecs cliniques. TRAIL pouvant aussi bien avoir un effet anti- que pro-tumoral en fonction du contexte, il est donc important de mieux caractériser les différentes voies canoniques et non-canoniques induites par le traitement.

1.2 Apoptose induite par TRAIL

La mort cellulaire programmée ou apoptose est un processus indispensable au bon fonctionnement de l'organisme. Elle est déclenchée en réponse à un signal interne ou externe de la cellule. L'apoptose joue un rôle crucial lors du développement, ainsi que tout au long de la vie adulte en permettant la régulation et l'homéostasie des tissus, l'élimination des cellules sénescents, malades ou infectées. Le terme apoptose est né en 1972, décrite par John Kerr, Andrew Wyllie et Alastair Currie, lors de l'étude de tissus sous microscopie (Kerr, 2002). La cellule rentrant en apoptose déclenche une série d'évènements caractéristique de cette mort cellulaire : Le blebbing de la membrane (apparition de renflement) avec la condensation puis la fragmentation de l'ADN, l'exposition des phosphatidylsérines sur la face externe de la membrane et le scindement de la cellule en petites vésicules appelées corps apoptotiques qui seront alors rapidement phagocytosées (capturées et digérées) par les cellules immunitaires résidentes par reconnaissance des phosphatidylsérines exposées. Cette mort cellulaire est une mort dite « silencieuse », c'est-à-dire qu'elle n'alerte pas le système immunitaire (en règle générale) et n'induit pas d'inflammation car le contenu cytoplasmique est constamment maintenu dans la cellule ainsi que dans les corps apoptotiques lors du scindement cellulaire. Il a été estimé que 100 milliards de cellules entrent en apoptose par jour dans un corps humain adulte, d'où la nécessité de ne pas induire de réaction immunitaire.

Apoptose voie extrinsèque (TRAIL)

L'apoptose peut donc être déclenchée par deux voies principales, la voie interne, aussi appelée la voie mitochondriale (la voie intrinsèque de l'apoptose), et la voie externe, celle induite lors de l'activation des récepteurs de morts dont les récepteurs au TRAIL (la voie extrinsèque).

Brièvement, la voie interne de l'apoptose peut être engagée par le biais de multiples protéines qui ont un véritable rôle de senseur dans la cellule. Ces protéines contrôlent en permanence le bon fonctionnement cellulaire, la présence de nutriment, la division cellulaire etc... Lorsque des anomalies sont détectées, ces protéines déclenchent alors des processus de réparation, et finalement l'apoptose afin d'éliminer la cellule dysfonctionnelle, mourante ou infectée. Ce mécanisme est primordial et se trouve être la première ligne de défense dans le contrôle de l'apparition de cellule cancéreuse.

Des cellules transformées, mutées génétiquement apparaissent chaque jour dans un organisme, sans pour autant entraîner le développement d'une tumeur. C'est ici grâce aux contrôles internes effectués par l'un des senseurs, le facteur de transcription TP53 (pour tumor protein 53) aussi nommé « le gardien du génome ». TP53 est constamment inhibé par MDM2, mais lorsque la cellule est en proie à des stress génétiques, de division ou réplication, l'inhibition de TP53 par MDM2 s'estompe et TP53 va permettre la transcription de gènes participant à la réparation de l'ADN, le cycle cellulaire, l'autophagie et en ultime recours, l'apoptose de la cellule. D'où le fait que TP53 est muté dans 54% de tous les cancers confondus (Sanz et al., 2019).

Lorsqu'une cellule échappe alors à ses propres mécanismes de contrôle interne, c'est le système immunitaire qui prend le relai pour la reconnaissance des cellules aberrantes. Nous allons focaliser notre attention sur la voie externe de l'apoptose, celle empruntée par la signalisation TRAIL. Nous reparlerons cependant de la voie interne car elle intervient dans un phénomène d'amplification.

Les récepteurs au TRAIL

Il existe 5 récepteurs au TRAIL : TRAIL-R1 (DR4/*TNFSF10A*), TRAIL-R2 (DR5/*TNFSF10B*), TRAIL-R3 (DcR1/ Decoy Receptor 1/ TRID/ *TNFSF10C*), TRAIL-R4 (DcR2/ *TNFSF10CD*), et un récepteur soluble Osteoprotegerine (OPG, *TNFRSF11B*).

Les récepteurs DR4 et 5 sont donc des protéines transmembranaires qui vont transduire le signal lors de leurs trimérisation induite par TRAIL ligand. Le domaine extracellulaire de ces récepteurs est constitué de 3 domaines riches en cystéines (CRD, cystein rich domain) qui permettent la reconnaissance et l'interaction avec le ligand TRAIL. Un segment transmembranaire les ancre à la membrane, puis la partie intracellulaire contenant les domaines de morts (DD, death domain) permettent la formation d'un complexe protéique (le 'death-inducing signaling complex', DISC) induisant l'apoptose. DR5 se différencie de DR4 par une région proche de la membrane (MPD, membrane proximal domain) qui a été démontré comme pouvant induire de façon autonome la voie ERK par l'activation de Rac1, sans nécessité de recrutement du DISC et entraînant un phénotype invasif de la tumeur (von Karstedt et al., 2015). Il n'est pas complètement élucidé lequel de ces récepteurs est préférentiellement utilisé pour induire l'apoptose des cellules tumorales. Dépendamment du type cellulaire, l'induction de l'apoptose par TRAIL a été recensée comme se faisant majoritairement par le biais de DR5

(Nahacka et al., 2018) et parfois via DR4 (Stadel et al., 2010), même si il semblerait que les anticorps agonistes anti-DR5 soient plus efficaces pour induire l'apoptose.

Le DcR1 est le premier decoy récepteur de TRAIL découvert en 1997 (Degli-Esposti et al., 1997a; MacFarlane et al., 1997; Pan, 1997a; Schneider et al., 1997a). Il ne possède pas de segment transmembranaire et donc pas de domaine de mort (désigné TRID pour TRAIL receptor without an intracellular domain) mais est ancré à la membrane via un glycolipide, un glycosylphosphatidylinositol (GPI). Le DcR2 quant à lui possède le segment transmembranaire comme le DR4 et 5 mais cependant possède un domaine de mort tronqué (TRUNDD, truncated death domain), le rendant inapte à induire le signal apoptotique (Degli-Esposti et al., 1997b; Marsters et al., 1997). En plus de ces deux récepteurs membranaires, il existe un troisième récepteur au TRAIL, soluble cette fois ci, l'OPG. L'OPG a un rôle important dans la différenciation des ostéoclastes, secrété par ces mêmes cellules afin de contrôler leurs prolifération et différenciation en inhibant le ligand RANK-L (Receptor Activator of Nuclear Factor-kappa B Ligand) (Marie and Halbout, 2008). L'OPG a été démontré comme pouvant lier TRAIL avec une faible affinité et agir ainsi comme un decoy récepteur de TRAIL (Emery et al., 1998).

Il existe un dernier récepteur, à la base décrit comme étant un récepteur soluble d'autres membres de la famille des TNF, Fas L, TNF-like molecule 1A (TL1A), et LIGHT. Ce récepteur soluble nommé Decoy receptor 3 (Dcr3, tumor necrosis factor receptor superfamily member 6B (TNFRSF6B)) semble pouvoir lier TRAIL mais avec une faible affinité. Souvent surexprimé dans les cancers, les observations quant à son rôle semblent mitigées. Dans la majorité des cas, il agit comme un inhibiteur de l'apoptose induit par TRAIL dans les cellules tumorales, où la diminution de son niveau d'expression par sh augmente la sensibilité des cellules tumorales à la mort cellulaire (Liang et al., 2017). Mais il a été aussi recensé, sans trop d'explication mécanistique, comme apte à sensibiliser des lignées (Jurkat, HeLa) au TRAIL (Wu et al., 2004).

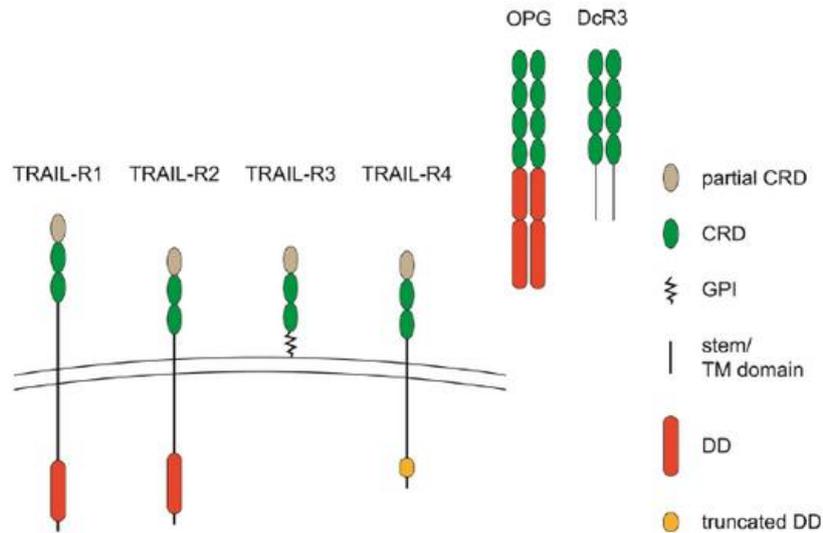


Figure 1-3 : Représentation des domaines structuraux des récepteurs au TRAIL.

La partie extracellulaire des récepteurs au TRAIL (TRAIL-R1-4) est composée d'un enchaînement de trois CRDs (ovale vert et gris). Le CRD-1 est partiel et permet le pré-assemblage des récepteurs par interaction homophile. Les CRD-2/3 quant à eux permettent l'interaction avec le ligand TRAIL. TRAIL-R1/2 possèdent tous deux le domaine de mort requis pour la transduction du signal apoptotique (rouge) alors que celui du récepteur leurre TRAIL-R4 est tronqué et non fonctionnel. TRAIL-R3 est lié à la membrane par un ancrage glycosylphosphatidylinositol, sans domaine transmembranaire et donc sans le domaine de mort. L'OPG et DcR3 sont deux récepteurs leurres solubles, reportés comme pouvant lier TRAIL avec une faible affinité. Ils sont tous deux sécrétés sous une forme de dimères et composés d'un enchaînement de 4 CRD. L'OPG possède deux domaines ressemblant aux domaines de morts. Figure provenant de (Danish et al., 2017).

Une étude a montré une forte corrélation entre le niveau de récepteur decoy et la résistance au TRAIL (Zwacka, 2009), et cela aussi dû au fait de la formation d'hétérotrimères (voir le rôle inhibiteur de ces récepteurs decoy dans la partie '1.3.1. Résistance à l'apoptose'). Tout comme les récepteurs au TNF, les récepteurs au TRAIL possèdent des domaines de pré-assemblage (pre-ligand binding assembly domain (PLAD)) situés en amont des domaines riches en cystéines. Ces domaines permettent en temps normal le pré-assemblage d'homotrimères en attente de l'interaction avec le ligand. Il a été démontré que la formation d'hétérotrimères était possible avec un effet dominant négatif (Neumann et al., 2014), et permettait la survie cellulaire notamment par le biais de DR5 (Shlyakhtina et al., 2017).

Formation du DISC

L'induction du signal apoptotique s'effectue lors de la liaison de TRAIL ligand au CRD des récepteurs. Cela induit ainsi leurs trimérisations et un changement conformationnel permettant l'interaction des DD coté cytoplasme qui va permettre la formation du DISC. L'interaction des DD des récepteurs entraîne le recrutement de la protéine adaptatrice FADD par interaction homéotypique des DD de la protéine au DD des récepteurs. FADD va alors recruter à son tour par son DED (Death effector domain) les procaspases initiateuses 8 et 10 possédant elles aussi deux domaines DED. Les caspases (pour cystéine-aspartic protéase) sont des protéases, des enzymes permettant le clivage de séquences spécifiques par hydrolyse lorsqu'elles sont actives. Les procaspases 8 et 10 une fois liées à FADD par leur premier domaine DED1 peuvent à leur tour recruter d'autres procaspases 8 et 10 par interaction de leurs seconds domaines, entraînant des chaînes de procaspases qui atteignent en moyenne 6 procaspases pour une seule protéine adaptatrice FADD (Hughes et al., 2016). Cet assemblage est important, car il permet l'homodimérisation des sites enzymatiques des procaspases 8 liées par leurs DED2 et ainsi l'autoprotéolyse des procaspases entre-elles libérant la petite sous unité (appelée P10) lors du clivage de l'aspartate en position 283. Une seconde protéolyse s'ensuit pour libérer la grande sous unité (P20) par le clivage en aval du DED2. La forme mature de la caspase-8 est donc composée de deux grandes sous unités et des deux petites dû à l'homodimérisation des procaspases, formant ainsi un hétérotétramère d'unités (Tummers and Green, 2017). Les observations sur le rôle de la caspase 10 dans l'initiation de l'apoptose est très controversée. Faiblement exprimée dans de nombreuses lignées, il semblerait qu'elle est bien recrutée par FADD sous le récepteur TRAIL, et permet une apoptose grandement diminuée en efficacité lorsque la caspase-8 est absente (Sprick, 2002). Des études récentes mettent en avant un rôle anti-apoptotique de la caspase 10 qui limiterait l'activation de la caspase-8 tout en augmentant la voie de survie NF- κ B (Horn et al., 2017).

La protéine c-FLIP est un inhibiteur endogène de la voie extrinsèque de l'apoptose, elle se présente sous trois formes fonctionnelles, une forme longue FLIP-L et deux formes courtes FLIP-S et FLIP-R. FLIP-L est fortement similaire à la caspase-8 avec les domaines DED en N-terminal, mais ne possède pas le résidu cystéine du site catalytique, la rendant ainsi non-fonctionnelle. FLIP n'interagit pas directement avec FADD, c'est la procaspase-8 qui une fois recrutée via ses DED par FADD, peut à son tour interagir par ses DED avec FLIP qui agit ainsi comme un dominant négatif (Hughes et al., 2016). Cependant des études ont permis de discriminer le rôle de FLIP en fonction de sa forme. En effet à l'origine les observations

provenaient de surexpression des différentes formes de FLIP, masquant son rôle lors de régulation plus fine. Il a été montré que FLIP-L, à faible niveau protéique, est en fait capable d'accroître l'activation de la caspase-8 (Chang, 2002; Micheau et al., 2002; Yu et al., 2009). Alors qu'à haut niveau, le ratio caspase-8/ FLIP-L devient trop faible entraînant un effet anti-apoptotique. FLIP-S et R sont quant à eux des dominants négatifs, ne possédant que les deux DED sans le DD, FLIP-S est ainsi recruté par ses DED mais inhibe l'activation de la procaspase-8, il a même été montré que FLIP-s bloquait le recrutement de nouvelles procaspases (Tummers and Green, 2017). Il peut cependant permettre la formation d'autres complexes sur lesquelles nous reviendront. Pendant longtemps on pensait que le DISC n'était composé que de FADD/C8/FLIP sous le récepteur de TRAIL, et que d'autres complexes pouvaient se former en milieu cytoplasmique lorsque FADD se décrochait du récepteur. Nous savons dorénavant que d'autres molécules peuvent être recrutées au récepteur, mais nous reviendrons dessus ainsi que sur les formes de FLIP dans le chapitre 1.4 les voies non canoniques de TRAIL.

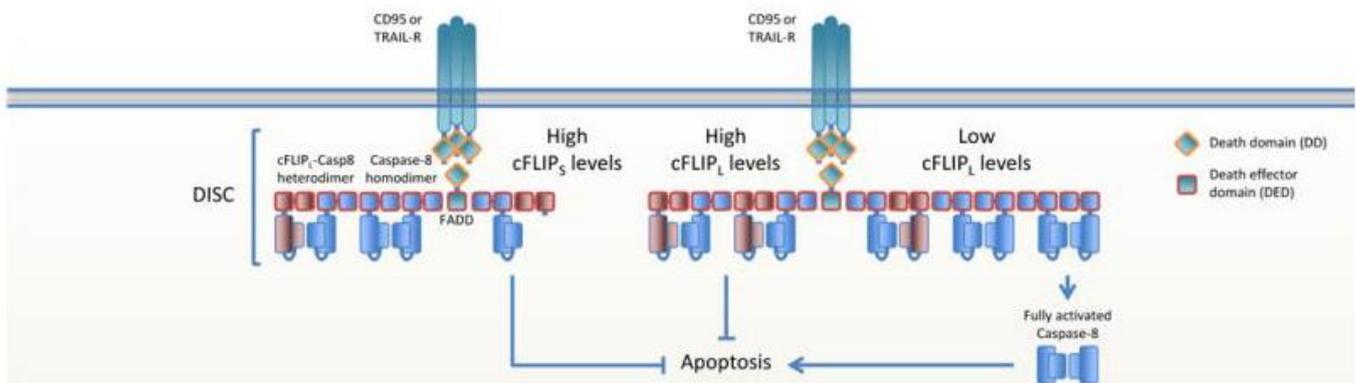


Figure 1-4 : Formation du DISC en fonction des différentes formes de FLIP

La liaison de TRAIL à ses récepteurs DR4/DR5 entraîne leurs trimérisations et le changement conformationnel qui permet le rassemblement des DD et le recrutement de FADD. FLIP sous sa forme longue peut être recruté à la caspase-8 par interaction de leurs DED respectifs, entraînant la formation d'hétérodimères et le recrutement d'autre procaspase-8 en retour. Le premier clivage de la procaspase-8 est alors déclenchée mais pas la seconde qui permet la libération de la caspase-8 du DISC. Un haut niveau protéique de FLIP-L diminue donc la quantité d'homodimère de caspase-8 et ralentit le signal apoptotique en limitant la quantité de caspase-8 pleinement active. FLIP-S possède les deux DED mais pas le DD, inhibant le recrutement de nouvelles procaspase-8 sous le DISC ce qui a pour effet de bloquer le signal pro-apoptotique. Figure provenant de la revue (Tummers and Green, 2017).

Une fois que la caspase-8 est mature et active, elle va pouvoir propager le signal apoptotique par clivage enzymatique de ces substrats. La caspase-8 va ainsi cliver les caspases effectrices 3/6/7 qui vont à leurs tours cliver leurs substrats, la caspase 3/7 permettent la séparation de DFF40 de son inhibiteur endogène DFF45 qui va alors participer à la fragmentation de l'ADN tandis que la caspase 3 clive PARP-1 chargé de réparer les dégâts à l'ADN. ROCK1 est aussi clivé par les caspases 3/7 entraînant le blebbing de la membrane (Elmore, 2007).

Lorsque l'activation direct des caspases effectrices par les initiatrices est suffisante à induire l'apoptose des cellules, on dit que les cellules sont de type I. Si elles requièrent cependant une amplification du signal par la voie interne de l'apoptose, elles sont alors dites de type II.

Il a été observé en 1998 que la mort induite par FAS, et donc l'apoptose extrinsèque recourait à des mécanismes moléculaires de la voie intrinsèque par les mitochondries (Li et al., 1998). Et que lorsque l'on surexprimait des protéines inhibitrices de l'apoptose intrinsèque, on prévenait de la mort induite par FAS (extrinsèque) d'hépatocytes de souris (Yin et al., 1999).

Il a été montré que ce qui différencie les cellules de type 1 du type 2 était l'action d'une protéine inhibitrice de l'apoptose, XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis protein). XIAP fait partie de la famille des IAP (inhibitors of apoptosis) et possède des BIR domaines (baculoviral IAP repeat) qui permettent la reconnaissance des caspases effectrices 3/7, inhibant leurs activations. Les IAPs possèdent aussi un domaine UBA (ubiquitin-associated domains) qui permet le recrutement de la ligase E3 et l'ubiquitination des caspases effectrices pour les adresser au protéasome pour leur dégradation. L'utilisation de SMAC mimétiques (molécule chimique simulant la protéine SMAC/DIABLO pour direct IAP-binding protein with low pI, inhibiteur endogène des IAP dont XIAP), a permis de sensibiliser les cellules à FAS sans recourir à la voie interne (Jost et al., 2009). Le même phénomène a pu être reproduit pour la voie du TRAIL (Huang et al., 2016)

Amplification mitochondriale

Les cellules de type 2 nécessitent une amplification du signal apoptotique lors de la stimulation des récepteurs de morts, car l'activation des caspases effectrices par la caspase-8 est inhibée par XIAP. Le signal transduit communique alors avec la voie interne de l'apoptose, laquelle est régie par les mitochondries. Les mitochondries sont des organelles cellulaires, permettant notamment la respiration, et qui contiennent en elles des effecteurs pour l'induction apoptotique. L'apoptose déclenchée par les mitochondries est sous le contrôle d'une grande

famille de molécules appelée la famille BCL-2. Le ratio de ces acteurs pro- et anti-apoptotiques régule le déclenchement du MOMP (mitochondrial outer membrane permeabilization) des mitochondries. Le MOMP est l'événement de perméabilisation de la membrane mitochondriale externe afin de relarguer le contenu dans le cytoplasme de la cellule. Les acteurs moléculaires de l'apoptose contenu dans les mitochondries vont former de nouveaux complexes de mort pour la transduction du signal apoptotique (Kalkavan and Green, 2018).

Pour les cellules de type 2, la caspase-8 activée lors de la formation du DISC sous TRAIL va cliver une protéine appelée BID (BH3 interacting-domain death agonist) en tBID (truncated BID) (Huang et al., 2016). La caspase-8 active reconnaît une séquence spécifique qu'elle peut cliver, la séquence peptidique LETD (Leucine, Glutamate, Thréonine et Aspartate) ou XEXD pour une protéine et non un peptide (Julien and Wells, 2017). BID fait partie de la superfamille BCL2, cette famille qui régule la mort cellulaire via les mitochondries et réunit aussi bien des protéines anti- que pro-apoptotiques. Les membres de cette famille possèdent un BH domaine (BCL-2 homology domain) qui leur permettent d'interagir ensemble. tBID est recruté alors à l'OMM (outer-mitochondrial membrane) et peut interagir avec BAX, un autre membre de la famille BCL qui forme ensemble avec BAK et BCL2 une balance décisionnelle de la perméabilisation des mitochondries. BAX est recruté par ses domaines BH à tBID pour former des oligomères à la membrane de la mitochondrie, formant des pores, détruisant ainsi la mitochondrie et relarguant le contenu mitochondrial dans le cytosol. Le cytochrome C ainsi que SMAC/DIABLO sont relâchés dans le cytoplasme : Les cytochromes C s'associent avec des protéines APAF-1 (Apoptotic peptidase activating factor 1) présente dans le cytoplasme mais sous une forme conformationnelle non-active. L'interaction du cytochrome C avec APAF-1 permet le changement conformationnel d'APAF-1, qui va exposer son domaine CARD et permettre de recruter plusieurs APAF-1 par ce domaine. C'est la formation du complexe appelé « apoptosome ». L'apoptosome recrute alors les procaspases 9 afin de les activer. Elles activeront à leur tour les caspases effectrices 3 et 7, qui elles même ne sont plus inhibées par les XIAP du au relargage de SMAC/DIABLO durant le MOMP.

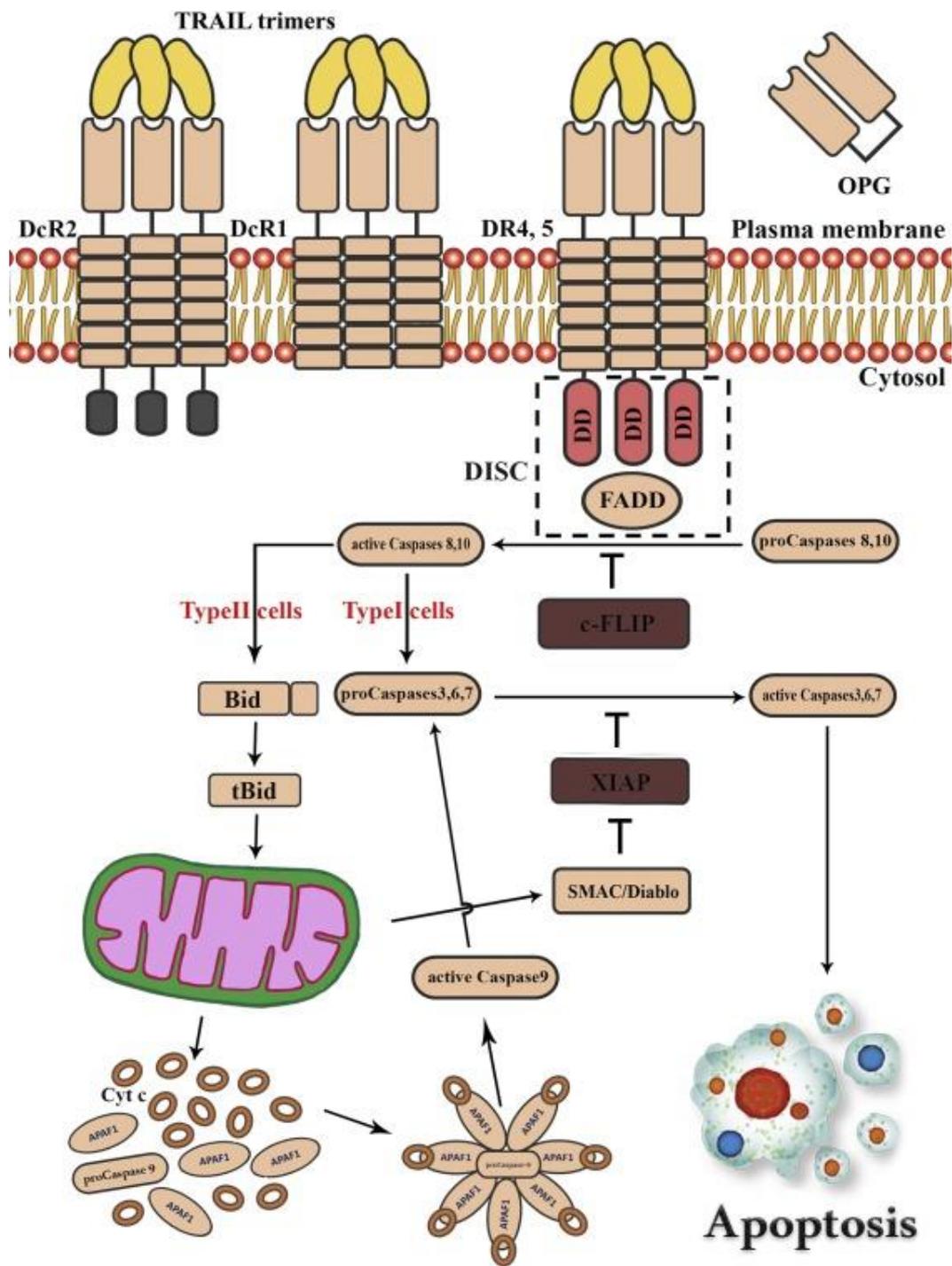


Figure 1-5 : Schéma récapitulatif de la transduction du signal apoptotique par les récepteurs de TRAIL.

La liaison de TRAIL au récepteurs DR4/5 entraîne sa trimérisation et le changement conformationnel de la partie cytoplasmique permettant le recrutement de la protéine adaptatrice FADD par interaction homotypique des DD. Procaspase-8 est alors recrutée et est activée par autoprotolyse dépendamment de la concentration en c-FLIP, l'inhibiteur endogène (et de ses isoformes). Pour les cellules de types 1, exprimant faiblement XIAP, l'activation de la caspase-8 initiateur est suffisante pour induire le clivage des caspase 3,6,7 effectrices et déclencher l'apoptose. Pour les cellules de type 2, l'inhibition exercée par les XIAP sur les caspases effectrices est trop conséquente pour que la caspase-8 puisse directement les activer. La caspase-8 initie l'amplification mitochondriale par le clivage de BID en tBID, induisant le MOMP des mitochondries et le relargage des Cyt c. APAF et Cyt c se complexent avec la procaspase 9 induisant son activation qui va pouvoir aider la caspase-8 à initier l'apoptose. En parallèle, SMAC/DIABLO est relargué durant le MOMP et lève l'inhibition effectuée par XIAP sur les caspases effectrices. Figure provenant de (Naimi et al., 2018).

1.3 Résistance à l'apoptose induite par TRAIL

La résistance à l'apoptose est une caractéristique inhérente au cancer. La pression de sélection qu'exerce le système immunitaire sur les cellules cancéreuses lors des phases d'élimination et d'équilibre du développement tumoral contraint la tumeur à développer des mécanismes de résistances afin de s'évader du contrôle immunitaire. Ces mécanismes sont multiples, cela peut prendre la forme de la non-reconnaissance des signaux, l'inhibition de la voie ou encore l'exploitation de l'environnement tumoral afin de s'évader. Comprendre ces mécanismes de résistances est primordial dans le traitement du cancer, d'où la hausse de la médecine personnalisée qui consiste en une analyse génétique des tumeurs avant un traitement. L'essai Shiva lancé en 2012 et coordonné par l'institut Curie a investi la faisabilité de l'étude de chaque tumeur de patient avant traitement. Il a été montré qu'il était possible en 26 jours d'obtenir le profil moléculaire de la tumeur biopsiée afin de traiter dorénavant les tumeurs en fonction de leurs cartes génétiques et non plus de leurs localisations (Le Tourneau et al., 2014).

Nous analyserons ici quelques phénomènes de résistances fréquemment rencontrés lors de traitement par TRAIL ainsi que certaines observations encore non clarifiées. Nous étudierons ensuite l'hétérogénéité tumorale comme étant une méthode de résistance à l'échelle de la population et son impact sur la réponse au traitement par TRAIL.

1.3.1 Résistance à l'apoptose

A l'échelle de la cellule, la sensibilité ou la résistance à l'apoptose peut être modulée à de multiples niveaux : à la réception du signal, lors de sa transduction, en fonction de l'activation d'autres voies communicantes, et lors de la résolution.

Il existe encore bien d'autres mécanismes de résistances à des échelles plus macroscopiques que nous ne détaillerons pas ici, au niveau de la tumeur et de l'environnement tumoral - comme citées dans la section sur l'immunité antitumorale, des interactions tumeurs/système immunitaire peuvent s'effectuer pour inhiber le rôle cytotoxique des lymphocytes ; ou encore l'accessibilité du traitement (la cellule au centre de la tumeur n'aura pas le même accès au traitement TRAIL que les cellules en périphérie) ou simplement la formulation chimique du ligand.

Récepteurs

La stimulation des récepteurs de mort par le ligand TRAIL est la première étape dans l'induction du signal apoptotique. C'est donc à la membrane que commence les premières modulations de sensibilité des cellules stimulées par TRAIL. Il a été démontré que le rapport du niveau d'expression des récepteurs leurre DcR1 et DcR2 en fonction des récepteurs de morts DR4 et DR5 avait une incidence directe sur la sensibilité des cellules au TRAIL. Des expériences d'expressions transitoires dans différentes lignées cancéreuses sensibles au TRAIL ont pu mettre en évidence le rôle anti-apoptotique des récepteurs leurres. La surexpression de DcR1 inhibe l'activation des caspases, mais cela sans co-précipiter avec les récepteurs de morts, ce qui signifie que son rôle se situerait dans une simple rétention du ligand. DcR2, quant à lui, retarde le signal et précipite avec DR5 particulièrement. DcR2 agit donc comme un inhibiteur compétitif, se préassemblant avec DR5 pour former des hétérotrimères limitant le signal (Mérino et al., 2006). La surexpression de DcR1 et 2 par certaines lignées cancéreuses est donc une stratégie d'acquisition de résistance au TRAIL (Sanlioglu et al., 2005). Plus directement, des mutations sur la séquence des sites actifs des gènes codant pour les récepteurs de morts DR4 et 5 ont pu être observées dans certains cancers. De fréquentes délétions et mutations sont retrouvées sur le chromosome 8 en position p21-22 (localisation des récepteurs au TRAIL), que ce soit dans des cancers du sein métastatiques (Shin et al., 2001) ou des lymphomes non-hodgkinien (Lee et al., 2001). Ces mutations ont pour effet d'inhiber le signal apoptotique lors d'expériences d'expression du gène muté dans d'autres lignées.

La localisation du récepteur pourrait avoir une influence sur l'induction du signal. En absence de TRAIL, les récepteurs de morts DR4 et DR5 sont exclus des radeaux lipidiques, les domaines de la membrane riches en sphingolipides et cholestérol formant des îlots denses. Ces radeaux lipidiques ont un rôle dans l'endo et l'exocytose, permettent des concentrations de récepteurs localisés et sont aussi connus pour favoriser des inductions de signal comme celle de la voie de l'insuline. La stimulation des cellules cancéreuses sensibles par TRAIL provoque la relocalisation des récepteurs DR4 et 5 aux radeaux lipidiques pour la transduction du signal apoptotique (Xie, 2011). Alors qu'inversement, une stimulation des récepteurs se situant en dehors des radeaux lipidiques favoriserait alors l'activation de voies non canoniques de survies telles que la voie des MAP kinases et la voie NF- κ B (Song et al., 2007). Cependant il ne semble pas certifié que cette localisation aux radeaux lipidiques influe sur l'efficacité de transduction du signal apoptotique. D'autres études ont pu mettre en évidence que seul DcR1 était localisé au niveau des radeaux lipidiques, le traitement TRAIL induisant la relocalisation de DR4 et non

de DR5 aux radeaux et notamment que le recrutement du DISC sous le récepteur était majoritairement retrouvé dans la fraction cellulaire soluble plutôt qu'aux radeaux lipidiques (Dickens et al., 2012; Mérimo et al., 2006).

En plus de la localisation membranaire, des études ont mis en évidence un rôle surprenant de DR5, localisé au niveau nucléaire cette fois-ci : dans une lignée de cellule cancéreuse de la prostate, et confirmé dans d'autres lignées, DR5 était retrouvé localisé dans le noyau. En condition non-stimulée par TRAIL, la coprécipitation de DR5 entraîne des complexes formés de DR5 associées à des composants cruciaux de la machinerie des micro-ARNs, tel que DROSHA, DGCR8 et les sous unités P68, NF45 et hnRNPA1. Les micro-ARNs sont des séquences nucléotidiques d'une vingtaine de nucléotides permettant l'inhibition de nombreuses cibles ARNs présentes dans le cytoplasme. Cette interaction entre DR5 et les composantes de la machinerie entraîne alors l'inhibition de maturation de nombreux micro-ARNs dont les LET-7. Les LET-7 sont une grande famille de microARN connus pour leur rôle antitumoral, car ils régulent négativement de nombreuses voies notamment impliquées dans la prolifération. Cette localisation nucléaire de DR5 peut être retrouvée dans des cellules saines mais en proportion nettement inférieure, mettant à jour une nouvelle stratégie du cancer afin de résister à l'apoptose tout en accentuant la prolifération (Bertsch et al., 2014; Haselmann et al., 2014).

Des modifications post traductionnelle peuvent aussi modifier l'efficacité de transduction du signal apoptotique par les récepteurs. Des analyses transcriptomiques ont montré que la sensibilité de certaines lignées au TRAIL serait aussi corrélée au niveau d'expression de polypeptides N-acétylgalactosaminyltransférases, et notamment de l'enzyme GALNT14. Il a ainsi été démontré que DR5 pouvait être O-glycosylé par cette enzyme lors de sa maturation dans le réticulum endoplasmique (compartiment intracellulaire où finissent de maturer les protéines traduites). La glycosylation s'effectue sur des groupements de serines et thréonines, présentes dans le domaine extracellulaire du récepteur autour des CRD 2 et 3 ce qui favorise la formation du DISC. La mutation de ces sites ainsi que le KO de l'enzyme GALNT14 entraîne l'inhibition de glycosylation du récepteur et augmente la résistance des cellules au TRAIL. Il a été observé que l'effet de O-glycosylation ne modifie pas l'affinité du ligand à son récepteur (Wagner et al., 2007), cependant il semblerait que l'ajout de ces carbohydrates facilite le recrutement des caspases 8 et l'activation du complexe DISC. Concernant le récepteur DR4, une N-glycosylation du récepteur induirait la formation d'agrégats et la stabilisation des récepteurs DR4 à la membrane plasmique, amplifiant la transduction du signal apoptotique (Dufour et al., 2017; Micheau, 2018). Les modifications post-traductionnelles via l'ajout de

sucres étant dérégulés chez les cellules cancéreuses, la caractérisation et la compréhension des effets de ces modifications permettront de mieux comprendre les stratégies de résistance mises en place par les cellules cancéreuses.

L'assemblage du DISC

Dans cette partie, nous nous concentrerons sur les stratégies du cancer perturbant la formation du DISC en aval des récepteurs.

Une des premières molécules composantes du DISC à être recrutée est FADD. L'expression de FADD est capitale pour l'apoptose induite par TRAIL, des recherches ayant démontrées que le signal apoptotique était inhibé en l'absence de FADD dans des lignées cancéreuses de souris (Kuang et al., 2000). Avec un rôle aussi crucial dans l'apoptose, il est étonnant de constater que FADD n'est que très rarement muté dans les cancers (Soung et al., 2004). Ceci peut être expliqué par les nombreuses fonctions que remplit FADD. Elle participe à la prolifération, au cycle cellulaire et même la surveillance du génome (Marín-Rubio et al., 2019). De ce fait, si l'expression de FADD est rarement diminué dans certains cancers (Tourneur et al., 2003), des phénomènes d'amplifications avec l'apparition de multiples copies du gène codant pour FADD sont majoritairement observés (Chien et al., 2016).

L'activation de la caspase-8 est un évènement obligatoire pour la transduction du signal apoptotique (Tummers and Green, 2017). De ce fait, il était attendu que son expression soit retrouvée fréquemment diminuée dans de nombreux cancers et associée à la résistance thérapeutique. Si les premières observations se rangeaient en faveur de cette hypothèse après analyse de transcriptome de certains cancers, comme du colon (Kim et al., 2003), gastrique (Soung et al., 2005) ou neural (Hopkins-Donaldson et al., 2000) ; il a aussi été observé que des augmentations de niveau d'expression pouvait être associé à la migration et la résistance thérapeutique (Stupack, 2013). L'analyse histologique de tissu tumoral lors du projet HPA (Human Protein Atlas) a permis d'avoir un meilleur point de vue sur l'expression protéique de la caspase-8 dans des cancers, et non plus de son ARN messager. Ainsi, le niveau de la caspase-8 peut en effet être réduit dans certains cancers, mais cela reste un phénomène relativement rare. Cependant dans la majorité des cancers, notamment ceux du col de l'utérus, du pancréas et du rein, la quantité de caspase-8 est augmentée dans la tumeur. Cette observation inattendue relance les recherches sur un rôle potentiellement pro-tumoral de la caspase-8. Des études récentes mettent à jour le rôle controversé de la caspase en tant qu'inducteur essentiel de

l'apoptose, mais avec aussi des détournements en faveur de la survie des cellules cancéreuses. Il a été démontré que la caspase-8 avait un rôle essentiel lors du développement pour l'angiogenèse de la rétine dans des conditions saines (Tisch et al., 2019). Ce phénomène est aussi retrouvé dans le cancer, notamment dans le glioblastome, où une expression élevée de caspase-8 entraînait l'activation de la voie de survie NF- κ B entraînant prolifération et invasion (Gdynia et al., 2007) et plus récemment, que cela favorisait de surcroît l'angiogenèse du glioblastome (Fianco et al., 2017). Récemment, la caspase-8 a été observée dans le noyau de cellules cancéreuses. Cette localisation nucléaire de la caspase-8 jouerait un rôle pro-tumoral, supprimant l'arrêt en phase G2/M induit par P53, inhibant ainsi la mort P53 dépendante tout en augmentant la prolifération cellulaire (Müller et al., 2020). Il serait intéressant de mieux caractériser le processus sous-jacent à ces relocalisations nucléaires du récepteur DR5 et de la caspase-8 qui permettent de favoriser le développement tumoral.

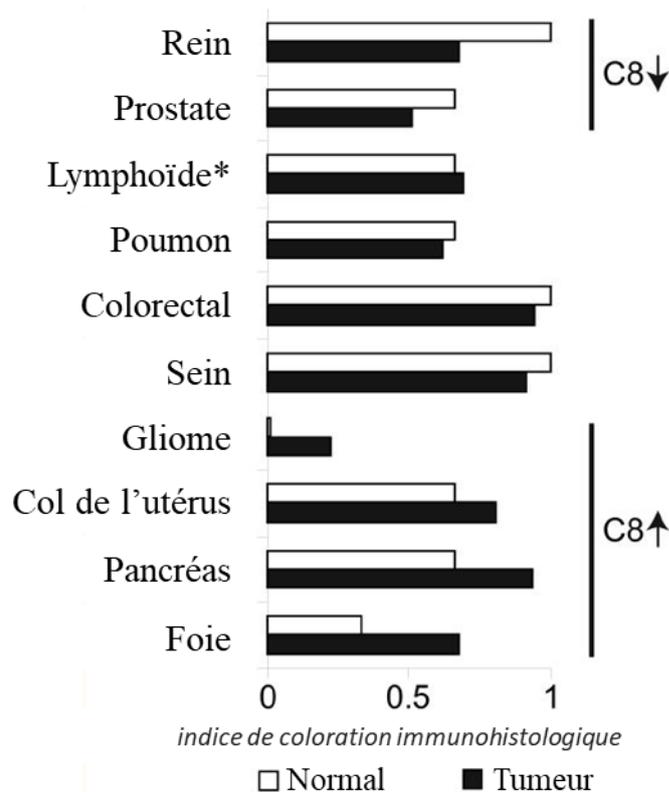


Figure 1-6 : Expression de la caspase-8 dans le cancer (versus le tissu sain).

Etude de l'expression de la caspase-8 dans les tissus néoplasiques en comparaison des tissus normaux provenant de l'analyse HPA (Human Protein Atlas). L'anticorps utilisé HPA001302 cible la région P10 du domaine catalytique de la caspase-8. * Les lymphomes sont comparés aux cellules lymphoïdes actives provenant des mêmes ganglions lymphatiques. Les lymphoïdes naïfs possèdent une expression caspase-8 plus importante. Figure traduite provenant de la publication de (Stupack, 2013)

FLIP est un inhibiteur endogène de l'apoptose extrinsèque, c'est pourquoi son expression est fréquemment augmenté dans de nombreux cancers (Riley et al., 2013; Rippon et al., 2004). Cette surexpression de FLIP confère ainsi la résistance à l'apoptose induite par TRAIL en bloquant l'activation de la procaspase-8 en caspase-8 active (Zong et al., 2009). De plus, la surexpression de FLIP permet aussi la résistance à la voie interne de l'apoptose. En effet, il a été observé que FLIP avait un rôle important sur l'apoptose dépendante de P53 (voie interne). Il a été montré que FLIP est sous le contrôle du facteur de transcription P53, et que réduire l'expression de FLIP par siARN dans une lignée cancéreuse du colon (HCT116) augmente la sensibilité à la mort induite par P53 via deux mécanismes. D'une part, l'activation de P53 par chimiothérapie ou inhibiteur pharmacologique de MDM2 en condition de FLIP inhibé entraîne l'expression de DR5 et l'activation de l'apoptose par les récepteurs de TRAIL indépendamment du ligand. D'autre part, les cibles transcriptionnelles de P53 diffèrent en fonction de l'expression de FLIP. Lors de l'inhibition de FLIP, les gènes pro-apoptotiques sont préférentiellement transcrits par P53 lors de son activation, dont le gène PUMA qui induit directement la voie interne de l'apoptose. Ce serait un cas d'amplification par la voie externe de la voie interne via un recrutement du DISC sous DR5 indépendamment du ligand (Lees et al., 2019).

La voie mitochondriale

Au même titre que l'assemblage du DISC, de nombreuses perturbations peuvent être retrouvées au niveau de la signalisation de la voie interne de l'apoptose, impliquée dans la signalisation par TRAIL pour les cellules de types 2.

Le clivage de BID en tBID par la caspase-8 initiateur est la première étape obligatoire de l'amplification mitochondriale pour les cellules de types 2. L'expression de BID est fréquemment diminuée dans de nombreux cancers (Krajewska et al., 2002), et de nombreuses mutations ont pu être observées dans le gène (Lee et al., 2004). La réexpression de BID s'accompagne d'un regain de sensibilité aux thérapies et sa surexpression et constamment

corrélée à une meilleure survie (Miao et al., 2006; Orzechowska et al., 2014). Un des mécanismes d'inhibition de l'expression de BID est la surexpression d'AKT. AKT ou encore PKB (protéine kinase B) est une kinase régulant de nombreuses voies cellulaires, telles que le cycle cellulaire, la prolifération, la migration et le métabolisme. L'expression d'AKT est fréquemment retrouvé augmenté dans le cancer, régulant négativement BID ce qui participe à la résistance au TRAIL (Goncharenko-Khaider et al., 2010).

BID une fois activé par clivage en tBID recrute alors les protéines pro-apoptotique BAX/BAK, eux-mêmes inhibés par les anti-apoptotiques comme MCL-1 et BCL2. Parmi ces acteurs, les protéines pro-apoptotiques seront fréquemment diminuées et inversement augmentées pour les anti-apoptotiques dans de nombreux cancers (Campbell and Tait, 2018). Le développement de BH3 mimétiques, inhibiteurs des anti-apoptotiques de la famille de BCL2 est une stratégie développée afin de sensibiliser les cellules tumorales aux chimiothérapies et aux ligands de morts (Chen et al., 2011; Oakes et al., 2012). Des inducteurs direct de la protéines BAX sont actuellement en cours d'études (Liu et al., 2016).

Les IAPs ont un rôle important dans la résistance à la voie interne et externe de l'apoptose. Les IAPs sont des inhibiteurs des caspases effectrices en plus de participer à l'induction de la voie non canonique NF- κ B. On observe une forte augmentation du niveau protéique des IAPs dans de nombreux tissu tumoraux (Lopes et al., 2007; Pluta et al., 2015). La recherche qui s'effectue autour des SMACS mimétiques semble aujourd'hui être une stratégie prévalente dans la sensibilisation des cellules tumorales aux thérapies. De très nombreuses molécules sont développées et testées avec des résultats encourageant et cela dans de nombreux types de cancers (Boddu et al., 2019; Chen and Zhang, 2018; Lalaoui et al., 2020; Thibault et al., 2018; Zhu et al., 2019b). Il a même été démontré que l'inhibition des IAPs permettait de sensibiliser les cellules cancéreuses et non les cellules saines à TRAIL (Finlay et al., 2014).

Les voies de dégradation

L'autophagie est un mécanisme de recyclage cellulaire, connecté avec la voie du métabolisme mTOR (mammalian target of rapamycin), qui contrôle la disponibilité en ressources nutritionnelles de la cellule. Il existe une étroite communication entre la voie de l'apoptose et de l'autophagie afin de contrôler si la cellule doit survivre ou mourir en cas de carence (Mariño et al., 2014). L'inhibition de l'autophagie résulte en une sensibilisation des cellules cancéreuses au ligand TRAIL par de nombreux phénomènes (Nazim et al., 2015, 2017). L'accumulation de

protéines pro-apoptotiques activées normalement dégradées par autophagie, telles que les caspase 3 et 8 actives (Nazim and Park, 2015) ; l'arrêt du cycle en phase G2/M (Monma et al., 2018) ; l'induction du stress du réticulum endoplasmique (Jia et al., 2018a) ; l'augmentation des ROS (reactive oxygen species) intracellulaire (Nazim and Park, 2018) ; et l'accumulation des récepteurs de morts DR4 et 5 à la membrane (Park et al., 2016; Qiao et al., 2018).

Le protéasome est une machinerie cellulaire de dégradation de protéines mal repliées et obsolètes. Les protéines qui doivent être dégradées sont polyubiquitinylées permettant leur adressage au protéasome. L'inhibition du protéasome entraîne des effets similaires à l'inhibition de l'autophagie, une accumulation des récepteurs de morts et notamment de DR5, augmentant la sensibilité des cellules cancéreuses au TRAIL (Cheong et al., 2011; Zhu et al., 2016). De même, les molécules actives tBID clivée et BIK s'accumulent, n'étant pas dégradées en l'absence de protéasome actif, renforçant l'apoptose induite par TRAIL (Sung et al., 2012). La caspase-8 active ainsi que de nombreuses autres molécules pro-apoptotiques entraînent une meilleure sensibilité aux ligands de mort une fois qu'elles ne sont plus dégradées (de Wilt et al., 2013). Cependant, des études ont démontré que l'inhibition du protéasome en combinaison d'un traitement TRAIL aurait permis de sensibiliser des cellules saines primaires (kératinocytes) (Leverkus et al., 2003).

La réponse génique : une résistance induite et transitoire

La plupart des traitements, stimulus ou induction de voie de signalisation engage une réponse génique. TRAIL, en plus de la voie apoptotique, induit une voie de survie qui est primordiale dans la décision du devenir cellulaire. Cette voie de survie (section 1.4.1), permet en fonction de l'intensité de la réponse génique qu'elle induit, d'inhiber le signal apoptotique.

Inhiber la transcription par un inhibiteur chimique comme l'Actinomycine D lors d'un co-traitement par TRAIL inhibe alors la réponse génique et sensibilise les cellules à l'apoptose (Wang et al., 2007). Il a été constaté qu'inhiber la transcription lors d'un traitement TRAIL bloque la production de FLIP en réponse au traitement (Matsuzaki et al., 2001). Un prétraitement de 8h à l'actinomycine-D avant l'ajout du traitement TRAIL augmente aussi la mort, mais cette fois-ci par l'augmentation du niveau des récepteurs DR4 et 5 à la membrane. L'hypothèse serait qu'inhiber la transcription des nouveaux ARNm pourrait induire en réponse l'augmentation de la traduction des ARNm codant pour les récepteurs (Jiang, 2012). Pareillement, inhiber la traduction par des inhibiteurs tel que le CHX (cycloheximide) permet

de sensibiliser des cellules cancéreuses, ici de colon, à l'apoptose induite par TRAIL. Le mécanisme est identique à l'inhibition de la transcription, cela bloque l'augmentation d'expression de FLIP en réponse au traitement TRAIL (Hernandez, 2001).

L'induction de la voie de survie et l'expression génique qui s'ensuit en réponse au traitement permet de déclencher une résistance transitoire dans les cellules survivantes. Ce phénomène de résistance transitoire a pu être démontré par Flusberg *et al.* Lors d'un traitement TRAIL, une réponse génique est induite par le traitement. Cette réponse permet une résistance accrue et décroissante dans le temps à un second traitement TRAIL, durant une période de 76h avec le maximum de résistance observée à 24h. Cette résistance transitoire est également observable chez d'autres lignées cellulaires, cependant l'intensité de la résistance octroyée est dépendante de la lignée étudiée. Des cellules immortalisées et non transformées d'épithélium mammaire sensibles au TRAIL (MCF10A) pouvaient devenir jusqu'à 6x plus résistante lors du second traitement par TRAIL en comparaison d'une résistance augmentée de 1,5x pour la lignée HeLa (cancer du cervix). L'analyse de l'expression génique liée au traitement indique de nouveau une augmentation de l'expression de la molécule anti-apoptotique FLIP. Ce qui est en accord avec les résultats des expériences d'inhibition de la traduction et de la transcription. Étonnamment, la voie de survie NF- κ B, qui contrôle la régulation de FLIP ne semble pas être responsable de la mise en place de la résistance. En effet, l'inhibition de NF- κ B par l'expression exogène d'un dominant négatif I κ B α n'a pas permis d'inhiber la mise en place de la résistance transitoire (Flusberg *et al.*, 2013a). Cependant NF- κ B est bien induit lors du traitement TRAIL, et contrôle l'expression de gènes impliqués dans l'inflammation.

Ce phénomène de résistance transitoire est observé en réponse à d'autres traitements, comme des inhibiteurs des voies BRAF (Sun *et al.*, 2014) et KRAS (Chen *et al.*, 2018a). Il a été montré lors de traitement au vémurafenib, un inhibiteur pharmacologique de la voie BRAF employé pour traiter des mélanomes métastatiques mutés BRAF-V600 que des états de pré-résistances existait dans la population. Les traitements au vémurafenib induisait une expression génique au cours du temps accordant la résistance au traitement. La surexpression des gènes *AXL*, *NGFR*, et *EGFR* sont retrouvés comme des marqueurs de pré résistance au traitement par le vémurafenib. Ces transcrits sont amplifiés au cours de la reprogrammation génique mais de nouveaux gènes tel que *APCDD1* est transcrit en réponse au traitement, ce gène est important pour la résistance mais le gène est à des niveau indétectable avant le traitement, signifiant qu'il ne participe pas à la pré résistance (Shaffer *et al.*, 2017).

De plus, il a été montré que des traitements répétés par TRAIL en plus d'induire une reprogrammation génique permettait de favoriser l'apparition de mutations dans le but d'acquies une résistance stable, la résistance acquise (Lovric and Hawkins, 2010). C'est une méthode aussi employée dans les laboratoires afin d'obtenir des modèles de lignée ayant développés une résistance au traitement.

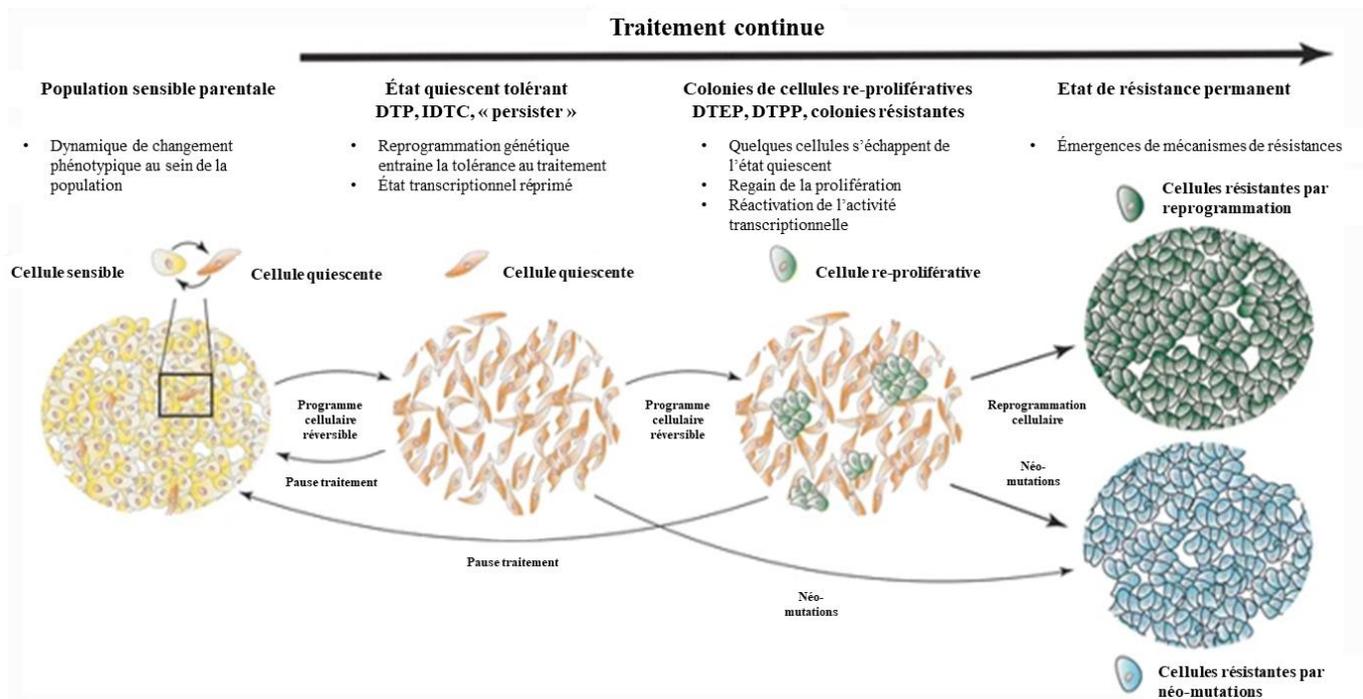


Figure 1-7 : Modèle de développement de la pharmaco-résistance acquise.

Dans une population cellulaire, les cellules alternent entre différents états cellulaires réversibles. Une petite population de cellule quiescente tolérante au traitement peut alors survivre aux anticancéreux. Une pause dans le traitement peut permettre aux cellules tolérantes de reformer la population initiale. Cependant lors de traitement continue, certaines cellules tolérantes quiescentes vont alors reprojiférer, se reprogrammer et maintenir une résistance permanente. Les néo-mutations sont aussi favorisées par la pression de sélection induite par le traitement, permettant l'émergence de nouveaux clones.

Les mécanismes moléculaires de cette résistance transitoire au TRAIL ont été étudiés au niveau protéomique pour chaque cellule d'une population (single-cell) traitée au TRAIL par la technique de cytométrie de masse CyTOF. Ces résultats montrent une forte activation de la voie des MAPK comme pP38, pS6 et pAKT ainsi que pNF- κ B dans les HeLa et d'autres lignées 2h après un traitement par TRAIL. Ils ne trouvent aucune corrélation entre le cycle cellulaire et la résistance, ni même de profil type expliquant complètement cette résistance transitoire.

L'analyse des cellules individuellement démontrent que de nombreuses voies peuvent être induites lors d'un même traitement TRAIL et cela au sein d'une population clonale. Ils observent que la meilleure corrélation obtenue avec cette résistance se situe dans l'hétérogénéité de réponse à TRAIL, plus une lignée est apte à avoir une réponse fortement hétérogène entre individus de la même lignée, plus cette lignée est potentiellement résistante aux traitements et les cellules survivantes persisteront. Limiter l'hétérogénéité en utilisant des inhibiteurs synchronise les cellules entre elles, réduisant le nombre de cellules survivantes. Inhiber la réponse génique en inhibant la traduction avec le cycloheximide bloque entièrement la survie des cellules. Plus une lignée est hétérogène dans les voies de signalisation qu'elle peut activer en réponse à un même traitement, plus le risque de retrouver des survivants dans la population augmente (Baskar et al., 2019).

1.3.2 L'hétérogénéité de réponse au TRAIL

L'hétérogénéité est une propriété intrinsèque du vivant, qui a comme rôle premier d'assurer la robustesse d'une population aux fluctuations de l'environnement. Une population existe dans un écosystème, un environnement amené à varier. Une population (bactérienne, animale, cellulaire etc...) doit posséder une certaine souplesse dans sa réponse à un stimulus.

Cette hétérogénéité est aujourd'hui un des freins majeurs aux thérapies anticancéreuses. Il existe une très grande hétérogénéité intra-tumorale, c'est-à-dire au sein d'une tumeur, qui est de plus très dynamique et tend à évoluer. Cette hétérogénéité peut provenir de sources multiples : de récentes études tendent à s'accorder sur le fait que la majorité des cancers proviendraient d'une seule cellule transformée (Navin, 2014; Ni et al., 2013) mais de nouvelles mutations peuvent apparaître au sein d'une tumeur, entraînant l'émergence de nouveaux clones, et augmentant ainsi la variabilité de réponse aux thérapies.

Nous savons aujourd'hui que l'hétérogénéité n'est pas seulement une conséquence des mutations génétiques, elle peut aussi être non génétique (Sharma et al., 2019). En effet, des cellules sœurs/clonales peuvent différer dans leurs réponses à un même traitement. C'est un phénomène rencontré fréquemment dans les laboratoires : une lignée génétiquement identique, fraîchement purifiée, peut posséder néanmoins une grande variabilité inter-cellulaire dans l'induction de l'apoptose lors de traitements. Cette variabilité n'est pas juste de l'ordre de la cinétique, des cellules sœurs prédites sensibles pour un traitement peuvent avoir des réponses

différentes : une cellule sœurs peut mourir au bout de deux heures, alors qu'une autre peut survivre même après des jours de traitements continus (Ballweg et al., 2017).

L'étude moléculaire de l'hétérogénéité intercellulaire a été pendant longtemps mis de côté, car les outils technologiques ne permettaient pas son analyse. Afin d'observer des phénomènes d'hétérogénéité inter-cellulaires, il faut pouvoir analyser les cellules une par une pour les comparer, ce sont les technologies en cellule unique ('single-cell'). Une des premières méthodes de cellule unique est la microscopie, où la morphologie de chaque cellule peut être comparée et identifiée en fonction des autres cellules de la population. L'hétérogénéité dans les tumeurs étaient ainsi mesurées via des techniques de FISH (Fluorescence In Situ Hybridation) ou de SKY (Spectral Karyotype), consistant en l'utilisation d'amorces fluorescentes spécifiques de chaque chromosome pour l'obtention des caryotypes. Les cellules sont alors bloquées en métaphase, avant la séparation des chromosomes (période où les chromosomes sont les plus denses) pour être ensuite analysées sous microscope. Ces observations ont permis de reporter les premier cas d'hétérogénéité intra-tumorale avec des anomalies chromosomiques (Teixeira et al., 1995). Nous assistons aujourd'hui à une explosion en termes d'avancées technologiques dans le domaine du 'single-cell', que ce soit en termes de microscopie et d'imagerie permettant un suivi qualitatif et quantitatif de cellules individuelles en population que dans le domaine du séquençage à haut débit. Les nouvelles méthodes de WGA (Whole Genomic Amplification) et WTA (Whole Transcriptomic Amplification) permettent maintenant de suramplifier le génome ou transcriptome de cellule unique avec suffisamment de précision pour détecter les mutations et les différences d'expression des gènes entre les cellules. Cela a permis de nouvelles études sur la place de l'hétérogénéité dans le traitement du cancer, la réponse aux thérapies et l'analyse des cellules rares. Ces cellules rares sont un infime pourcent de la population, mais qui pourraient par exemple, résister à un traitement chimio thérapeutique et entraîner la rechute du patient (Proserpio and Lönnberg, 2016; Tang et al., 2019).

Hétérogénéité non-génétique

L'hétérogénéité non génétique a bien un rôle fonctionnel primordial dans le développement. A partir d'une seule cellule œuf, d'un seul génome, un individu pluricellulaire différencié composé de 30.000 milliards de cellules pour environ 200 types cellulaires différents va ainsi être formé (Huang, 2009). L'hétérogénéité permet ainsi lors du développement, dans une population clonale, de maintenir des individus multipotents, alternant entre de multiples « états cellulaires » spécifiques afin de pouvoir se différencier en de nombreux types cellulaires (Graf

and Stadtfeld, 2008). Les états cellulaires représentent des configurations transcriptomiques, protéomiques et phénotypiques qu'acquiert la cellule lorsqu'elle remplit une fonction ou s'engage dans un processus cellulaire. Les différentes voies de signalisations communiquent en permanence entre-elles et sont interdépendantes, avec de nombreux acteurs moléculaires impliqués dans différentes voies. Certaines sont inhibées d'autres amplifiées, pour induire des facteurs de transcriptions spécifiques régulant eux-mêmes l'expression de plusieurs gènes cibles. Des cellules sœurs peuvent donc diverger de par leurs états cellulaires, génétiquement identiques mais dans des « états » ou contextes cellulaires différents, comme par exemple, les phases du cycle cellulaire. Des études récentes ont même analysé la relation qui lie l'épigénome (forme de la chromatine pour l'accessibilité à la transcription) et le transcriptome au niveau 'single-cell'. Ils ont ainsi pu mettre en évidence que l'hétérogénéité n'affecte pas uniquement un gène, mais entraîne bien des alternances d'états cellulaires distincts quantifiables et cohérents entre les profils épigénomiques et transcriptomiques. Cela permettrait d'étudier par exemple les différents états cellulaires qui accordent sensibilité ou résistance à l'apoptose (Liu et al., 2019).

Pendant longtemps, la communauté scientifique assumait une répartition assez homogène de la réponse cellulaire par la population. Les méthodes classiques d'analyses moyennées en population ('bulk') permettent d'analyser à l'échelle de la population une moyenne de la réponse transcriptomique ou protéomique, contrairement aux méthodes 'single-cell'. Les réponses cellulaires sont rarement homogènes (Figure 1-8). Des cellules progénitrices hématopoïétiques sont traitées à l'EPO (érythropoïétine) pour être différenciées en érythroïdes. Elles perdent progressivement l'expression de la protéine c-KIT, marqueur d'indifférenciation comme observé sur le Western Blot (Figure 1-8a). On observe une extinction progressive de la protéine c-KIT de 50% entre le jour 1 et 3 au sein de la population cellulaire. C'est en comparant avec les résultats de la cytométrie en flux (qui permet l'analyse de chaque cellule séparément pour l'expression de la protéine c-KIT) que l'on observe une hétérogénéité de réponse des cellules non observable par Western Blot (Figure 1-8b). Entre le premier et le troisième jour, il existe deux populations, une n'exprimant plus la protéine, l'autre voit même son niveau augmenter avant de perdre son expression au fil des jours. Ce phénomène est un exemple d'hétérogénéité de réponse, confondu dans une approche qui ne mesure que la moyenne (Figure 1-8c).

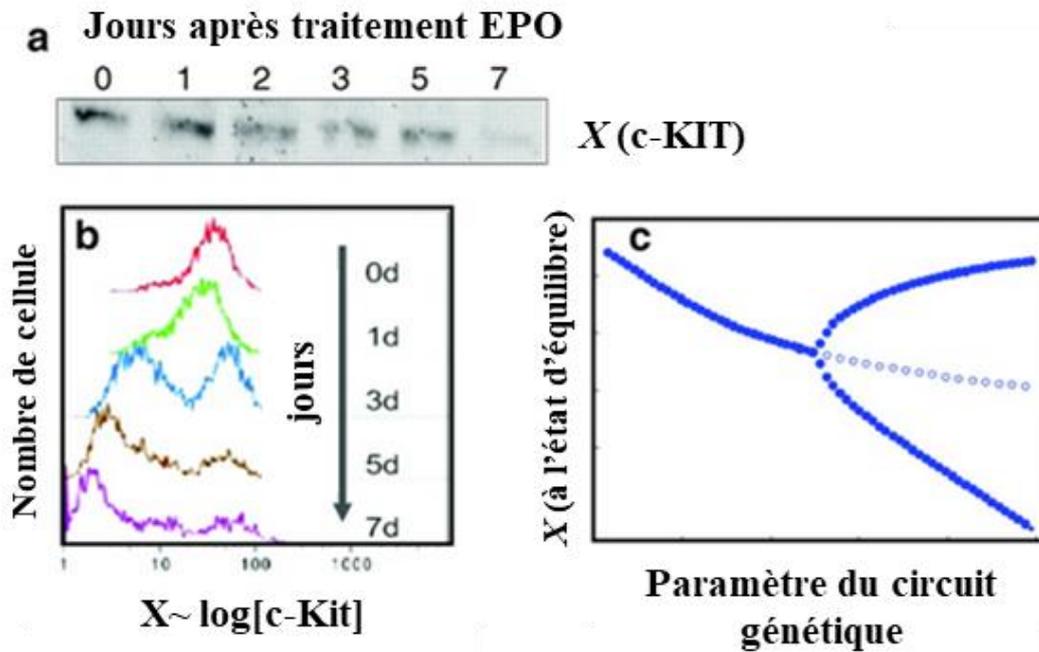


Figure 1-8 : Exemple d'hétérogénéité de réponse masquée par les méthodes 'en population' moyennées.

L'hétérogénéité de réponse cellulaire est une information qui ne peut être récoltée par des méthodes d'approche où la population est moyennée. Les technologies de cellule-unique permettent d'observer les différents effets des circuits génétiques en réponse à un stimulus, ici l'expression du gène c-Kit lors d'un traitement à l'érythropoïétine (EPO) de cellules progénitrices hématopoïétiques pour différenciation en cellules érythroïdes. (a) Western Blot montrant une diminution de l'expression protéique de c-Kit en jour après le traitement. (b) L'analyse de l'expression de c-Kit à la membrane par cytométrie en flux permet de visualiser l'hétérogénéité d'expression de la protéine entre les cellules et démontre au troisième jour l'existence de population, une exprimant faiblement et l'autre fortement la protéine c-Kit. (c) Diagramme de bifurcation qui explique la diminution globale de la protéine c-Kit malgré l'existence de deux sous-populations exprimant faiblement ou fortement la protéine. Figure modifiée provenant de (Huang, 2009).

L'hétérogénéité non-génétique a plusieurs origines dans une population cellulaire (Figure 1-9). Il y a des causes de cette hétérogénéité non génétique qui peuvent être extrinsèques à cette population clonale, c'est-à-dire provenant de variation de l'environnement cellulaire, le positionnement par exemple : une cellule au centre de la tumeur n'aura pas le même accès à la chimiothérapie qu'une cellule en périphérie, en plus de se retrouver dans des conditions hypoxiques. Quand les variations ne sont pas liées à l'environnement cellulaire, on parle d'hétérogénéité intrinsèque (Kim et al., 2018), une hétérogénéité lié uniquement à l'influence de la population sur elle-même. On peut alors encore sous diviser la macro-hétérogénéité de la

micro. La macro-hétérogénéité prend en compte toute la population cellulaire, comparant ainsi des cellules génétiquement identiques mais dans des états cellulaires différents, permettant l'apparition de population différentes au sein de la population clonale pour un facteur donné. La micro-hétérogénéité, quant à elle, définit la variabilité qui existe au sein d'une population de cellule qui répondrait uniformément mais malgré tout avec des différences d'intensité (l'expression d'un gène par exemple).

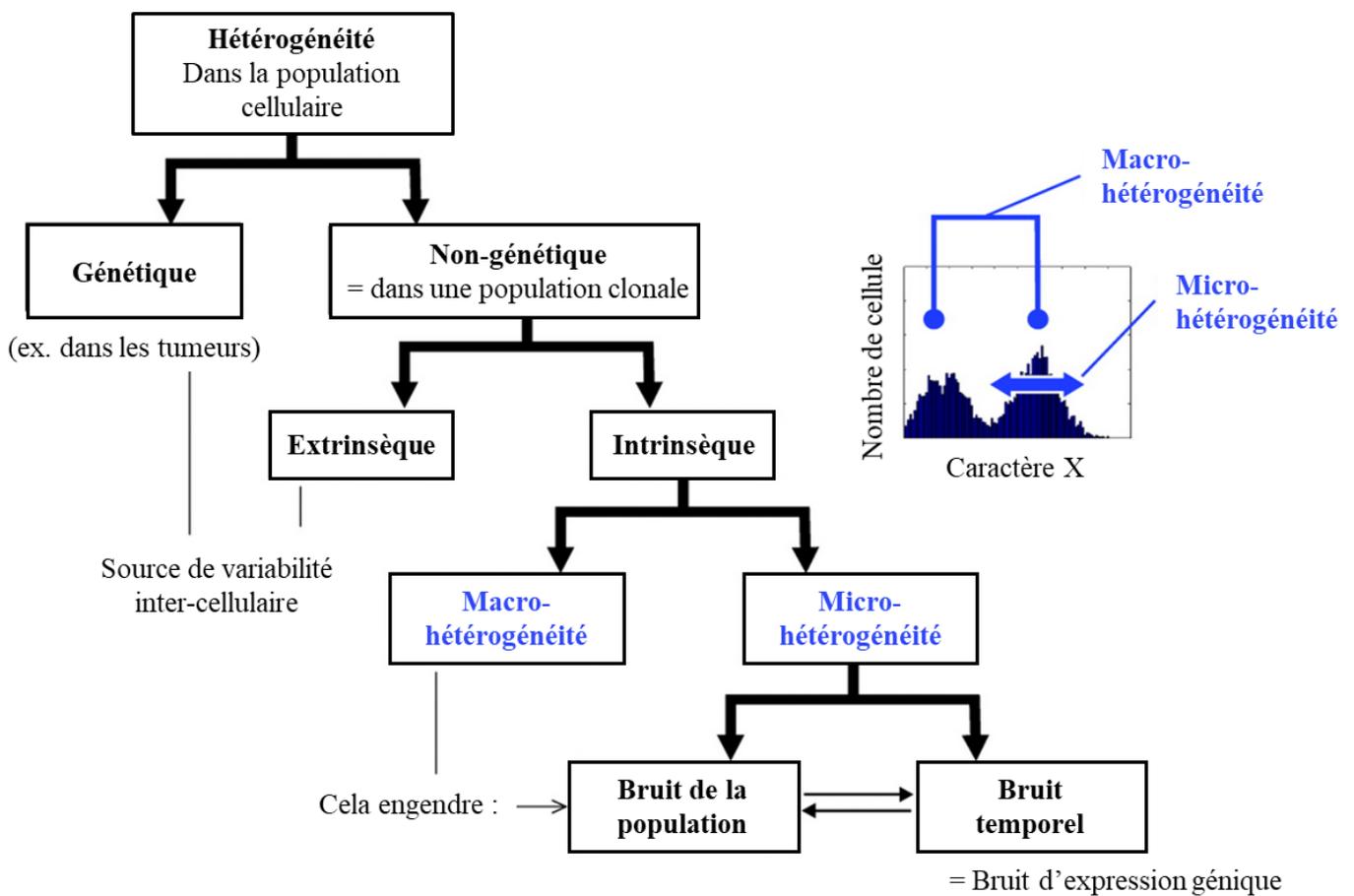


Figure 1-9 : Hétérogénéité de population cellulaire.

Hiérarchisation des différents concepts de l'hétérogénéité de population. (explication contenu dans le paragraphe précédent) ; Figure adaptée provenant de (Huang, 2009).

L'explication majoritaire de cette hétérogénéité intra clonale, autre que l'environnement cellulaire repose sur la stochasticité d'interactions moléculaires. La transcription d'un gène par les ARN polymérase peut avoir lieu en éclat d'activité ('transcriptional burst'), de même que

la phosphorylation d'une protéine par une kinase. Cette stochasticité d'expression génique entraîne ainsi différents niveaux transcriptomiques et protéomiques entre cellules sœurs, différents états cellulaires et augmente l'hétérogénéité de la population (bruit d'expression génique (Raj and van Oudenaarden, 2008)).

L'étude de la variabilité d'expression génique (le bruit intrinsèque) est d'autant plus difficile à analyser que l'information est cachée dans la variation moyenne d'expression génique lié à l'environnement ou à un stimulus en particulier (l'extrinsèque). Il a malgré tout été démontré qu'une forte perturbation de la variabilité d'un gène transcrit avait un impact tout autant dramatique sur la population qu'un gène mal exprimé, indiquant que cette variabilité est régulée (Schmiedel et al., 2019).

Le bruit d'expression génique qui impacte directement le niveau protéique du gène est ensuite amplifié par des réactions en chaînes dû à l'interconnectivité existante entre les voies de signalisations, les facteurs de transcriptions et l'expression génique. Des travaux dans la levure démontrent que le bruit génique est suivi d'une modification des niveaux protéiques, modulant les voies de signalisations et entraînant des modifications épigénétiques (Bury-Moné and Sclavi, 2017). Alors que d'autres études ont permis de mettre en relation la carte épigénétique (l'accessibilité à l'ADN) avec le transcriptome (Liu et al., 2019). Ces travaux démontrent que le bruit d'expression génique va bien plus loin qu'entraîner une variabilité d'expression d'un gène transcrit, mais tend à pousser la cellule dans un nouvel état cellulaire (Kim et al., 2018).

Ces états cellulaires régulés à l'état basal au sein de la population modulent la sensibilité des cellules cancéreuses clonales en favorisant la pré-activation de certaines voies et augmentent la variabilité de réponse à un traitement. Cela explique pourquoi une population est hétérogène dans sa réponse à un traitement TRAIL au niveau de chaque cellule individuellement, et comment ces états cellulaires préexistants augmentent l'hétérogénéité d'activation des voies de signalisations dans la population, corrélée à la résistance générale de la lignée (Baskar et al., 2019).

Impact sur la résistance thérapeutique au TRAIL, la réponse partielle ('fractional killing').

Cette hétérogénéité intra-clonale (et intra-tumorale en règle générale) possède un impact dramatique dans le traitement du cancer, car elle cause le « fractional killing » ou réponse partielle. La réponse partielle représente une réponse incomplète de la totalité d'une population

pourtant prédite sensible (pas de mutation pour inhiber la voie). Cette réponse incomplète, liée à l'hétérogénéité, permet à des cellules qui se trouvaient dans un des états cellulaires de pré-résistance de tolérer le traitement et d'y survivre. Comme nous l'avons précédemment évoqué dans la section 1.3.1 Résistance transitoire, le traitement TRAIL induit dans les cellules survivantes une résistance exacerbée aux futurs traitements (Flusberg et al., 2013a) tout en favorisant l'apparition de nouvelles mutations, et donc potentiellement la transmission de la résistance aux futures générations cellulaires (Lovric and Hawkins, 2010).

La réponse partielle est donc une conséquence de l'hétérogénéité intra clonale. Le bruit d'expression génique qui fait diverger des cellules sœurs entre-elles en termes de transcriptomes, protéomes et métabolomes dû aux états cellulaires instaure donc des différences dans les niveaux de protéines pro- et anti-apoptotiques. Et cela impacte différemment la sensibilité de chaque cellule d'une même population face à un même traitement (Flusberg and Sorger, 2015). Il est intéressant de constater que cette variabilité intra clonale n'est pas liée à une mauvaise répartition du contenu cellulaire lors de la division. En effet, deux cellules sœurs qui viennent de se diviser auront une sensibilité très similaire (temps de mort quasiment identique) alors qu'au contraire, elles vont diverger avec le temps et accumuler les différences, ici de sensibilité (Spencer et al., 2009).

Cependant, cette réponse partielle, tout comme l'hétérogénéité dans le développement, est régulée à l'échelle d'une population cellulaire, et elle est spécifique d'une lignée. En laboratoire, il est classique de définir l'Emax et la IC50 d'une lignée par rapport à un composé chimique cytotoxique. La IC50 représente la concentration inhibitrice médiane, qui permet d'inhiber un processus biologique à 50 pourcents. L'Emax représente quant à lui l'effet maximal du composé, utilisé jusqu'aux doses saturantes. L'observation que la IC50 est une mesure stable pour une lignée cellulaire donnée, indique que l'hétérogénéité au sein d'une population est régulée. Le groupe de P. Sorger (Harvard Medical School, Boston USA) a ainsi pu démontrer dans de très nombreuses lignées de cancer du sein que la IC50 et l'Emax sont entièrement dépendant de la lignée et du composé employé. Ils montrent ainsi qu'il existe une grande variabilité de réponse de lignées entre elles, pourtant toutes des cancers du sein, et que l'efficacité du médicament était spécifique d'une lignée (Fallahi-Sichani et al., 2013). Flusberg *et al.* ont aussi pu observer ce phénomène, et cela même après avoir rendu les cellules résistantes par un premier traitement TRAIL. Trois jours après le premier traitement, les cellules survivantes perdent progressivement le phénotype résistant pour retourner à la sensibilité

d'origine de la lignée et mourir de nouveau dans des proportions identiques (Flusberg et al., 2013a).

L'émergence des technologies en cellule unique permet aujourd'hui d'étudier l'origine et les mécanismes de la variabilité cellulaire, comme par exemple : Quelles sont les molécules déterminantes aussi bien pour l'inhibition que l'induction de l'apoptose ? Les mécanismes et facteurs moléculaires de résistance/sensibilité sont-ils spécifiques d'une lignée ou est-ce un mécanisme général ? (Roux et al., 2015a)

Afin de décortiquer l'activation de la voie de l'apoptose pour chacune des étapes déterminantes et cela dans des cellules individuelles, de nombreux groupes ont employé l'imagerie dynamique. L'imagerie dynamique est une technique de suivi par microscopie des cellules dans le temps. Elle permet à l'aide de sondes reportrices de suivre l'activation d'une voie de signalisation, la relocalisation cellulaire d'une molécule marquée ou encore des interactions entre protéines. Des études ont utilisé cette méthode avec des sondes permettant de mesurer l'activité de la caspase-8 (IC-RP initial caspase reporter protein) et de la caspase 3 (EC-RP Effector caspase reporter protein) associé à un reporteur de la perméabilisation mitochondriale. L'objectif était de déterminer les cinétiques d'activation des caspases initiatrices et effectrices en fonction de l'évènement du MOMP. Les sondes fonctionnent sur un principe de FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfert), une molécule de ECFP (Enhanced Cyan Fluorescent Protein) reliée par un linker à une molécule Vénus (Yellow Fluorescent Protein). Le FRET est un transfert d'énergie, entre l'ECFP et la molécule Vénus et le linker utilisé est conçu pour être la séquence clivée par la caspase-8 initiatrice ou 3 effectrice, de motif IETD et DEVDR respectivement. Lorsque la caspase (3 ou 8 en fonction de la sonde employée) est activée lors de la transduction du signal apoptotique par TRAIL, le linker est clivé et les molécules ECFP et VENUS sont séparés, réduisant le FRET. Le MOMP est mesuré par la perte de fluorescence des mitochondries. Pour cela, une protéine fluorescente RFP est fusionnée avec la séquence d'adressage de SMAC afin d'être localisée dans l'espace intermembranaire des mitochondries (IMS-RP, inter-membrane space Red Protein). Ils ont ainsi pu, dans chaque cellule, mesurer l'activité de la caspase-8 initiatrice ou 3 effectrice en fonction du MOMP et relié les activités au devenir cellulaire (apoptose ou survie) lors d'un traitement TRAIL. La lignée cellulaire employée étaient des HeLa, des cellules de type 2, c'est-à-dire qu'elles requièrent l'étape d'amplification mitochondriale pour déclencher l'apoptose due à l'inhibition des IAPs. Ils ont ainsi pu démontrer qu'il existait une grande variabilité d'activation des caspases, et surtout de la caspase-8 initiatrice. La caspase 3 est inactive jusqu'au MOMP, où

l'on retrouve alors un pic d'activation. Il devient très clair que le MOMP est un évènement obligatoire qui permet de retirer l'inhibition sur la caspase 3 effectrice par XIAP. L'hétérogénéité de réponse au TRAIL semble dépendant de l'activation de la caspase-8, qui une fois suffisante pour induire le MOMP permet une action rapide et homogène entre les cellules de l'induction apoptotique par le biais de la caspase 3 effectrice (Albeck et al., 2008).

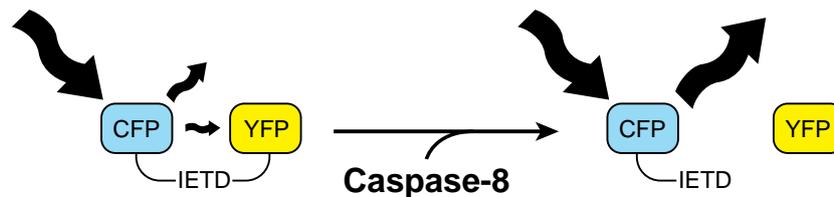


Figure 1-10 Schéma de la sonde à activité caspase-8 IC-RP.

Schéma de la sonde IC-RP permettant de reporter dans chaque cellule l'activité caspase-8 induite par l'activation de l'apoptose par TRAIL. Les cellules sont infectées par rétrovirus afin d'exprimer de façon stable la sonde. La sonde fonctionne sur un principe de FRET : La protéine ECFP (excitation/émission 434/477) à sa fluorescence émise captée par la protéine fluorescente mVenus (excitation/émission 515/527). Le clivage de la séquence linker IETD par la caspase-8 active sépare les deux protéines, ce qui en résulte d'une augmentation de l'émission ECFP dans la population de cellules traitée par TRAIL.

En accord avec ces travaux, Roux *et al.* ont pu démontrer que la réponse partielle au TRAIL provenait d'une hétérogénéité d'activation de la caspase-8, qui est gouverné par un seuil d'activation propre à la lignée à atteindre pour déclencher l'apoptose. Par la même méthodologie, ils ont pu observer une importante hétérogénéité d'activation de la caspase-8 rapporté par la sonde FRET IC-RP, et ainsi associer les courbes d'activité caspase-8 avec la réponse cellulaire des cellules traitées par TRAIL. Ils ont observé que si les activités caspase-8 semblent confondues entre les cellules survivantes et mourantes, c'est au niveau de la cinétique d'activation de la caspase que se situe la différence la décision cellulaire entre survie et apoptose. En effet, si la cellule réussit à dépasser un certain seuil de vitesse d'activation lors du traitement TRAIL (dérivée dans le temps du signal FRET), alors elle engage l'apoptose. Ce seuil d'activité de la caspase-8 est ainsi propre à chaque lignée, ce qui démontre encore l'aspect hautement régulé de cette hétérogénéité intra clonale. Augmenter la concentration en TRAIL lors d'un traitement augmente les vitesses d'activation de la caspase-8 et donc augmente le

nombre de cellules qui atteignent le seuil d'activité. Inhiber le protéasome durant un traitement TRAIL permet a plus de cellules d'atteindre la vitesse d'activation de la caspase-8 dans le temps, sans modifier le seuil, ce qui signifie que la dégradation par le protéasome de la caspase activée est un processus de résistance à l'apoptose important dans la réponse au TRAIL. En accord avec les précédents articles, ce seuil d'activation déterminé dans les HeLa (types 2) peut être déplacé lorsque l'on utilise des inhibiteurs de BCL-2 (ABT 263). Les courbes d'activités caspase-8 sont identiques au sein de la population traitée par TRAIL en combinaison de l'ABT 263. Cela signifie que BCL 2 n'influe pas sur l'activation de la caspase-8 car il se situe en aval de la voie apoptotique. Cependant le seuil à atteindre d'activité maximale caspase-8 afin de déclencher l'apoptose est diminué dans la population. La proportion de cellules qui déclenchent l'apoptose pour les cellules co-traitées par TRAIL et l'inhibiteur de BCL2 est augmentée en comparaison des cellules traitées par TRAIL malgré des activités caspase-8 identiques (Roux et al., 2015a). Ce phénomène de seuil peut être aussi retrouvé dans la voie interne de l'apoptose (et probablement dans de nombreuses autres voies de signalisations) ou l'accumulation de P53 dans le noyaux doit atteindre un certain niveau avant de déclencher l'apoptose (Paek et al., 2016).

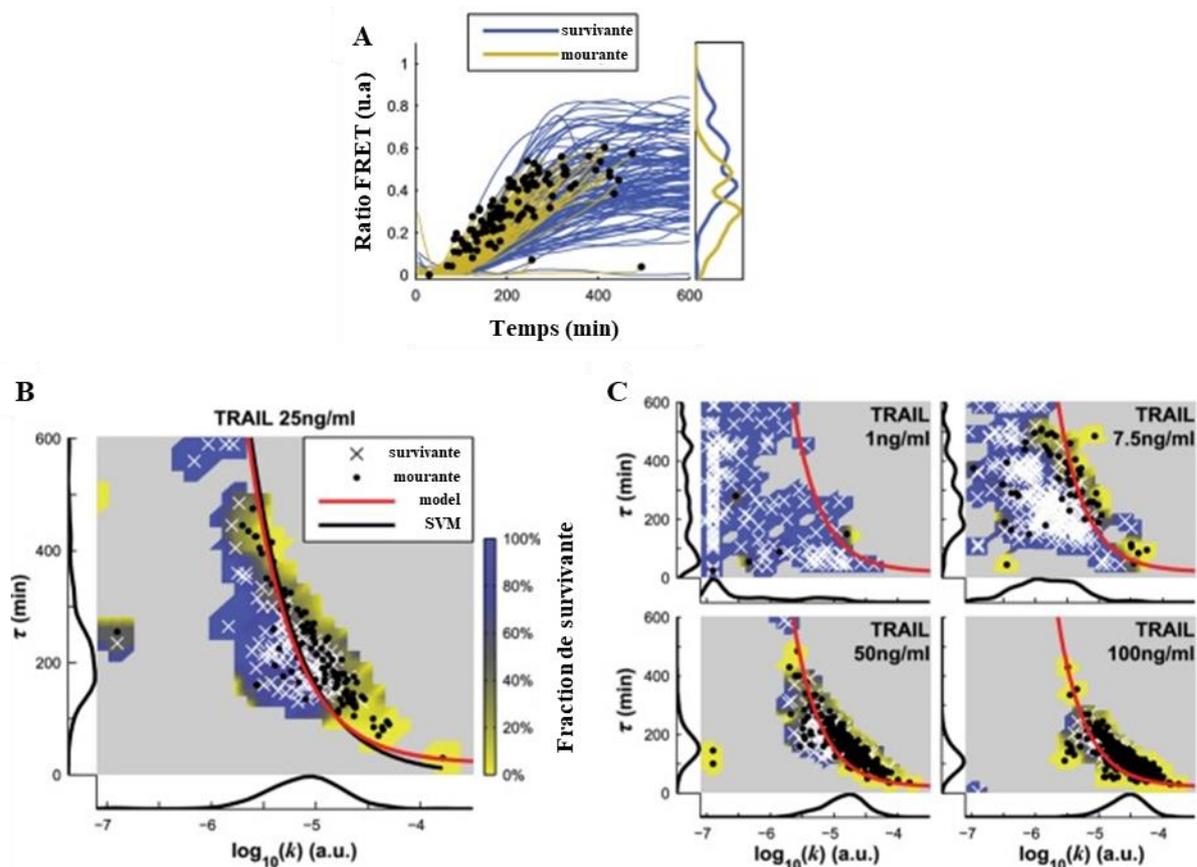


Figure 1-11 : Il existe un seuil de dynamique d'activation de la caspase-8 qui définit le destin cellulaire dans l'hétérogénéité de réponse observable durant un traitement TRAIL.

(A) Les cellules HeLa exprimant de façon stable la sonde à activité caspase IC-RP sont traitées à 25 ng/mL de TRAIL et suivies par Live-Cell-Microscopy sur les canaux de : lumière polarisée, CFP ; YFP. Le ratio FRET (CFP/YFP) permet de représenter les dynamiques d'activation de la caspase-8 et cela dans chaque cellule tout en associant le destin cellulaire (en bleu les cellules survivantes et en jaune temps de mort des cellules sensibles). (B) A partir des résultats biologiques obtenus lors du traitement TRAIL 25 ng/mL, la dérivée maximale de chaque courbes FRET ratio des cellules mourantes versus survivante a permis de définir un modèle ($\theta T_{25} = 2.61 \times 10^{-3}$) permettant de séparer les deux populations avec 83% de précision (point noir pour cellules mourantes et croix blanche pour cellules résistantes). (C) Utilisation du même modèle sur différentes concentrations en TRAIL. Augmenter la concentration augmente la dynamique moyenne de l'activité caspase-8 dans la population, augmentant le nombre de cellules mourantes. Figure modifiée provenant de la publication de Roux *et al.* (Roux et al., 2015a).

Toutes ces études en cellule unique ont permis l'intégration de nombreuses données qui permettent l'étude quantitative de l'hétérogénéité et la mise en évidence des facteurs déterminants en se basant sur des modèles mathématiques. Ainsi Bertaux a pu développer un modèle afin d'étudier par simulation la réponse partielle au TRAIL. Dans son modèle, le renouvellement de protéine anti apoptotique lié au bruit d'expression génique explique le « fractional killing », permettant même de prédire la résistance transitoire induite, observée par Flusberg *et al.* (Bertaux et al., 2014; Flusberg et al., 2013a). Le développement de ces modèles mathématiques pourrait permettre de prédire des mécanismes de résistances et de trouver des cibles thérapeutiques pour réduire l'hétérogénéité de réponse et ainsi augmenter l'efficacité des thérapies (Ballweg et al., 2017; Roux et al., 2015b).

1.4 Les voies non-canoniques engagées par TRAIL

TRAIL peut induire, en plus de la voie d'apoptose extrinsèque, des voies 'non-canoniques', la voie NF- κ B et celle des MAP Kinases. Ces voies sont associées à la survie, la prolifération et l'inflammation (Baud and Jacque, 2008). Puisque l'hétérogénéité intra-clonale entraîne différents états cellulaires au sein de la population isogénique, où certaines voies de signalisations seront plus prédisposées à l'induction et qu'un traitement TRAIL peut induire plusieurs voies, il reste à comprendre quels sont les acteurs moléculaires déterminants qui permettent la décision cellulaire entre la survie et la mort.

De plus, il a été démontré récemment que TRAIL pouvait, en condition de caspases inhibées, induire une autre mort cellulaire, la nécroptose : Une nécrose programmée avec des propriétés fortement immunogène qui suscite un large intérêt thérapeutique (Galluzzi et al., 2017). L'hétérogénéité de réponse se situe au-delà d'une réponse binaire survie-mort, mais peut aussi induire de nouvelles modalités de morts cellulaires ayant des impacts différents sur la biologie de la tumeur et la réponse aux traitements.

En 2017, deux articles ont été publiés simultanément sur la 'secondary necrosis', un phénomène connu des biologistes qui ont pu observer lors de traitements apoptotiques de cellules en culture, une phase tardive s'apparentant à de la nécrose (renflement de la membrane). Longtemps associé à un artefact de condition de culture cellulaire où l'élimination des cellules apoptotiques ne pouvait avoir lieu, il a été démontré que c'était un processus programmé avec une relevance thérapeutique (Sachet et al., 2017). La caspase 3 effectrice, une fois activée pour l'exécution de l'apoptose peut aussi cliver un autre substrat, GSDME/DFNA5 (Gasdermin E) formant ainsi des pores à la membrane afin de la perméabiliser et induire l'inflammation (Rogers et al., 2017; Wang et al., 2017b). Les acteurs moléculaires sont très similaires à ceux de la pyroptose, une autre mort programmée faisant intervenir la caspase 1 et GSDMD (Gasdermin D), soulignant l'étroite relation existante entre les modalités de morts cellulaires de par le partage de nombreux acteurs moléculaires entre ces voies. Il a été observé que la caspase-8 pouvait cliver GSDMD en condition d'infection par les bactéries *Yersinia*, de la famille des Enterobacteriaceae pour induire la pyroptose (Sarhan et al., 2018). Plus récemment, il a aussi été démontré que la pyroptose pouvait bifurquer sur la 'secondary necrosis' via l'amplification mitochondriale du processus apoptotique. Lorsque l'effecteur final de la pyroptose est absent (GSDMD), la caspase 1 peut cliver BID afin d'induire le MOMP, relarguer les SMAC dans le cytoplasme pour lever l'inhibition de XIAP sur la caspase 3 effectrice qui va alors cliver GSDME, induisant

ainsi la 'secondary necrosis' en mort alternative de la pyroptose (Heilig et al., 2020). Toutes ces observations sur l'intercommunication de ces voies de mort cellulaire ont soulevé la question de savoir s'il existait un complexe au centre de ces voies. Le PANoptosome, un complexe moléculaire régulant pyroptose, apoptose et nécroptose a ainsi été découvert, et qui de plus serait inhibé par TAK-1/MAP3K7 (TGF β activated kinase1), une molécule centrale dans la voie de survie induite par TRAIL (Samir et al., 2020).

1.4.1 TRAIL induit la survie : complexe 1 versus complexe 2 ?

Il y eut beaucoup de controverses à propos de l'induction de la voie de survie par TRAIL. Le TNF ayant été découvert en premier, il a été plus étudié et les molécules impliquées dans la signalisation du TNF ont été découvert plus séquentiellement. Parce que TRAIL semblait induire d'une façon similaire au TNF l'apoptose ainsi que la voie de survie, la voie fut étudiée en premier pour son potentiel anticancéreux. Peu de temps après sa découverte, il fut observé que TRAIL induisait l'apoptose dépendamment de FADD et pouvait activer la voie NF- κ B (Schneider et al., 1997b). Cependant, TRADD (TNF Receptor-Associated Death Domain) qui est l'une des premières molécules adaptatrices recrutées sous le TNF pour l'induction de la voie NF- κ B, ne semblait pas impliqué dans l'induction de l'apoptose par TRAIL, où seuls FADD et la caspase-8 étaient requis (Kischkel et al., 2000; Sprick et al., 2000).

Voie de signalisation de NF- κ B et des MAP Kinase induites par TRAIL : TRAIL versus TNF

TRADD est une molécule centrale de la voie du TNF, première molécule adaptatrice recrutée sous le récepteur du TNF par interaction homophile de ses DD et ceux du récepteur. Cela permet ensuite le recrutement de RIPK1 par interactions homophiles des DD pour co-recruter TRAF2 (Tumor Necrosis Factor Receptor Associated Factor 2). Ce complexe associé au récepteur à la membrane est nommé le complexe 1, et transduit la voie NF- κ B. Ce complexe peut se dissocier de la membrane, où TRADD va pouvoir alors recruter FADD via les DDs de nouveau libres car dissociés du récepteur. FADD va pouvoir recruter la procaspase-8 pour induire l'apoptose extrinsèque. Ce complexe cytosolique composé de TRAF2, RIPK1, TRADD, FADD et procaspase-8 est ainsi appelé le complexe 2 du TNF et permet l'induction de l'apoptose (Micheau and Tschopp, 2003).

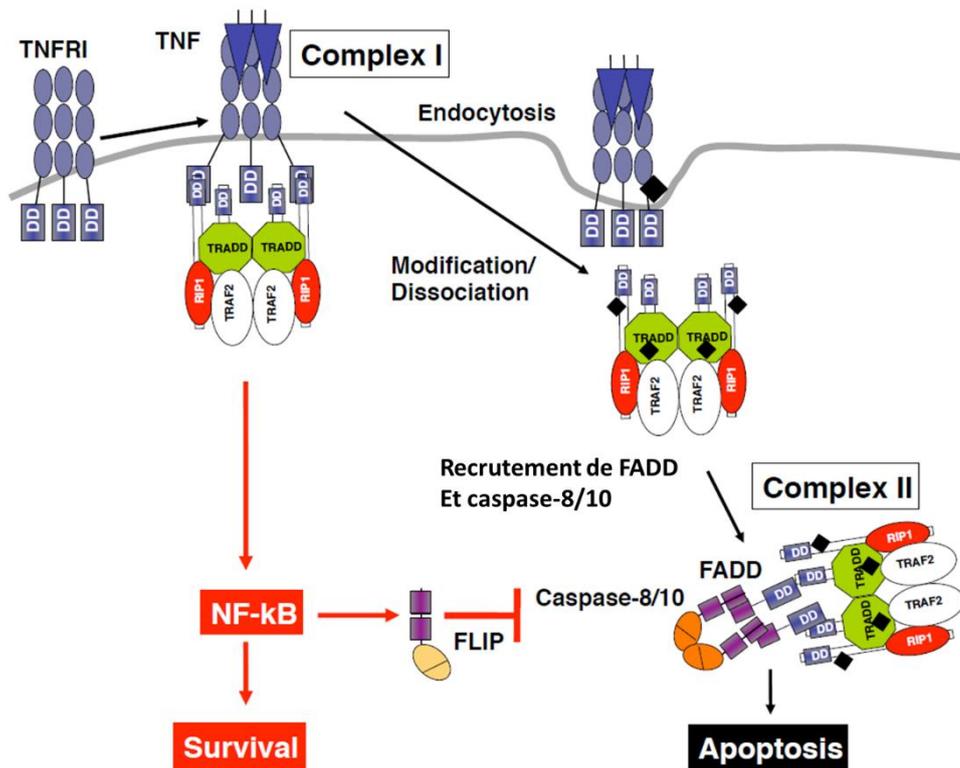


Figure 1-12 : Schéma de l'induction de l'apoptose et de la voie NF-κB par le TNF.

La trimérisation du récepteur au TNF lors de la liaison de son ligand permet le recrutement de la molécule adaptatrice TRADD, et s'ensuit le recrutement de TRAF2, RIPK1 qui forment le complexe 1 et l'induction de la voie NF-κB. Des modifications du récepteur et molécules associés (tel que débiquitination de RIPK1 par CYLD) entraînent l'internalisation du récepteur et la dissociation du complexe 1 pour permettre la formation du complexe 2 cytosolique où FADD et caspase-8 sont recrutés pour induire l'apoptose. Si dans le premier temps, l'induction de NF-κB lors de l'activation du récepteur a été suffisante, alors le niveau de FLIP produit permet l'inhibition de la voie apoptotique. Figure traduite provenant de (Micheau and Tschopp, 2003).

Il a été observé que TRAIL, tout comme le TNF, peut induire la voie NF-κB (Keane et al., 2000) ainsi que la voie des MAPK (Mühlenbeck et al., 1998; Sarker et al., 2002). Cependant il a été constaté par la suite que la TRAIL est capable d'induire davantage l'apoptose et que le TNF, lui, induit préférentiellement l'inflammation. Des expériences de surexpression de FADD ont permis de démontrer des interactions avec TRADD au niveau du récepteur, ce qui suggérait une activation de la voie NF-κB similaire au TNF. Ces résultats n'ont pu être reproduit avec les niveaux endogènes de FADD (Schneider et al., 1997b). La protéine TRAF2 permet l'activation de NF-κB et JNK, en étant recruté directement au récepteur alors que TRADD ne semblait impliqué dans la voie lors d'utilisation de dominants négatifs (Hu et al., 1999). TRADD est

pourtant bien retrouvé comme étant impliqué par d'autres groupes, et son inhibition a pour effet de sensibiliser les cellules au TRAIL (Cao et al., 2011; Kim et al., 2011). Durant ces expériences, RIPK1 est directement recruté au récepteur d'autant plus en condition de TRADD KO, et tout comme dans la voie du TNF, il est essentiel pour l'induction de NF- κ B par TRAIL (Lin et al., 2000).

En 2012, une équipe qui travailla beaucoup sur l'induction de NF- κ B par TRAIL (Baader et al., 2005; Ehrhardt et al., 2003), décortiqua la voie en profondeur pour permettre d'ordonner le recrutement des molécules impliquées. Ils déterminèrent que FADD et la caspase-8 étaient obligatoire pour induire NF- κ B, tout comme pour l'induction de l'apoptose extrinsèque. Les DD des récepteurs DR4 et 5 permettent le recrutement de FADD, qui lorsque son expression est diminuée ou inhibée dans une lignée JURKAT FADD KO, bloque alors complètement l'activation NF- κ B ainsi que l'apoptose. Modifier la séquence DED de FADD 182-RHDLL-186 permettant le recrutement de la caspase-8, bloque alors de nouveau l'induction NF- κ B tout comme l'apoptose. La caspase-8 est ainsi donc requise et nécessite son site actif 358-QACQG-362 pour activer NF- κ B (Grunert et al., 2012).

La différence majeure qui existe entre la voie du TNF et de TRAIL se situe dans l'ordre de recrutement des molécules associées. Sous les TNF-R, le complexe 1 formé des premières protéines recrutées (TRADD TRAF2 et RIPK1) est pro-inflammatoire et permet l'activation de NF- κ B. Une forte stimulation des récepteurs permet alors l'internalisation du récepteur et la dissociation du complexe 1 pour former le complexe 2, cytosolique, où FADD et procaspase-8 rejoignent le complexe pour l'induction de l'apoptose. Sous les TRAIL-R, l'ordre de recrutement est inversé. Alors que le complexe 1 est pro-apoptotique formé de FADD et procaspase-8, le complexe 2 est quant à lui pro-inflammatoire (Wajant, 2017). De plus, TRADD qui est absent sous le récepteur de TRAIL est en fait recruté par FADD au complexe apoptosome. Comme pour le TNF, TRADD permet le recrutement de TRAF2 et RIPK1 cytosolique pour l'induction de la voie NF- κ B, ce qui a pour effet la transcription de gènes anti apoptotiques (Cao et al., 2011; Kim et al., 2011). Cela explique les reports controversés qu'il y eut entre le TNF et TRAIL ainsi qu'avec la nomination des complexes formés, et pourquoi TRAIL semble plus efficace à induire l'apoptose que le TNF.

Malgré ces avancées, il n'était pas encore déterminé comment s'effectuait le recrutement des molécules impliquées dans l'activation de la voie NF- κ B et celles des MAP kinases, et si ce

recrutement était strictement lié au complexe 2 cytosolique. Deux études parurent en 2017 et permirent d'élucider certains des mécanismes de recrutement.

La première permit de démontrer que le complexe d'assemblage des chaînes linéaires de polyubiquitines (LUBAC) était recruté au niveau du complexe 2 cytosolique, mais aussi au complexe 1 sous le récepteur TRAIL (Lafont et al., 2017). LUBAC est un complexe protéique, formé de Hoip (Rnf31 – ring finger protein 31), Hoil-11 (Rbck1 – RanBP-type and C3HC4-type zinc finger containing 1) et Sharpin (Connekt1, SIPL1 – SHANK-associated RH domain interactor). LUBAC est connu pour permettre l'activation de NF- κ B : lorsque RIPK1 est polyubiquitiné par les cIAP1/2 (E3 ubiquitin (Ub) ligases cellular inhibitor of apoptosis 1/2) sur sa lysine en position 63, cela permet le recrutement des protéines adaptatrices TAB2/3 (Kanayama et al., 2004) qui vont à leurs tours recruter la kinase TAK-1 (Varfolomeev et al., 2008). Le complexe LUBAC reconnaît lui aussi la chaîne de polyubiquitine de RIPK1 et va à son tour conjuguer des chaînes ce qui retient alors le complexe NEMO (NF- κ B essential modulator) associé à IKKa/b. TAK-1 se trouvant à proximité retenu sur l'autre chaîne de polyubiquitine peut alors phosphoryler IKKb, qui phosphoryle à son tour IKKa. Les formes complexées et cytosoliques de IKKa et IKKb sont phosphorylées ce qui entraîne leurs dégradations et libère NF- κ B. Le NLS (nuclear localization signal) est une séquence permettant l'adressage de NF- κ B au noyau, induisant la transcription de ses gènes cibles dont FLIP. TAK-1 en plus de phosphoryler IKK va aussi induire la voie des MAP kinases en phosphorylant MKK6 qui va induire l'activation de JNK et P38 (Peltzer et al., 2016).

Cela démontre que la voie de survie n'est pas exclusivement cytosolique et qu'elle est recrutée au niveau du récepteur, cependant sans explications mécanistiques.

La deuxième étude a pu démontrer que la caspase-8 pouvait, en plus de son rôle de protéase, servir de plateforme de signalisation. Elle permet alors la formation d'un complexe nommé le FADDosome composé de FADD/pro-caspase8/RIPK1, ce qui permet de comprendre enfin comment RIPK1 est recruté sous le récepteur pour induire la voie NF- κ B. En effet, ils ont pu observer que dépléter la caspase-8 inhibe la production de cytokines inflammatoires, et que restaurer la caspase-8 par une caspase mutée pour son site actif inhibe l'apoptose mais pas la production des cytokines. En marquant TRAIL à la biotine, ils ont co-immunoprécipité le ligand avec le récepteur ainsi que le complexe associé coté intramembranaire. Ils démontrent que FADD/caspase8/RIPK1 sont bien recrutés sous le récepteur de manière caspase-8 dépendante mais indépendamment de son activité protéolytique. Inhiber l'activité de caspase-8 augmente

la production de cytokine car abolie le clivage de RIPK1 par la caspase. Ils démontrent aussi de façon intéressante que l'abolition de la caspase-8 n'empêche pas le recrutement de TRAF2 (qui permet le recrutement des cIAP1 et 2) et supposent que TRAF2 et les cIAP1/2 sont recrutés indépendamment sous le récepteur par sa queue cytoplasmique. En co-immunoprécipitant la caspase-8 cette fois ci, ils observent que ce complexe peut être cytosolique ou localisé au niveau du récepteur (Henry and Martin, 2017). En définitive, la voie TRAIL ressemble plus au TNF qu'attendu cela malgré l'absence de TRADD sous le récepteur. Ce sont des différences spatiales et de cinétique par le fait que les molécules de la voie apoptotique sont recrutées dans un premier temps et permettent ensuite le recrutement des molécules pro inflammatoires.

De plus, l'apoptose induite par le TNF aussi bien que par TRAIL peut bifurquer sous certaines conditions sur la voie de la nécroptose, une nécrose cellulaire programmée caractérisée maintenant depuis quelques années. Le TNF est recensé comme plus efficace que TRAIL dans l'induction de cette voie, lié de nouveau aux différences spatiales et temporels de recrutement des molécules au niveau du récepteur.

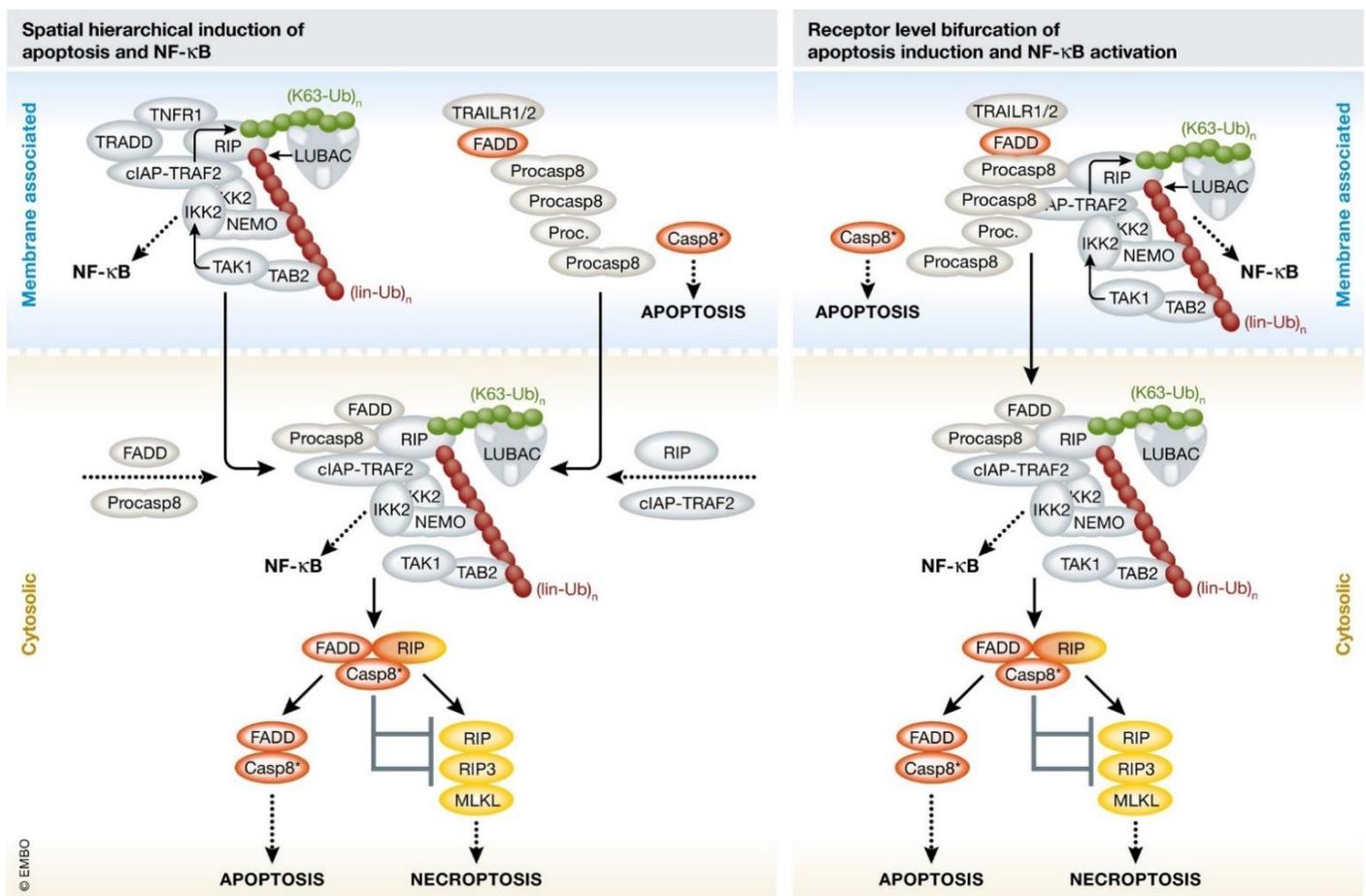


Figure 1-13 : Différences et similitudes de l'induction de la voie de survie sous les récepteurs de TNF et de TRAIL.

Il était hypothétisé que sous les récepteurs au TRAIL, seules les molécules pro-apoptotiques étaient recrutées, et que dans un second temps, la dissociation du complexe permettait la formation d'un complexe cytosolique semblable au TNF après recrutement de TRAF2 et RIPK1 permettant d'induire l'apoptose et la voie NF- κ B. Après les travaux de Lafont et Henry/Martin sur le recrutement de la voie de survie par TRAIL et le rôle de plateforme de recrutement de la procaspase-8 respectivement ont permis de démontrer comment les molécules de pro-survie pouvaient être recrutées sous le récepteur. Le TNF et TRAIL sont aussi tous deux aptes à déclencher la nécroptose lors de la stimulation de leurs récepteurs, une mort cellulaire dont nous parlerons dès le prochain chapitre. Figure provenant de (Wajant, 2017)

1.4.2 Communication de modalité de morts cellulaires, TRAIL peut induire la nécroptose.

Pendant longtemps, la mort cellulaire se représentait sous deux formes : Une forme régulée, l'apoptose, mort cellulaire programmée indispensable pour le développement et l'homéostasie des tissus et une accidentelle, la nécrose, une mort cellulaire liée à un stress physique ou chimique de la cellule.

Nous savons aujourd'hui qu'il existe de nombreux types de morts cellulaires, encodées dans le génome dans un véritable propos évolutif, faisant intervenir des acteurs moléculaires spécifiques (Galluzzi et al., 2018).

La nécroptose est une mort cellulaire programmée, s'apparentant d'un point de vue morphologique à de la nécrose (renflement cytoplasmique et rapide perte d'intégrité membranaire). La première fois que la nécroptose fut observée était lors de test de traitement au TNF sur différentes lignées. Il a été constaté que le TNF pouvait induire des morts cellulaires avec des spécificités morphologiques différentes en fonction de la lignée testée (Laster et al., 1988). Ré-observée durant des travaux sur la lignée cellulaire de souris L929 lors d'emploi du TNF (Grooten et al., 1993), cette nécrose est démontrée comme dépendante de l'augmentation des ROS dans la cellule (Goossens et al., 1995). L'inhibition des caspases est montrée comme requis pour l'induction de la nécroptose (Kitanaka and Kuchino, 1999; Vercammen et al., 1998). L'aspect régulé de la nécroptose apparut après les travaux de Holler : Il démontra pour la première fois que cette Nécrose était bien régulée au niveau moléculaire, dépendante de RIPK1 et de l'inhibition des caspases lors d'une induction de l'apoptose extrinsèque par FAS, TNF et TRAIL (Holler et al., 2000). Le terme apparut quant à lui en 2005 lorsque a été

découvert le premier inhibiteur de la nécroptose, la Necrostatin-1 (Nec-1) inhibiteur de l'activité kinase RIPK1 (Degterev et al., 2005).

Considérée comme une mort de secours afin de palier à la menace de certains virus et pathogènes qui auraient comme stratégie d'inhiber l'apoptose : Elle permet la mise en place d'une mort bien plus immunogénique que l'apoptose, c'est-à-dire apte à activer le système immunitaire (Chan et al., 2003; Nailwal and Chan, 2019). Il est maintenant établi que la nécroptose joue aussi un rôle dans l'immunité et le développement, et est associée à de nombreuses maladies de type inflammation chroniques (Weinlich et al., 2017).

La nécroptose induite par TRAIL

Divers stimuli ont été recensés comme aptes à déclencher la nécroptose : En interne de la cellule, l'augmentation de la concentration en espèces réactives de l'oxygène (ROS) ou en céramides (chaines de lipides actives), ainsi que des conditions anaérobiques peuvent induire de la nécroptose en fonction de la lignée cellulaire (Jia et al., 2018b; Sun et al., 2019; Thon et al., 2005). De multiples signaux externes peuvent aussi induire la voie de la nécroptose : Par les récepteurs de reconnaissance des agents pathogènes (PRRs) tel que ZBP1 (Z-DNA Binding Protein 1) (Upton et al., 2012), par les récepteurs TLR3 qui reconnaissent les ARN viraux double brin (Kaiser et al., 2013) et TLR4 pour le LPS (Lipopolysaccharide) (He et al., 2011). Il a aussi été observé que l'interféron de type 1 pouvait déclencher la nécroptose des macrophages (Robinson et al., 2012). Et bien sûr, par la voie des récepteurs de morts de la famille du TNF tel que le TNF même, FAS et TRAIL (Holler et al., 2000; Jouan-Lanhouet et al., 2012; Sosna et al., 2014). Il a même été démontré que la nécroptose pouvait être déclenchée par la voie interne de l'apoptose, lors de traitement cisplatine, une chimiothérapie qui induit des cassures dans l'ADN, activant le facteur de transcription P53 et ses gènes cibles permettant le déclenchement de l'apoptose (Xu et al., 2017).

La nécroptose dépend principalement de RIPK3 (Receptor-interacting protein kinase 3) et de MLKL (Mixed Lineage Kinase Domain Like Pseudokinase), l'exécuteur final. Sous les TRAIL-R, FADD et RIPK1 ont été montrés comme cruciaux pour l'induction de la nécroptose. RIPK3 est une kinase de la famille des RIP kinases dont fait partie RIPK1. Il a été montré que son expression est fréquemment éteinte dans de nombreux cancers par méthylation de l'ADN, laissant suggérer un rôle anti oncogène (Koo et al., 2015). Il a été démontré qu'une grande expression de RIPK3 (et de MLKL plus récemment) était un facteur de bon pronostic dans les

cancers colorectaux. Ces types de cancers sont fréquemment traités au fluorouracile (5-Fu), une chimiothérapie induisant l'arrêt du cycle cellulaire et qui a été montré comme étant un inducteur de la nécroptose dans des lignées RIPK3 positive. (Colbert et al., 2013; Conev et al., 2019).

RIPK3 est activé par cis-autophosphorylation sur sa sérine-199 (site actif) et en position S227 afin de pouvoir recruter MLKL, l'effecteur final (McQuade et al., 2013). MLKL est sous forme de monomère cytosolique, et lorsqu'il est phosphorylé par RIPK3 sur ses sites Thr357/Ser358, il oligomérisse en tri/tétramère et est alors relocalisé à la membrane. Il est encore indéterminé quels sont les acteurs responsables de la relocalisation de MLKL même si certains mécanismes ont été mis à jour : Il a été montré qu'une fois à la membrane, MLKL recrutait le complexe ESCRT-III afin de permettre la formation de vésicule extracellulaire pour un transport de cytokines, chemokines et de MLKL membranaire afin d'activer les cellules dendritiques pour une réponse immunitaire par les lymphocytes T CD8+ (Gong et al., 2017). Ce phénomène tendrait aussi à limiter la mort cellulaire et éviter la rupture membranaire : une hypothèse fut proposée que ces vésicules permettaient de restreindre la quantité de MLKL à la surface par exportation dans ces vésicules tout en transmettant les signaux de danger (Fan et al., 2019). De récents travaux ont prouvé que la relocalisation de MLKL dépendait d'un réseau de microtubules et d'actines associés au Golgi. De plus, ils montrent l'importance d'un seuil en termes de quantité de pMLKL actif à la membrane à franchir pour déclencher la nécroptose (Samson et al., 2020).

Le faisceau hélicoïdal N-terminal de MLKL contenant 6 hélices peut alors se lier aux phospholipides de phosphatidylinositol à la membrane plasmique pour y former de larges pores et la rupture membranaire. La translocation de MLKL à la membrane est suivie du recrutement de transporteur d'ion Ca^{2+} pour l'influx de calcium comme TRPM7, probablement afin de permettre la formation des vésicules par ESCRT-III (Cai et al., 2014), mais un autre groupe a pu démontrer que MLKL lui-même avait un rôle de canal à cations, laissant passer Mg^{2+} , Na^{+} et K^{+} mais pas Ca^{2+} , et que cet influx de cations était déterminant pour déclencher la nécroptose et les larges pores (Xia et al., 2016).

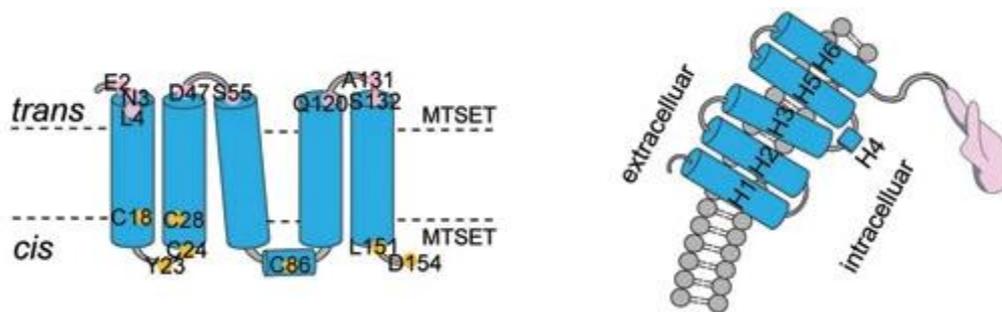


Figure 1-14 : Schéma structurel de MLKL.

La structure de MLKL ainsi que l'insertion des fragments présumés transmembranaires dans la membrane a été observé à l'aide de test au MTSET (2-(trimethyl ammonium) ethyl methane thiosulfonate, bromide). Le MTSET est un agent membrane imperméable qui modifie la charge des cystéines, impactant de ce fait le canal et son rôle de transporteur. En utilisant un système de bicouche lipidique plane, ils ont aussi pu avec précision traiter au MTSET en coté cis (interne) ou trans (externe). Ils ont ainsi pu observer que les domaines H1,2,3,5,6 était membranaire alors que le 4 était cytosolique. En jaune, tous les résidus cystéines (ou mutés cystéines) testés en coté cis, ou en rose pour le coté trans. figure provenant de (Xia et al., 2016).

Lors de la liaison de TRAIL à ses récepteurs DR4/5, le DISC est recruté (FADD/C8/FLIP) et l'apoptose est initiée. Le complexe cytosolique FADDosome décrit plus tôt, composé de FADD/caspase-8 (FLIP)/RIPK1 déclenche alors l'apoptose. En condition normale, la caspase-8 active clive alors RIPK1 et RIPK3, inhibant ainsi la nécroptose (Oberst et al., 2011). Cependant, lorsque l'activité de la caspase-8 est inhibée, RIPK1 peut recruter RIPK3 par interaction de leurs domaines RHIM (RIP homotypic interaction motifs). Un complexe moléculaire se forme dans le cytosol, un assemblage hétérodimérique de structures filamenteuses composées de RIPK1 RIPK3 FADD et caspase 8 appeler le ripoptosome (Li et al., 2012). RIPK1 et RIPK3 s'auto-et trans- phosphorylent, permettant ainsi le recrutement de MLKL et sa phosphorylation pour former un nouveau complexe cytosolique appeler le nécrosome : Ce complexe est formé de RIPK1/RIPK3/MLKL et permet de déclencher la nécroptose. Le nécrosome serait aussi dépendant de l'autophagie, il a été observé que P62/SQSTM1 (sequestosome 1), une protéine cargo associé à l'autophagie, recrutait RIPK1 et permettait la formation du nécrosome (Goodall et al., 2016a).

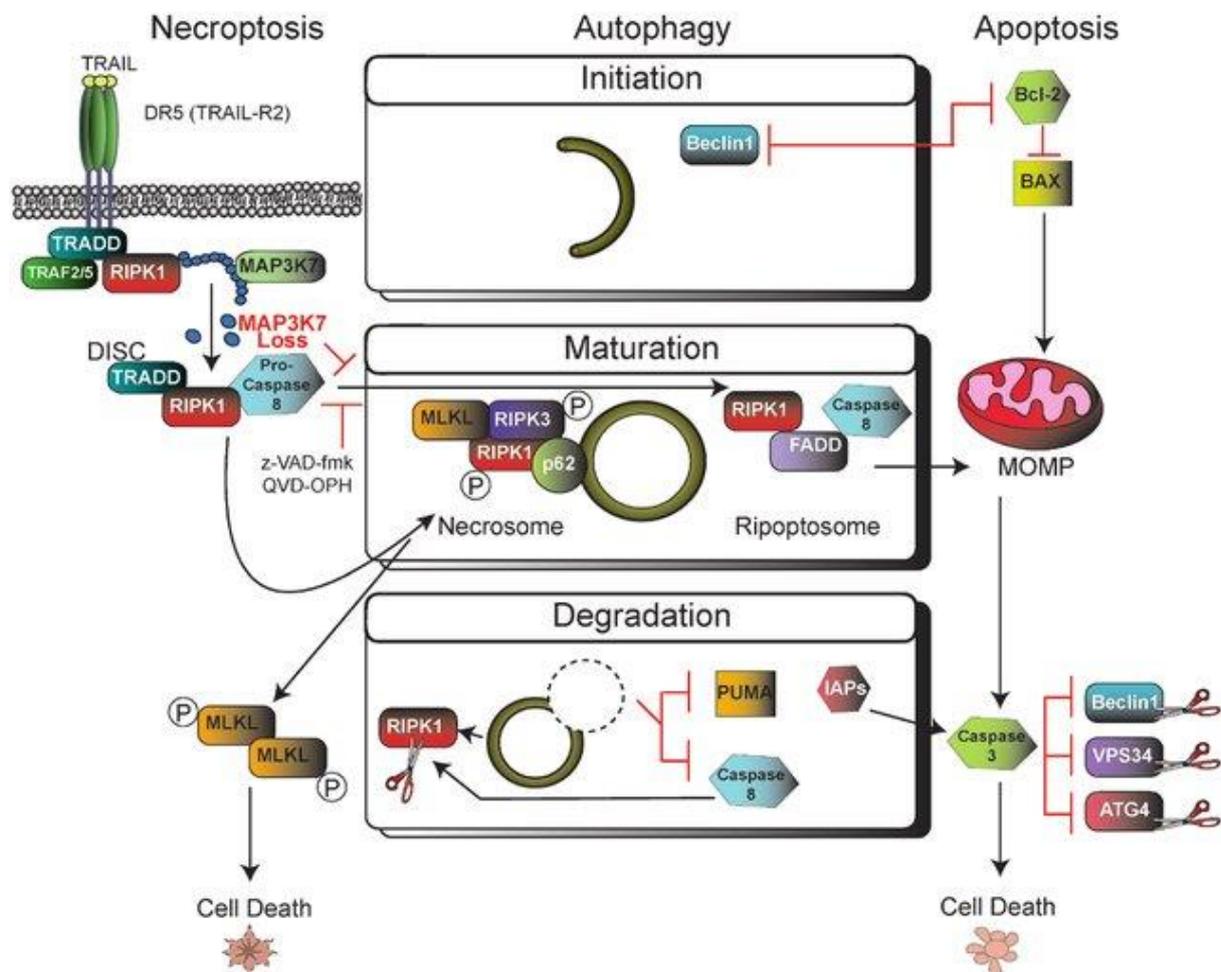


Figure 1-15 : Communication entre apoptose, nécroptose et autophagie.

Un traitement TRAIL engage en condition de TAK-1 nul (MAP3K7) préférentiellement la nécroptose, et exclusivement lors d'utilisation d'inhibiteurs des caspases (z-VAD-fmk/QVD-OPH). Ils ont pu démontrer lors de leurs précédents travaux (Goodall et al., 2016a) que l'autophagie avait un rôle important pour l'induction de la nécroptose par TRAIL, et indépendant du processus de dégradation : Inhiber la formation des autophagosome ou la maturation bloque la nécroptose, alors que l'apoptose peut être déclenchée en mort alternative. Inhiber la dégradation cependant augmente la sensibilité à la mort cellulaire. Figure provenant de de l'éditorial de Goodall (Goodall et al., 2016b).

Il existe quelques différences majeures entre l'induction de la nécroptose par TRAIL comparé au TNF. Tout d'abord, Le TNF a été reporté comme plus à même à induire la nécroptose que TRAIL (Sosna et al., 2016). Cela est lié à la différence hiérarchique de recrutement que nous avons pu aborder dans le chapitre de la survie : Sous les récepteurs de TRAIL, la caspase-8 est plus rapidement activée que sous les récepteurs du TNF, entamant le clivage de RIPK1 et 3. Les TNF-R recrutent d'abord RIPK1 et active la caspase-8 dans un second temps. Ensuite, FADD est cruciale pour déclencher la nécroptose par TRAIL alors qu'il est dispensable voir

inhibe l'induction par le TNF, et ce pour les mêmes raisons que cité précédemment : FADD est la molécule adaptatrice qui permet le recrutement de la caspase-8 et de RIPK1 sous les récepteurs TRAIL et non sous les récepteurs au TNF (Sosna et al., 2016).

Décision cellulaire entre survie et apoptose et nécroptose

La voie apoptotique, nécroptotique et de survie pouvant être engagées toutes les trois sous les TRAIL-R, quels sont les molécules qui permettent de décider de la voie qui sera exécutée ?

FLIP est un important régulateur de l'apoptose, de la survie et de la nécroptose (Tsuchiya et al., 2015). FLIP était au départ reconnu comme un inhibiteur simple de l'apoptose malgré des données contradictoires observées où FLIP jouerait les rôles pro- et anti-apoptotiques. FLIP existe sous trois formes, une forme longue FLIP (L) et deux courtes FLIP (S) et (R). Il s'est avéré que FLIP (L) est en réalité un activateur plus efficace de la procaspase-8 que la procaspase-8 elle-même (Yu et al., 2009). Cependant des études biochimiques ont montré que la caspase-8 activée par FLIP (L) resterait liée au DISC, et ainsi serait limitée aux substrats environnants. La caspase-8 peut cliver RIPK1 au niveau du domaine kinase (KD) et au niveau du domaine intermédiaire (ID) : Quand la caspase-8 est pleinement active, elle clive rapidement les deux domaines de RIPK1, inhibant la voie NF- κ B et des MAP-K en plus de la nécroptose. Cependant, partiellement activée par le changement conformationnel qu'a induit FLIP (L), elle ne clive RIPK1 qu'au niveau du domaine kinase ce qui a été montré comme renforçant l'induction de la voie NF- κ B (Zhang et al., 2015). Le domaine kinase de RIPK1 étant crucial pour l'activation de la nécroptose, la nécroptose est de ce fait inhibée. FLIP (S) quant à lui ne possède pas le domaine catalytique permettant le clivage enzymatique, bloquant ainsi totalement l'activation de caspase-8. Par contre, RIPK1 sous sa forme entière va pouvoir former le ripoptosome et déclencher la nécroptose (Safa, 2012).

En résumé, FLIP (L) inhibe l'apoptose ainsi que la nécroptose tout en suractivant la voie NF- κ B par l'activation localisée et la rétention de la caspase-8 au niveau du récepteur, alors que FLIP (S/R) quant à eux inhibent l'apoptose, permettent l'induction de la voie NF- κ B de façon modérée lié à l'absence de clivage de RIPK1 par la caspase-8, mais permettent l'induction de la nécroptose.

RIPK1 se situe dans le carrefour de la décision cellulaire entre survie, apoptose et nécroptose. RIPK1 peut être phosphorylé/polyubiquitiné sur de multiples sites ayant de différentes implications en termes d'activation et d'inhibition de voies. ULK1 (Unc-51 Like Autophagy

Activating Kinase 1), une sérine thréonine kinase impliquée dans l'induction de l'autophagie, est recrutée par RIPK1 via les chaînes de polyubiquitines. Elle phosphoryle alors RIPK1 sur sa sérine 357 afin de prévenir de la mort cellulaire (Wu et al., 2020b).

RIPK1 aurait un rôle plutôt d'inhibiteur de mort cellulaire plutôt qu'inducteur de par son rôle dans le recrutement de TAK-1/NF- κ B. Des expériences de souris K.O pour RIPK1 décèdent peu après la naissance, alors qu'un K.O combiné de RIPK3 et caspase-8 restaure un phénotype normal chez les souris RIPK1 (-/-) (Dillon et al., 2014). Il a même été observé que la nécroptose pouvait avoir lieu en condition de RIPK1 KO après stimulation par le TNF-L. RIPK3 est recruté directement via TRADD, son oligomérisation permettant son auto-phosphorylation et l'engagement de la voie nécroptotique (Wang et al., 2020). (Il resterait ici à déterminer si le même phénomène peut se reproduire lors de l'induction de la nécroptose par TRAIL, même si TRADD n'est pas recruté sous le récepteur). Des complexes cytosoliques pourraient aussi induire la nécroptose via TRADD en l'absence de RIPK1. Nous avons déjà pu aborder les ubiquitylations de RIPK1 qui permettait l'activation de la voie NF- κ B et des MAP-K, mais ce phénomène est réversible, les chaînes d'ubiquitines peuvent être déconjuguées par des déubiquitinases (DUBs). CYLD (cylindromatosis) est une DUB primordiale dans la voie des récepteurs de morts, catalysant la déubiquitination de RIPK1 et inhibant ainsi la voie de survie tout en favorisant l'apoptose ainsi que la nécroptose (Moquin et al., 2013; Sun, 2010). CYLD peut d'ailleurs aussi être clivée par la caspase-8, ce qui renforce l'induction de NF- κ B par RIPK1 et l'effet anti-apoptotique et pro-inflammatoire de FLIP (L) : La caspase-8 active clive RIPK1 et CYLD, induisant l'apoptose. Mais la caspase-8 activée par FLIP (L) clive RIPK1 dans son KD l'activant pour la voie NF- κ B en plus de cliver CYLD, levant toute répression de la voie de survie (O'Donnell et al., 2011).

TAK-1 quant à lui peut être considéré comme le maître régulateur de la survie. TAK-1 active NF- κ B qui permet la transcription de nombreux gènes anti-apoptotiques tout en permettant l'activation de la voie des MAP-K et de la survie (Hirata et al., 2017).

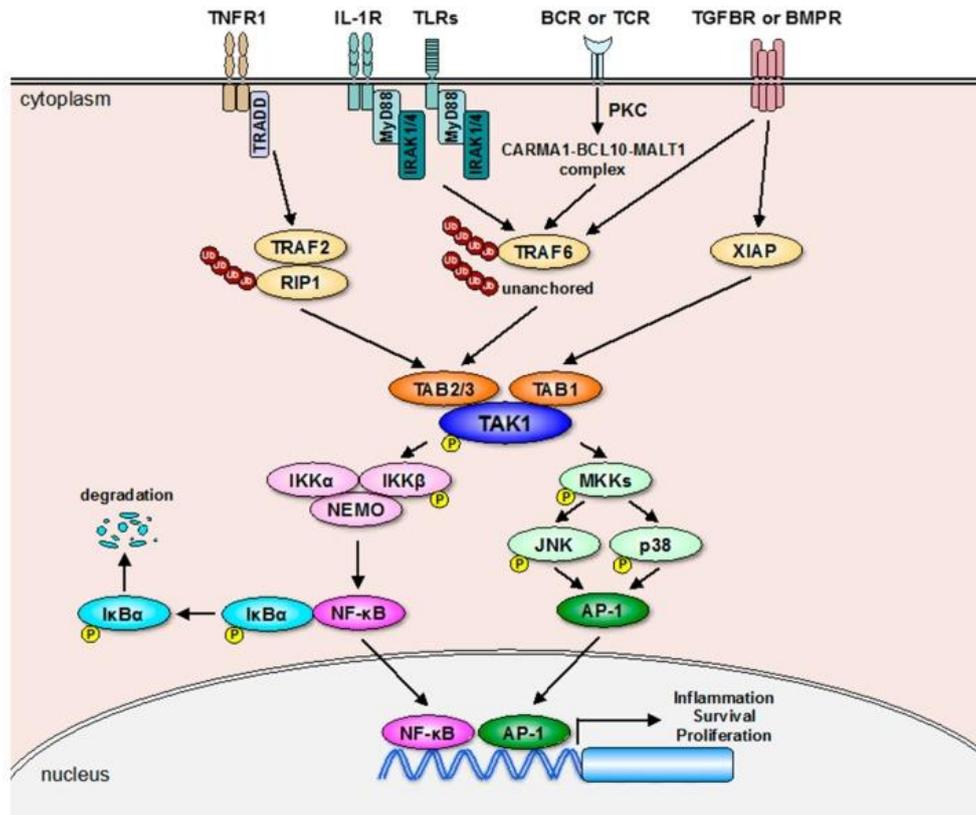


Figure 1-16 : La voie NF- κ B et des MAP kinases sous le contrôle de TAK-1.

TAK-1 une fois activé induit la voie NF- κ B en phosphorylant IKK β qui phosphoryle IKK α en retour. Cela entraîne sa dégradation en relâchant l'inhibition qui s'effectuait en permanence sur NF- κ B, démasquant son NLS. NF- κ B est relocalisé au noyau pour induire la transcription de ses gènes, dont les gènes anti-apoptotiques comme FLIP, mais aussi des gènes impliqués dans l'inflammation et la prolifération. Parallèlement, TAK-1 phosphoryle aussi MKKs (McKusick-Kaufman Syndrome) qui phosphoryle à son tour JNK1/2, ERK1/2 et P38. Induisant le facteur de transcription AP-1 qui permet la suramplification de la transcription des gènes sous le contrôle de NF- κ B. Figure provenant de (Hirata et al., 2017).

TAK-1 est décrit comme un inhibiteur de l'apoptose aussi bien que de la nécroptose (Goodall et al., 2016a; Morioka et al., 2009). Étonnamment, une surexpression de TAK-1 semble induire la nécroptose lors d'une stimulation par le TNF (Morioka et al., 2014). Il est proposé que dans une condition où TAB-2 serait déficient, TAK-1 ne pouvant se lier à RIPK1 par la chaîne de polyubiquitine pourrait créer des liaisons alternatives permettant l'activation cette fois-ci de

RIPK1 par phosphorylation entraînant la nécroptose (Mihaly et al., 2014). De plus, TAK-1 inhibe le complexe PAN-optosis (Pyroptose, Apoptose Nécroptose), qui est au centre de la décision du déclenchement de multiples voies de morts cellulaires. La phosphorylation de RIPK1 par TAK-1 inhibe la formation du complexe RIPK1/RIPK3/FADD/caspase8 contrôlant apoptose et nécroptose. Il a été montré que la caspase-8 peut lors de son activation bifurquer sur la pyroptose en clivant GSDMD à la place de la caspase 1 (Orning et al., 2018), ce qui en fait un complexe régulant trois voies de morts cellulaires. Sous stimulation par TRAIL, il a été observé que TAK-1 permettait de moduler la sensibilité à l'apoptose. La délétion de TAK-1 dans des lignées MEFs permet d'augmenter les ROS intracellulaires et de diminuer le niveau protéique des cIAP. Il est surprenant de constater qu'ils n'ont pu observer aucunes modifications de sensibilité à TRAIL en inhibant NF- κ B, présumé responsable de la sensibilité (Morioka et al., 2009). Notamment que Baskar *et al.* démontre que NF- κ B est bien activé au bout de trois heures de TRAIL, mais cela dans les HeLa (Baskar et al., 2019). Néanmoins, ils observent aussi que les kératinocytes et fibroblastes de souris sont eux aussi sensibilisés lors de la délétion de TAK-1. Cela laisse présager que des stratégies d'inhibition de TAK-1 en thérapies anticancéreuses pourraient être néfastes pour l'individu traité en sensibilisant les cellules saines au TRAIL.

Nécroptose en thérapie

La nécroptose est au centre de nombreuses maladies inflammatoires lié au relargage de multiples DAMPS (motifs moléculaires associés aux dégâts) dans le milieu extracellulaire lors de la perméabilisation membranaire par MLKL (Kaczmarek et al., 2013; Houry et al., 2020). Ces DAMPS reconnues par les PRR (récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires) des cellules immunitaires environnantes de l'immunité innée induisent leur activation et la réponse inflammatoire : la sécrétion d'histamine par ces cellules permettant la vasodilatation afin de recruter d'autres cellules immunitaires ; la sécrétion de TNF qui permet au niveau des capillaires d'induire l'adhésion des cellules immunitaires recrutées en plus de la sécrétion de nombreuses interleukines pour le recrutement (Chaplin, 2010). De plus, les acteurs moléculaires de la nécroptose, RIPK1/RIPK3 peuvent indépendamment de MLKL activé NLRP3 (NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3), protéine activatrice de l'inflammasome qui active la caspase 1 afin de maturer les cytokines inflammatoires IL 1b (Interleukine-1b) et IL 18 augmentant de nouveau l'intensité de la réponse en présence d'ARN viraux (Wang et al., 2014).

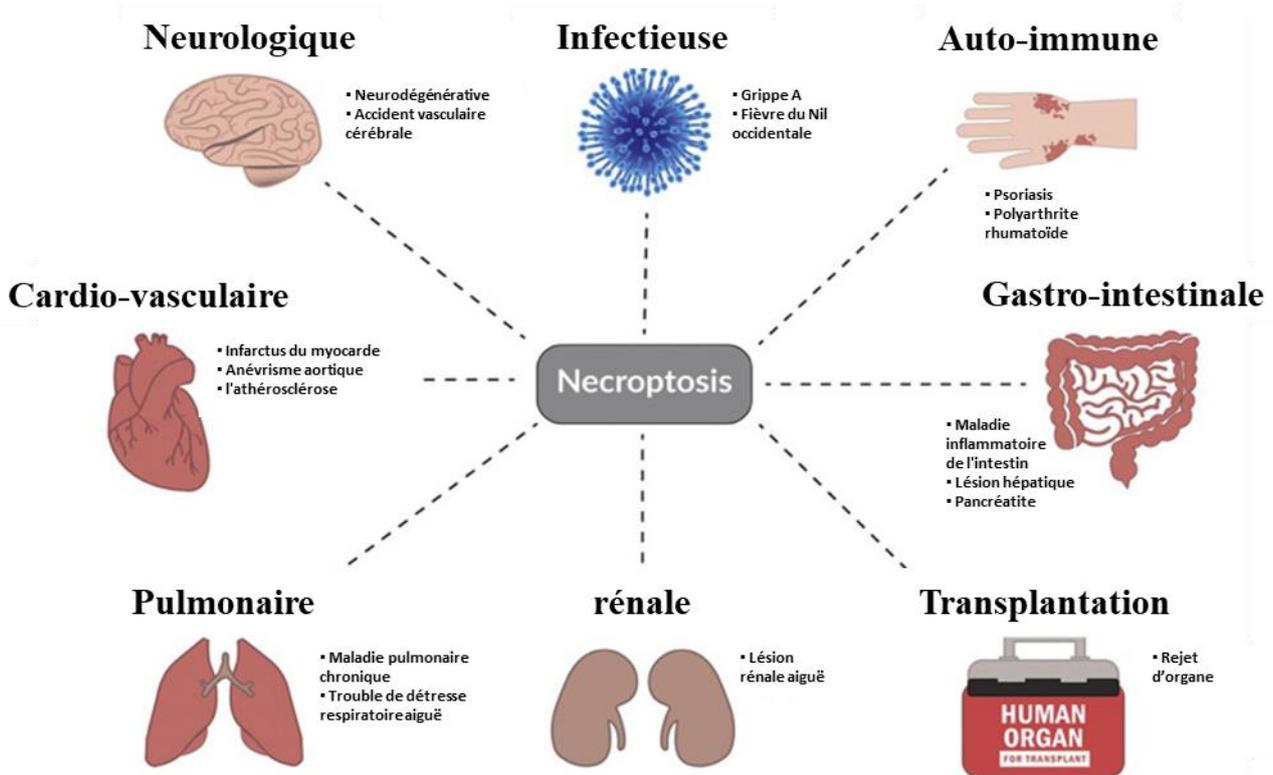


Figure 1-17 : La nécroptose est impliquée dans plusieurs physiopathologies.

La nécroptose induit une forte réaction immunitaire associée à l'inflammation. Des perturbations dans la régulation de la voie est associée à de nombreuses physiopathologies. Schéma traduit provenant de (Khoury et al., 2020).

Dans le cas du cancer, la nécroptose est envisagée comme une nouvelle stratégie pour des thérapies anticancéreuses. Elle permettrait de déclencher une mort plus immunogénique que l'apoptose, induisant l'activation du système immunitaire et la mise en place d'une immunité antitumorale : le système immunitaire activé peut alors reconnaître les cellules cancéreuses et éradiquer les cellules tumorales restantes (Kroemer et al., 2013). L'inhibition de RIPK3 par méthylation dans de nombreux cancers (Koo et al., 2015), ainsi qu'une communication antagoniste des voies apoptotique et nécroptotique ont permis de suggérer que la nécroptose pourrait aussi permettre d'outrepasser la résistance à l'apoptose retrouvée dans de nombreux cancers (Huang et al., 2018).

Les premières expériences de vaccination tumorale étaient prometteuses : Des souris immunocompétente BALB/c ont été immunisées par des cellules cancéreuses CT26 (carcinomes de colon de souris) en nécroptose, déclenchée par l'augmentation de RIPK3 via un

système TET-on (afin d'éviter les effets liés aux drogues employées) (Aaes et al., 2016). La vaccination par les cellules en nécroptose a permis le cross-priming (présentation croisée) des antigènes par les cellules en nécroptose aux cellules dendritiques, le relargage de DAMPS comme HMGB1 (high-mobility group box 1) et l'ATP, induisant la prolifération des LT CD8+ pour une réponse cytotoxique. 90% des souris ainsi immunisées n'ont pas développé de tumeur lors du second challenge après 30 jours. La nécroptose induit donc une vaccination antitumorale et ce plus efficacement que des cellules en nécroses. En effet, l'injection de cellules nécrotiques (par cycle de congélation décongélation) est moins efficace à induire une réponse antitumorale. Cela signifie qu'en plus de la rupture membranaire et le relargage de DAMPS, il existe un phénomène bien plus immunogène permettant d'activer efficacement le système immunitaire. Ils observent que l'activation de NF- κ B est une partie importante de cette efficacité d'immunisation, résultats confirmés par un autre groupe qui démontre le rôle important de RIPK1 et NF- κ B dans l'activation du système immunitaire (Yatim et al., 2015).

La shikonine, un constituant d'une herbe médicinale chinoise, qui a été décrite déclenchant la nécroptose par augmentation des ROS et du niveau protéique de RIPK1 et RIPK3, a aussi permis de largement prolonger la durée de vie de souris atteintes d'ostéosarcome métastatique pulmonaire (Fu et al., 2013). Elle inhibe de plus la voie de la glycolyse aérobie en inhibant PKM2 (pyruvate kinase isozyme M2), une enzyme fréquemment augmentée dans certains cancers. Une forte expression de PKM2 est associée à la résistance à la cisplatine. L'emploi de shikonine en combinaison de la cisplatine permet non seulement de sensibiliser les cellules à la mort, mais aussi de basculer de l'apoptose à la nécroptose et de contourner la résistance (Wang et al., 2018b). Elle a aussi été démontrée comme sensibilisant les cellules au TRAIL sans pour autant cette fois-ci changer de type de mort, conservant l'induction de la voie apoptotique (Guo et al., 2018).

Cependant, la nécroptose pourrait aussi avoir des effets néfastes lors d'une thérapie (Zhu et al., 2019a). La nécroptose aurait un rôle dans le développement tumoral dans des souris atteintes de PDA (pancreatic ductal adenocarcinoma), où un KO de RIPK3 inhibe alors le développement tumoral. Cela est lié à la sécrétion de CXCL1 par les cellules nécroptotiques, une chimiokine impliquée dans le recrutement des cellules immunitaires mais associée aussi au développement tumoral et métastatique (Seifert et al., 2016; Wang et al., 2018a). La sécrétion de CXCL1 induit le recrutement de MDSC (myeloid-derived suppressor cells), qui permettent d'inhiber localement la réponse immunitaire et permettre ainsi une niche de progression tumorale et de métastase (Wang et al., 2017a). La nécroptose déclencherait, de par

l'inflammation qui est liée, la migration cellulaire et les métastases (Cai et al., 2016). De plus, nous ne savons toujours pas si un traitement pourrait être spécifique des cellules cancéreuses sans affecter les cellules saines, et quels seraient les effets d'une telle thérapie sur l'organisme, malgré l'idée attractive de conférer une immunité antitumorale tout en contournant les résistances aux traitements actuels.

1.5 Objectifs de la thèse

L'objectif général de la thèse est de comprendre l'origine moléculaire des résistances non-génétiques aux ligands des récepteurs de mort : la résistance intrinsèque d'une population de cellules isogéniques et la résistance induite dans les cellules survivantes.

Quels sont les facteurs moléculaires à l'origine de la réponse hétérogène au traitement TRAIL ?

Nous savons que la sensibilité à l'apoptose induite par TRAIL peut être modulée à plusieurs niveaux dans le cancer (récepteurs, expression des facteurs pro et anti-apoptotiques, les voies de dégradation, du métabolisme etc...). Nous avons aussi pu voir que l'hétérogénéité retrouvée dans la population tumorale est un mécanisme de résistance à part entière. L'hétérogénéité qui existe au sein d'une population clonale entraîne l'émergence d'états cellulaires transitoires et régulés de pré-résistance dans la population. Ces états cellulaires entraînent des modulations de l'expression de nombreuses molécules causant une réponse partielle de la population traitée et limitant l'efficacité des thérapies anticancéreuses.

Depuis l'émergence des nouvelles technologies « single cell », il est maintenant possible d'étudier l'hétérogénéité en étudiant chaque cellule de la population tumorale. Les techniques transcriptomiques permettent d'étudier le transcriptome de chaque cellule et d'observer l'hétérogénéité préexistante ainsi que les schémas transcriptomiques qui ont permis d'en déduire l'existence d'états cellulaires dans la population. Il est même possible actuellement en employant des techniques comme le CyTOF, d'analyser en résolution « single cell » le niveau protéique et les modifications post-traductionnelles d'acteurs moléculaires impliqués dans l'activation de voie de signalisation. De plus, l'analyse en « single cell » des cellules traitées par un agent chimique a permis d'observer la réponse génique induite par le composé et de comprendre les mécanismes moléculaires de la résistance mise en place. Cependant toutes ces techniques ne permettent pas d'étude dynamique car elles requièrent la destruction de la cellule afin de procéder à la mesure finale.

L'imagerie dynamique permet quant à elle de suivre une activité enzymatique, ou encore une relocalisation cellulaire pour chaque cellule dans le temps. C'est par cette méthode qu'il a été montré qu'il existait une forte hétérogénéité d'activation de la caspase 8 dans les cellules d'une

population traitées par TRAIL et qu'il existait un seuil propre à la lignée d'activité à atteindre afin de déclencher l'apoptose.

L'hétérogénéité de réponse à TRAIL de la population est donc due à une hétérogénéité d'activation de la caspase-8 entre les cellules, elle-même due à l'hétérogénéité d'expression génique retrouvée dans la population clonale. Cette hétérogénéité est difficile à analyser car il est impossible de déterminer quels sont les cellules se trouvant dans un état de pré-résistances/sensibilités jusqu'à leurs réponses cellulaires. Les cellules mourantes ne peuvent alors plus être analysées dû à la dégradation de leurs contenus cytoplasmiques, et les cellules survivantes sont reprogrammées masquant l'origine moléculaire de la pré-résistance dû à l'induction génique de la résistance adaptative.

Les acteurs moléculaires responsables des états cellulaires de pré-résistances à un traitement ne peuvent donc pas être criblés. Les études « single cell » actuelles qui étudient les états cellulaires sont des études corrélatives, où un acteur moléculaire déjà connu pour inhiber la voie (ou accorder la résistance) est recherché dans la population afin de déterminer si son expression est hétérogène, corrélé à la résistance ou encore si d'autres gènes sont coexprimés en fonction du gène cible.

Un moyen qui permettrait d'étudier les états cellulaires ainsi que les gènes différentiellement exprimés qui participent à l'hétérogénéité de réponse à un traitement serait de pouvoir prédire la sensibilité des cellules au traitement. Cela permettrait de les analyser et de connaître les profils de pré-résistances avant la reprogrammation génique induite par le traitement et aussi de déterminer les profils de pré-sensibilités avant la mort cellulaire.

Etudier ces états cellulaires et les gènes impliqués dans la pré-résistance permettrait de prédire la sensibilité au traitement de la population en fonction des profils transcriptomiques retrouvés dans les cellules. Afin de trouver une méthode permettant l'analyse de l'origine moléculaire de la pré-sensibilité et résistance au traitement TRAIL, nous avons émis hypothèse que l'activité caspase-8 pouvait permettre de prédire la sensibilité de la cellule pour le traitement en cours. Les travaux de J. ROUX *et al* ont montré que l'activité de la caspase-8 initiatrice était déterminante de la réponse cellulaire lors d'un traitement TRAIL. L'initiation de l'apoptose par la caspase-8 est un processus qui se pourrait être suffisamment précoce afin de permettre de discriminer pour une partie de la population leurs destins cellulaires avant une induction génique. Par des techniques de séquençages en single-cell sur les cellules prédites sensibles ou

résistantes, nous pourrions alors étudier l'origine moléculaire de la pré-résistance aux traitements TRAIL :

Quels sont les facteurs moléculaires responsables de la résistance transitoire à l'apoptose induite par TRAIL dans les cellules survivantes ? Ce contexte cellulaire induit ne pourrait-il pas sensibiliser ces cellules à la nécroptose ?

L'hétérogénéité de réponse des cellules au TRAIL entraîne donc des états accordant la résistance à des cellules provenant d'une population normalement sensible : les cellules survivantes au traitement TRAIL sont reprogrammées et développent une résistance transitoire pour les traitements TRAIL suivants en plus de devenir plus agressives et invasives. Cette résistance transitoire est caractérisée par une surexpression de gènes anti-apoptotiques tels que FLIP et étonnamment semble indépendante de la voie NF- κ B. La voie NF- κ B est bien transduite lors de traitement TRAIL et a déjà été montré comme participant à la résistance cellulaire au TRAIL, notamment en induisant l'expression de FLIP. Cependant il a aussi été montré que la surexpression de FLIP et l'inhibition de la voie apoptotique permettait aussi de favoriser la nécroptose. La nécroptose est aujourd'hui étudiée afin de contourner les résistances à l'apoptose de cellules cancéreuses, en plus de permettre une mort plus immunogène. Il a été montré que des cellules tumorales résistantes à la cisplatine ou au TRAIL étaient sensibles à la nécroptose. Cependant il n'a encore jamais été observé s'il était possible de contourner la résistance transitoire au traitement TRAIL en employant des traitements. De même qu'il n'a pas encore été déterminé si des traitements nécroptotiques pouvaient aussi induire une résistance transitoire tout comme les traitements apoptotiques par TRAIL.

Au vu de ces éléments, l'objectif de ce projet a été de déterminer quels sont les facteurs moléculaires responsables de la mise en place de la résistance transitoire au traitement TRAIL. TRAIL pouvant aussi induire les voies non-canoniques de NF- κ B et des MAP Kinases, toutes deux sous le contrôle de TAK1, nous allons observer lors de co-traitements par TRAIL avec des inhibiteurs pharmacologiques des différents facteurs de la voie non canonique de survie s'il est possible de réprimer la mise en place de la résistance. Nous avons émis l'hypothèse que la résistance à l'apoptose induite par le traitement TRAIL pourrait sensibiliser les cellules à la nécroptose induite par TRAIL, normalement inhibée durant l'induction apoptotique.

**Chapitre 2. Une approche de
pharmacogénomique fonctionnelle en
cellule unique révèle les origines
moléculaires de la résistance non-
génétique à TRAIL**

2.1 Introduction de l'article

L'hétérogénéité tumorale est actuellement un frein majeur aux thérapies anticancéreuses, elle induit une variabilité de réponse de la population tumorale et la persistance de cellules cancéreuses résistantes. L'hétérogénéité dans le cancer existe à de multiples échelles : elle se retrouve entre patients due à des génomes différents ; au sein d'un même patient en fonction du tissu des cellules tumorales ; dans la tumeur plusieurs clones peuvent être retrouvés dû à l'apparition de néo-mutations ; et finalement même au sein d'une population clonale, une hétérogénéité non-génétique existe entre les cellules sœurs (Grzywa et al., 2017). Cette hétérogénéité non-génétique provient de la divergence de cellules isogéniques : deux cellules cancéreuses sœurs auront tendance à répondre de façon semblables plus leur 'décision' de réponse au traitement est rapprochée la division cellulaire, et que la probabilité de divergence de réponse s'accroît plus cette 'décision' de réponse au traitement est éloignée de la division cellulaire (Spencer et al., 2009). Cela signifie que la répartition du contenu cytoplasmique lors de la division se fait d'une façon symétrique et qu'il y a une accumulation de différences au cours du temps. Plusieurs facteurs peuvent être responsables de la variabilité non-génétique : des facteurs externes tels que l'environnement, le positionnement, l'accessibilité au traitement, les interactions cellulaires, la densité cellulaire etc. (Loewer and Lahav, 2011; Snijder and Pelkmans, 2011). Mais aussi des causes internes comme le bruit d'expression génique qui est lié à la stochasticité d'expression des gènes, épissage des ARNm, la stochasticité d'interaction protéine-protéine. Ces phénomènes entraînent dans une population de cellules isogéniques une variabilité dans leurs transcriptomes, protéomes et métabolomes, qui permet alors l'émergence de multiples états cellulaires transitoires (MacLean et al., 2018; Snijder and Pelkmans, 2011). Ces états cellulaires sont donc des contextes transcriptomiques, protéomiques ayant des répercussions directes sur la sensibilité cellulaire et la réponse phénotypique au traitement : une partie de la population peut se retrouver dans un contexte cellulaire de pré-résistance lié à une forte expression de gènes de résistances tels que des gènes régulant négativement l'apoptose. Une partie des cellules de population clonales dites 'sensibles' ne répond pas au traitement à une dose donnée, dans cet état de résistance non-génétique 'intrinsèque'. Ces cellules sont de plus reconfigurées lors de l'induction génique qui s'ensuit au cours de la thérapie afin de maintenir et amplifier un état de résistance non-génétique 'induite', où divers mécanismes de résistance aux drogues peuvent émerger de ces cellules, comme des mutations qui sont alors

favorisées afin de faire de cette résistance un caractère héritable pour les prochaines générations (Lovric and Hawkins, 2010; Ramirez et al., 2016; Shaffer et al., 2017).

Cette hétérogénéité intra clonale semble régulée au sein de la population isogénique. La concentration en chimiothérapie permettant de tuer une proportion donnée de la population isogénique reste stable (IC50, Emax). La population survivante au traitement acquiert alors une résistance transitoire par induction génique, une reprogrammation qui peut être réinitialisée après un certain délai (ici trois jours) pour reformer une population avec la même sensibilité d'origine (Flusberg et al., 2013a). Cette variabilité à l'origine au sein de la population clonale entraîne donc une réponse incomplète de la population, le « fractional killing ». Même à dose saturante d'un traitement (Emax), une fraction stable de la population peut résister (Emax>0, (Fallahi-Sichani et al., 2013)).

Il a été démontré par plusieurs équipes dont la mienne que la réponse partielle était liée à des variabilités de dynamique de réponse cellulaire : un traitement par le ligand de mort TRAIL afin d'induire la voie extrinsèque de l'apoptose des cellules cancéreuses par les récepteurs DR4 et DR5 résulte dans une population clonale en une large variabilité d'activation de la caspase-8 initiatrice. L'activité caspase-8 est dans ce cas déterminante du destin cellulaire, un seuil de vitesse d'activation à atteindre dépendant de la lignée permet le déclenchement de l'apoptose ou échoue lorsque la cinétique d'activation est insuffisante (Roux et al., 2015a). Des phénomènes identiques de seuils et de dynamique d'activation de voies ont été recensés : La dynamique de translocation de P53 lors de traitement cisplatine est de nouveau régi par un seuil déterminant de destin cellulaire (Paek et al., 2016). Et plus récemment pour l'accumulation spatiale de la protéine MLKL à la membrane qui doit franchir un seuil d'induction de la nécroptose (Samson et al., 2020). L'hétérogénéité intra-clonale entraîne donc des différences de niveaux protéiques pour les molécules aussi bien pro qu'anti-apoptotiques, entraînant des vitesses d'activation variables de ces voies concernées lors d'un traitement supposé uniforme de la population permettant ou non de franchir les seuils d'activations des déterminants moléculaires contrôlant le destin cellulaire.

L'émergence des technologies single-cell, séquençage à haut débit et imagerie dynamique permettent actuellement une étude à haute résolution des dynamiques d'activations des déterminants moléculaires de la réponse phénotypique des cellules dans une population. Cependant si séparément il a été observé que la sensibilité au TRAIL dépendait de la cinétique d'activation de la caspase-8 (Roux et al., 2015a), et que certaines activations de voies étaient

corrélées à la résistance au TRAIL (Baskar et al., 2019), il n'a pour l'instant encore jamais été possible d'associer pour une même cellule les dynamiques d'activations avec une analyse omique de la résistance reliés au destin cellulaire : la dégradation du contenu lié à la mort induite par le traitement ne peut le permettre, ce qui rend l'analyse de la sensibilité impossible. De même que l'induction génique liée au traitement empêche alors l'analyse des facteurs moléculaires qui seraient à l'origine de cet état de « pré résistance ». Et comme il a été démontré que les traitements induisent une reprogrammation cellulaire (Shaffer et al., 2017), ces analyses portent sur la résistance mise en place et non sur les états moléculaires de « pré-résistance ».

Nous avons lors de cette étude développé une méthode de prédiction basée sur les activités précoces de la caspase-8 qui nous permettent de déterminer pour une partie de la population le destin cellulaire de ces cellules au traitement TRAIL en cours. Nous avons alors mis en place une méthode qui emploie trois technologies en cellule unique : une mesure prédictive de réponse cellulaire par vidéo-microscopie, une isolation de chaque cellule *in situ* par capture laser (microdissection), suivi d'un profilage transcriptomique (single-cell RNA seq) afin de déterminer les signatures transcriptomiques des cellules prédites sensibles et résistantes au TRAIL et valider expérimentalement ces facteurs moléculaires.

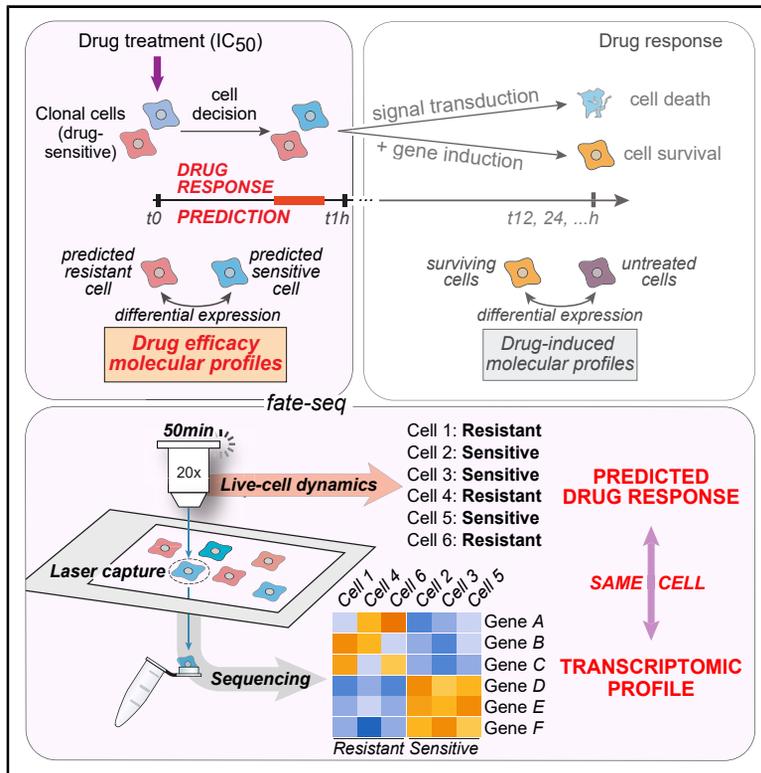
Dans ces travaux, j'ai pu effectuer la validation fonctionnelle des gènes retrouvés différentiellement exprimés entre cellules sensibles et résistantes afin de confirmer leurs rôles dans la modulation de la sensibilité au TRAIL.

2.2 Article

Cell Systems

Profiling the Non-genetic Origins of Cancer Drug Resistance with a Single-Cell Functional Genomics Approach Using Predictive Cell Dynamics

Graphical Abstract



Authors

Mickael Meyer, Agnès Paquet, Marie-Jeanne Arguel, ..., Pascal Barbry, Paul Hofman, Jérémie Roux

Correspondence

jeremie.roux@univ-cotedazur.fr

In Brief

For most cancer drug treatments, a fraction of the clonal cell population can survive because of non-genetic cell-to-cell variability. We present fate-seq, a method to determine the molecular origins of this heterogeneous drug response, by comparing the transcriptomic profiles of predicted resistant versus predicted sensitive cells, before treatment induces confounding changes.

Highlights

- Fate-seq links the drug response of a single cell to its own transcriptomic profile
- Fate-seq recovers variable cell decision information from unstructured variability
- It identifies molecular factors causing the intrinsic resistance to cancer drugs
- A TRAIL therapeutic efficacy profile is performed in HeLa cells as proof of concept



Methods in Brief

Profiling the Non-genetic Origins of Cancer Drug Resistance with a Single-Cell Functional Genomics Approach Using Predictive Cell Dynamics

Mickael Meyer,^{1,4} Agnès Paquet,^{2,4} Marie-Jeanne Arguel,² Ludovic Peyre,¹ Luis C. Gomes-Pereira,³ Kevin Lebrigand,² Baharia Mograbi,¹ Patrick Brest,¹ Rainer Waldmann,² Pascal Barbry,² Paul Hofman,¹ and Jérémie Roux^{1,5,*}

¹Université Côte d'Azur, CNRS UMR 7284, Inserm U 1081, Institut de Recherche sur le Cancer et le Vieillessement de Nice, Centre Antoine Lacassagne, 06107 Nice, France

²Université Côte d'Azur, CNRS UMR 7275, Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, Sophia Antipolis, 06560 Nice, France

³Université Côte d'Azur, Inria, INRAE, CNRS, Sorbonne Université, Biocore team, Sophia Antipolis, 06560 Nice, France

⁴These authors contributed equally

⁵Lead Contact

*Correspondence: jeremie.roux@univ-cotedazur.fr

<https://doi.org/10.1016/j.cels.2020.08.019>

SUMMARY

Non-genetic heterogeneity observed in clonal cell populations is an immediate cause of drug resistance that remains challenging to profile because of its transient nature. Here, we coupled three single-cell technologies to link the predicted drug response of a cell to its own genome-wide transcriptomic profile. As a proof of principle, we analyzed the response to tumor-necrosis-factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) in HeLa cells to demonstrate that cell dynamics can discriminate the transient transcriptional states at the origin of cell decisions such as sensitivity and resistance. Our same-cell approach, named fate-seq, can reveal the molecular factors regulating the efficacy of a drug in clonal cells, providing therapeutic targets of non-genetic drug resistance otherwise confounded in gene expression noise. A record of this paper's transparent peer review process is included in the Supplemental Information.

INTRODUCTION

Isogenic cell populations exhibit multiple scales of non-genetic heterogeneity, from gene expression to phenotypic response. Clonal cells in the same phenomenological state, such as cell cycle or differentiation stages, can still respond differently to the same stimulus (Purvis et al., 2012; Spencer et al., 2009). A common hypothesis for this cell-to-cell phenotypic heterogeneity is the co-existence, within isogenic cell populations, of different cellular states that arise from stochasticity in the biochemical reactions controlling molecules biosynthesis and degradation (Balázs et al., 2011; Elowitz et al., 2002; Loewer et al., 2013; Raj and van Oudenaarden, 2008). These processes generate biological noise that can facilitate cell decisions such as growth, adaptation, cell proliferation, differentiation, and drug response, in a non-genetic fashion, yet constant and apparently regulated (Albeck et al., 2013; Mitchell et al., 2018; Purvis et al., 2012; Saint et al., 2019; Santos et al., 2007; Spencer et al., 2009; Süel et al., 2006).

In addition, non-genetic heterogeneity has also been linked to tumor formation—cell evading apoptosis—and incomplete eradication of tumor clones (Marusyk et al., 2012; Reyes and Lahav, 2018). Recent studies including ours have shown that the incomplete response to cancer therapeutics (fractional killing) is due to differences in cell response dynamics (Paek et al.,

2016; Roux et al., 2015). Heterogeneous cell signaling dynamics play a significant role in the efficacies of many cancer drugs where most of the “sensitive cell lines” still respond partially at the population level, with only a fraction of cells undergoing apoptosis at saturating doses (Fallahi-Sichani et al., 2013; Forcina et al., 2017). Even after repeated rounds of drug challenges, drug-tolerant persister cells have been shown to mediate this fractional killing, suggesting that the same individual cell can switch between opposing phenotypic responses (Flusberg et al., 2013; Sharma et al., 2010; Su et al., 2017). Phenotypic switching, a survival strategy without *de novo* mutation (Acar et al., 2008), is a form of drug evasion that has been shown to lead to genetic drug resistance, ultimately accounting for cancer therapeutic failure (Ramirez et al., 2016; Shaffer et al., 2017; Sharma et al., 2010). Thus, understanding the molecular basis of this drug response phenotype switching at the single-cell level has implications for cancer therapeutic development (Salgia and Kulkarni, 2018). Death receptor agonists, such as tumor-necrosis-factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL), are excellent models for studying the origins of drug response heterogeneity, as they were proven disappointing in clinical trials due to fractional killing, evidenced by a low maximum drug effect (E_{max}) (Gonzalez and Ashkenazi, 2010; Holland, 2014). However, identifying the molecular determinants of drug response heterogeneity has been impaired by the technical and analytical



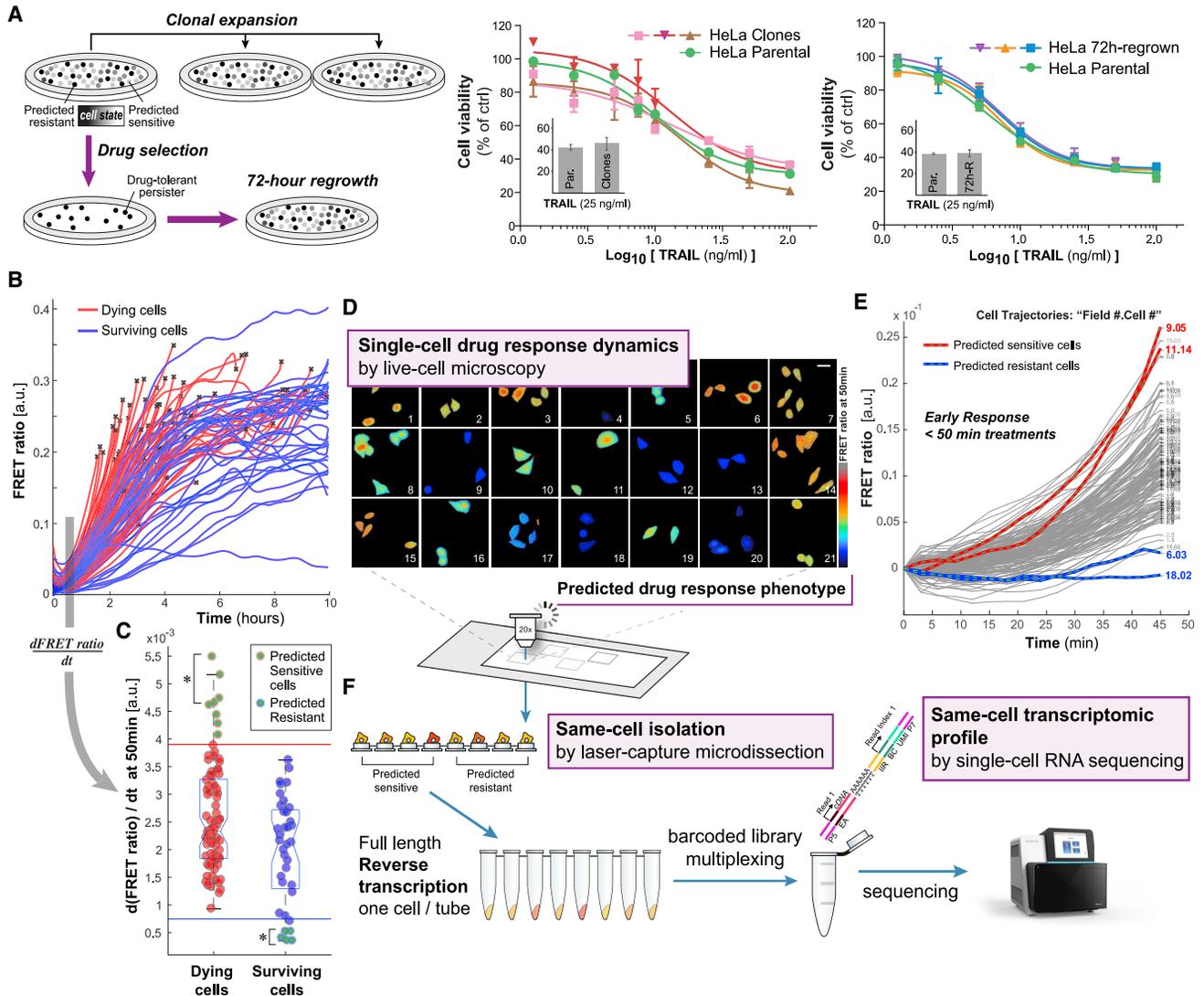


Figure 1. Constant Proportioning of Cell Response Heterogeneity Enables Stable Predictive Metrics of Drug Response for Phenotype-Coupled Same-Cell Profiling: Fate-Seq

(A) Clonal expansion and drug selection reveal the plasticity of drug response phenotypes in isogenic cells. For clonal expansion: single-cell clones were obtained by limiting dilutions of the HeLa parental cells. For drug selection: parental HeLa cells were treated with TRAIL (25 ng/mL for 15 h). The surviving cells from the first treatments were allowed to regrow for 72 h. Once the surviving cells and the sub-clones had regrown into new cultures (72 h and 3 weeks, respectively), they were all treated with TRAIL at several doses, and their responses were compared with the parental cells. One representative dose response profile is shown for both clonal expansion and drug selection experiments. Bar graphs represent cell viability from at least three biological repeats of both clonal expansion and drug selection experiments. Cell viability was assessed 15 h post-treatment by CellTiter-Glo, and the absorbance is represented in percent of control relative to cell population treated with TRAIL-vehicle, data are represented as mean \pm SD.

(B) Single-cell trajectories of FRET ratio reporting caspase-8 activity. Live-cell microscopy experiments (> 10 h) were performed to establish the caspase-8 dynamics predicting the ultimate cell fate after treatment with TRAIL (25 ng/mL in HeLa cells stably expressing the FRET biosensor IC-RP; Albeck et al., 2008). One representative experiment of 143 tracked cells is presented.

(C) The caspase-8 activation rate (time derivative of FRET ratio, $d(\text{FRET ratio})/dt$; Roux et al., 2015) after TRAIL stimulation is calculated for each single cell: we found a time after treatment (50 min) at which caspase-8 activation rate could accurately predict the ultimate cell response at the end of the experiment, using constant thresholds (colored lines; measured in at least three experiments). The star indicates the top 4 predicted cells of each group that can be processed in fate-seq (Figure 2). The cell fate prediction being done after 50-min TRAIL stimulation limits gene induction (Figure S1B) and allows to isolate the sensitive cells that would otherwise die.

(D) Example live-cell microscopy experiment for caspase-8 early activation measurement in each identified cell. 50-min live-cell microscopy experiment was performed to collect caspase-8 dynamics for each cell cultured on a membrane ready for micro-dissection. About 20 fields of cells are monitored, and all cells are tracked for their FRET signal in time.

(E) Single-cell trajectories of FRET ratio are reported for each cell tracked to perform the fate prediction based on their caspase-8 activation rate ($d(\text{FRET ratio})/dt$) 50-min post-TRAIL treatment (25 ng/mL, see Figure 1C). One representative experiment of 158 tracked cells is presented. Red and blue trajectories with green dash lines were predicted sensitive and predicted resistant cells, respectively. Note that a single measure of the FRET ratio at 50 min would not be sufficient to

(legend continued on next page)

impediments of multimodal single-cell approaches. Indeed, measuring signaling dynamics or phenotypic response and global gene expression profiles in the same cell has been technically challenging, not to mention that drug treatment itself either deteriorates the integrity of sensitive cells or induces an associated genomic response. Targeted CRISPR screens (Adamson et al., 2016; Datlinger et al., 2017; Dixit et al., 2016; Jaitin et al., 2014; Rubin et al., 2019) have opened up opportunities to same-cell studies with the caveat that each factor chosen to be targeted has its own cell line that will differ from the parental cells prior the phenotype assessment (limiting the molecular targets examined and subjecting the measured cells to some of the biases of genetic reprogramming). As a consequence, the relationship between global -omic signatures and phenotypic measures has stayed mainly correlative.

To overcome these limitations, we designed a workflow coupling three single-cell technologies: we used a predictive measure of single-cell response by live-cell microscopy, in order to isolate predicted sensitive and predicted resistant cells by laser-capture microdissection and then profiled each captured cell by single-cell RNA sequencing directly (with no cell dissociation, sorting, nor microfluidics handling). This allowed to determine in the same cell, the genome-wide transcriptomic profile at the mechanistic origin of cellular drug response and establish as a proof of principle, a single-cell functional signature of TRAIL therapeutic efficacy.

RESULTS

Single Cells Perpetuate Population Heterogeneity in Constant Proportions, Providing Features for Cell Fate Prediction

Phenotypic switching, which implies unstable phenotypes at the level of each single cell, makes it difficult to associate cell profiles to their future drug response phenotypes. To first evaluate the stability (interconversion property) of the two drug response phenotypes observed within a clonal HeLa cell population treated with TRAIL (cell death or survival), we performed several rounds of clonal expansion and drug selection. HeLa cells were either sub-cloned into new cultures or treated with TRAIL at around their IC_{50} (25 ng/mL) to put the non-responding cells into new cultures. We found that cells derived from clonal expansion or drug selection of parental HeLa cells could produce new cell populations of similar and constant drug response profiles, regardless of the cell clone or their response phenotype to the first drug treatment (Figure 1A). Although this observed non-genetic resistance is transient, with cells switching phenotypes, we found that each cell could perpetuate the drug response heterogeneity of the population, in constant proportions.

While the potential fate of a cell is unstable, we had previously shown that it is correlated with the initiator caspase (caspase-8) maximal activity during the course of TRAIL treatment (Roux et al., 2015). (However, the maximal caspase-8 activity is reached at cell death for the sensitive cells, which had defied

its use as a predictive measure to assess cell fate upon treatment.) With the proportioning of the cell responses being constant at the population level, we sought to evaluate in each cell, the caspase-8 activation rate systematically after drug addition and associate it with the cell response phenotype at the end of the experiment (dying or surviving cell). By doing so, we found that caspase-8 activation rate at 50 min post-treatment was a robust predictor of cell fate for the most differing cells (Figures 1B and 1C). We, thus, could define two thresholds (sensitive and resistant) that were constant between training experiments and with which the prediction could accurately classify the response phenotype of the cells (Figure 1C), at a time after TRAIL treatment where no significant change was induced at the transcriptomic level (Figure S1), and no cell had yet executed cell death.

Although there was no transcriptomic change detectable after a short TRAIL treatment, we sought to verify whether some gene expression variability between the 50-min TRAIL-treated cells could indicate their response phenotypes. We analyzed 3,000 single cells—resting and 50-min TRAIL-treated cells, using the 10X platform (10X Genomics B.V., the Netherlands): after regressing out the cell-cycle component, we could not identify pre-existing cell-to-cell differences in genes of the TRAIL-signaling pathway that would recapitulate the constant fractional response (Figures S1A–S1D). Although isogenic populations contain cells in different states (such as the different phases of the cell cycle), classic single-cell RNA sequencing could not discriminate drug-sensitivity or -resistance states, because of the lack of known gene markers to identify these clusters.

Together, these experiments showed that although the response of a cell may switch between resistant and sensitive, there is no emerging feature in their global transcriptomic state that can help detecting these different cell states. However, we show here that early caspase-8 activation rates can predict the ultimate cell response of the most differing cells, which could be used to enrich these rare cell groups prior to sequencing and establish the markers of drug efficacy.

Single-Cell Response Prediction Coupled to Same-Cell Isolation *In Situ*

The measured gene expression variability of isogenic cells has been so far referred to as gene expression noise (unstructured variability; Eling et al., 2019) instead of an observable signal, in part because of the lack of prior knowledge on the different states of a cell, such as the drug-sensitivity states. To address this issue, we designed a same-cell functional pharmacogenomics approach that couples the prior knowledge of the cell phenotypic state (predicted cell fate) to the transcriptomic profile of the same cell: fate-seq (Figures 1D–1F). Predicted cell fate is determined with the response dynamic profile of each cell monitored by live-cell microscopy: in each experiment ~150 cells were imaged and tracked for 50 min post-TRAIL treatment to perform cell fate predictions. Cells that showed a definitive commitment based on their caspase-8 activation rate (as cells

determine the cell fate, as the basal activity ratio differs between untreated cells (normalization to the same cell at time 0 must be done), and because the predictive metric is based on the time derivative of the FRET ratio, which requires two consecutive measures of the same cell in time.

(F) Each cell has been tracked so to allow the same cell to be phenotyped in live-cell microscopy, isolated by laser-capture microdissection and profiled by single-cell RNA-seq. Two to 8 single-cells were captured and sequenced per fate-seq experiment.

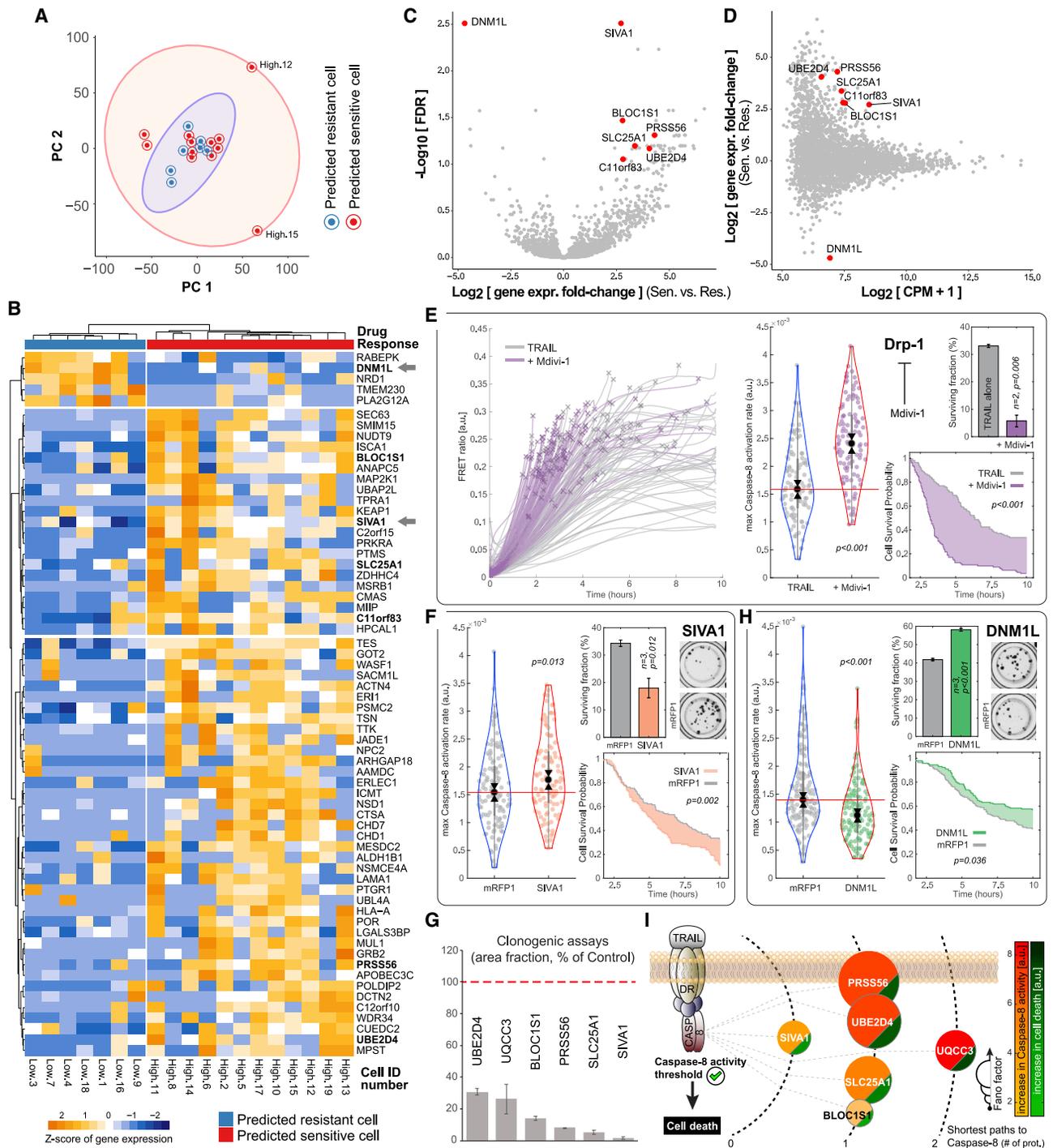


Figure 2. Fate-Seq Recovers a Drug-Efficacy Gene Signature from Unstructured Variability: Profiling TRAIL Response as a Proof of Principle
Cells selected based on their predicted phenotype 50-min post-TRAIL treatment (25 ng/mL) were assayed by single-cell RNA sequencing.

(A) Principal component analysis of the single-cell RNA-seq. Each dot represents a cell colored by its predicted phenotype. “High” refer to cells in (B).
(B) TRAIL sensitivity signature of HeLa cells: hierarchical clustering of genes (FDR < 0.1 and $|\log_2(\text{FC})| > 2$) from selected cells highlights the heterogeneity of cancer drug response information contained in isogenic cells treated together. “High” and “low” refer to the cell identifier in dataset.
(C) Volcano-plot: x axis represents the difference in average gene expression between predicted sensitive and predicted resistant cells (\log_2 scale). y axis represents the FDR ($-\log_{10}$ FDR). Red dots represent the gene candidates for functional validations.
(D) MA-plot: x axis represents the average gene expression for each gene (\log_2 CPM + 1). y axis represents the difference in gene expression between predicted sensitive (high) versus predicted resistant cells (low), \log_2 scale. Red dots represent the gene candidates for functional validations.

(legend continued on next page)

in starred-brackets Figure 1C) were captured by laser microdissection. With this, the predicted sensitive and predicted resistant cells that had been cultured in population could be directly isolated *in situ* without dissociation, immediately lysed and processed individually (one cell per tube). Barcoded cells from several experiments were then pooled for multiplexed single-cell RNA sequencing (Figure S2; QC metrics in Table S1). Since lost cells, debris, or captured doublets could not be checked by visual inspection once catapulted in the tube, stringent exclusion criteria were used after sequencing, based on UMI counts and dropout rates, supplying 19 cells for further analysis (from 54 cells collected in 8 experiments).

The devised predictive measure is of particular interest because (1) it allows to determine accurately the response phenotype of a cell before drug stimulation could induce major confounding changes in its transcriptomic profile (as shown in Figure S1B) and because (2) it allows to recover both resistant and sensitive cells, while other analyses can only compare resistant cells to an untreated sample. By coupling the prediction of a cell response to transcriptomic profiling of the same cell, fate-seq should provide a link between a cell molecular state and its resulting phenotype, with cell signatures of drug efficacy.

Fate-Seq Reveals a Drug Sensitivity Signature within Gene Expression Variability

We first validated by principal component analysis and unsupervised hierarchical clustering that predicted sensitive and resistant cells to TRAIL did not cluster in separate regions of the first two principal components landscape (Figure 2A) and that the clustering was not linked to the presence of confounding factors such as batches of single-cell collections, cell-cycle phase prediction, or even predicted phenotype (Figure S3A). These results confirmed that although the cell fate decision was already determined for these cells, their potential expression difference was

still confounded within gene expression noise when compared classically. A hierarchical clustering analysis based on the genes with the most significant biological variation, highly variable genes (Lun et al., 2016), could not recover the two predicted cell response phenotypes either (Figure S3B).

However, by grouping cells based on their predicted response phenotype, pathway enrichment analyses significantly ranked functions such as “cell death and survival” (Figure S4), indicating that we had increased the meaningful expression signal by performing differential expression analysis between our predicted cell groups. Hierarchical clustering based on the most significant differentially expressed genes (false discovery rate [FDR] < 0.1 and $|\log_2(\text{FC})| > 2$) highlighted the heterogeneity of anticancer drug sensitivity information contained in identical cells treated together and revealed the TRAIL-efficacy gene signature in HeLa cells (Figure 2B; arrows point to the top gene target of each response category. Differential expression analyses results provided in Table S2). We then derived a short list of target genes intersecting on a couple of statistical criteria (minimal FDR, minimal dropout rate, maximal fold change with sufficiently high expression levels in both predicted phenotypic responses, Figures 2C and 2D): top target genes *DNM1L* and *SIVA1* as well as *BLOC1S1*, *PRSS56*, *SLC25A1*, *UBE2D4*, and *C11orf83* (named *UQCC3* hereafter).

To initiate the functional validation of the target genes, we first used inhibitor drugs for a protein whose gene was highly expressed in predicted resistant cells. Targeting dynamin-1-like protein (DRP1), encoded by *DNM1L* (top gene target found highly expressed in resistant cells, Figures 2C and 2D), we found that both mdivi-1 and dynasore (DRP1 and dynamins inhibitors, respectively) could significantly increase TRAIL-induced caspase-8 activity (Figures 2E and S5). In addition, these treatment combinations with mdivi-1 or dynasore, consequently increased cell death response compared with TRAIL alone: shortening by

(E) Pharmacological validations of top target gene *DNM1L* using co-treatment with inhibitor drugs. Live-cell microscopy experiments evaluating the effect of Mdivi-1 (25 μM) in combination or not with TRAIL treatment (25 ng/mL) in parental cells expressing IC-RP only. FRET ratio trajectories: 266 cells were tracked in the 10-h representative experiment shown (controls shown in Figures S5E and S5F). Violin plots: maximal caspase-8 activation rate of each cell for each condition of the same representative experiment. Survival curves: cell death times of each condition in the representative experiment (event determined by morphology assessment in live-cell microscopy). Bar graphs: average cell surviving fraction at the end of the live-cell microscopy experiments (10 h, dead cell counts determined by morphology assessment) for 2 experimental repeats (547 cells were tracked in total), data are represented as mean \pm SEM.

(F) Functional validations of top differentially expressed gene *SIVA1*, using engineered cell lines: single-cell assessments of caspase-8 activation and cell survival upon treatment with TRAIL (25 ng/mL) performed by live-cell microscopy experiments evaluating the effect of overexpressing the target gene in parental HeLa cells expressing IC-RP. Control cells (mRFP1) are IC-RP parentals, overexpressing mRFP1 fluorescent protein only. Violin plots: maximal caspase-8 activation rate of each cell for each condition of one representative experiment where 276 cells were tracked. Survival curves: cell death times of each condition in the same representative experiment (event determined by morphology assessment in live-cell microscopy). Bar graphs: average cell surviving fraction at the end of the live-cell microscopy experiments (10 h, dead cell counts determined by morphology assessment) for 3 experimental repeats (831 cells were tracked in total), data are represented as mean \pm SEM. Clonogenic assays: one representative experiment of at least 3 experimental repeats of crystal-violet stained cells in 96-well plates, 1 week after a 24-h treatment with TRAIL (250 ng/mL).

(G) Average clone area fraction from at least three clonogenic assays for each cell line overexpressing a short-listed target gene *UBE2D4*, *UQCC3* (*c11orf83*), *BLOC1S1*, *PRSS56*, *SLC25A1*, and *SIVA1* compared with IC-RP parentals overexpressing mRFP1 fluorescent protein only. Crystal-violet stained cells in 96-well plates, 1 week after a 24-h treatment with TRAIL (250 ng/mL), were photographed, and the well area fraction occupied by cell colonies was evaluated in ImageJ, data are represented as mean \pm SD.

(H) Functional validations of top differentially expressed gene *DNM1L*, performed by live-cell microscopy experiments as described in (F) above. Violin plots: maximal caspase-8 activation rate of each cell for each condition of one representative experiment where 349 cells were tracked. Survival curves: cell death times of each condition in the same representative experiment (event determined by morphology assessment in live-cell microscopy). Bar graphs: average cell surviving fraction at the end of the live-cell microscopy experiments (10 h, dead cell counts determined by morphology assessment) for 3 experimental repeats (1,017 cells were tracked in total), data are represented as mean \pm SEM. Clonogenic assays: same as in (F).

(I) Diagram of the shortest paths between the target genes that increase cell death and caspase-8 on concentric half-circles with dashed lines (DR, death receptors; CASP8, caspase-8). For each gene of the TRAIL efficacy signature established in HeLa cells, the size of the colored circle is proportional to its Fano factor (variance/mean expression ratio of each gene), and the color gradients are scaled on its relative effect on caspase-8 activity and on cell death. The caspase-8 activity threshold (Roux et al., 2015, direct relationship between caspase-8 activation and cell death) is preserved for each gene.

2.2-fold the half-life of the cell population and decreasing cell survival probability below 0.1 (versus 0.32 in control cells, [Figures 2E and S5](#)). A translation inhibitor and an inhibitor for targets further down the list of differentially expressed genes were used as positive and negative controls respectively ([Figures S6 and S7](#), respectively).

We then engineered cell lines to overexpress the shortlisted genes that were found highly expressed in predicted sensitive cells: top target gene *SIVA1* as well as *BLOC1S1*, *PRSS56*, *SLC25A1*, *UBE2D4*, and *UQCC3* (*c11orf83*), all in fusion with the fluorescent protein mRFP1. Using live-cell microscopy, we compared each cell line to control cells (established in parallel but overexpressing mRFP1 only) by monitoring their caspase-8 activation and survival rates after TRAIL treatment; an average of 850 cells were tracked per gene validation. We also measured by clonogenic assays, the capacity of drug-tolerant persisters to produce cell colonies after TRAIL treatment. We found that overexpression of *SIVA1*, *PRSS56*, *SLC25A1*, *UBE2D4*, and *UQCC3*, all increased significantly the rate of caspase-8 activation induced by TRAIL ([Figures 2F and S8A](#), these observations confirmed the validity of the screening criteria). Cell sensitivity to TRAIL was correspondingly increased in engineered cell lines with these target genes. In addition, we could also validate a long-term effect of these gene perturbations, by showing that all target genes could significantly reduce the number of colonies produced by drug-tolerant persisters after a treatment with TRAIL ([Figures 2F and S8A](#), all quantifications in [Figure 2G](#)). Overexpression of *SIVA1* could also increase cell sensitivity to death receptor therapeutic antibodies such mapatumumab ($IC_{50} = 0.148$ nM versus 0.373 nM in parental cells) and drozitumab ($IC_{50} = 75.4$ versus 123.5 ng/mL in parental cells, with anti-Fc antibody cross-linking). Conversely, as expected, overexpression of *DNM1L* significantly decreased caspase-8 activation rate, cell sensitivity to TRAIL and increased the number of colonies from drug-tolerant persisters ([Figure 2H](#)), further validating the approach. A gene that was further down the list of differentially expressed genes with no statistically significant difference, *LLPH*, was used as overexpression control ([Figure S8C](#)).

Together these results showed that our same-cell functional pharmacogenomics approach allowed the identification of a set of target genes that could both predict and perturb the non-genetic drug resistance to TRAIL, constituting a drug efficacy gene signature that differ from drug-induced gene signatures.

DISCUSSION

It is now possible with the approach described here to recover cell decision information from unstructured variability in gene expression (i.e., biological noise) by monitoring the same cell across the screening from phenotype prediction to single-cell transcriptomics. We demonstrated that this approach reveals the transcriptomic profiles at the mechanistic origin of cell response, as opposed to the therapy-induced profile in resistant cells. As a proof of principle, we used this method to uncover a cell sensitivity signature to TRAIL, composed of factors regulating the population response proportioning that gives rise to drug resistance within a clonal cell population. This set of genes, *DNM1L*, *SIVA1*, *BLOC1S1*, *PRSS56*, *SLC25A1*, *UBE2D4*, and *UQCC3*, could be specifically perturbed to increase cell sensitivity to death

receptor agonists. These genes were found to participate to the fast phenotypic switching between resistant and sensitive cell states, due to the natural gene expression heterogeneity of an isogenic cell population. Clonogenic assays ultimately confirmed that stabilizing the expression of the identified target genes could rescue cell sensitivity to the drug with long-term benefits. These results, therefore, suggest that the method presented here can identify sets of biomarker candidates as well as co-drugs improving the pharmacological profiles of primary treatments that lack efficacies because of cell-to-cell variability within a cell type or clone. We also observed that the amount of expression variability of a target gene seemed correlated to its rescue capacity. Indeed, by evaluating the shortest path between the target genes and caspase-8, we found that at equal distance, the noisier (highest Fano factor) the expression in parental cells was the larger the effect a gene overexpression had on caspase-8 activity and ultimately, cell death ([Figure 2I](#), at similar variability: the longer the shortest path, the larger the effect). These observations also support the hypothesis that signaling networks utilize noise to increase population-level information transfer and regulate the overall cell population response ([Suderman et al., 2017](#)). With the shortlisted target genes validated to affect the drug response, our results suggest that same-cell functional pharmacogenomics screens, comparing isogenic cells treated together, are promising methods to reveal regulatory factors and therapeutic targets of non-genetic drug resistance, providing a substrate for developing the tools of rationale combination therapy in systems pharmacology.

Since transient non-genetic resistance is not stably inherited in sister cells (as opposed to epigenetic phenotypes [[Dawson, 2017](#)]), classic single-cell multimodal analyses of induced or inherited factors ([Bell et al., 2019](#); [Kim et al., 2018](#)) remained inappropriate to study the molecular determinant of transient resistance, where each single-cell can give rise to an equally heterogeneous cell population, invariably exhibiting the same drug response heterogeneity. With our approach, however, we started to address the long-standing question on how heterogeneous cell states can inform cell decision, by applying the method to cancer drugs transient resistance. Indeed, the question whether a cell can evade cancer treatment thanks to preexisting cellular state differences, remains unanswered owing to a fundamental limitation: the latency of the cell fate decision (the cell decision is only observable at the time when sensitive cells disappear and resistant cells emerge with an induced-genomic profile). A key aspect here is to use predictions of drug response in order to preserve all cells in the population; this allowed the analyses of responding versus non-responding cells within the same drug-sensitive population at a nearly naive transcriptional state. By studying single cells together, comparing cell response within the same population and acquiring both the response prediction with the transcriptomic profile of the same cell, our approach reveals cell decision information otherwise confounded by gene expression noise within or between cell samples.

As clinical assessment of sub-clonal heterogeneity becomes a relevant information during cancer diagnosis ([Karaayvaz et al., 2018](#)), the cellular mechanisms that regulate the cell states within a tumor clone (drug responding and non-responding states) will be critical for cancer drug development. Here, we propose a multimodal profiling methodology to pair a non-destructive

measurement, such as a pharmacological profile, to single-cell RNA sequencing. Unlike other single-cell multimodal profiling methods using microfluidics (Lane et al., 2017) or fluorescent-activated cell sorting (FACS, the most widely used solution; Stuart and Satija, 2019), our approach allows repeated measurements of the same cell in population and *in situ* to gather predictive drug response dynamics before the destructive assay. The framework, therefore, enables the identification of molecular factors causing in the incomplete response of sensitive cell types to cancer therapeutics (rather than induced factors). With the field of dynamic biomarkers growing rapidly (Liu et al., 2019), this framework is amenable to all multi-omics methods to isolate single cell based on their drug response profile and reveal sets of biomarkers or networks of molecular factors that can readily be targeted to improve the pharmacological profiles of primary treatments impaired by cellular heterogeneity.

STAR★METHODS

Detailed methods are provided in the online version of this paper and include the following:

- KEY RESOURCES TABLE
- RESOURCE AVAILABILITY
 - Lead Contact
 - Materials Availability
 - Data and Code Availability
- EXPERIMENTAL MODEL
- METHOD DETAILS
 - Plasmids and Cloning
 - Cell Line Constructions
 - Quantitative PCR
 - Cell Viability
 - Clonogenic Assays
 - Live-Cell Microscopy
 - Laser-Capture Microdissection
 - Laser-Captured Single-Cell Sequencing
 - Droplet-based Single-Cell Sequencing
- QUANTIFICATION AND STATISTICAL ANALYSIS
 - Live-Cell Imaging Analyses
 - Laser-Captured Single-Cell Analyses
 - Statistical Analyses
 - Droplet-based Single-Cell Analyses

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental Information can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.cels.2020.08.019>.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Virginie Magnone and Laure-Emmanuelle Zaragosi for help with the 10x Genomics experiments, Nadir Djerbi for the live-cell microscopy setup at the IRCAN's Molecular and Cellular Core Imaging (PICMI) Facility (supported by funding from FEDER, Conseil Régional Provence-Alpes-Côte d'Azur, Conseil Départemental 06, Cancéropôle PACA, Gis Ibisa et Inserm), as well as Maeva Gesson and Damien Alcor for the laser microdissection setup at Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire (C3M/INSERM 1065). Single-cell RNA sequencing was performed by UCAGenomiX, a partner platform of the National Infrastructure France Génomique (ANR-10-INBS-09-03 and ANR-10-INBS-09-02), with support from Conseil Départemental des Alpes Mari-

times (2016-358 294DGADSH-CV) and Cancéropôle PACA. This work was funded by a Marie Curie International Incoming Fellowship within the 7th European Community Framework Programme (proposal SysBioDRez, no. 626190, call reference: FP7- PEOPLE-2013-IF), an INCa Plan Cancer Biologie Des Systèmes, ITMO Cancer (proposal IMoDRez, no. 18CB001-00), a young investigator award (Emergence Jeunes Chercheurs), as well as a Single-cell Starting package from Cancéropôle Provence-Alpes-Côte d'Azur, the French National Cancer Institute (INCa), and the Provence-Alpes-Côte d'Azur Region, to J.R.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Investigation, M.M., M.-J.A., L.P., R.W., and J.R.; Formal Analysis, A.P., L.C.G.-P., K.L., and J.R.; Data Curation, K.L. and A.P.; Resources, B.M., P. Brest, P. Barbry, P.H., and J.R.; Methodology, R.W. and J.R.; Conceptualization, A.P. and J.R.; Writing – Original Draft, A.P. and J.R.; Writing – Review & Editing, A.P., M.-J.A., P. Brest, P. Barbry, K.L., R.W., and J.R.; Visualization, A.P. and J.R.; Funding Acquisition, J.R.; Supervision, J.R.

DECLARATION OF INTERESTS

Methods and results presented here are part of a patent application (J.R., A.P., L.C.G.-P., and M.M.). Other authors declare no competing interests.

Received: March 2, 2020

Revised: June 12, 2020

Accepted: August 28, 2020

Published: September 23, 2020

REFERENCES

- Acar, M., Mettetal, J.T., and van Oudenaarden, A. (2008). Stochastic switching as a survival strategy in fluctuating environments. *Nat. Genet.* *40*, 471–475.
- Adamson, B., Norman, T.M., Jost, M., Cho, M.Y., Nuñez, J.K., Chen, Y., Villalta, J.E., Gilbert, L.A., Horlbeck, M.A., Hein, M.Y., et al. (2016). A multiplexed single-cell CRISPR screening platform enables systematic dissection of the unfolded protein response. *Cell* *167*, 1867–1882.e21.
- Albeck, J.G., Burke, J.M., Aldridge, B.B., Zhang, M., Lauffenburger, D.A., and Sorger, P.K. (2008). Quantitative analysis of pathways controlling extrinsic apoptosis in single cells. *Mol. Cell* *30*, 11–25.
- Albeck, J.G., Mills, G.B., and Brugge, J.S. (2013). Frequency-modulated pulses of ERK activity transmit quantitative proliferation signals. *Mol. Cell* *49*, 249–261.
- Angelidis, I., Simon, L.M., Fernandez, I.E., Strunz, M., Mayr, C.H., Greiffo, F.R., Tsiiridis, G., Ansari, M., Graf, E., Strom, T.-M., et al. (2019). An atlas of the aging lung mapped by single cell transcriptomics and deep tissue proteomics. *Nat. Commun.* *10*, 963.
- Arguel, M.J., Lebrigand, K., Paquet, A., Ruiz García, S., Zaragosi, L.E., Barbry, P., and Waldmann, R. (2017). A cost effective 5' selective single cell transcriptome profiling approach with improved UMI design. *Nucleic Acids Res.* *45*, e48.
- Balázsi, G., van Oudenaarden, A., and Collins, J.J. (2011). Cellular decision making and biological noise: from microbes to mammals. *Cell* *144*, 910–925.
- Bell, C.C., Fennell, K.A., Chan, Y.C., Rambow, F., Yeung, M.M., Vassiliadis, D., Lara, L., Yeh, P., Martelotto, L.G., Rogiers, A., et al. (2019). Targeting enhancer switching overcomes non-genetic drug resistance in acute myeloid leukaemia. *Nat. Commun.* *10*, 2723.
- Datlinger, P., Rendeiro, A.F., Schmidl, C., Krausgruber, T., Traxler, P., Klughammer, J., Schuster, L.C., Kuchler, A., Alpar, D., and Bock, C. (2017). Pooled CRISPR screening with single-cell transcriptome readout. *Nat. Methods* *14*, 297–301.
- Dawson, M.A. (2017). The cancer epigenome: concepts, challenges, and therapeutic opportunities. *Science* *355*, 1147–1152.
- Dixit, A., Parnas, O., Li, B., Chen, J., Fulco, C.P., Jerby-Arnon, L., Marjanovic, N.D., Dionne, D., Burks, T., Raychowdhury, R., et al. (2016). Perturb-seq: dissecting molecular circuits with scalable single-cell RNA profiling of pooled genetic screens. *Cell* *167*, 1853–1866.e17.

- Dobin, A., Davis, C.A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., Batut, P., Chaisson, M., and Gingeras, T.R. (2013). STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* 29, 15–21.
- Eling, N., Morgan, M.D., and Marioni, J.C. (2019). Challenges in measuring and understanding biological noise. *Nat. Rev. Genet.* 20, 536–548.
- Elowitz, M.B., Levine, A.J., Siggia, E.D., and Swain, P.S. (2002). Stochastic gene expression in a single cell. *Science* 297, 1183–1186.
- Fallahi-Sichani, M., Honarnejad, S., Heiser, L.M., Gray, J.W., and Sorger, P.K. (2013). Metrics other than potency reveal systematic variation in responses to cancer drugs. *Nat. Chem. Biol.* 9, 708–714.
- Flusberg, D.A., Roux, J., Spencer, S.L., and Sorger, P.K. (2013). Cells surviving fractional killing by TRAIL exhibit transient but sustainable resistance and inflammatory phenotypes. *Mol. Biol. Cell* 24, 2186–2200.
- Forcina, G.C., Conlon, M., Wells, A., Cao, J.Y., and Dixon, S.J. (2017). Systematic quantification of population cell death kinetics in mammalian cells. *Cell Syst.* 4, 600–610.e6.
- Friedman, J.R., Lackner, L.L., West, M., DiBenedetto, J.R., Nunnari, J., and Voeltz, G.K. (2011). ER tubules mark sites of mitochondrial division. *Science* 334, 358–362.
- Gonzalez, F., and Ashkenazi, A. (2010). New insights into apoptosis signaling by Apo2L/TRAIL. *Oncogene* 29, 4752–4765.
- Holland, P.M. (2014). Death receptor agonist therapies for cancer, which is the right TRAIL? *Cytokine Growth Factor Rev.* 25, 185–193.
- Jaitin, D.A., Kenigsberg, E., Keren-Shaul, H., Elefant, N., Paul, F., Zaretsky, I., Mildner, A., Cohen, N., Jung, S., Tanay, A., and Amit, I. (2014). Massively parallel single-cell RNA-seq for marker-free decomposition of tissues into cell types. *Science* 343, 776–779.
- Karaayvaz, M., Cristea, S., Gillespie, S.M., Patel, A.P., Mylvaganam, R., Luo, C.C., Specht, M.C., Bernstein, B.E., Michor, F., and Ellisen, L.W. (2018). Unravelling subclonal heterogeneity and aggressive disease states in TNBC through single-cell RNA-seq. *Nat. Commun.* 9, 3588.
- Kim, C., Gao, R., Sei, E., Brandt, R., Hartman, J., Hatschek, T., Crosetto, N., Foukakis, T., and Navin, N.E. (2018). Chemoresistance evolution in triple-negative breast cancer delineated by single-cell sequencing. *Cell* 173, 879–893.e13.
- Lane, K., Van Valen, D., DeFelice, M.M., Macklin, D.N., Kudo, T., Jaimovich, A., Carr, A., Meyer, T., Pe'er, D., Boutet, S.C., and Covert, M.W. (2017). Measuring signaling and RNA-seq in the same cell links gene expression to dynamic patterns of NF- κ B activation. *Cell Syst.* 4, 458–469.e5.
- Liu, C., He, H., Li, X., Su, M.A., and Cao, Y. (2019). Dynamic metrics-based biomarkers to predict responders to anti-PD-1 immunotherapy. *Br. J. Cancer* 120, 346–355.
- Loewer, A., Karanam, K., Mock, C., and Lahav, G. (2013). The p53 response in single cells is linearly correlated to the number of DNA breaks without a distinct threshold. *BMC Biol.* 11, 114.
- Lun, A.T.L., McCarthy, D.J., and Marioni, J.C. (2016). A step-by-step workflow for low-level analysis of single-cell RNA-seq data with Bioconductor. *F1000Res.* 5, 2122.
- Macosko, E.Z., Basu, A., Satija, R., Nemes, J., Shekhar, K., Goldman, M., Tirosh, I., Bialas, A.R., Kamitaki, N., Martersteck, E.M., et al. (2015). Highly parallel genome-wide expression profiling of individual cells using nanoliter droplets. *Cell* 161, 1202–1214.
- Marusyk, A., Almendro, V., and Polyak, K. (2012). Intra-tumour heterogeneity: a looking glass for cancer? *Nat. Rev. Cancer* 12, 323–334.
- McCarthy, D.J., Chen, Y., and Smyth, G.K. (2012). Differential expression analysis of multifactor RNA-seq experiments with respect to biological variation. *Nucleic Acids Res.* 40, 4288–4297.
- Mitchell, S., Roy, K., Zangle, T.A., and Hoffmann, A. (2018). Nongenetic origins of cell-to-cell variability in B lymphocyte proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 115, E2888–E2897.
- Paek, A.L., Liu, J.C., Loewer, A., Forrester, W.C., and Lahav, G. (2016). Cell-to-cell variation in p53 dynamics leads to fractional killing. *Cell* 165, 631–642.
- Purvis, J.E., Karhohs, K.W., Mock, C., Batchelor, E., Loewer, A., and Lahav, G. (2012). p53 dynamics control cell fate. *Science* 336, 1440–1444.
- Raj, A., and van Oudenaarden, A. (2008). Nature, nurture, or chance: stochastic gene expression and its consequences. *Cell* 135, 216–226.
- Ramirez, M., Rajaram, S., Steininger, R.J., Osipchuk, D., Roth, M.A., Morinishi, L.S., Evans, L., Ji, W., Hsu, C.H., Thurley, K., et al. (2016). Diverse drug-resistance mechanisms can emerge from drug-tolerant cancer persister cells. *Nat. Commun.* 7, 10690.
- Revinski, D.R., Zaragosi, L.E., Boutin, C., Ruiz-Garcia, S., Deprez, M., Thomé, V., Rosnet, O., Gay, A.S., Mercey, O., Paquet, A., et al. (2018). CDC20B is required for deuterosome-mediated centriole production in multiciliated cells. *Nat. Commun.* 9, 4668.
- Reyes, J., and Lahav, G. (2018). Leveraging and coping with uncertainty in the response of individual cells to therapy. *Curr. Opin. Biotechnol.* 51, 109–115.
- Roux, J., Hafner, M., Bandara, S., Sims, J.J., Hudson, H., Chai, D., and Sorger, P.K. (2015). Fractional killing arises from cell-to-cell variability in overcoming a caspase activity threshold. *Mol. Syst. Biol.* 11, 803.
- Rubin, A.J., Parker, K.R., Satpathy, A.T., Qi, Y., Wu, B., Ong, A.J., Mumbach, M.R., Ji, A.L., Kim, D.S., Cho, S.W., et al. (2019). Coupled single-cell CRISPR screening and epigenomic profiling reveals causal gene regulatory networks. *Cell* 176, 361–376.e17.
- Saint, M., Bertaux, F., Tang, W., Sun, X.M., Game, L., Köferle, A., Bähler, J., Shahrezaei, V., and Marguerat, S. (2019). Single-cell imaging and RNA sequencing reveal patterns of gene expression heterogeneity during fission yeast growth and adaptation. *Nat. Microbiol.* 4, 480–491.
- Salgia, R., and Kulkarni, P. (2018). The genetic/non-genetic duality of drug “resistance” in cancer. *Trends Cancer* 4, 110–118.
- Santos, S.D.M., Verveer, P.J., and Bastiaens, P.I.H. (2007). Growth factor-induced MAPK network topology shapes Erk response determining PC-12 cell fate. *Nat. Cell Biol.* 9, 324–330.
- Shaffer, S.M., Dunagin, M.C., Torborg, S.R., Torre, E.A., Emert, B., Krepler, C., Beqiri, M., Sproesser, K., Brafford, P.A., Xiao, M., et al. (2017). Rare cell variability and drug-induced reprogramming as a mode of cancer drug resistance. *Nature* 546, 431–435.
- Sharma, S.V., Lee, D.Y., Li, B., Quinlan, M.P., Takahashi, F., Maheswaran, S., McDermott, U., Azizian, N., Zou, L., Fischbach, M.A., et al. (2010). A chromatin-mediated reversible drug-tolerant state in cancer cell subpopulations. *Cell* 141, 69–80.
- Spencer, S.L., Gaudet, S., Albeck, J.G., Burke, J.M., and Sorger, P.K. (2009). Non-genetic origins of cell-to-cell variability in TRAIL-induced apoptosis. *Nature* 459, 428–432.
- Stoeckius, M., Hafemeister, C., Stephenson, W., Houck-Loomis, B., Chattopadhyay, P.K., Swerdlow, H., Satija, R., and Smibert, P. (2017). Simultaneous epitope and transcriptome measurement in single cells. *Nat. Methods* 14, 865–868.
- Stoeckius, M., Zheng, S., Houck-Loomis, B., Hao, S., Yeung, B.Z., Mauck, W.M., Smibert, P., and Satija, R. (2018). Cell Hashing with barcoded antibodies enables multiplexing and doublet detection for single cell genomics. *Genome Biol.* 19, 224.
- Stuart, T., Butler, A., Hoffman, P., Hafemeister, C., Papalexi, E., Mauck, W.M., Hao, Y., Stoeckius, M., Smibert, P., and Satija, R. (2019). Comprehensive integration of single-cell data. *Cell* 177, 1888–1902.e21.
- Stuart, T., and Satija, R. (2019). Integrative single-cell analysis. *Nat. Rev. Genet.* 20, 257–272.
- Su, Y., Wei, W., Robert, L., Xue, M., Tsoi, J., Garcia-Diaz, A., Homet Moreno, B., Kim, J., Ng, R.H., Lee, J.W., et al. (2017). Single-cell analysis resolves the cell state transition and signaling dynamics associated with melanoma drug-induced resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 114, 13679–13684.
- Suderman, R., Bachman, J.A., Smith, A., Sorger, P.K., and Deeds, E.J. (2017). Fundamental trade-offs between information flow in single cells and cellular populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 114, 5755–5760.
- Süel, G.M., Garcia-Ojalvo, J., Liberman, L.M., and Elowitz, M.B. (2006). An excitable gene regulatory circuit induces transient cellular differentiation. *Nature* 440, 545–550.

STAR★METHODS

KEY RESOURCES TABLE

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
Antibodies		
A0251 anti-human Hashtag 1 Antibody	Biologend	cat# 394601
A0252 anti-human Hashtag 2 Antibody	Biologend	cat# 394603
A0253 anti-human Hashtag 3 Antibody	Biologend	cat# 394605
A0254 anti-human Hashtag 4 Antibody	Biologend	cat# 394607
A0255 anti-human Hashtag 5 Antibody	Biologend	cat# 394609
ANTI-DR5 (PRO95780 (DROZITUMAB)) HUMAN IGM	Interchim	cat# AB00740-15.0
Mapatumumab	Creative biolabs	cat# TAB-H48
AffiniPure F(ab') ₂ Fragment Donkey Anti-Human IgG, Fc _γ fragment specific	Jackson ImmunoResearch Europe Ltd	RRID: AB_2340485, cat# 709-006-098
Bacterial and Virus Strains		
pQCXIX (retroviral vector)	Clontech Takara Bio	cat# 631515
pQCXIX mCherry (retroviral vector)	this manuscript	N/A
pQCXIX mCherry-DNM1L (retroviral vector)	this manuscript	N/A
pMSCV-pBabeMCS-IRES-RFP (retroviral vector)	Addgene	RRID: Addgene_33337
pMSCV-BLOC1S1-IRES-RFP (retroviral vector)	this manuscript	N/A
pMSCV-LLPH-IRES-RFP (retroviral vector)	this manuscript	N/A
pMSCV-PRSS56-IRES-RFP (retroviral vector)	this manuscript	N/A
pMSCV-SIVA1-IRES-RFP (retroviral vector)	this manuscript	N/A
pMSCV-SLC25A1-IRES-RFP (retroviral vector)	this manuscript	N/A
pMSCV-UBE2D4-IRES-RFP (retroviral vector)	this manuscript	N/A
pMSCV-UQCC3-IRES-RFP (retroviral vector)	this manuscript	N/A
Chemicals, Peptides, and Recombinant Proteins		
Cycloheximide	R&D Systems Europe	cat# 0970
Dynasore	ENZO Life Science	cat# ALX-270-502
Mdivi-1	ENZO Life Science	cat# BML-CM127
Hoechst 33342 dye	Thermo Fisher Scientific	cat# H3570
Recombinant human (rh) TRAIL	R&D Systems Europe	cat# 375-TEC/CF
Tin protoporphyrin IX dichloride	R&D Systems Europe	cat# 0747
Critical Commercial Assays		
Master Mix Fast SYBR green	Thermo Fisher Scientific	cat# 4385618
CellTiter-Glo Luminescent Assay	Promega	cat# G7570
Chromium Single Cell 3' Reagent Kit, V2 Chemistry	10X Genomics	cat# 120237
RNeasy kit	Qiagen	cat# 74106
High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Thermo Fisher Scientific	cat# 4368813
Deposited Data		
10X Genomics, RNA sequencing processed data files	this manuscript	Mendeley data Dataset: https://doi.org/10.17632/m289yp5skd.1
Fate-seq differential analysis results (edgeR)	this manuscript	Table S2
10X Genomics differential analysis results from the pseudo-bulk analyses (TRAIL time, dose)	this manuscript	Table S3
fate-seq RNA sequencing raw data GEO, GSE138832	this manuscript	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE138832
10X Genomics, RNA sequencing raw data GEO, GSE138833	this manuscript	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE138833

(Continued on next page)

Continued

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
Experimental Models: Cell Lines		
HeLa IC-RP, mCherry (human)	this manuscript	N/A
HeLa IC-RP, mCherry-DNM1L (human)	this manuscript	N/A
HeLa IC-RP, RFP (human)	this manuscript	N/A
HeLa IC-RP, BLOC1S1, RFP (human)	this manuscript	N/A
HeLa IC-RP, LLPH, RFP (human)	this manuscript	N/A
HeLa IC-RP, PRSS56, RFP (human)	this manuscript	N/A
HeLa IC-RP, SIVA1, RFP (human)	this manuscript	N/A
HeLa IC-RP, SLC25A1, RFP (human)	this manuscript	N/A
HeLa IC-RP, UBE2D4, RFP (human)	this manuscript	N/A
HeLa IC-RP, UQCC3, RFP (human)	this manuscript	N/A
HeLa IC-RP (human)	(Roux et al., 2015)	N/A
Oligonucleotides		
Target gene primers for qPCR	this manuscript	Table S7
Cell ID barcodes	this manuscript	Table S4
Isolated single cell library primers	this manuscript	Table S5
Target gene primers for cloning	this manuscript	Table S6
Software and Algorithms		
Ingenuity Pathway Analysis (IPA, QIAGEN Inc).	QIAGEN Inc	https://digitalinsights.qiagen.com/
R code for RNA sequencing data analyses	this manuscript	Github repository: https://github.com/jrxlab/fate-seq_proc
STAR	(Dobin et al., 2013)	v2.4.0a
Drop-seq tools	(Macosko et al., 2015)	v1.0
ImageJ	https://imagej.nih.gov/ij/	v1.5.2
Fiji	https://fiji.sc/	v2
Cell Ranger Single-Cell Software Suite	10X Genomics	v3.0.2
R	https://www.r-project.org/	v3.6.1

RESOURCE AVAILABILITY

Lead Contact

Further information and requests for resources and reagents should be directed to and will be fulfilled by the Lead Contact, Jeremie Roux (jeremie.roux@univ-cotedazur.fr).

Materials Availability

Plasmids and cell lines generated in this study are available from the Lead Contact upon request, with an MTA when required.

Data and Code Availability

10X Genomics RNA sequencing processed data files have been deposited to Mendeley Data (<https://doi.org/10.17632/m289yp5skd.1>). Fate-seq RNA sequencing and 10X Genomics raw data can be accessed on GEO (accession # GSE138832 and GSE138833 respectively): <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE138832>, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE138833>.

R code for RNA sequencing data analyses is available at: https://github.com/jrxlab/fate-seq_proc.

EXPERIMENTAL MODEL

HeLa cells (derived from human, female cervix adenocarcinoma) were obtained from the ATCC and cultured in DMEM Glutamax supplemented with 10% fetal bovine serum and penicillin/streptomycin (Thermo Fisher Scientific, France) or in phenol red-free DMEM Glutamax supplemented with 10% fetal bovine serum and penicillin / streptomycin (Thermo Fisher Scientific, France) during live-cell imaging. The parental cells and its derived subclones and engineered cell lines tested negatively for mycoplasma contamination.

METHOD DETAILS

Plasmids and Cloning

mRFP1 versions of *BLOC1S1*, *DNM1L*, *LLPH*, *PRSS56*, *SIVA1*, *SLC25A1*, *UBE2D4*, *UQCC3* (*C11orf83*) were constructed by PCR from ORF Clones in pcDNA3.1+/C-(K)-DYK vectors (GenScript Biotech B.V., Netherlands) or from mCh-Drp1 (a gift from Gia Voeltz (Friedman et al., 2011), Addgene plasmid # 49152), all with mRFP1 in position 2 after the IRES (transcriptional fusion) in pMSCV-pBabeMCS-IRES-RFP (a gift from Martine Roussel & Charles Sherr, Addgene plasmid # 33337) and in pQCXIX (Clontech Takara Bio, France). Primers for subcloning can be found in Table S6.

Cell Line Constructions

HeLa cells stably expressing IC-RP (Roux et al., 2015) were used for all cell lines constructions, freshly cloned cells were used in all experiments (below passage 10). *BLOC1S1*, *DNM1L*, *LLPH*, *PRSS56*, *SIVA1*, *SLC25A1*, *UBE2D4*, *UQCC3* (*C11orf83*) with mRFP1 cells (transcriptional fusion) were obtained by infection with retrovirus (Retro-X system, Clontech Takara Bio, France) of the respective mRFP1 fusion gene into the parental clone of HeLa IC-RP cells. After infection, positive cells were enriched by FACS sorting but not sub-cloned to avoid the selection of a particular clone and to allow the emergence of a population of cells expressing various amount of each mRFP1 tagged protein.

Quantitative PCR

Cells were washed twice with cold PBS, lysed and frozen in Trizol (TR-118; Euromedex, Souffelweyersheim, France). RNA was extracted using a RNeasy kit (74106, QIAGEN Inc). RNA concentration was determined by measuring absorbance at 260/280 nm. RNA was reverse transcribed to cDNA using High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (4368813; Thermo Fisher Scientific, France). Quantitative PCR was performed with 50 ng cDNA, 500 nM primer, and Master Mix Fast SYBR green (4385618; Thermo Fisher Scientific, France). Primers are listed in the Table S7.

Cell Viability

Viable cells were determined using CellTiter-Glo® Luminescent Assay (Promega, Madison, USA) or directly counted using Hoechst stain. Briefly, 2×10^3 cells/well were added to the 96-well plate before being treated 24 hr later with TRAIL in a DMEM medium supplemented with 10% of FBS. After 15 hours of TRAIL treatment, the CellTiter-Glo® buffer and substrate, but also the 96-well plate were all equilibrated to room temperature prior to use. Buffer and substrate were mixed and a volume equal to the volume of cell culture medium present in each well, was directly added to the plate. The plate was then mixed on an orbital shaker to induce cell lysis and finally read with a luminometer (2104 EnVision® Multilabel Plate Reader, PerkinElmer). For Hoechst staining, a final concentration of 2.5 µg/ml Hoechst 33342 dye (Thermo Fisher Scientific, France) was added after the TRAIL treatment, to each well and incubated for 15 min in the dark at 37°C. Finally, the viability was quantified on images acquired with a fluorescence microscope (EVOS FL, AMG with 10x magnification), using Fiji software.

Clonogenic Assays

Cells were plated on a 96-well plate. After 24h, there were treated with a saturating dose of TRAIL (250ng/mL) and let grown for colony formation. After one week medium was removed and wells were washed with PBS. Colonies were both fixed and stained with a solution of 3.7% paraformaldehyde and 0.5% crystal violet in phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.2) for 30 minutes, then washed three times with PBS. The 96-well plate was kept at room temperature and quantified using Fiji software.

Live-Cell Microscopy

Clonal HeLa cells stably expressing the FRET-based initiator caspase reporter (IC-RP) were seeded into FrameSlides PET (Carl Zeiss, France) or 96-well plates, coated with rat-tail collagen I (Thermo Fisher Scientific, France). Cells in phenol red-free DMEM Glutamax supplemented with 10% fetal bovine serum and penicillin / streptomycin (Thermo Fisher Scientific, France), were imaged every 3 min for up to 24 hours in the temperature/CO₂-controlled environmental chamber of a DeltaVision Elite microscope (GE Healthcare Life Sciences, Velizy-Villacoublay, France), with a 20x objective (NA = 0.75) in transmitted light and using the following solid-state illumination excitation wavelengths and single bandpass emission filters : for CFP (Ex. 438/24 nm / Em. 475-24 nm), YFP (Ex. 513/17 nm / Em. 548/22 nm). In addition to the time-lapse runs, cells stably expressing our target proteins tagged with mRFP1 or mCherry, were imaged at the beginning of the experiment for mCherry (Ex. 575/25 nm / Em. 625-45 nm).

Laser-Capture Microdissection

Right after a 50-minute live-cell microscopy, the reaction was stopped by replacing the FrameSlide cell media with PBS Ca²⁺/Mg²⁺ at 4dC, and non-contact laser capture microdissection was performed with a Zeiss PALM MicroBeam (Carl Zeiss, France). Cells were ranked based on their caspase-8 activation rates at 50 minutes, determined by live-cell microscopy image and signal analyses, to select high and low responding cells, and their xy coordinates were converted to position the Zeiss RoboStage accordingly (using scripts developed in house). Chosen single-cells were then catapulted into 0.2 ml domed caps tube (strips) containing 4.3 µl of lysis buffer (0,2% w/v Tween 20, 1.5U/µl Promega RNaseIN Plus). Tubes were kept on ice and frozen in dry ice directly after collection to minimize RNA degradation during sample collection and transport.

Laser-Captured Single-Cell Sequencing

cDNA Preparation

Samples were thawed on ice and 2.43 μ l of a mix containing 10,000 molecules Life Technologies ERCC spike-In Mix 1, 2.5 mM dNTPs, and 3.7 μ M single barcoded reverse transcription primer (Table S4) was added to each tube, incubated for 10 min at room temperature, 3 min at 70°C and cooled to 10°C. Immediately after lysis, 8.27 μ l 1.8X reverse transcription buffer (Invitrogen), 4.53 mM DTT, 1.8M Betaine, 10.8 mM MgCl₂, 3.62 μ M template switching oligonucleotide, 0.6 U/ μ l Promega RNase IN Plus, 7.5 U/ μ l Invitrogen SuperScript II reverse transcriptase were added and samples were reverse transcribed 10 min at 25°C, 90 min at 42°C, 15 min at 70°C and kept at 10°C until PCR amplification. Samples were PCR amplified (KAPA HiFi Hotstart) in 31 μ l for 20 cycles with 0.8 μ M forward PCR primer, 0.8 μ M biotinylated reverse PCR primer (primer sequences in Table S5). Samples were incubated 3 min at 98°C followed by 20 cycles at 98°C for 20 sec, 64°C for 15 sec, 72°C for 6 min followed by a final extension for 5 min at 72°C. After PCR amplification, samples were pooled and purified with 0.8X Beckman Coulter SPRIselect beads, washed once with 85% EtOH and eluted in 30 μ l.

Library Preparation

Batches of barcoded cDNAs were pooled, purified with SPRIselect beads (0.8x) and eluted in 12 μ l. Nine μ l (typically 10 – 20 ng of cDNA) were used for tagmentation and Illumina library preparation as previously described (Arguel et al., 2017).

Sequencing

Libraries were sequenced with a NextSeq 500/550 High Output v2 kit (75 cycles) that allows up to 91 cycles with an index1 read of 20 nt. (8-bp cell barcode and 12 bp UMI) and a read1 of 71 nt. for cDNA sequencing, with custom sequencing primers as described in (Arguel et al., 2017).

Droplet-based Single-Cell Sequencing

Single-Cell Preparation

Clonal HeLa cells stably expressing the FRET-based initiator caspase reporter (IC-RP) were cultured in 6-well plates for 24 hours and then treated with TRAIL. Right after treatments, cells from each treatment conditions, were detached with trypsin (filtered, counted) and incubated with Hashtag antibodies (Biolegend TotalSeq™, San Diego, CA) for 20 min at 4 dC. Live cells from each treatment conditions were then counted and merged into one sample according to the manufacturer's recommendations (10x Genomics, Netherlands). Cell Hashing protocol with Hashtag oligonucleotide (HTO) was then conducted with 10x Genomics single-cell 3' V2 chemistry to generate single-cell emulsion.

Single-Cell and Hashtag Oligo Sequencing

Single-cell RNA-seq was performed following manufacturer's protocol (Chromium™ Single Cell 3' Reagent Kit, V2 Chemistry) to obtain single cell 3' libraries for Illumina sequencing. PCR of 12 cycles was performed for cDNA amplification with HTO primer (Stoeckius et al., 2018). Final cDNA library was then pooled with 10% of HTO library in final pool for sequencing.

Libraries were sequenced with a NextSeq 500/550 High Output v2 kit (75 cycles) that allows up to 91 cycles of paired-end sequencing: Read 1 had a length of 26 bases that included the cell barcode and the UMI; Read 2 had a length of 57 bases that contained the cDNA insert; Index reads for sample index of 8 bases. Cell Ranger Single-Cell Software Suite v3.0.2 was used to perform demultiplexing of individual cells, barcode processing and single-cell 3' gene counting using standards default parameters and human build GRCh38.

Hashtag Library Preparation and Analysis

For HTO library preparation, 10 cycles of PCR amplification (Stoeckius et al., 2018) followed by a size selection with Blue Pippin 3% agarose gel cassette (BDQ3010) Marker Q3 were necessary to select 180bp specific amplicon. We used the following sample barcodes from BioLegend: A0251: GTCAACTCTTAGCG, A0252: TGATGGCCTATTGGG, A0253: TTCCGCCTCTTTTG, A0254: AGTAAGTTCAGCGTA, A0255: AAGTATCGTTTCGCA. Antibody hashtags counting was done using CITE-seq-Count (Stoeckius et al., 2017) using standard 10X Genomics parameters “-cbf 1 -cbl 16 -umif 17 -umil 26 -hd 2” and barcode “-whitelist” from Cell Ranger analysis.

QUANTIFICATION AND STATISTICAL ANALYSIS

Live-Cell Imaging Analyses

For the analysis of the FRET signal, the background-subtracted CFP and YFP images were divided to get a ratiometric image (CFP/YFP) using ImageJ and custom plug-ins to track cells (Albeck et al., 2008). Signals were normalized by subtracting the minimum value across all time points from each single-cell time course and the average trajectory of the corresponding drug vehicle-treated cells. Cell death times were determined by visual inspection, for each corresponding cell trajectory with the transmitted light image stacks and used to determine population cell viability. Cell death assessment was performed by visual inspection in transmitted light of the cell morphology change, cell death time was marked and used for cell death counts. Caspase-8 activation rates were determined from CFP/YFP ratio trajectories, as described before (Roux et al., 2015).

Statistical Analyses on Live-Cell Experiments

Independent replicate numbers (n) are reported in the corresponding figure panels. Statistical significance of the difference in maximal activation rates was assessed using Wilcoxon rank sum test, statistical significance of the surviving fractions in experiments repeats was assessed using two-sample t-test, and Cell Survival probabilities (Empirical Survivor Function, ecdf) were compared with a two-sample Kolmogorov-Smirnov test.

Laser-Captured Single-Cell Analyses Bioinformatics Analyses

Mapping of cDNA reads was performed using STAR against human hg19 build following encode RNA-seq recommendations (Dobin et al., 2013). Drop-seq tools (Macosko et al., 2015) was then used to tag SAM records with cell barcode (XC) and molecule identifier (XM) extracted from index1 reads. Gene name tag (GE) were also added using Drop-seq (TagReadWithGeneExon pipeline) and Ensembl reference GRCh37.75 prior to digital expression count matrix production using an edit distance of 1 (DigitalExpression pipeline).

Statistical Analyses

Exploratory analysis of single-cell RNA-seq data was performed for quality control. Poor quality cells, based on high dropout rate and outlier total UMI counts (number of UMI < 40,000 or > 220,000), were excluded from the final dataset to avoid including damaged cells and doublets that could not be detected during laser capture microdissection. Library size normalization and highly variable genes selection were performed using the R package scran (Lun et al., 2016). Cell-cycle assessment was performed using the algorithm described before (Macosko et al., 2015), based on our curated gene sets (Revinski et al., 2018). Hierarchical clustering and heatmaps were generated using the R package pheatmap, using Euclidean distance and Ward.D method unless otherwise specified. Differential analysis was performed using the edgeR likelihood ratio test framework (McCarthy et al., 2012). P-values were adjusted for multiple testing using the Benjamini-Hochberg method. Molecular function enrichment analyses were performed using Ingenuity Pathway Analysis (IPA, QIAGEN Inc).

Droplet-based Single-Cell Analyses

Hashtag Demultiplexing and Preprocessing

Single-cell RNA-seq and hashtag data were analyzed using the R toolkit Seurat V3 (Stuart et al., 2019) and custom R scripts. Hashtag counts were normalized using the CLR method, then cell barcodes were demultiplexed and doublet and negative cells were excluded using the HTODemux function with parameter positive.quantile = 0.95. Low quality cells were excluded from the dataset based on the following criteria: number of genes detected < 2,000, percentage of UMI mapping to mitochondrial genes > 5% or number of UMIs < 10,000. The final numbers of cells included were: 1,529 for control sample, 1,481 for TRAIL 50 min 25 ng/ml, 1,631 for TRAIL 120 min 10 ng/ml, 1,804 for TRAIL 120 min 25 ng/ml and 2,115 for TRAIL 120 min 40 ng/ml. Cell cycle scores were calculated using Seurat CellCycleScoring function, based on previously published gene sets (Revinski et al., 2018). Each sample was first normalized to 10,000 UMIs, and variable features were selected using the vst method.

Analysis of Control and TRAIL 50-min Samples

Analysis of individual samples was performed using the standard Seurat workflow based on a number of PC = 10 and SNN/Louvain clustering with resolution parameter res=0.3.

Integration of Control and Treated Samples

We used the Seurat V3 data integration pipeline to analyze all 5 samples together (Stuart et al., 2019). Integration was performed based on the first 20 CCA dimensions, and a regression of the G2M, S scores and total number of RNA molecules was included to remove the effects of cell cycle and sequencing depth. PCA was used as dimensionality reduction technique, and the number of PCs to include in downstream analyses was set based on inspection of the elbow plot. A resolution of 0.1 was used for the SNN/Louvain clustering. Significance of differential expression analysis between clusters or between experimental conditions was performed using Wilcoxon Rank Sum test using the FindMarker function. MA-plot between experimental conditions were generated using average gene expression values estimated using the AverageExpression function.

Pseudo-Bulk Analysis

Two pseudo-bulk samples were constructed from each single cell sample by randomly selecting 700 cells (without replacement) among all cells passing quality filter, then, we calculated the UMI count value for each gene by adding the UMIs counts corresponding to this gene from these 700 cells. Statistical analysis of bulk samples was performed using the R package edgeR (McCarthy et al., 2012). Library size differences normalization factors were calculated using the TMM method. Differential analysis was performed using the likelihood ratio test. Pvalues were adjusted for multiple testing using the Benjamini-Hochberg method. Heatmaps were generated using the R package pheatmap. Gene set enrichment analysis was performed using the package fgsea.

Transcriptional Noise Analysis

Raw single cell count data was used for this analysis. The following preprocessing was applied in order to account for differences in sequencing depth for each cell and for differences in the number of single-cell captured for each sample. First, we started by randomly selecting 1000 cells among all cells with at least 15,000 UMIs in each sample. Then, for each cell, the number of UMIs was downsampled to 15,000 using the SampleUMI function in Seurat. For each sample, the transcriptional noise was measured as $1 - \rho$, where ρ is the Spearman correlation coefficient between 2 cells, for all possible pairs of cells in this sample (Angelidis et al., 2019).

Cell Systems, Volume 11

Supplemental Information

Profiling the Non-genetic Origins of Cancer Drug

Resistance with a Single-Cell Functional Genomics

Approach Using Predictive Cell Dynamics

Mickael Meyer, Agnès Paquet, Marie-Jeanne Arguel, Ludovic Peyre, Luis C. Gomes-Pereira, Kevin Lebrigand, Baharia Mograbi, Patrick Brest, Rainer Waldmann, Pascal Barbry, Paul Hofman, and Jérémie Roux

Cell Systems, Volume 11

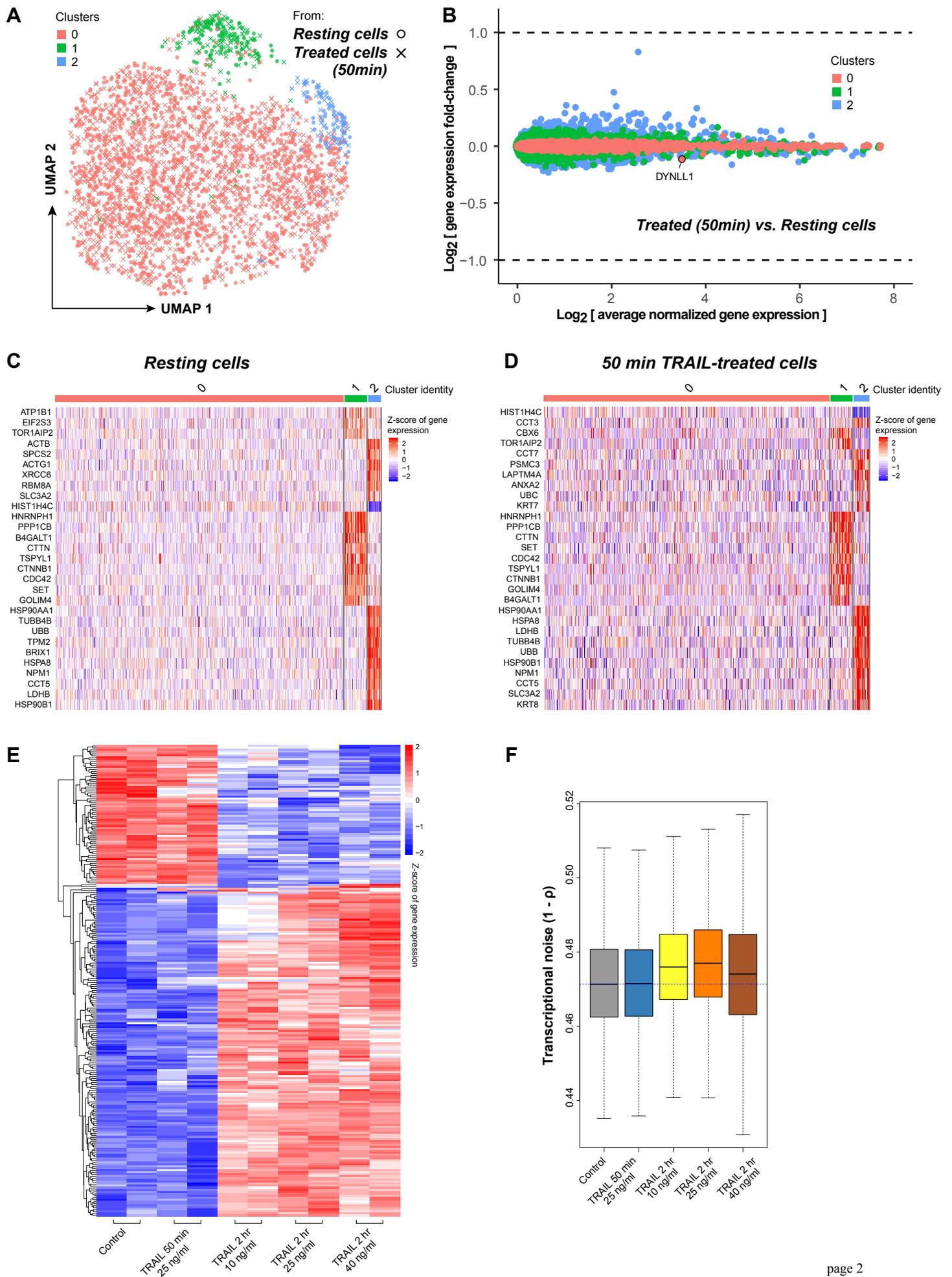
Supplemental Information

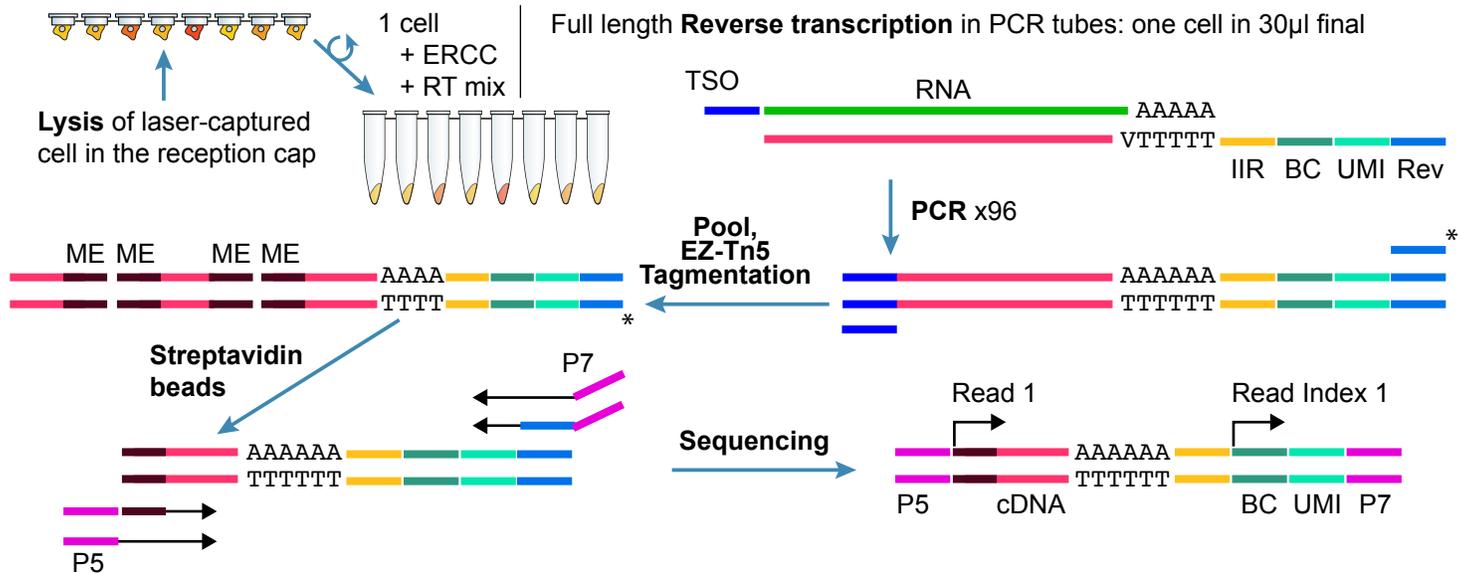
Profiling the Non-genetic Origins of Cancer Drug

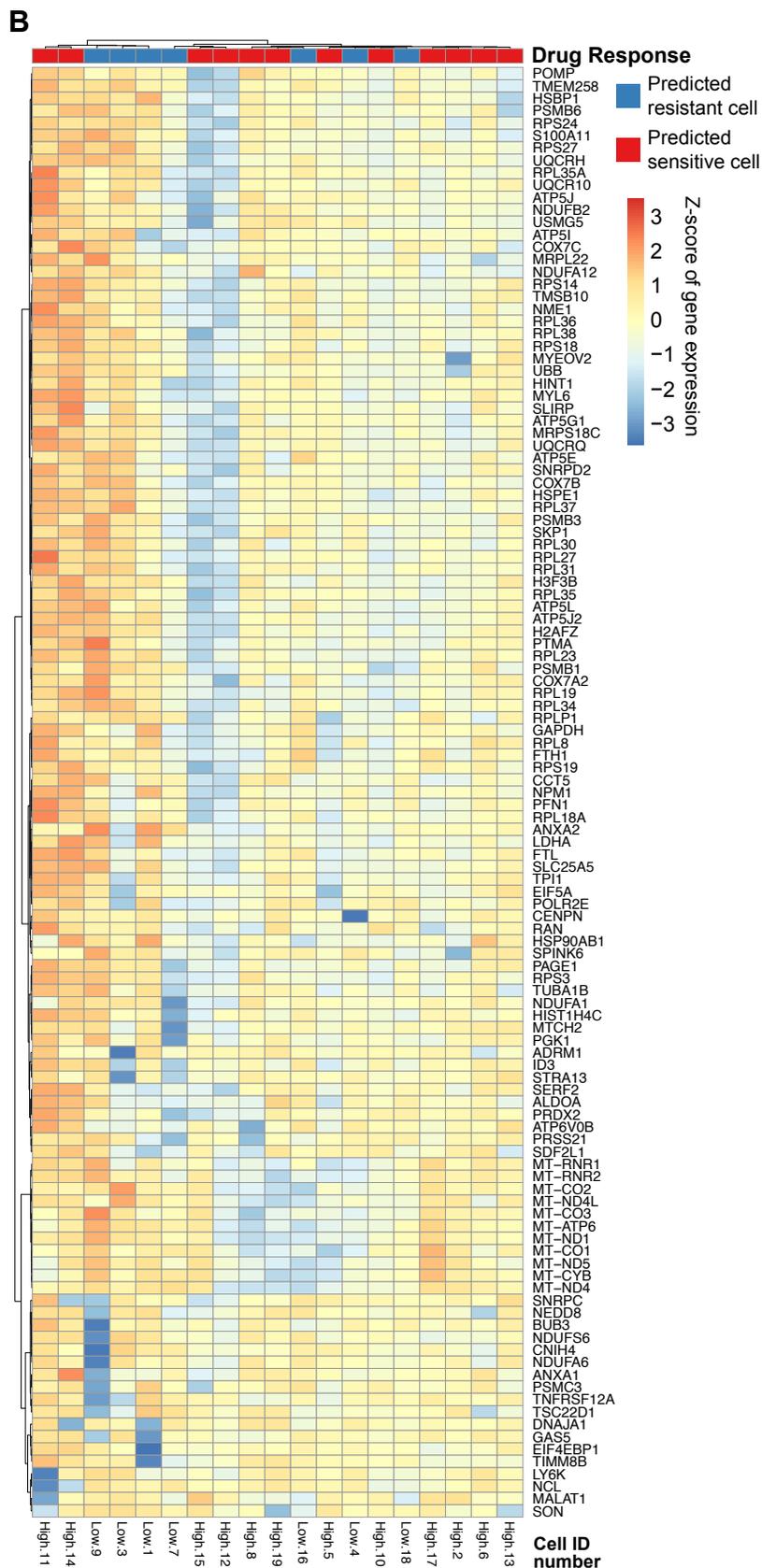
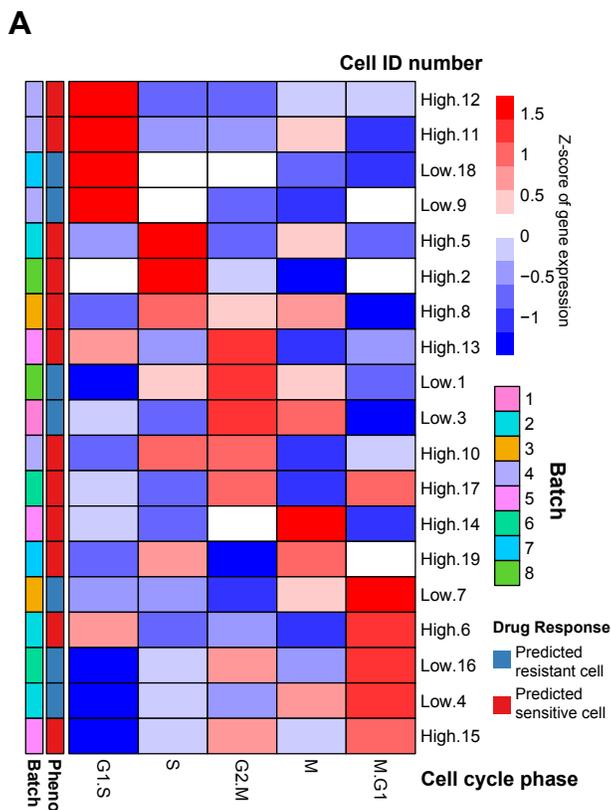
Resistance with a Single-Cell Functional Genomics

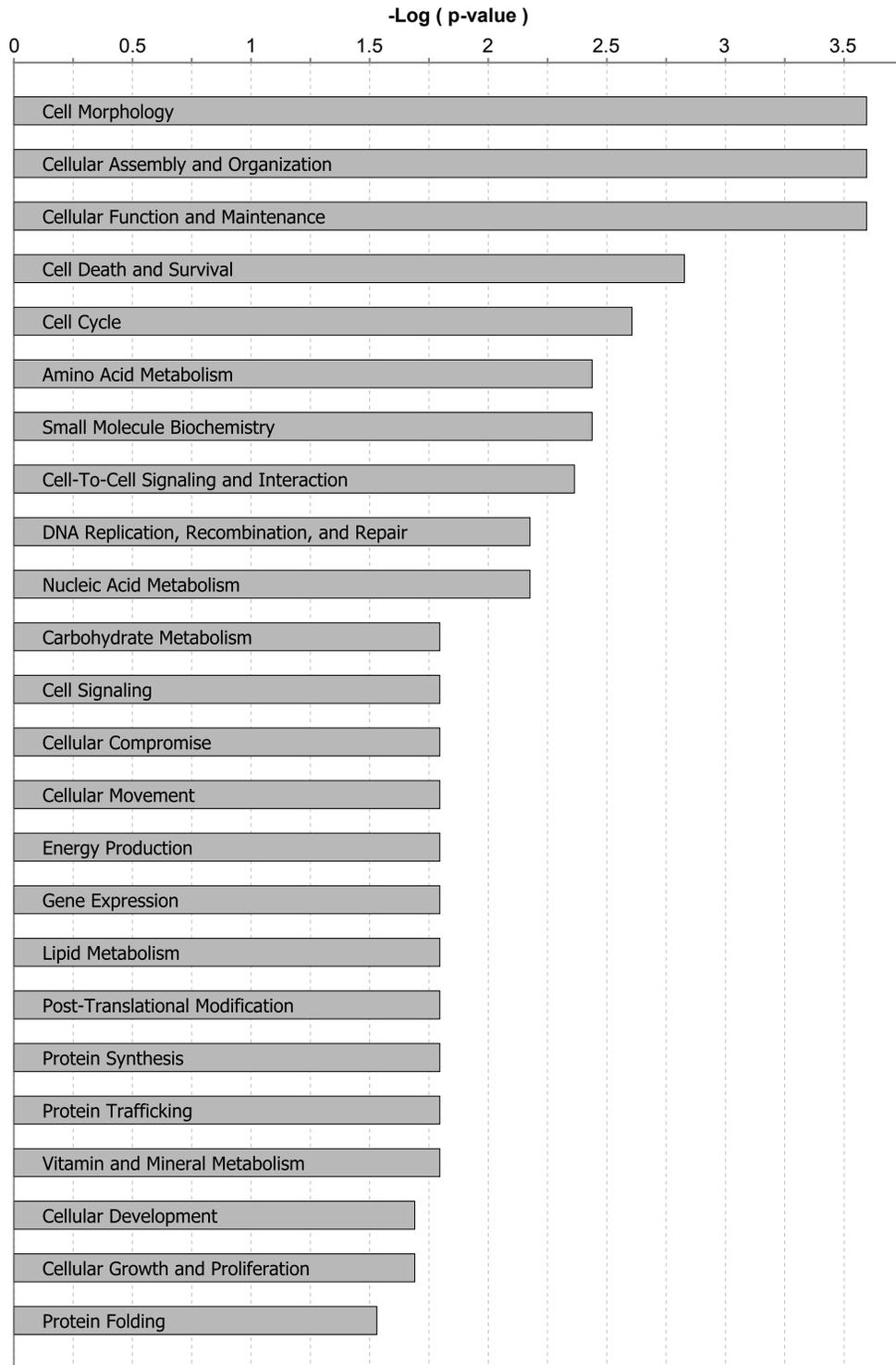
Approach Using Predictive Cell Dynamics

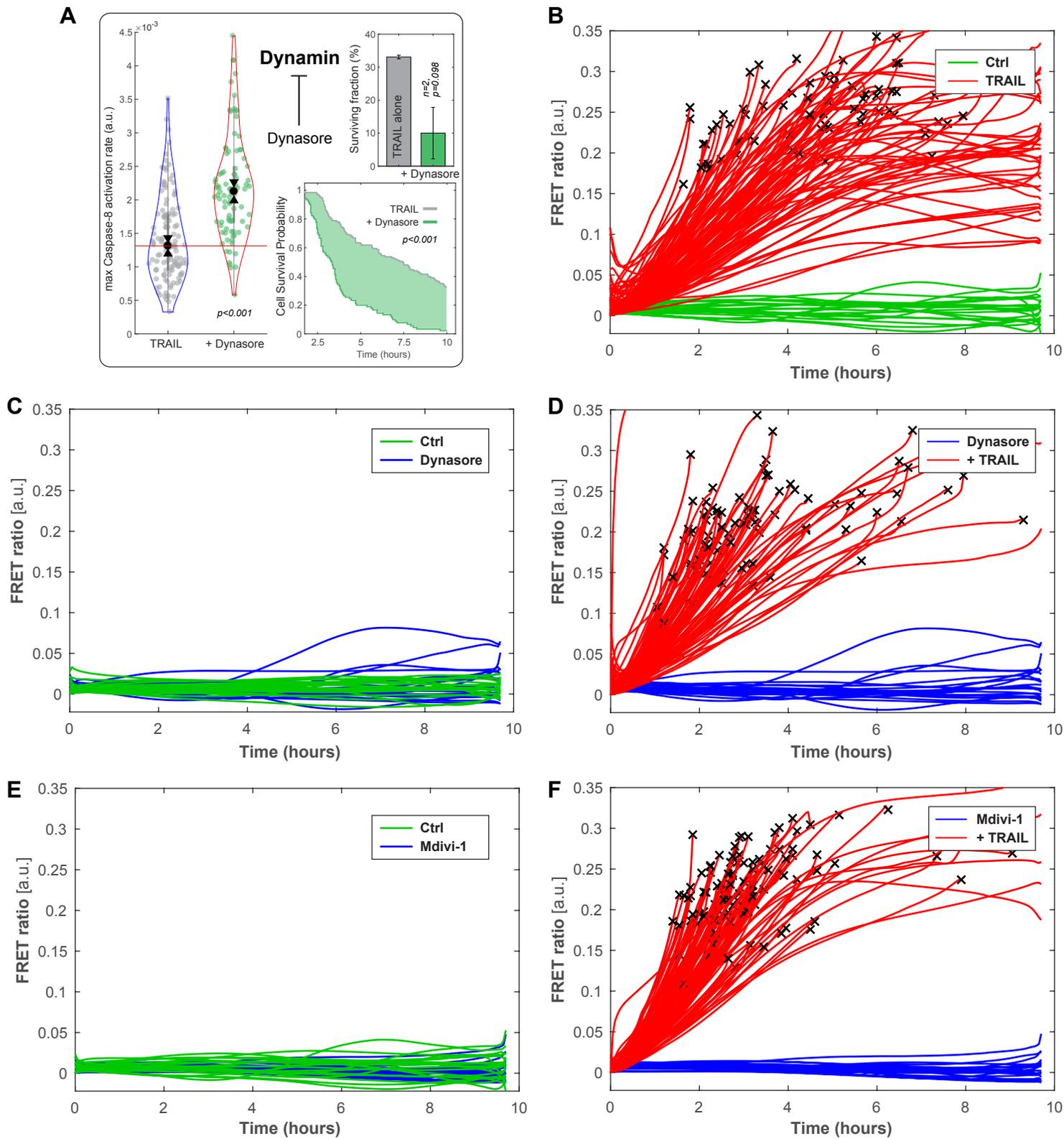
Mickael Meyer, Agnès Paquet, Marie-Jeanne Arguel, Ludovic Peyre, Luis C. Gomes-Pereira, Kevin Lebrigand, Baharia Mograbi, Patrick Brest, Rainer Waldmann, Pascal Barbry, Paul Hofman, and Jérémie Roux

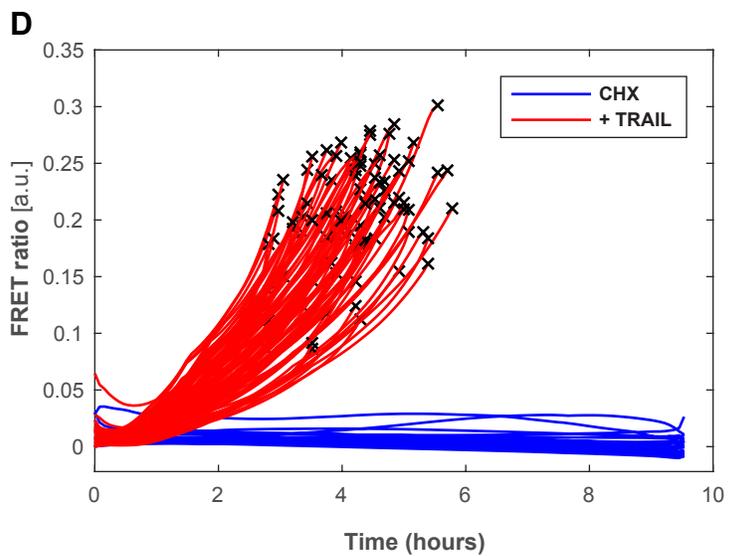
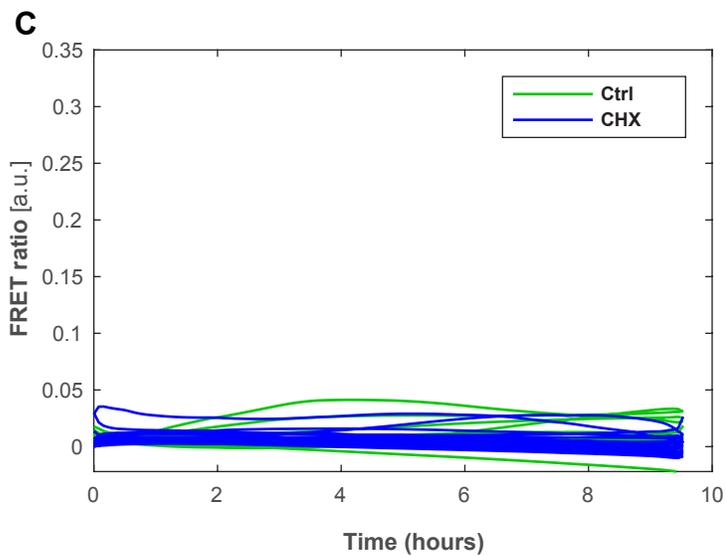
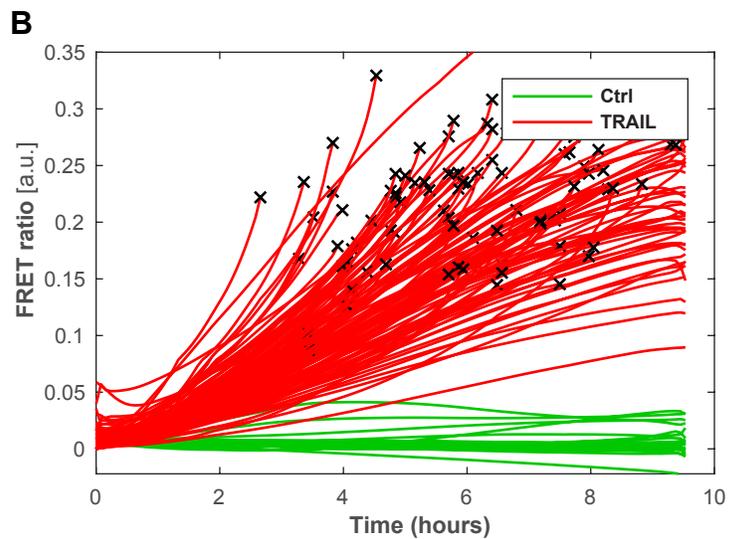
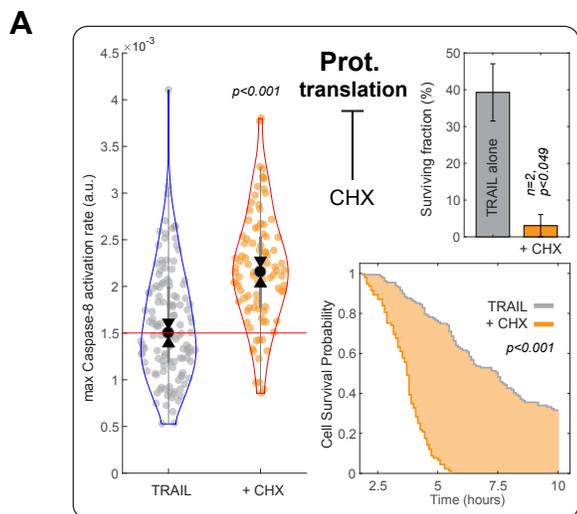


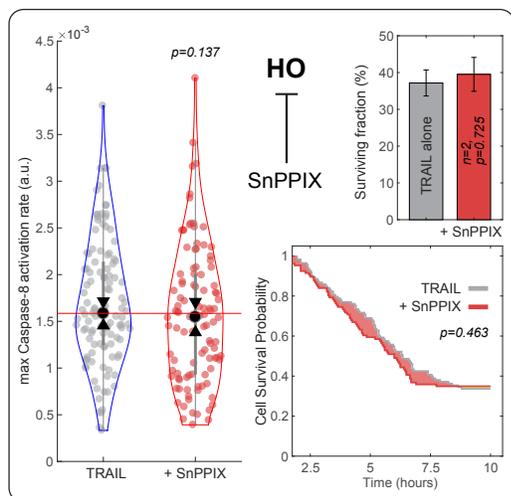
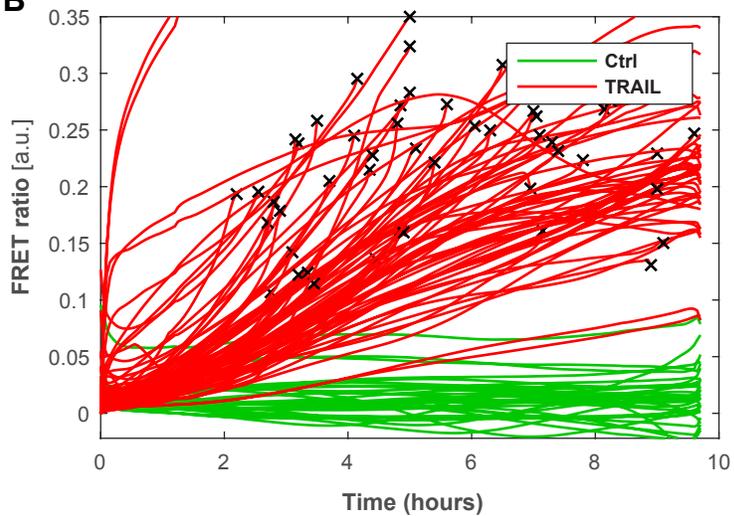
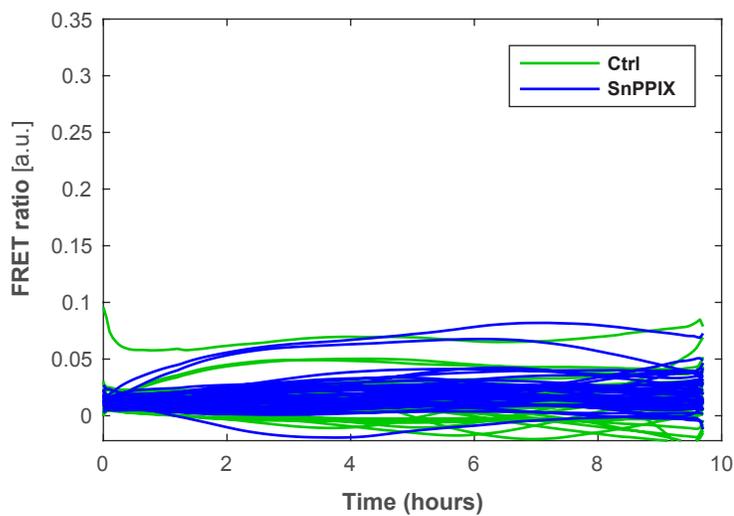
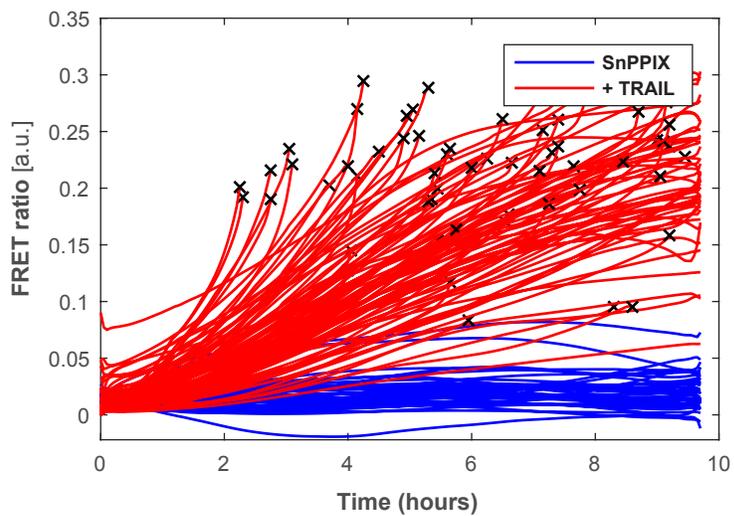










A**B****C****D**

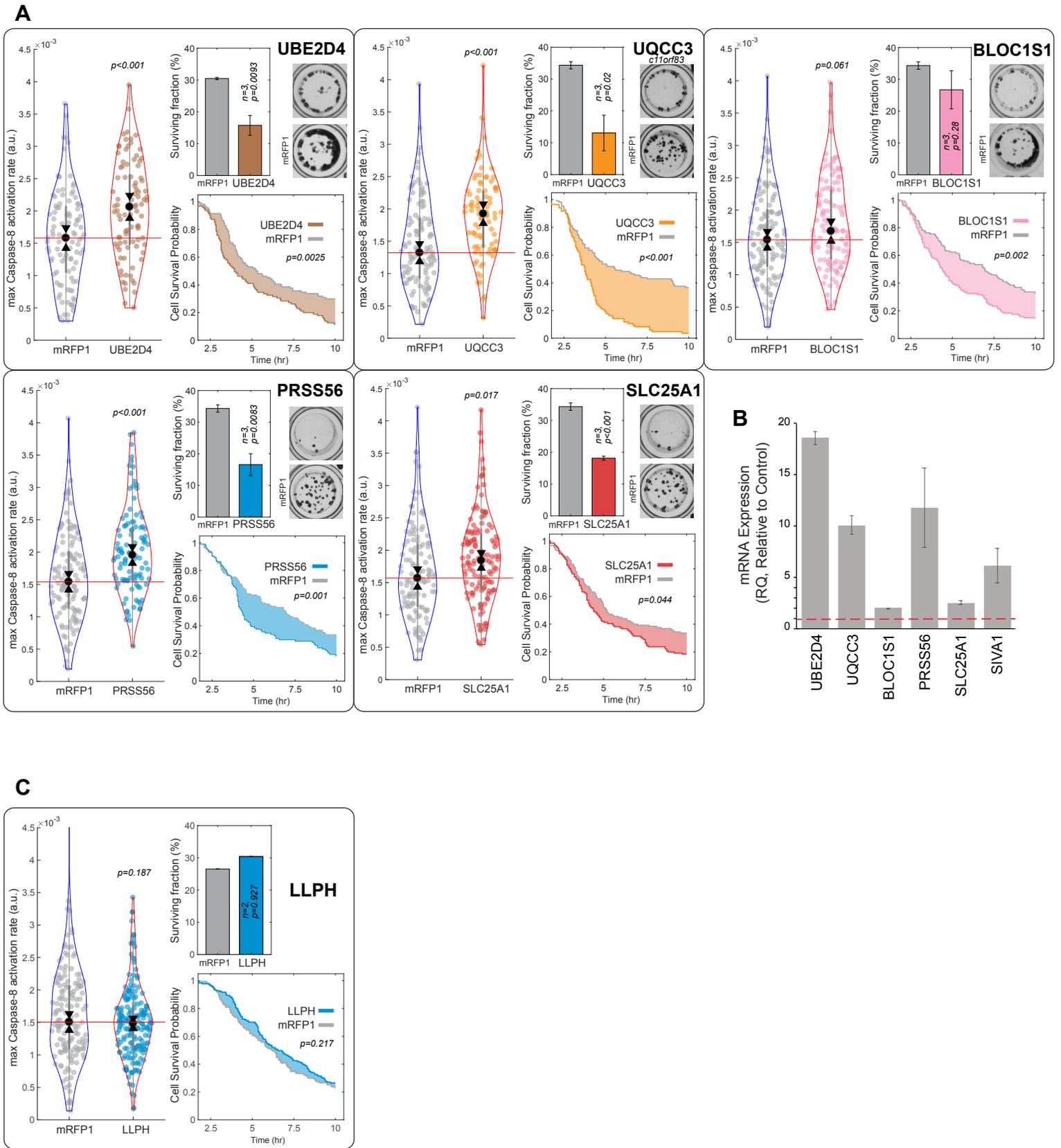


Figure S1: Single-cell RNAseq profiling of HeLa cells in resting conditions or after short treatment with TRAIL. Related to Figure 1

- (A) UMAP representation of the joint analysis of control resting cells and 50-min treated cells, profiled using the 10X Genomics platform (> 1,500 cells per condition). Three cell sub-populations were found by clustering analysis after regressing out the cell cycle component.
- (B) Differential analysis of the 50-min treated cells vs. control resting cells, for each of the 3 cell sub-population clusters observed in panel A. The x-axis: average normalized gene expression in a given cluster (log₂ scale). The y-axis: log₂ fold-change of gene expression between 50-min treated cells and control. Only one gene, *DYNLL1*, reached statistical significance after adjustment for multiple testing.
- (C) Heatmap of the most differentially expressed (DE) genes by clusters, for the resting cells.
- (D) Heatmap of the most DE genes by clusters, after a 50-min treatment with TRAIL 25 ng/ml.
- (E) Pseudo-bulk RNAseq analysis of response to increasing time and dose of TRAIL treatment. The heatmap is based on a subset of 241 genes found differentially expressed after 120 min treatment with TRAIL, at 10 ng/ml, 25 ng/ml and 40 ng/ml (Table S3). It required 2 hours to start detecting some DE genes in HeLa cells treated with TRAIL, with only the TNF signaling hallmark pathway showing significant enrichment (GSEA with FDR < 0.1, Table S3). No gene was found statistically significant when comparing TRAIL 50 min at 25ng/ml with control.
- (F) Gene expression noise analysis. Each boxplot represents the distribution of the transcription noise measured in each condition. No difference was observed between control and TRAIL 25 ng/ml for 50 min, and only a slight increase is observed in the other conditions.

Figure S2: Isolated single cell library preparation for RNA sequencing. Related to Figure 1

- Laser captured single cells with predicted phenotype were collected and lysed in domed caps of 0.2 ml PCR tubes and stored frozen. The lysed cells were spun into PCR tubes with an RT mix, ERCC spike-ins, and reverse transcribed with an RT primer that contained a priming site for amplification (Rev), a random sequence for RNA molecule identification (unique molecular identifier, UMI), a cell barcode (BC) and an Illumina Index Read (IIR). (The template switching oligonucleotide (TSO) adds a second PCR priming site during RT.) After PCR amplification the 3' biotinylated (*) full-length cDNA was fragmented by tagmentation with EZ-Tn5 transposase (end-joined with mosaic end adaptors, ME) and the 3' terminal fragments were isolated on

Streptavidin beads. Sequences required for Illumina sequencing (P5, P7) were introduced by PCR prior to sequencing. See methods section for details, primer sequences in Tables S4,5.

Figure S3: Analysis of gene expression variability in the fate-seq samples. Related to Figure 2

(A) Heatmap of cell cycle scores in each cell, with collection batch and phenotype information associated with each cell displayed on the left panel. No relationship between cell collection, phenotype and cell cycle score was observed.

(B) Hierarchical clustering of gene expression levels for the genes identified as most variable in our analysis. The phenotype labels corresponding to each cell are displayed at the top of the graph. The variability in gene expression does not correspond to the phenotype of the cells.

Figure S4: Molecular functions associated with the differentially expressed genes identified using our fate-seq workflow. Related to Figure 2

This analysis is based on a subset of genes selected based on nominal p-value < 0.05. Only the most significant molecular functions are represented (-log (p-value) > 1.5). Analyses were generated through the use of IPA (QIAGEN Inc., <https://www.qiagenbioinformatics.com/products/ingenuity-pathway-analysis>).

Figure S5: Pharmacological validations of top target gene *DNM1L* using co-treatment with inhibitor drugs. Related to Figure 2

(A) Live-cell microscopy experiments evaluating the effect of Dynasore (20 μ M) in combination or not with TRAIL treatment (25 ng/ml) in parental cells expressing IC-RP only. *Violin plots*: maximal caspase-8 activation rate of each cell for each condition of the one representative experiment where 256 cells were tracked. *Survival curves*: cell death times of each condition in the same representative experiment (event determined by morphology assessment in live-cell microscopy). *Bar graphs*: average cell surviving fraction at the end of the live-cell microscopy experiments (10 hr, dead cell counts determined by morphology assessment) for 2 experimental repeats (513 cells were tracked in total), data are represented as mean \pm SEM.

FRET ratio trajectories of parental cells expressing IC-RP only treated with TRAIL (25ng/ml) or not (B: 155 cells tracked), in combination with Dynasore (20 μ M) or not (C: 60 cells tracked, and D: 132 cells tracked), or in combination with Mdivi-1 (25 μ M) or not (E: 60 cells tracked, and F: 151 cells were tracked) in 10-hours live-cell experiment.

Figure S6: Live-cell microscopy experiments evaluating the effect of cycloheximide on caspase-8 activation and cell survival upon treatment with TRAIL. Related to Figure 2

(A) Single-cell assessments of caspase-8 activation and cell survival, evaluating the effect of cycloheximide (2.5 µg/ml) in combination or not with TRAIL treatment (25 ng/ml) in parental cells expressing IC-RP only. *Violin plots*: maximal caspase-8 activation rate of each cell for each condition of the one representative experiment where 260 cells were tracked. *Survival curves*: cell death times of each condition in the same representative experiment (event determined by morphology assessment in live-cell microscopy). *Bar graphs*: average cell surviving fraction at the end of the live-cell microscopy experiments (10 hr, dead cell counts determined by morphology assessment) for 2 experimental repeats (440 cells were tracked in total), data are represented as mean ± SEM.

FRET ratio trajectories of parental cells expressing IC-RP only, treated with TRAIL (25 ng/ml) or not (B: 168 cells tracked), in combination with cycloheximide (2.5 µg/ml) or not (C: 60 cells tracked, and D: 134 cells tracked) in 10-hours live-cell experiment.

Figure S7: Live-cell microscopy experiments evaluating the effect of tin protoporphyrin IX on caspase-8 activation and cell survival upon treatment with TRAIL. Related to Figure 2

(A) Single-cell assessments of caspase-8 activation and cell survival, evaluating the effect of tin protoporphyrin IX (SnPPIX 5 µM, targeting heme oxygenase -HO, encoded by *HMOX1 and 2*) in combination or not with TRAIL treatment (25 ng/ml) in parental cells expressing IC-RP only. *Violin plots*: maximal caspase-8 activation rate of each cell for each condition of the one representative experiment where 263 cells were tracked. *Survival curves*: cell death times of each condition in the same representative experiment (event determined by morphology assessment in live-cell microscopy). *Bar graphs*: average cell surviving fraction at the end of the live-cell microscopy experiments (10 hr, dead cell counts determined by morphology assessment) for 2 experimental repeats (501 cells were tracked in total), data are represented as mean ± SEM.

FRET ratio trajectories of parental cells expressing IC-RP only, treated with TRAIL (25ng/ml) or not (B: 148 cells tracked), in combination with tin protoporphyrin IX (SnPPIX 5 µM) or not (C: 93 cells tracked, and D: 153 cells tracked) in 10-hours live-cell experiment.

Figure S8: Target genes validation using engineered cell lines: single-cell assessment of caspase-8 activation and cell survival upon treatment with TRAIL. Related to Figure 2

(A) Functional validation of short-listed target genes *UBE2D4*, *UQCC3* (*c11orf83*), *BLOC1S1*, *PRSS56*, and *SLC25A1*, using engineered cell lines: single-cell assessment of caspase-8

5 activation and cell survival upon treatment with TRAIL (25ng/ml) performed by live-cell microscopy experiments evaluating the effect of overexpressing a target gene in parental HeLa cells expressing IC-RP in each box. Control cells (mRFP1) are IC-RP parentals, overexpressing mRFP1 fluorescent protein only. *Violin plots*: maximal caspase-8 activation rate of each cell for each condition of one representative experiment (number of cells tracked in the experiment
10 shown for *UBE2D4*: 237, *UQCC3*: 239, *BLOC1S1*: 285, *PRSS56*: 270, and *SLC25A1*: 298). *Survival curves*: cell death times of each condition in the same representative experiments shown (event determined by morphology assessment in live-cell microscopy). *Bar graphs*: average cell surviving fraction at the end of the live-cell microscopy experiments (10 hr, dead cell counts determined by morphology assessment in live-cell microscopy) for at 3 experimental repeats
15 (776 total cells tracked for *UBE2D4*, 794 for *UQCC3*, 888 for *BLOC1S1*, 813 for *PRSS56*, and 817 for *SLC25A1*), data are represented as mean \pm SEM. *Clonogenic assays*: one representative experiment of at least 3 experimental repeats of crystal-violet stained cells in 96-well plates, one week after a 24h-treatment with TRAIL (250 ng/ml).

(B) Quantitative PCR analyses of the target gene expressed in their respective cell lines
20 compared to the IC-RP parental cell line.

(C) Functional assessment of *LLPH* gene, performed by live-cell microscopy experiments as described in panel A above. *Violin plots*: maximal caspase-8 activation rate of each cell for each condition of one representative experiment where 373 cells were tracked. *Survival curves*: cell
25 death times of each condition in the same representative experiment (event determined by morphology assessment in live-cell microscopy). *Bar graphs*: average cell surviving fraction at the end of the experiments (10 hr, dead cell counts determined by morphology assessment in live-cell microscopy) for 2 experimental repeats (677 cells were tracked in total), data are represented as mean \pm SEM.

Chapitre 3. Un préconditionnement TRAIL sensibilise les cellules à la nécroptose

3.1 Introduction

TRAIL est un ligand de mort faisant partie de la superfamille des TNF (Tumor Necrosis Factor). Sa liaison sous sa forme trimérique aux récepteurs DR4/DR5 (*TNFSF10A/TNFSF10B*) permet le recrutement des protéines du DISC (death inducing signalling complex) entraînant l'activation de la caspase initiateur (caspase-8) et la transduction du signal apoptotique (Pan, 1997b). C'est un anticancéreux prometteur de par son aptitude à induire sélectivement l'apoptose des cellules cancéreuses en épargnant le tissu sain (Bonavida et al., 1999). Cependant TRAIL s'est avéré décevant lors des tests cliniques, inapte à éliminer l'entière population tumorale dû à des phénomènes de résistance. Notamment il a été démontré qu'un traitement au TRAIL induisait une réponse génique transitoire permettant de résister à un second traitement (Flusberg et al., 2013a). Étonnamment, le facteur de transcription NF- κ B (nuclear factor-kappa B) ne semblait pas impliqué dans la mise en place de cette résistance, malgré son rôle dans la régulation des gènes anti-apoptotiques pourtant retrouvés amplifiés lors de cette adaptation. En effet, malgré l'expression stable du « super » dominant négatif [IkBsr] dans les cellules MCF10A traitées, l'induction de résistance ne pouvait être bloquée.

Si l'ensemble des acteurs moléculaires responsable de cette résistance est encore inconnu, certains mécanismes ont pu être mis en évidence comme une réduction de l'efficacité de formation du DISC sous le récepteur, un niveau de caspase-8 diminué ou encore une augmentation de la protéine anti-apoptotique FLIP-L (Flusberg et al., 2013a).

Ces dernières caractéristiques de résistance à l'apoptose induite par le traitement TRAIL ont été démontrées comme étant requises ou favorisant l'induction d'une autre mort cellulaire : la nécroptose.

La nécroptose est une mort cellulaire programmée ayant les caractéristiques phénotypiques de la nécrose. À l'origine décrite comme consécutive à un traitement FAS-L en condition d'inhibition de la Caspase-8 (Holler et al., 2000), il a été découvert qu'elle pouvait également être induite par TRAIL (Jouan-Lanhouet et al., 2012) par le biais de l'activation des kinases RIPK1 et RIPK3. La nécroptose est aussi induite par augmentation de CFLAR (FLIP-S) dans les cellules épithéliales murines d'origine intestinale (Shindo et al., 2019). De plus, la nécroptose est aujourd'hui une stratégie utilisée pour tenter de contourner la résistance à l'apoptose (Huang et al., 2018). Hautement immunogénique de par la rupture membranaire et le relargage de DAMPS (damage-associated molecular patterns) (Lin et al., 2018), une

vaccination de souris par des cellules nécroptotiques a permis des régressions tumorales par la mise en place d'une immunosurveillance augmentée (He et al., 2017).

Nous avons au cours de ce travail, nous avons émis l'hypothèse que des cellules cancéreuses rendues transitoirement résistantes à l'apoptose pouvaient être prédisposées à une sensibilité accrue à la nécroptose induite par TRAIL. Nous avons dans un premier temps démontré que cette résistance s'effectue par une diminution de l'activité de la caspase-8 et semblait être induite par TAK-1 en amont de NF- κ B. Pour la première fois, nous observons une résistance induite par un traitement nécroptotique lors d'un second « challenge » à la nécroptose. Cette résistance à la nécroptose permet aussi de protéger les cellules d'un traitement apoptotique. Contre toute attente, nous avons pu observer une grande sensibilité à la nécroptose des cellules survivantes à l'apoptose induite par TRAIL, et ce par la stabilisation de l'un des acteurs moléculaires majeur de la nécroptose dans les cellules survivantes, la protéine RIPK3.

3.2 Matériels et Méthodes

3.2.1 Clonage de RIPK3

Le gène RIPK3 mCherry a été cloné à partir du plasmide d'Addgene (ref #61386) dans le plasmide rétroviral pQCXIP (ref #73012) pour une expression stable dans la lignée HeLa par transduction.

Amplification PCR

RIPK3 et mCherry ont été amplifiés séparément par les amorces PCR figurant dans la table des primers ci-dessous à l'aide du kit Xtrem KOD Hot start Dna POL (Sigma ref : 71975-M) selon le protocole du fabricant. Les amorces ont été synthétisées par Eurofins et construites dans l'objectif d'inclure les sites de restriction NOT1 NHE1 – NHE1 MFE1 pour la stratégie de clonage de la protéine de fusion. Pour cela les codons stop de RIPK3 et start de mCherry ont été retirés afin de s'assurer de corrélation entre l'intensité de mCherry et l'abondance de RIPK3. Les primers permettent d'inclure un linker de 4 acides aminés non-chargés afin d'éviter tous risques d'encombrement allostérique et l'intégration de la séquence consensus KOZAC (ACCGCC) pour favoriser la traduction du transgène. En contrôle, le plasmide pQCXIP mCherry a été produit suivant la logique précédente, avec le couple de primers spécifiques afin de réintégrer le codon start.

Tableau d'amorces.

RIPK3 forward (NOT1)	CCCATACCATAAGAAT <u>GCGGCCGC</u> GCCACC ATGTCGTGCGTCAAGTTATGGCCC
RIPK3 reverse (NHE1)	GTGGGTGTGTTCCG GCTAGC <u>ACCTCC</u> TTCCCGCTATGATTATACCAACCC
Cherry forward (NHE1)	CCCATACCATAAGAAT <u>GCTAGC</u> GTGAGCAAGGGCGAGGAGG
Cherry reverse (MFE1)	GGTGTGTTCCG <u>CTCGAG</u> TTA CTTGTACAGTTCGTCATGCC
Cherry contrôle forward (NOT1)	CCCATACCATAAGAAT <u>GCGGCCGC</u> GCTAGC ATGGTGAGCAAGGGCGAGG
Cherry contrôle reverse (MFE1)	GGTGTGTTCCG <u>CTCGAG</u> TTA CTTGTACAGTTCGTCATGCC

Clonage par digestion / ligation.

Les amplicons de RIPK3 et mCherry amplifiés ainsi que le plasmide sont digérés par le couple d'enzymes NOT1 NHE1 (GCGGCCGC ; GCTAGC) et NHE1 MFE1 (GCTAGC ; CAATTG) respectivement.

Les amplicons ainsi que le plasmide digéré sont déposés sur gel en addition du 6x dye loading additionné de Sybr green dans un gel agarose (TBE 0.5 X agarose 1.5%). Les bandes sont vérifiées pour leurs tailles et récupérées pour purification par le kit QIAquick Gel Extraction Kit de chez Qiagen (référence : 6090). Les amplicons et le plasmide sont ligués par l'enzyme T4 DNA ligase de NEB (référence : M0202L) durant 15 minutes avant transformation des bactéries NEB® 5-alpha Competent E. coli (High Efficiency) (NEB référence : C2987H) par la méthode heatshock recommandée. Les bactéries transformées après une heure d'incubation dans le SOC sont étalées sur boîte agar supplémentées en ampicilline (ref : 69-53-4) pour une croissance sur la nuit. Le lendemain, des colonies sont piquées puis amplifiées dans un start de 2 mL de Terrific Broth (Thermofisher référence : 22711022) avant la production bactérienne le lendemain dans 50 mL.

Maxi préparation

Les 50 mL de bactéries sont culotées par centrifugation à 6000G pendant 10 minutes, puis le plasmide est purifié à l'aide du kit QIAGEN plasmid maxi kits (référence : 12162) selon le protocole.

La pureté des plasmides produits est analysée par nano-drop et la concentration ajustée à 1 µg.mL⁻¹. Les plasmides générés sont ensuite séquencés par Eurofins pour s'assurer de l'intégrité des amplicons intégrés.

3.2.2 Stratégie virus

Production virale

Pour la production des rétrovirus, nous avons utilisé le Pantropic Retroviral Expression System de chez TAKARA (référence : 631512). Les GP2-293 (Retro-X) contenant les gènes viraux *gag* et *pol* sont transfectées avec les plasmides VSV-G du kit et le plasmide pQCXIP RIPK3-mCherry ou le contrôle pQCXIP mCherry à l'aide de la Lipofectamine 3000 du kit

Lipofectamine™ 3000 Transfection Reagent (référence : L3000150) selon le protocole en laboratoire de sécurité microbiologique P2. Le lendemain, le milieu est prudemment renouvelé avec 5 mL de milieu de culture frais pour une production virale de deux jours. Le milieu contenant les charges virales est ensuite filtré et récolté dans un tube contenant préalablement 2.5 mL de milieu.

Infection des cellules cibles

Les cellules HeLa IC (voir chapitre 2 « fate seq ») fraîchement triées pour un clone (CL2) sontensemencées en plaque 6 puits dans le P2 pour incubation durant la nuit avec 2 mL de milieu additionné de polybrène (ref : 28728-55-4) contenant les charges virales du rétrovirus RIPK3-mCherry et le contrôle mCherry. Le lendemain les cellules sont lavées et le milieu renouvelé. Les cellules prolifèrent 3 jours en P2 pour les 2 changements de plaque prévus dans les règles BPL avant d'être replacées en incubateur de culture des salles communes.

3.2.3 Enrichissement par cytométrie en flux de la population

Les cellules HeLa IC CL 2 transduites pour le gène RIPK3-mCherry et mCherry avec environ 10 % d'efficacité sont ensuite enrichies par BD FACSAria sorter dans notre plateforme de Cytométrie. Les cellules sont resuspendues en milieu PBS additionné de 10% SVF et 2,5 mM EDTA. Le tri est calibré sur la triple positivité des cellules pour les spectres de fluorescence CFP, mVenus et mCherry respectivement pour 500 000 cellules réensemencées en diamètre 100. Une dilution limite a été réalisée pour l'obtention de plusieurs clones des populations de cellules HeLa IC CL2 RIPK3-mCherry et mCherry.

3.2.4 Lignées cellulaires et matériel de cultures

La lignée HeLa IC CL2 (Jérémy Roux, Boston Harvard) ainsi que les lignées dérivées générées durant l'étape de clonage de RIPK3 (chap : 3.2.1) HeLa IC CL2 RIPK3-mcherry, mCherry et les GP2-293 sont cultivées en milieux DMEM W/GLUTAMAX-I,PYR,4.5G GLUCOSE. La lignée HT-29 est cultivée en RPMI 1640 W/GLUTAMAX-I. Les milieux utilisés sont supplémentés de 10% SVF et 1% Pen-Strep. Le milieu Opti-MEM a été utilisé lors de la préparation des agents de transfection. Tous les milieux et réactifs tels que la trypsine 0.05% EDTA, le PBS DULBECCO'S W/O CA MG (1X) pour culture et tampon FACS proviennent de la société LIFE Technologies et le SVF de Dutscher.

3.2.5 Anticorps et Western Blot RIPK3

Les échantillons pour WB ont été lavés sur plaque à trois reprises dans 1 mL de PBS et recueillis dans cette même plaque en ajoutant du tampon TR3 (SDS 20 %, 15ml Carlo Erba (600432), Glycérol 15ml (SIGMA G6279), Na₂HPO₄ 0,178g (MERCK 1065761000) Qsp H₂O 100ml) supplémenté avec un cocktail d'inhibiteurs de protéases et de phosphatases (le Na₃VO₄, B glycéro, NaPPi et NaF, tous provenant de chez Sigma de références respectives S6508, G6251, P8010, 201154). Les échantillons de TR3 ont été lysés sur de la glace pendant 30 minutes. Ils sont ensuite centrifugés à 14 000 rpm pendant 15 minutes à 4 ° C et les culots d'ADN ont été jetés.

Les échantillons de protéines sont ensuite dosés à l'aide du kit DC Protein Assay de Biorad (ref : 5000001) selon le protocole du fabricant. La DO est mesurée à l'aide de l'appareil Perkin Elmer Envision 2104 Multilabel reader à la longueur d'onde 650 nm.

Les échantillons dosés sont alors resuspendus dans une solution de TR12 / β mercaptoéthanol (SDS 12%, Glycérol 40%, Na₂HPO₄(2H₂O) 40mM, Bleu de bromophénol et β mercaptoéthanol au 1/5 eme) et chauffés à 95°C durant 15 minutes. Les échantillons sont ensuite déposés dans des grands gels avec le standard (ref : 06P-0111) : Pour visualiser la protéine RIPK3, des gels de séparation à 12% d'acrylamide ont été préalablement préparés avec le gel de concentration à 4%, voir le tableau ci-dessous.

Solutions	Fournisseurs	12%	4%
Acrylamide Bis 30%	SIGMA A3699	12 ml	1,65 ml
Tris HCl pH8,8 1,5M	Q-BIOGENE TRIS05KG	7,5 ml	3,15 ml
SDS 10%	Carlo erba 600432	300 µl	125 µl
H ₂ O	-	12 ml	7,5 ml
Temed	SIGMA T9281	15 µl	12,5 µl
APS 10%	SIGMA A3678	150 µl	62,5 µl

Les grands gels sont alors déposés dans les cuves et mis à migrer sur la nuit à 25 mA constant, 60 V et 2 W.

Les gels sont mis à transférer sur Membrane PVDF (Millipore IPVH00010, préalablement activée dans le méthanol) dans les cuves à transferts durant 3h30 à 500 mA contenant le tampon de transfert de composition : Tris 2,42 g (Q-BIOGENE TRIS05KG), Glycine 11,25 g (Amersham US16407), 200 mL méthanol (Carlo Erba 414816), Qsp1 L H2O.

Les membranes sont après le transfert rincées 2x en PBS Tween 0,1% (Sigma P1379) et mises à saturer pendant 30 minutes dans le tampon de saturation BSA (Tris HCl pH 7,4 1M 10ml, NaCl 5M 30ml, EDTA 0,5M 2ml, Tween 20 1ml, BSA (Sigma A7030) 3% 30 g, Gélatine 5g, QSP 1L H2O). L'anticorps RIPK3 (CST ref : #95702) est ajouté au 1/1000 dans le tampon de saturation et la membrane est mise à incuber sur roue à 4°C sur la nuit. Le lendemain, les membranes sont lavées 3x au tampon de lavage (Tris 24,22g (Q-BIOGENE TRIS05KG), NaCl 175,32g (SIGMA S9625), Ajusté au pH 7,4 HCl (Carlo erba 403871), Tween 0,1%) et mises de nouveau à saturer dans le tampon de BSA 30 minutes. L'anticorps secondaire (mouse rabbit abcam (ref : ab205718 et ab6721 respectivement) est ajouté au tampon de BSA durant une heure sous agitation à température ambiante. Les membranes sont lavées 3x dans le tampon de lavage Tween et 1 lavage dans une solution de Tris 100mM. La révélation se fait ensuite à l'aide du kit ECL (Amersham RPN2209) et l'intensité HRP est révélée à l'aide de l'imageur Syngene Pxi d'Ozyme.

3.2.6 Inhibiteurs et ligands de mort.

Produits	Fournisseur	Référence	Solvant	Concentration stock
CHX	Sigma-Aldrich	C7698	DMSO	100 µg/mL
QVD	Sigma-Aldrich	SML0063	DMSO	20 mM
BV-6	Calbiochem	5.33965	DMSO	20 mM
NEC-1	Enzo ®	BML AP 309 0020	DMSO	20 mg/mL
NSA	Calbiochem	432531-71-0	DMSO	100 mg/mL
TRAIL	R&D System	375-TEC/CF-MTO	PBS+/+	200 µg/mL
5Z-7-Oxozeaenol	Sigma-Aldrich	O9890	DMSO	27,5961 mM
IKKi BMS-345541	Calbiochem	445430-58-0	DMSO	25 mM

JNKi SP600125	Abcam	ab120065	DMSO	100 mM
MKKi U0126	Abcam	ab120241	DMSO	100 mM
P38i SB 202190	Abcam	ab120638	DMSO	100 mM

3.2.7 Viabilité cellulaire.

La viabilité cellulaire a été mesurée de 3 manières différentes dans ce chapitre. Par décompte visuel lors de l'analyse d'image des expériences Live Cell Microscopy (expliquée dans le chapitre 3.2.10), par quantification d'ATP sécrété par les cellules vivantes et par crystal violet en analysant la densité cellulaire.

Quantification de l'ATP

La mesure de viabilité par quantification de l'ATP a été utilisé pour toutes les doses réponses et les calibrages. La mesure de l'ATP s'est effectuée avec le kit CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay de Promega (référence : G7570). Les cellules sontensemencées en plaque 96 et traitées dans 100 µL de milieu de culture en triplicata technique. Le CellTiter-Glo® Reagent est préparé comme indiqué dans le protocole du kit, puis 100 µL du mix (réactifs A+B) est ajouté à la fin du traitement dans chaque puit. Les cellules sont mises sous agitateur 15 minutes à température ambiante avant lecture au luminomètre (2104 EnVision® Multilabel Plate Reader, PerkinElmer). En contrôle, le triplicata de puits non traités indique le 100% de survie de la population alors que des puits traités au Triton 0.1% pour 100% de létalité.

Crystal violet

Afin de mesurer la survie cellulaire après des traitements successifs, nous avons mis au point un protocole au crystal violet permettant de mesurer le pourcentage de recouvrement des cellules survivantes en comparaison des contrôles non traités. 100 000 cellules HeLa IC CL2 RIPK3-mCherry sontensemencées de manière équivalente dans des 6 puits. Les cellules sont traitées ou non en duplicata technique, les plaques sont arrêtées au temps t=0 correspondant au début du premier traitement de l'expérience (contrôle de l'ensemencement), à t=15h pour la fin du premier traitement, t=24 pour la prolifération entre la fin du premier traitement et le début du second et à T=39h à la fin du second traitement. Les puits non-traités permettent de visualiser

la prolifération tout au long de l'expérience. A la fin d'un traitement, les plaques sont lavées 2x au PBS et le milieu est renouvelé. Si la plaque est à arrêter, les cellules sont fixées et colorées dans une solution de crystal violet (3.7% paraformaldehyde, 0.5% crystal violet et 20% EtOH dans du phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.2)) pendant 30 minutes. Elles sont ensuite lavées 4x au PBS et 1x avec de l'H₂O milliQ afin de laver les sels du PBS puis sont mises à sécher 24h. Les plaques sont conservées à température ambiante et les images sont analysées sous le logiciel Fiji.

3.2.8 Live Cell Microscopy

Les cellules sontensemencées sur les plaques 96 puits fond verre sensoplate sterile (Dutscher référence : 655892) préalablement incubées au collagène (rat tail collagen de Sigma, référence : C3867). La veille, le chauffage est lancé pour atteindre une température de 37.5°C le lendemain matin. Des cellules dans du DMEM Glutamax sans phénol, sans supplémentation de 10% de sérum bovin fœtal mais avec pénicilline / streptomycine (Thermo Fisher Scientific, France), ont été imagées toutes les 3 min pendant 24 heures maximum dans la chambre à température contrôlée et CO₂ d'un microscope DeltaVision Elite (GE Healthcare Life Sciences, Velizy-Villacoublay, France), avec un objectif 20x (NA = 0,75) en lumière transmise et en utilisant les longueurs d'onde d'excitation d'éclairage à l'état solide et les filtres d'émission passe-bande simples suivants: pour CFP (Ex. 438/24 nm / Em. 475-24 nm), YFP (Ex. 513/17 nm / Em. 548/22 nm). En plus des analyses temporelles, des cellules exprimant de manière stable la protéine RIPK3-mCherry, ont été imagées au début de l'expérience pour mCherry (Ex. 575/25 nm / Em. 625-45 nm). Pour l'analyse du signal FRET, les images CFP et YFP soustraites au bruit de fond ont été divisées pour obtenir une image ratiométrique (CFP / YFP) à l'aide d'ImageJ et de plug-ins personnalisés pour suivre les cellules (Albeck et al., 2008). Les signaux ont été normalisés en soustrayant la valeur minimale à tous les points temporels de chaque évolution temporelle monocellulaire et la trajectoire moyenne des cellules traitées par les agents spécifiés. Les temps de mort cellulaire ont été déterminés par inspection visuelle, pour chaque trajectoire cellulaire correspondante avec les piles d'images de lumière transmise et utilisés pour déterminer la viabilité des cellules de la population. L'évaluation de la mort cellulaire a été réalisée par inspection visuelle à la lumière transmise du changement de morphologie cellulaire, le temps de mort cellulaire a été marqué et utilisé pour le décompte des morts cellulaires. Les niveaux d'activation de la caspase-8 ont été déterminés à partir des trajectoires du rapport CFP / YFP, comme décrit précédemment (Roux et al., 2015a).

3.2.9 Induction de résistance (pour analyse Live Cell Microscopy)

Dans ce chapitre, les cellules seront fréquemment conditionnées à un traitement afin d'observer la résistance induite lors d'un second traitement sous vidéo microscopie. Voici la méthode mise au point pour ces expériences.

Les cellules sontensemencées en diamètre 100 dans le milieu de culture. Elles sont ensuite préconditionnées par différents traitements (qui seront spécifiés dans la partie résultats) pendant 20h, les inhibiteurs si présents étant ajoutés une heure avant le ligand de mort. Les cellules sont ensuite lavées 2x au PBS afin de retirer le traitement et les cellules mortes de la plaque puis laissées au repos dans le milieu de culture. Après 6h de repos, les cellules sont de nouveau lavées 2x au PBS pour retirer les cellules qui ont continué de mourir durant le temps de repos. Elles sont alors trypsinées et culottées par centrifugation (1000 RPM), resuspendues dans le milieu de culture et comptées au cell-counter (ref : Z1 Particle Counter Single) pour ensemen- cer finalement 5000 cellules par puits dans les plaques 96 puits (fond en verre sensoplate, stériles et pré-incubées avec du collagène). 18h après l'ensemencement ou 24h après la fin du premier traitement, les cellules sont traitées sous le microscope Delta Vision pour l'expérience de Live Cell Microscopy (voir chapitre précédent).

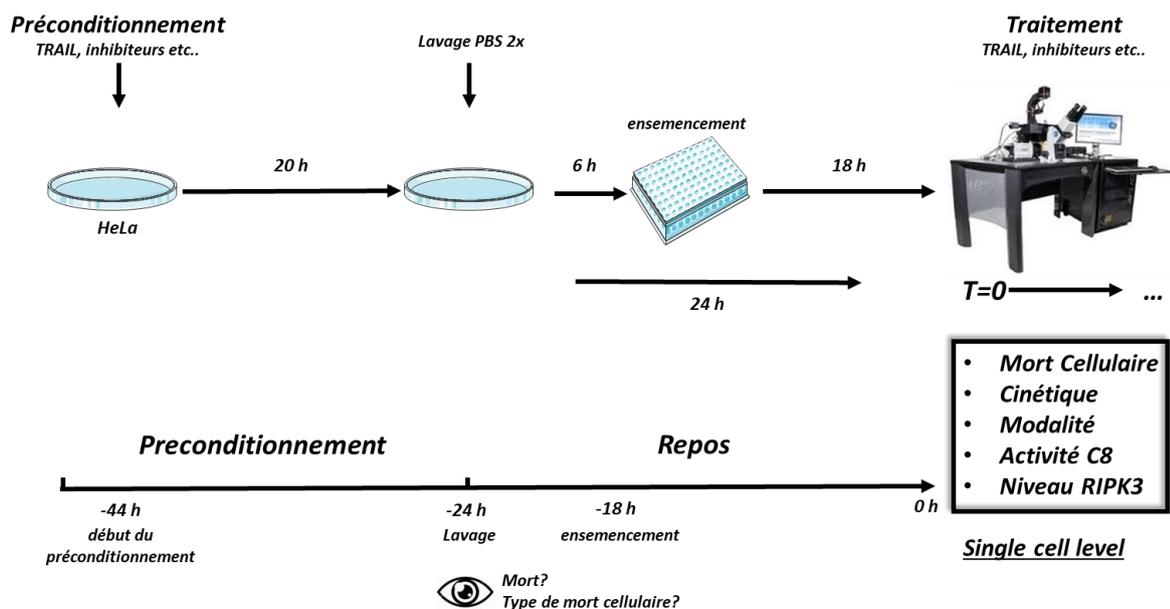


Figure 3-1 : Protocole de préconditionnement avant analyse LCM.

Schéma du protocole de préconditionnement pour traitement sous microscope durant 24h.

3.2.10 Microscopie de cellules vivantes et Analyse d'image

Des cellules HeLa clonales exprimant de manière stable le rapporteur de caspase initiateur basé sur FRET (IC-RP) et le gène chimérique RIPK3 fusionné au mCherry ont étéensemencées dans des plaques 96 puits, recouvertes de collagène I issu de queues de rat (Thermo Fisher Scientific, France). Les cellules cultivées dans du DMEM Glutamax sans phénol, supplémenté de 10% de sérum bovin fœtal et de pénicilline / streptomycine (Thermo Fisher Scientific, France), ont été imagées toutes les 3 min pendant 24 heures maximum dans la chambre à température contrôlée / CO₂ d'un microscope DeltaVision Elite (GE Healthcare Life Sciences, Velizy-Villacoublay, France), avec un objectif 20x (NA = 0,75) en lumière transmise et en utilisant les filtres d'émission passe-bande simples pour les longueurs d'onde d'excitation et d'émissions suivants: pour CFP (Ex. 438/24 nm / Em. 475-24 nm), YFP (Ex. 513/17 nm / Em. 548/22 nm). En plus des analyses cinétiques, les cellules exprimant de manière stable RIPK3-mCherry, ont été imagées au début de l'expérience pour mCherry (Ex. 575/25 nm / Em. 625-45 nm). Pour l'analyse du signal FRET, les images CFP et YFP soustraites en arrière-plan ont été divisées pour obtenir une image ratiométrique (CFP / YFP) à l'aide d'ImageJ et de plug-ins personnalisés pour suivre les cellules (Albeck et al., 2008). Les signaux ont été normalisés en soustrayant la valeur minimale à tous les points temporels de chaque évolution temporelle monocellulaire et la trajectoire moyenne des cellules traitées avec le véhicule médicamenteux correspondantes. Les temps de mort cellulaire ont été déterminés par inspection visuelle, pour chaque trajectoire cellulaire correspondante avec les piles d'images de lumière transmise et utilisés pour déterminer la viabilité des cellules de la population. L'évaluation de la mort cellulaire a été réalisée par inspection visuelle à la lumière transmise du changement de morphologie cellulaire, le temps de mort cellulaire a été marqué et utilisé pour le décompte des morts cellulaires. Les taux d'activation de la caspase-8 ont été déterminés à partir des trajectoires du rapport CFP / YFP, comme décrit précédemment (Roux et al., 2015a).

3.2.11 Traitements MATLAB des analyses d'images

La trajectoire moyenne du rapport FRET de toutes les cellules non traitées est soustraite de la trajectoire du rapport FRET de chaque cellule traitée. Pour chaque trajectoire, la valeur

minimale du rapport FRET dans les premières minutes de vidéo-microscopie est soustraite à tous les points de la trajectoire. Nous avons calculé la dérivée du rapport FRET en utilisant des différences finies et filtré les trajectoires en utilisant le Fonction MATLAB `filtfilt`.

3.3 Résultats

3.3.1 TRAIL induit une résistance à l'apoptose lors d'un second traitement des cellules survivantes par la diminution de l'activité caspase-8.

Lors de nos précédents travaux (Chapitre 2 fate-seq ; (Roux et al., 2015a)), nous avons pu montrer dans la cellule unique la relation qui existe entre la sensibilité au traitement TRAIL et l'activité caspase-8. Ainsi, les cellules de la population clonale atteignant le seuil d'activité caspase-8 au cours du traitement TRAIL déclencheront l'apoptose alors que les cellules possédant des activités inférieures survivront au traitement. Nous avons émis l'hypothèse que le phénomène de résistance induite par TRAIL, décrit dans les travaux de Flusberg *et al.* dans les lignées MCF-10a (Flusberg et al., 2013a), pourrait être liée à une inhibition des activités caspase-8 au sein de la population.

Le préconditionnement des cellules HeLa par des doses croissantes de TRAIL a permis la mise en place d'une résistance à un second traitement TRAIL (10ng.mL⁻¹) et cela avec un effet comparable à celui déjà observé dans les expériences de Flusberg *et al.* (la lignée HeLa étant devenue environ 2x plus résistante lors du second traitement 24h après le premier). L'efficacité de cette résistance est aussi dépendante de la dose de TRAIL utilisée : les cellules HeLa survivantes au traitement par TRAIL (5 ng/mL) sont environ 1,5x plus résistantes que des cellules non traitées, et 2x plus résistantes lorsqu'elles survivent à un traitement de 20 ng.mL⁻¹ (Figure. 3.2 A). Les cellules ont été préconditionnées en plaque dans l'incubateur et rincées 2 fois au PBS après 20h puis le milieu de culture est renouvelé. Cependant l'induction apoptotique par TRAIL se poursuit après retrait de la drogue et des cellules continuent de mourir durant le temps de « repos ». Les cellules sont ensuite de nouveau rincées 2 fois au PBS et ensemencées sur plaque en verre pour le traitement sous vidéo-microscopie. De nouvelles cellules peuvent mourir lors de l'ensemencement (Figure 3.2 B panel du haut), et seront alors exclues de l'analyse. Aucune cellule préconditionnée par un traitement TRAIL ne meurt après ensemencement mais au contraire toutes prolifèrent au cours de la vidéo microscopie dans la condition contrôle.

La résistance transitoire induite par TRAIL est médiée par une diminution de l'activité caspase-8.

Les dynamiques d'activation de la caspase-8 mesurées dans chaque cellule durant le traitement TRAIL permettent d'observer une réduction globale de l'activité dans les cellules préconditionnées au TRAIL. En comparaison du contrôle, l'allure des courbes des cellules préconditionnées par 5 ng.mL⁻¹ de TRAIL croit faiblement au cours de l'expérience, d'autant plus dans le préconditionnement par 20 ng.mL⁻¹ (Figure 3.2 C). Cela signifie que le clivage de la sonde par la caspase-8 est limité dans ces conditions en comparaison des cellules non-préconditionnées.

Le maximum d'activité caspase-8, représentatif de la cinétique d'activation est donc globalement retrouvé moins important dans les cellules préconditionnées au cours du second traitement comme en atteste les boxplots (chaque point représente le maximum d'activité caspase-8 d'une cellule) (Figure 3.2 D).

La cinétique d'activation a été démontré comme jouant un rôle majeur dans la réponse au TRAIL (Roux et al., 2015a). Cela démontre que la résistance induite lors du premier traitement s'effectue par l'inhibition moléculaire direct ou indirect de la caspase-8 active.

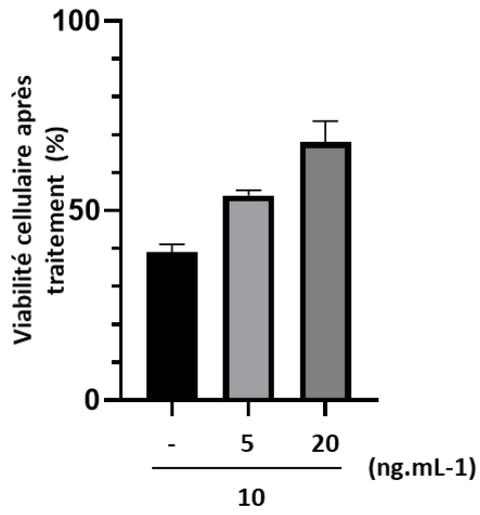
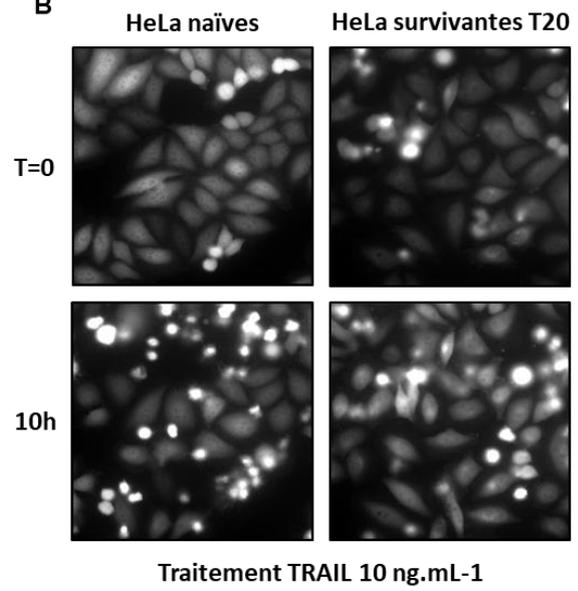
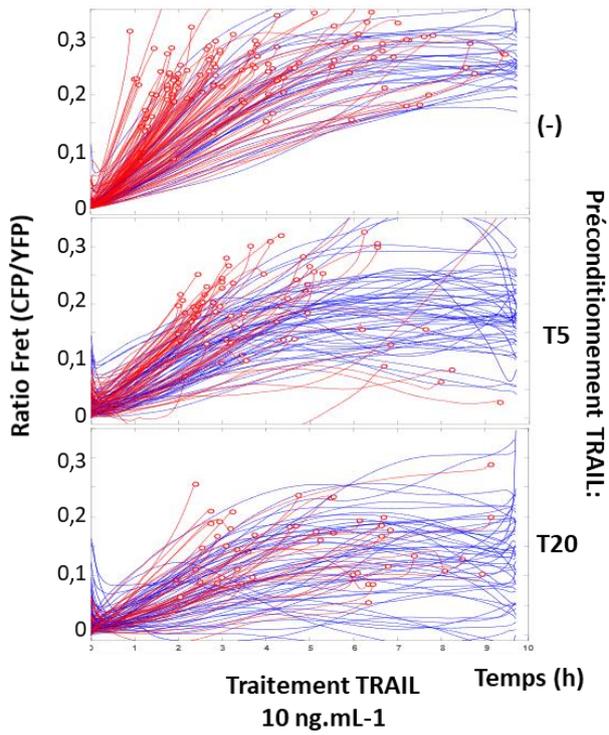
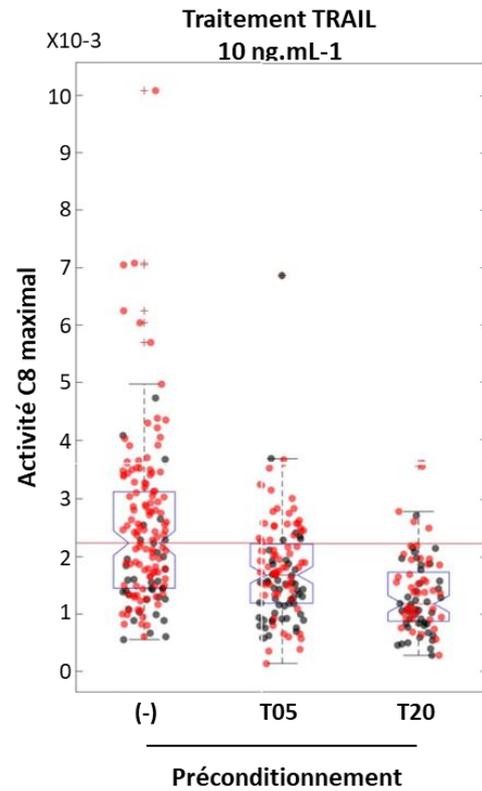
A**B****C****D**

Figure 3-2 : Mesure de la résistance au TRAIL lors d'un second traitement.

Les cellules HeLa IC ont été préconditionnées ou non par des différentes concentrations de TRAIL (5, 20 ng.mL⁻¹) puis sont réensemencées pour analyse LCM du second traitement 24h après le premier. **(A)** Pourcentage de cellules survivantes à 10h du second traitement TRAIL (10 ng.mL⁻¹) en fonction des préconditionnements. **(B)** Images LCM du canal YFP pour les cellules naïves et préconditionnées au TRAIL 20 ng.mL⁻¹ au début de l'expérience (t₀) et à 10h. **(C)** FRET ratio mesuré à partir du canal CFP sur le canal YFP représentant l'activité caspase-8 au cours du temps dans chaque cellule (bleu résistantes, rouge sensibles). **(D)** Boxplot représentant la dispersion de l'activité maximale de la caspase-8 (voir 3.2.9 analyses d'image) calculée à partir des courbes spécifiques de chaque préconditionnement et récoltées lors du traitement TRAIL. Chaque point représente une cellule (noir = résistant, rouge = sensible).

Inhiber TAK lors du préconditionnement bloque la mise en place de la résistance en restaurant l'activité caspase-8 lors du second traitement.

Au vu de la participation potentielle décrite dans la littérature de NF- κ B dans la résistance à TRAIL, nous avons employé dans ces expériences des inhibiteurs pharmacologiques afin de déterminer le ou les acteurs moléculaires responsables de la mise en place de la résistance sous un traitement TRAIL. Il a été démontré que TAK avait un rôle prépondérant dans la voie de survie au TRAIL et permettait l'induction de NF- κ B. Il a été rapporté que l'inhibition de TAK-1 sensibilise les cellules au TRAIL en inhibant les cIAP via l'augmentation des ROS (Morioka et al., 2009). Chez la souris, il est montré que TAK-1 est requis pour la survie des cellules embryonniques au TRAIL par activation de NF- κ B et l'expression de FLIP-L (Lluis et al., 2010). Cependant, Flusberg *et al.* n'ont pu réprimer la mise en place de la résistance lors d'un préconditionnement par TRAIL dans des cellules surexprimant le dominant négatif iKKr. Ils ont pourtant observé que cette résistance se faisait via l'augmentation de FLIP, qui est connu pour être régulé par le facteur de transcription NF- κ B.

Nous avons utilisé des inhibiteurs spécifiques de TAK et de NF- κ B afin de déterminer quel était l'acteur responsable de la mise en place de cette résistance au second traitement. Afin d'éviter un risque d'effet 'off-target', nous avons tout d'abord déterminé les doses optimales de traitement pour ces inhibiteurs, chacun étant déjà connu pour induire une sensibilité à TRAIL lors d'un co-traitement. Nous avons lors d'une dose-réponse, choisi d'utiliser une dose qui permettait de doubler la sensibilité des cellules (résultats non montrés). Chacun de ces inhibiteurs permet d'augmenter la sensibilité au TRAIL. Cela signifie que TAK et NF- κ B sont tous deux importants dans la résistance au traitement. Cependant cela n'informe pas sur leurs rôles respectifs dans la mise en place d'une résistance pour le second traitement.

L'inhibition d'IKK1/2 par le BMS 345541 durant un préconditionnement par TRAIL ne permet pas de bloquer la mise en place de la résistance transitoire. Cette résistance induite durant la première stimulation par TRAIL est maintenue malgré l'inhibition de la voie NF- κ B en comparaison du préconditionnement par TRAIL sans inhibiteur, et ce de manière caspase-8 dépendante (Figure 3.3 A et B).

Seule l'inhibition de TAK-1 avec l'inhibiteur 5Z-7-Oxozeaenol durant le préconditionnement par TRAIL permet de bloquer la mise en place de la résistance transitoire et ce dans plusieurs expériences indépendantes mais non comparables (Figure 3.3 A). Les cellules survivantes du premier traitement TRAIL + TAKi restent tout aussi sensibles que les cellules naïves. Les activités caspase-8 ne sont plus inhibées dans les cellules survivantes par l'effet du préconditionnement TRAIL. Les profils d'activités caspase-8 enregistrés lors du traitement par TRAIL de la population survivante au préconditionnement TRAIL + TAKi sont similaires aux profils de la population non-préconditionnée traitée par TRAIL (Figure 3.3 B).

Plusieurs doses d'inhibiteurs de TAK1 ont ensuite été employées afin de déterminer si nous étions bien dans une inhibition de la mise en place de la résistance ou alors dans un phénomène de sensibilisation qui masquerait la résistance induite par le traitement TRAIL. L'emploi de doses croissantes de l'inhibiteur de TAK1 a eu pour effet lors du préconditionnement d'augmenter le pourcentage de cellules en apoptose. Cependant, l'effet du préconditionnement par TRAIL en combinaison des doses croissantes de l'inhibiteur de TAK sur les cellules survivantes au préconditionnement conserve le même effet lors du second traitement, les cellules survivantes ont une sensibilité à l'apoptose identique aux cellules naïves non préconditionnées (Figure 3.3 C).

Afin de déterminer quel serait l'acteur moléculaire en aval de TAK1 responsable de la mise en place de la résistance à un second traitement TRAIL 24h après le premier, nous avons lors du préconditionnement par TRAIL inhibé les différentes protéines régulées par TAK1 connues pour participer à la sensibilité des cellules à l'apoptose. Chacune des doses d'inhibiteurs employées durant le préconditionnement ont été sélectionnées afin de doubler la sensibilité des cellules à l'apoptose induite par TRAIL lors du préconditionnement (résultats non montrés). L'inhibition de TAK1 (5Z-7-Oxozeaenol [2,5 μ M]) lors du préconditionnement inhibe de nouveau la mise en place de la résistance, restaurant la sensibilité d'origine de la population en comparaison du contrôle et de la population préconditionnée par 5 ng.mL⁻¹ de TRAIL. L'inhibition de MKK par l'U0126 [10 μ M] en combinaison de TRAIL durant le

préconditionnement ne semble pas avoir d'effet sur la mise en place de la résistance au second traitement en comparaison des cellules préconditionnées par TRAIL seul. L'inhibition de JNK par l'utilisation de SP600125 a eu pour effet d'augmenter la résistance induite par le preconditionnement TRAIL lors du second traitement. Inversement, il semblerait qu'inhiber IKK avec le BMS 345541 [2.5 μ M] et P38 avec le SB 202190 [10 μ M] lors du preconditionnement inhibe partiellement la mise en place de la résistance des cellules survivantes au preconditionnement lors du second traitement de 24h par TRAIL 10 ng.mL⁻¹ (Figure 3.3 D).

TAK permet donc lors de la transduction du signal apoptotique d'induire une résistance transitoire dans les cellules survivantes qui se traduit par une diminution du potentiel d'activation de caspase-8 ainsi qu'une sensibilité réduite lors d'un second traitement.

L'inhibition de l'activité caspase-8 serait donc un facteur clé de la résistance à l'apoptose. Elle est aussi décrite comme étant une condition requise pour l'induction de la nécroptose par TRAIL dans la littérature. Nous allons donc dans les prochaines expériences vérifier l'hypothèse suivante : la résistance à l'apoptose induite par TRAIL pourrait sensibiliser les cellules survivantes à la nécroptose.

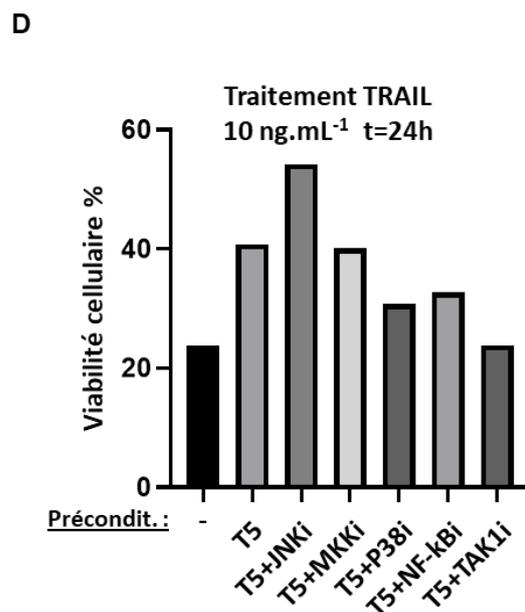
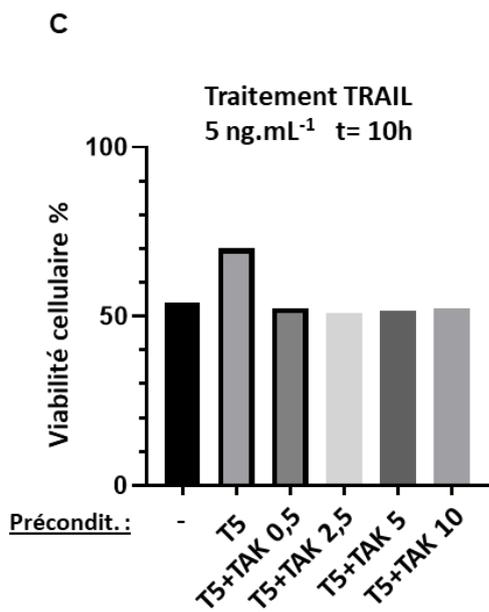
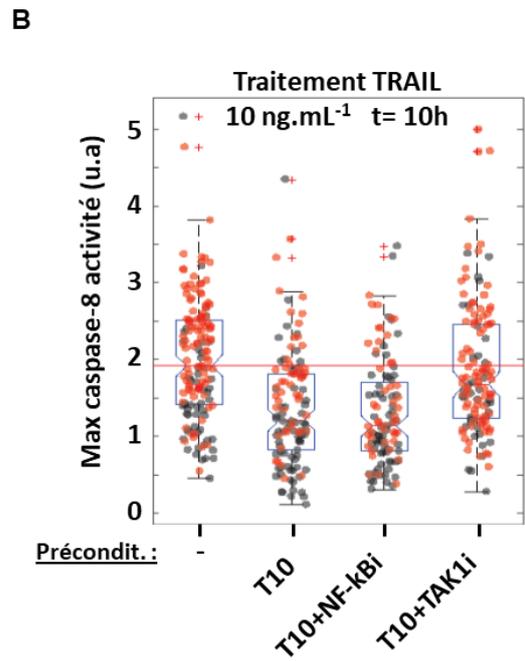
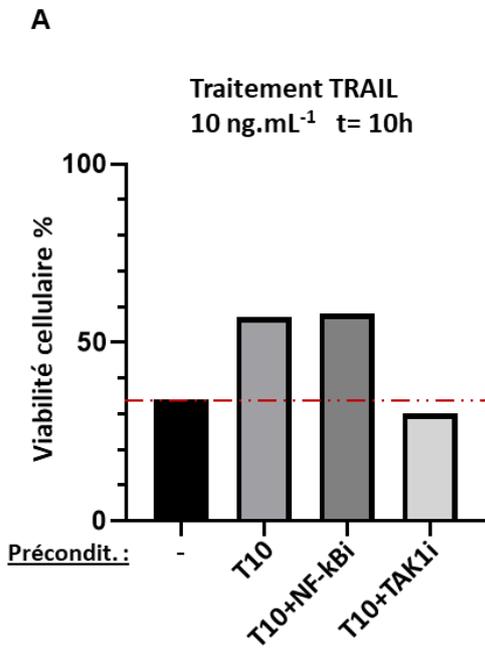


Figure 3-3 : Impact de l'inhibition de TAK et des voies en aval sur l'induction de la résistance au TRAIL.

Les cellules HeLa IC ont été préconditionnées ou non par TRAIL seul ou en combinaison d'inhibiteurs spécifiques des voies en aval de TAK et TAK lui-même. Après 20h de traitement, les cellules sont réensemencées pour analyse LCM du second traitement 24h après le premier. **(A)** Pourcentage de cellules survivantes à 10h du second traitement TRAIL (10 ng.mL^{-1}) en fonction du préconditionnement TRAIL en combinaison avec les inhibiteurs de TAK (5Z-7-Oxozeaenol [$2,5 \mu\text{M}$]) et de IKK (BMS 345541 [$2.5\mu\text{M}$]). **(B)** Dispersion du maximum d'activité caspase-8 récoltée dans chaque cellule durant le traitement TRAIL sous LCM en fonction des préconditionnements (chaque point représente l'activité maximale d'une cellule). **(C)** Les cellules HeLa IC ont été préconditionnées au traitement TRAIL durant 20h, en combinaison de dose croissante de l'inhibiteur de TAK ($0,5 ; 2,5 ; 5 ; 10 ; \mu\text{M}$). Les cellules HeLa survivantes du préconditionnement sont ensemencées et traitées sous le microscope par 5 ng.mL^{-1} de TRAIL durant 10h. **(D)** Pourcentage de cellules survivantes à 24h du second traitement TRAIL (10ng.mL^{-1}) en fonction du préconditionnement TRAIL en combinaison avec les inhibiteurs de TAK (5Z-7-Oxozeaenol [$2,5 \mu\text{M}$]), IKK (BMS 345541 [$2.5\mu\text{M}$]), JNK (SP600125 [$10\mu\text{M}$]), MKK (U0126 [$10\mu\text{M}$]) et P38 (SB 202190 [$10\mu\text{M}$]).

3.3.2 Caractérisation morphologique et induction de la nécroptose dans le modèle HeLa.

Afin d'étudier la communication régissant les mécanismes de résistance entre les différentes modalités de morts cellulaires (apoptose et nécroptose), nous avons tout d'abord souhaité la caractériser morphologiquement et nous assurer des états de fait bibliographiques. Nous avons pour cela utilisé le modèle cellulaire HT-29 reconnu comme l'un des modèles de référence et à ce jour le plus référencé dans l'étude de la nécroptose (Figure 3.4 **A**).

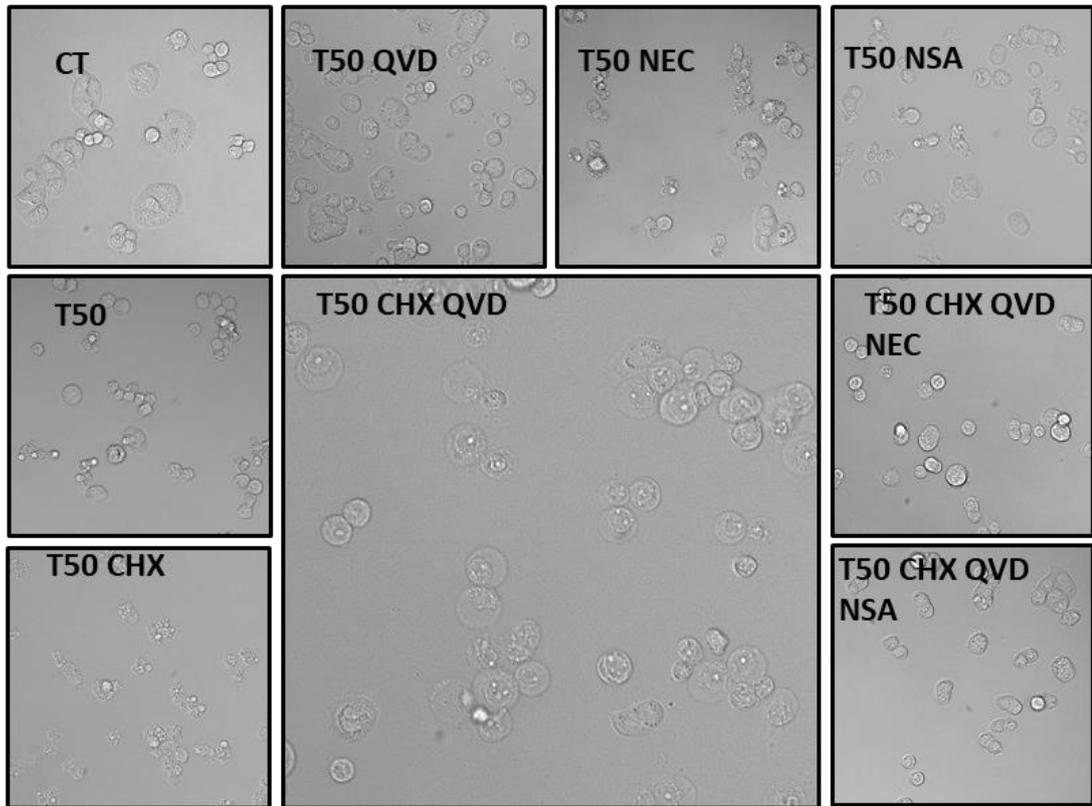
Nous avons ainsi mis au point les différents traitements inducteurs et inhibiteurs sur cette lignée par vidéo-microscopie. Un des traitement nécroptotique les plus référencés est le cocktail TNF+CHX+Z-VAD. Le TNF induit l'apoptose en tant que ligand de mort, le Z-VAD est un inhibiteur des caspases qui lève l'inhibition de RIPK3 par caspase-8 et le CHX, un inhibiteur de la traduction, permet de sensibiliser les cellules à la nécroptose. Il a été démontré que TRAIL était aussi apte à déclencher la nécroptose. Nous avons à la place du Z-VAD utilisé un autre inhibiteur des caspases, le Q-VD-OPH.

Nous avons sélectionné une dose de TRAIL permettant d'obtenir la dose létal 50 à 10h (Figure 3.4 **B**). Le traitement par TRAIL seul induit l'apoptose dans la lignée HT29 que l'on peut reconnaître par le blebbing des cellules mourantes et la formation de ces corps apoptotiques (Figure 3.4 **A**). Le co-traitement avec CHX augmente grandement la sensibilité des cellules à l'apoptose où 99% des cellules sont amenées à mourir en 10h. Lors du traitement TRAIL +

QVD, les cellules survivent toutes, TRAIL échouant à induire seul l'apoptose et la nécroptose. Cela signifie qu'inhiber les caspases lors de l'induction par TRAIL n'est pas suffisant pour stimuler le signal nécroptotique. C'est lors d'un traitement T.C.Q (TRAIL (50ng.mL⁻¹) + CHX (2.5ng.mL⁻¹) + QVD (20μM)) que la nécroptose se déclenche. Les cellules enflent rapidement avant la rupture membranaire.

Nous avons caractérisé la modalité de mort cellulaire engagée via l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de la nécroptose, l'inhibiteur de RIPK1 Nec-1 (Nécrostatine-1) et de MLKL, le NSA (nécrosulfonamide). Tous deux sont en mesure d'inhiber la nécroptose induite par le T.C.Q. Ces inhibiteurs ne semblent avoir aucun impact sur l'apoptose induite par TRAIL.

A



B

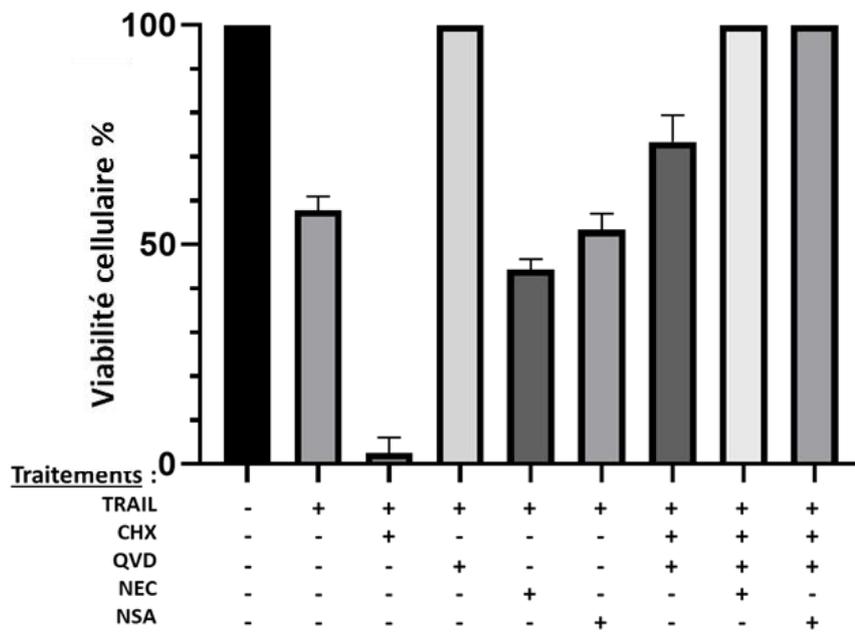


Figure 3-4 : Caractérisation morphologique de la nécroptose et impact des inhibiteurs.

Vidéo microscopie sous Delta-vision des cellules HT-29 traitées avec les différents inhibiteurs et inducteurs de la nécroptose. **(A)** Capture du canal de la lumière polarisée à 10h de traitement pour la morphologie. **(B)** Impact des différentes combinaisons de traitements sur la viabilité cellulaire à 10h. TRAIL (50ng.mL⁻¹), CHX (2. 5ng.mL⁻¹), QVD (20µM), NEC et NSA tous deux à 50µM.

Construction du modèle HeLa RIPK3-mCherry

Comme énoncé dans la section 1.4.2 de l'introduction (Nécroptose induite par TRAIL), de nombreuses lignées cancéreuses voient leurs expressions de RIPK3 inhibées au niveau de la transcription par méthylation de l'ADN. Il est possible de réexprimer RIPK3 dans ces cellules comme l'a fait Gi-Bang Koo *et al.* dans leur étude (Koo et al., 2015) par un traitement de 4 jours à l'agent déméthylant 5-aza-2'-deoxycytidine (5-AD) (Figure 3.5 A).

Les cellules HeLa n'exprimant pas RIPK3, nous l'avons réinséré et ce fusionné à la protéine fluorescente mCherry. Le fait que la lignée HeLa n'expriment plus RIPK3 par méthylation du gène offre la possibilité de corrélérer le niveau d'expression de RIPK3-mCherry aux intensités de fluorescences mCherry récoltées. RIPK3-mCherry a été cloné dans un vecteur viral pQCXIP pour transduction de la lignée. La lignée est amplifiée ensuite par cytométrie en flux pour obtention d'une lignée mixte en intégration. Des clones ont été isolés par dilution limite et la présence de RIPK3 est vérifiée par Western Blot dans ces lignées. Comme attendu, l'expression de RIPK3 endogène est présente dans la lignée contrôle HT-29 à environ 55 kD et absente dans les HeLa, alors qu'une nouvelle bande d'un poids moléculaire d'environ 85 kD apparait dans les clones transduits par le virus contenant la protéine de fusion RIPK3-mCherry (poids moléculaire mCherry : 28,8 kD) (Figure 3.5 B).

Attention cependant, au vu de la grande diversité de réponse obtenue liée à l'intégration aléatoire du transgène, nous avons finalement opté pour l'utilisation de la population mixte d'HeLa IC RIPK3-mCherry amplifiée par cytométrie pour l'ensemble des résultats présentés. En contrôle, une lignée HeLa a été générée par la même méthodologie n'exprimant que la protéine fluorescente mCherry.

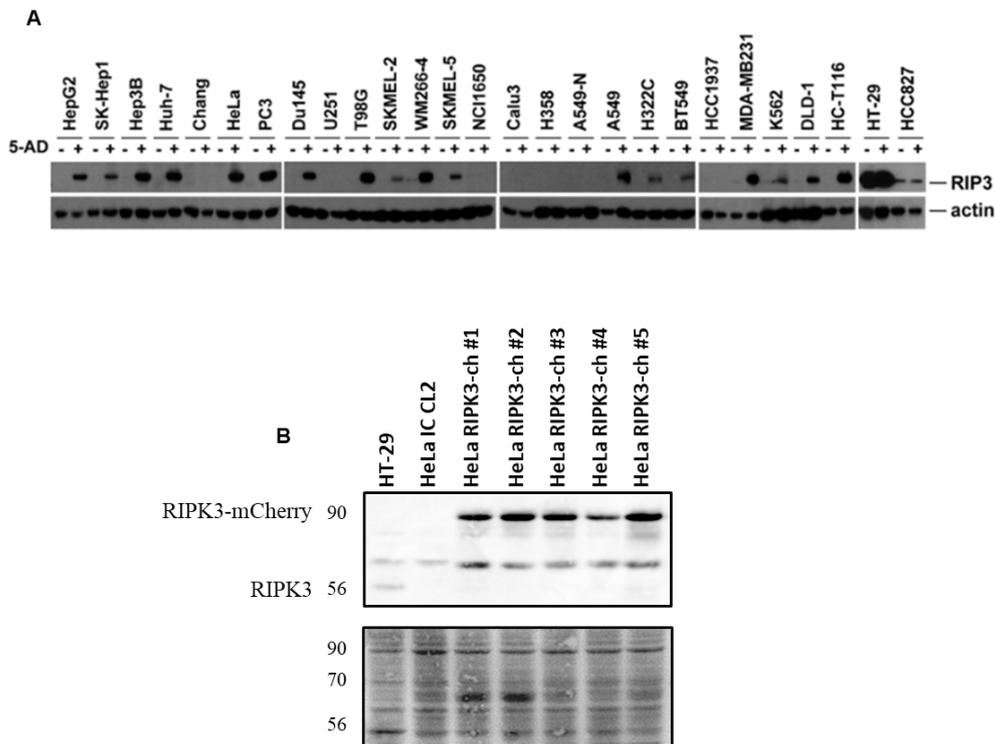


Figure 3-5 : Réexpression de la protéine RIPK3 dans le modèle cellulaire HeLa.

(A) Expression de RIPK3 dans différentes lignées après plus ou moins 4 jours de traitements à l'agents déméthylant 5-aza-2'-deoxycytidine (5-AD) 2 μ M (figure provenant de la publication de (Koo et al., 2015)). (B) Les cellules HeLa ont été transduites par un rétrovirus pour exprimer de façon stable la protéine chimérique RIPK3 en fusion du mCherry (voir 3.2.1 Clonage RIPK3 et 3.2.2 Stratégie Virus). L'expression protéique de RIPK3 et RIPK3 cherry a été analysée par Western blot en utilisant comme contrôle la lignée HT-29 et en contrôle de charge la coloration amidoblack de la membrane.

Validation du modèle HeLa

Après avoir créé cette nouvelle lignée HeLa exprimant RIPK3-mCherry, nous avons souhaité dans un premier temps déterminer si la réexpression de RIPK3 affectait l'induction du processus apoptotique lors d'un traitement par TRAIL.

RIPK3 n'impacte pas la réponse au TRAIL, la lignée HeLa ctl et HeLa RIPK3-mCherry possèdent toutes deux la même sensibilité de réponse au traitement TRAIL lors d'expériences sous microscope par comptage de cellules à 10h (Figure 3.6 A) ou lors de traitement en incubateur par le test de viabilité basé sur l'ATP Cell-Titer Glo à 24h (Figure 3.6 C). Le marquage par RIPK3-mCherry est plus spécifique que le cherry seul : il est strictement

cytosolique en condition basale alors que le marquage par le mCherry de la lignée contrôle est quant à lui diffus dans le cytoplasme et le noyau (Figure 3.6 A).

La réexpression de RIPK3 permet l'induction de la nécroptose dans les cellules HeLa. Les cellules HeLa mCherry « contrôle » ne peuvent répondre à la combinaison de traitement inducteur de nécroptose par TRAIL, l'inhibiteur de la traduction CHX et le pan-caspase inhibiteur QVD. L'expression de RIPK3 permet à la lignée générée de déclencher la nécroptose, caractérisée par un enfllement rapide des cellules, suivi de la perte d'intégrité membranaire (Figure 3.6 B). Il est à noter que la sonde d'activité caspase IC-RP ainsi que le marquage RIPK3 disparaissent totalement lors de l'étape finale de la nécroptose démontrant un fort effet de relargage du contenu cytoplasmique (données non montrées).

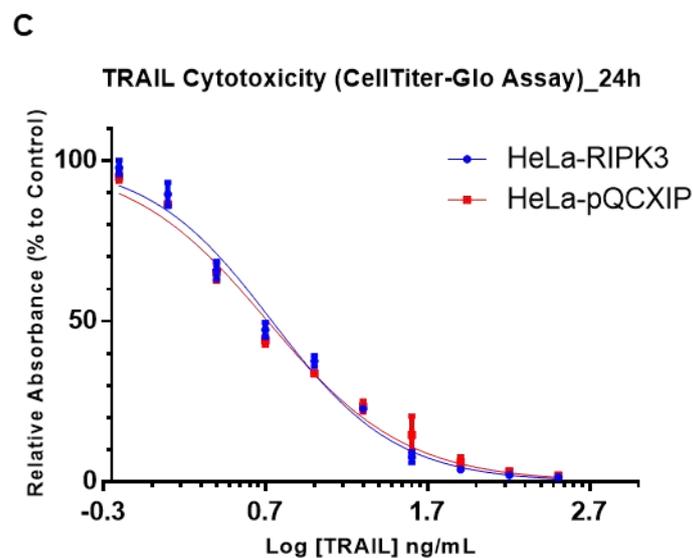
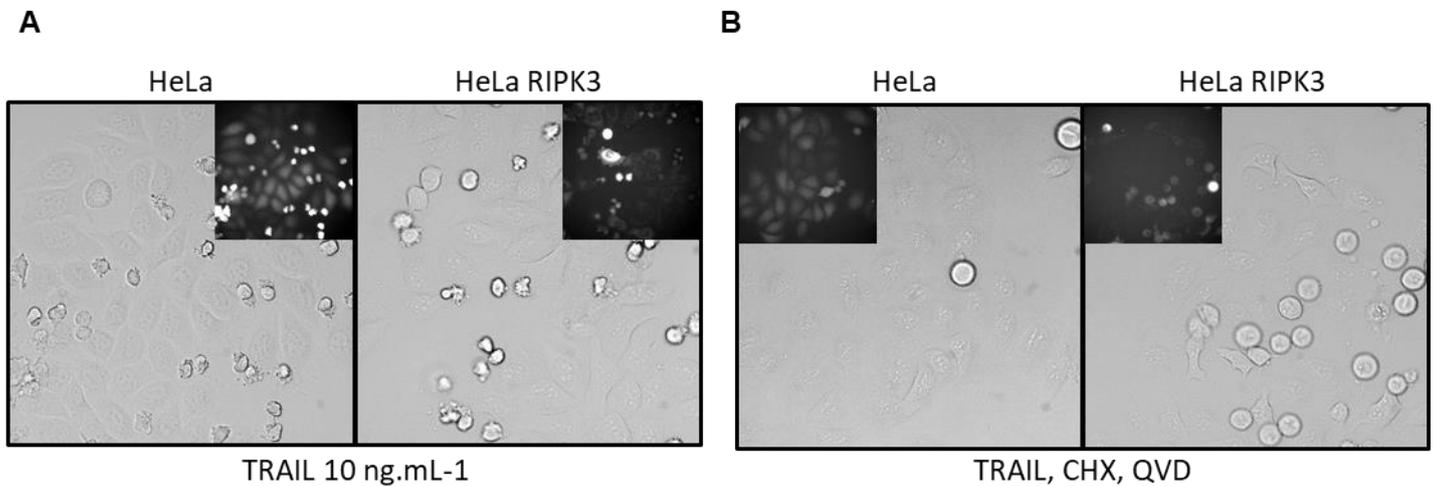


Figure 3-6 : Impact de la réexpression de RIPK3 dans la lignée HeLa.

Rôle de RIPK3 dans l'apoptose et la nécroptose induites par TRAIL. Les cellules HeLa exprimant en contrôle le vecteur vide mCherry pQCXIP et HeLa RIPK3 mCherry ont été ensemencées sur plaque en verre pour analyse sous vidéo microscopie. (A) Capture du canal de la lumière polarisée ainsi que le canal RFP pour la fluorescence mCherry à 10h de traitement TRAIL (10 ng.mL⁻¹) (B) ou en combinaison avec l'inhibiteur de traduction CHX (2.5 ng.mL⁻¹) et l'inhibiteur des caspases QVD (20μM) pour l'induction de nécroptose. (C) Dose réponse au TRAIL des cellules HeLa cherry « contrôle » et RIPK3 cherry mesurée par Celltiter-GLO à 24h de traitement.

3.3.3 L'induction de la nécroptose dépend de l'activité caspase-8 et du niveau protéique de RIPK3.

Lors des expériences précédentes de vidéo-microscopie sur cellule vivante (Figure 3.6 A et B), nous avons pu déterminer la sensibilité des lignées générées (« parentales », « contrôles » et « RIPK3 ») à l'apoptose ainsi qu'à la nécroptose. Nous avons aussi procédé à l'analyse d'images pour extraire les informations sur l'activité caspase-8 et l'impact du niveau protéique de RIPK3 sur la mort cellulaire par apoptose et nécroptose induite par TRAIL.

Les cellules de phénotype « sensible » et « résistant » d'une même condition sont séparées en deux groupes afin de visualiser la tendance de chaque profil de réponse phénotypique en termes de maximum d'activité caspase-8. Comme attendu lors d'un traitement apoptotique par TRAIL, le groupe « sensible » est le groupe qui atteint des activités caspase-8 plus importantes que le groupe « résistant ». Et inversement pour la nécroptose, la caspase-8 régulant négativement la voie de la nécroptose, il est intéressant de voir que le groupe « résistant » soit composé des cellules qui atteignent de plus grandes activités caspase-8 et ce malgré l'emploi de l'inhibiteur de caspases QVD (d'où les faibles activités caspase-8 mesurées, Figure 3.7 A).

La mesure du niveau d'expression de la protéine RIPK3-mCherry dans les cellules au début d'expérience de vidéo-microscopie a permis d'observer une corrélation entre l'expression de RIPK3 et le temps de mort des cellules par nécroptose. En effet, nous observons que plus la cellule possède de fortes concentrations en RIPK3 et plus elle est susceptible de mourir rapidement. Ce qui suggère un rôle critique des niveaux d'expression de RIPK3 pour réguler l'induction de la nécroptose (Figure 3.7 B).

Au vu des résultats précédents (Figure 3.6 A et C), nous avons vu que la réinsertion de RIPK3 n'avait aucun impact sur la sensibilité cellulaire globale de la population à l'apoptose induite par TRAIL. Le suivi vidéo-microscopique de chaque cellule en population permet d'associer le

niveau de fluorescence mCherry (et donc le niveau protéique de RIPK3) d'une cellule à sa réponse phénotypique au TRAIL. Nous pouvons observer ainsi qu'il n'existe aucune différence de répartition de la fluorescence entre les deux populations sensibles et résistantes à l'apoptose (Figure 3.7 C).

A l'inverse, nous venons de voir que les niveaux d'expression de RIPK3 semblent être un facteur clé de la régulation de l'induction de la nécroptose, mettant en évidence l'existence d'un seuil du niveau de RIP3K permettant la propagation du signal nécroptotique. On peut aussi constater qu'il existe une différence significative d'intensité mCherry mesurée à l'origine du traitement entre les cellules sensibles et résistantes (plus le niveau est faible et plus les cellules sont prédisposées à résister la nécroptose, Cf. Figure 3.7 D).

Il est important de noter qu'il est possible d'augmenter la quantité de mort cellulaire dans la condition nécroptose et de tuer 99% de la population quand aucune des cellules de la population RIPK3- ne meurt. Cela signifie que toutes les cellules expriment de façon stable RIPK3 et que la résistance observée n'est pas liée à une absence de la protéine. Cela nous conforte aussi dans le fait que l'expression du transgène semble être cohérent au niveau d'expression de ce gène dans d'autres lignées, mais des expériences supplémentaires sont nécessaires pour nous en assurer.

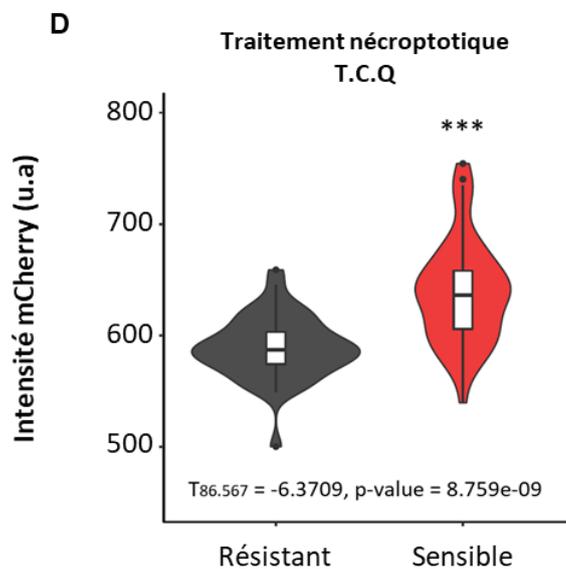
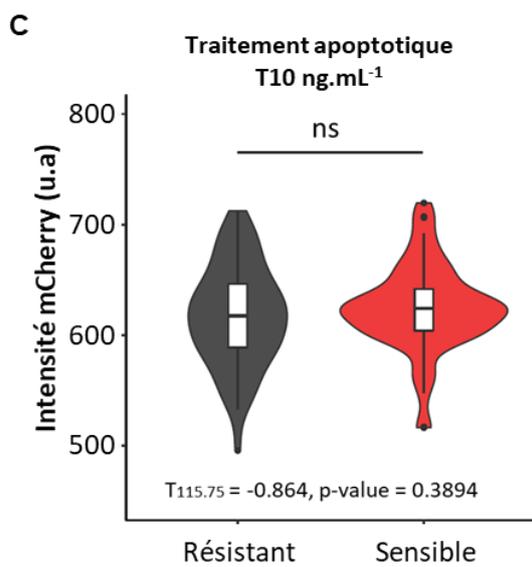
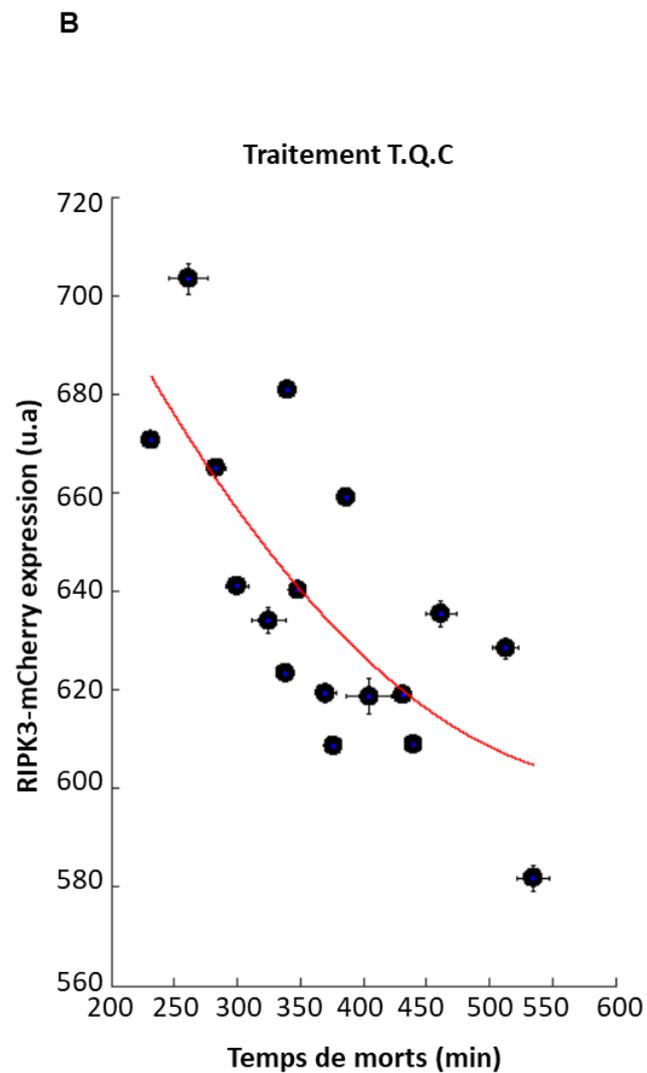
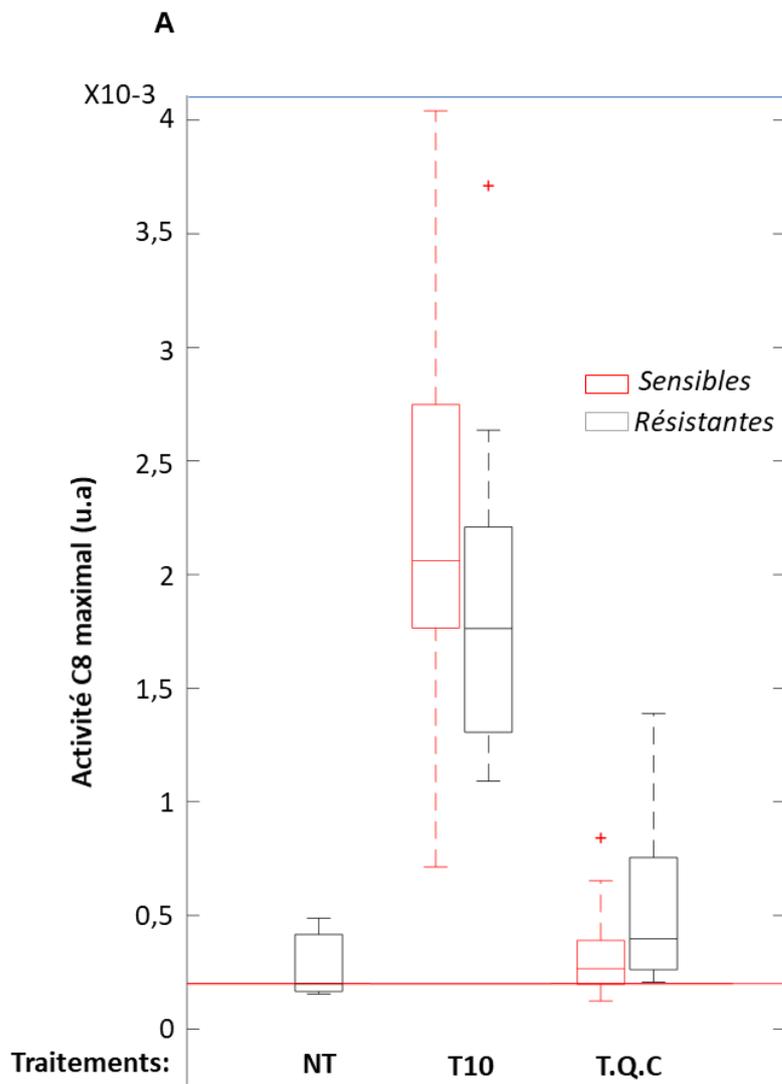


Figure 3-7 : Suivre de l'activité caspase-8 et du niveau protéique RIPK3 associé au devenir cellulaire.

Les cellules HeLa IC RIPK3 mCherry sont analysées sous vidéo microscopie lors de l'induction de l'apoptose et de la nécroptose. **(A)** Maximum d'activité caspase-8 atteint par chaque cellule des conditions « contrôle », apoptotiques (TRAIL 10ng.mL⁻¹) ou nécroptotiques T.C.Q (TRAIL 10ng.mL⁻¹, CHX 2.5 ng.mL⁻¹ et QVD 20μM) séparée en fonction de la réponse phénotypique au cours du traitement (rouge = sensible, noir = résistant). **(B)** Relation entre temps de mort et expression de RIPK3 cherry des cellules traitées par T.C.Q (TRAIL (10ng.mL⁻¹) CHX (2.5 ng.mL⁻¹) et QVD (20μM)). Chaque point représente la moyenne des 3 cellules les plus proches. En rouge : la courbe d'ajustement polynomial quadratique. **(C)** L'intensité de fluorescence mCherry de chaque cellule récoltée au début de l'expérience correspondant au niveau protéique de RIPK3 des cellules destinées à survivre ou mourir à un traitement apoptotique TRAIL (10ng.mL⁻¹) **(D)** ou nécroptotique T.C.Q (TRAIL (10ng.mL⁻¹) CHX (2.5 ng.mL⁻¹) et QVD (20μM)).

3.3.4 La nécroptose induit une résistance à un deuxième traitement nécroptotique consécutif

Dans la partie suivante de notre travail, nous avons cherché à savoir si un traitement nécroptotique peut induire une résistance cellulaire à la nécroptose lors de traitements successifs, à l'image du phénomène observé après induction de l'apoptose (Flusberg *et al.*)

Induction d'une résistance à la nécroptose dans le modèle HeLa IC RIPK3

L'objectif est donc de déterminer si un préconditionnement à la nécroptose protège ensuite les cellules survivantes d'un second traitement. Pour cela, les cellules HeLa RIPK3 ont été préconditionnées par deux traitements nécroptotiques différents, la combinaison T.C.Q (TRAIL CHX QVD) déjà employée dans les expériences précédentes, et la combinaison T.B.Q (TRAIL BV6 QVD). Le BV6 est un SMAC-mimétique, un antagoniste des cIAP. Les cIAP sont impliquées dans la poly-ubiquitination de RIPK1, ce qui induit NF-κB en plus d'inhiber la formation du ripoptosome et du nécrosome, et donc l'apoptose et la nécroptose. Nous avons employé ces deux traitements afin de nous assurer que les effets perçus ne pouvaient être attribué au CHX par exemple, qui en tant qu'inhibiteur de la traduction à un effet très large sur la biologie de la cellule.

Comme pour l'apoptose, un préconditionnement nécroptotique induit une résistance lors d'un second traitement 24h plus tard. Un préconditionnement au T.B.Q tout comme au T.C.Q protège du second traitement au T.B.Q, augmentant la résistance de la population à la

nécroptose (Figure 3.8 A). Nous obtenons les mêmes effets avec un second traitement T.C.Q (données non montrées).

Les images en contraste de phase ont été capturées à l'origine ainsi qu'à la fin du traitement (10h) de la population naïve et survivante au premier traitement T.B.Q (Figure 3.8 B). Durant le préconditionnement T.B.Q, les cellules meurent par nécroptose exclusivement. Nous pouvons cependant apercevoir des corps apoptotiques dans la condition survivante au début du traitement, probablement lié à l'épuisement de l'inhibiteur des caspases QVD dans ces cellules alors que l'inhibition cIAP par le BV6 et l'induction par TRAIL persistent. Ces cellules sont exclues du décompte ainsi que de l'analyse.

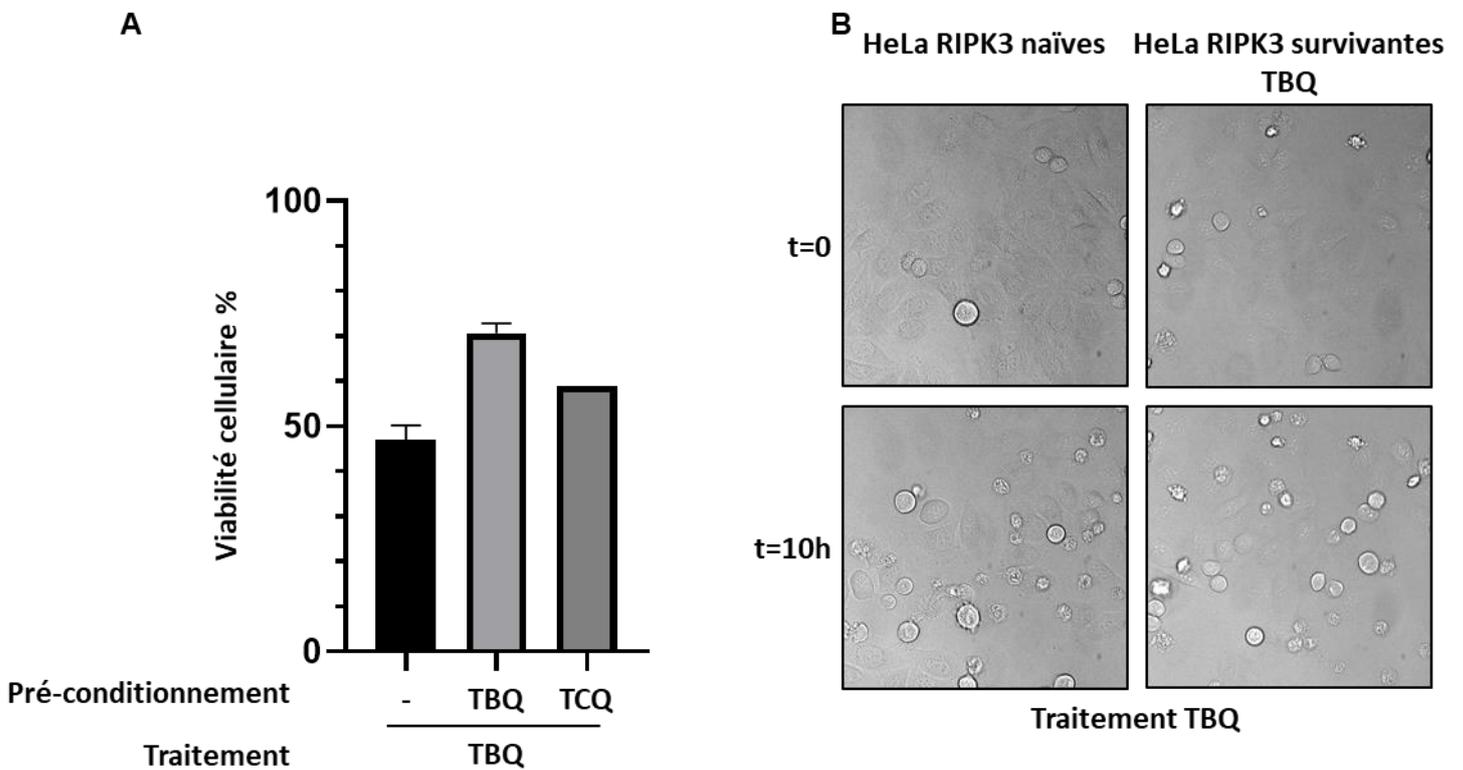


Figure 3-8 : Résistance au traitement nécroptotique lors d'un second traitement consécutif.

Analyse LCM et mise en évidence d'une résistance à la nécroptose. **(A)** Les cellules HeLa IC RIPK3 mCherry ont été préconditionnées ou non au préalable par le traitement nécroptotique T.B.Q (TRAIL (20 ng.mL⁻¹) QVD (20μM) et le SMAC mimétique BV-6 (0,2μM)) ou le T.C.Q (CHX (2.5ng.mL⁻¹)) pendant 20h. Les cellules naïves et survivantes au préconditionnement sontensemencées et traitées 24h après sous vidéo microscopie par la combinaison de traitement T.B.Q (TRAIL (10 ng.mL⁻¹) BV-6 (0,2 μM) et QVD (20μM)) pendant 10h pour analyse de la viabilité. **(B)** Capture de l'image de lumière polarisée à l'origine et à la fin du traitement T.B.Q de la population naïve et préconditionnée.

Le niveau protéique de RIPK3 n'explique pas la résistance à la nécroptose.

Sachant que la sensibilité à la nécroptose est liée au niveau protéique de RIPK3 (Figure 3.7 **B**), la première question que nous nous sommes donc posés fut : est-ce que cette résistance peut être liée à la sélection d'une population résistante, c'est-à-dire à une population qui exprime peu RIPK3 ?

Nous avons remarqué que le préconditionnement nécroptotique a eu pour effet d'augmenter les activités caspase-8 sous un traitement nécroptotique de surcroît, c'est-à-dire malgré l'emploi de l'inhibiteur des caspases QVD (Figure 3.9 **A**).

Etonnamment, les cellules survivantes au traitement sont équivalentes en termes d'expression de RIPK3-mCherry que la population naïve (Figure 3.9 **B**). Cela exclue ainsi l'hypothèse d'une résistance liée à une sélection ou bien une consommation de RIPK3 dans nos cellules survivantes.

Comme montré dans la (Figure 3.7 **B**), les cellules survivantes à un traitement nécroptotique T.B.Q ont tendance à avoir un niveau protéique de RIPK3 plus faible que celui retrouvé dans les cellules sensibles/mourantes lors du traitement. Le niveau de RIPK3 permet de prédire la sensibilité des cellules à un traitement nécroptotique (Figure 3.9 **C**). Lorsque les cellules sont préconditionnées au T.B.Q, la tendance de sensibilité en fonction du niveau de RIPK3 est conservée. Cependant il semblerait que les cellules survivantes sont maintenant capables de tolérer une quantité plus importante de RIPK3 avant de basculer dans la population sensible (Figure 3.9 **D**). Ce qui signifie qu'un mécanisme de résistance s'est mis en place lors de la première induction nécroptotique afin de protéger les cellules d'un second traitement. Malgré l'impact du niveau de RIPK3 sur la sensibilité des cellules à la nécroptose, il semblerait que cette résistance à la nécroptose induite par le préconditionnement nécroptotique soit

indépendante d'une modulation du niveau protéique de RIPK3 dans les cellules survivantes. Il est donc possible que cette résistance observée à la nécroptose provienne d'une pré-activation des caspases, dont la caspase-8 qui antagonise la voie de la nécroptose lorsqu'elle est active.

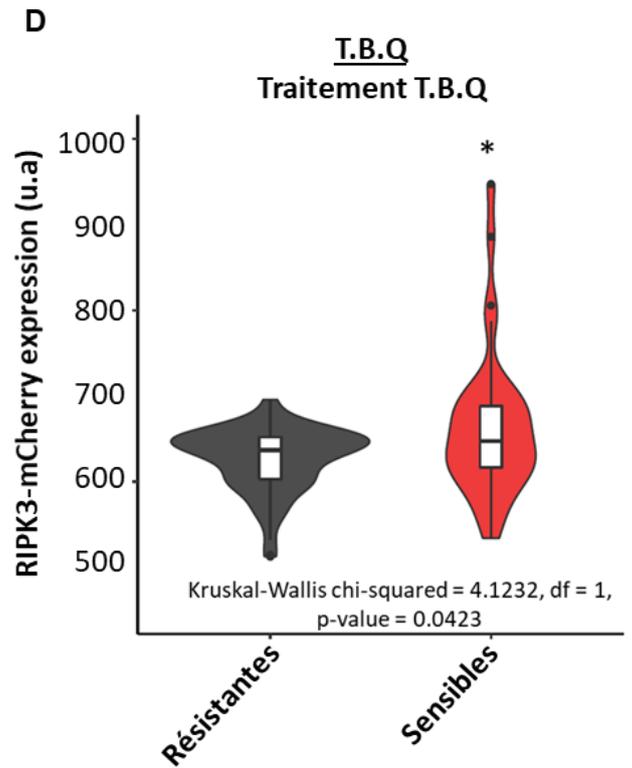
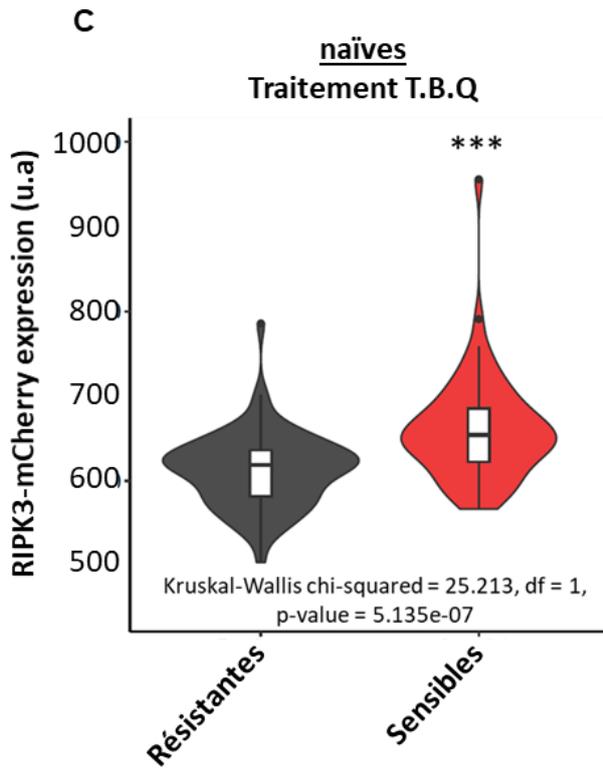
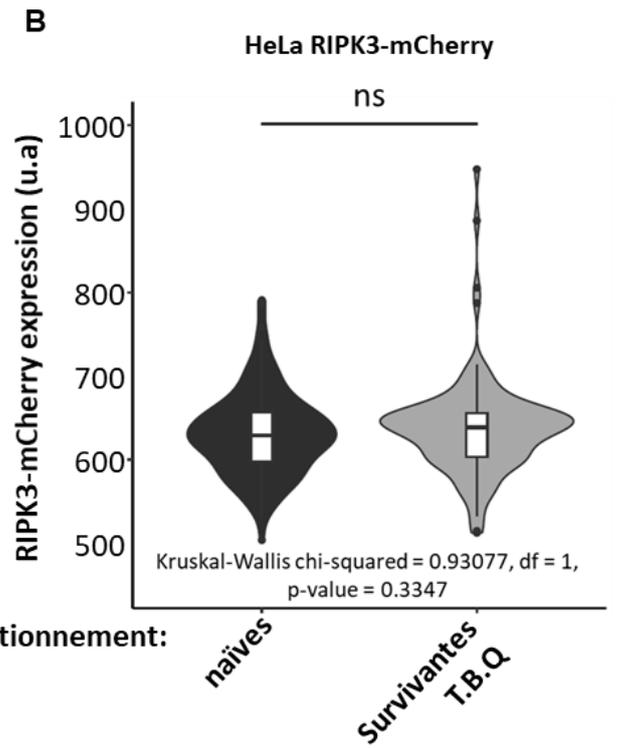
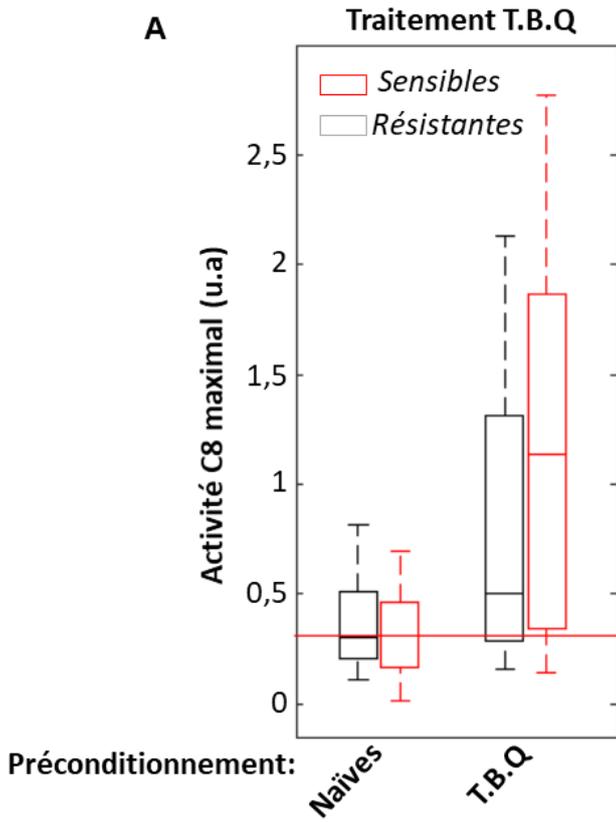


Figure 3-9 : Suivre de l'activité caspase-8 et niveau protéique RIPK3 en fonction du préconditionnement et de la sensibilité à la nécroptose.

A la suite de l'expérience (3.3.4), les images provenant des vidéos microscopiques sont analysées dans les canaux CFP, YFP et Cherry afin d'extraire les informations relatives sur le niveau protéique de RIPK3 et l'activité caspase-8. **(A)** Moyenne des maximums d'activité caspase-8 de chaque cellule obtenue après analyse d'image par Image J. **(B)** Box Plots représentant la dispersion mCherry corrélée au niveau protéique de RIPK3 de la population naïve contre la population préconditionnée au T.B.Q au temps t0 du second traitement. **(C)** Dispersion de l'intensité relative de mCherry dans la condition population contrôle des cellules résistantes ou sensibles au traitement T.B.Q. **(D)** Dispersion de l'intensité relative de mCherry dans la condition population préconditionnée au T.B.Q des cellules résistantes ou sensibles au second traitement T.B.Q.

3.3.5 La séquence des modalités de morts cellulaires induites à un impact différent sur la sensibilité cellulaire lors du second traitement.

Nous avons donc pu démontrer pour la première fois qu'un préconditionnement, aussi bien apoptotique que nécroptotique, induisait une résistance à un second challenge pour la même modalité de mort cellulaire. A ce stade, nous voulions déterminer si la résistance induite était commune aux différentes modalités de mort cellulaire ou si elle était spécifique d'une induction et enfin s'il était possible de la contourner en alternant les traitements.

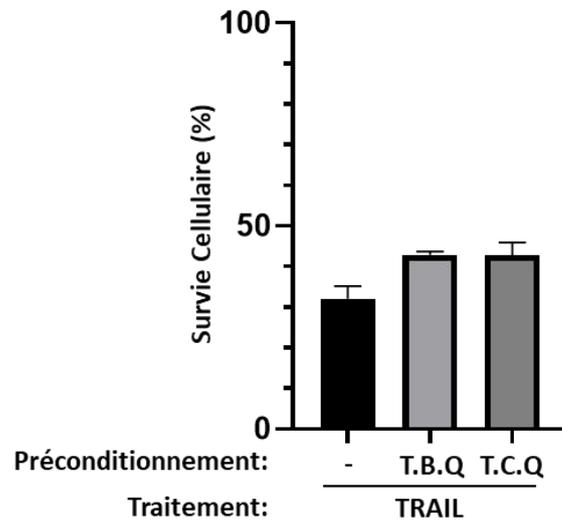
La nécroptose suivie de l'apoptose entraîne une résistance des cellules à la mort cellulaire

Les mécanismes de résistance engagés par un traitement nécroptotique sont encore mal connus. Il a été démontré que l'activation de la nécroptose engageait aussi la voie de survie NF- κ B, ce qui pourrait suggérer une résistance potentielle pour un second challenge apoptotique. Il existe de multiples façons d'induire de la nécroptose, nous nous sommes concentrés ici sur la nécroptose induite par TRAIL.

Nous avons préconditionné les cellules HeLa RIPK3 mCherry avec les deux traitements nécroptotiques T.B.Q et T.C.Q (TRAIL, QVD, BV-6 ou CHX) afin d'éviter d'observer un effet propre à un inhibiteur. Les cellules survivantes et les naïves sont ensemencées pour un second challenge apoptotique par le ligand de mort TRAIL. Les préconditionnements ont permis tous deux d'octroyer une résistance au TRAIL lors du second traitement en vidéo-microscopie. L'induction de résistance est plus faible que lors d'un préconditionnement par TRAIL seul (Figure 3.3 A), mais ont cependant le même effet avec les deux inhibiteurs utilisés (CHX ou BV-6) (Figure 3.10 A).

Comme observé précédemment, des cellules apoptotiques sont retrouvées au début d'expériences de vidéo-microscopie dans les conditions prétraitées. Ces cellules sont mortes entre l'ensemencement et le début de l'expérience, dans des conditions de prétraitements induisant exclusivement de la nécroptose. Les cellules non traitées des conditions préconditionnées prolifèrent normalement sans induction de mort durant toute la vidéo-microscopie. On peut noter cependant que la prolifération des cellules prétraitées par le CHX est largement réduite, comme on peut aussi le constater dans les images au temps t0 du panel (Figure 3.10 **B**) où une population cellulaire moins dense est retrouvée malgré un ensemencement identique.

A



B

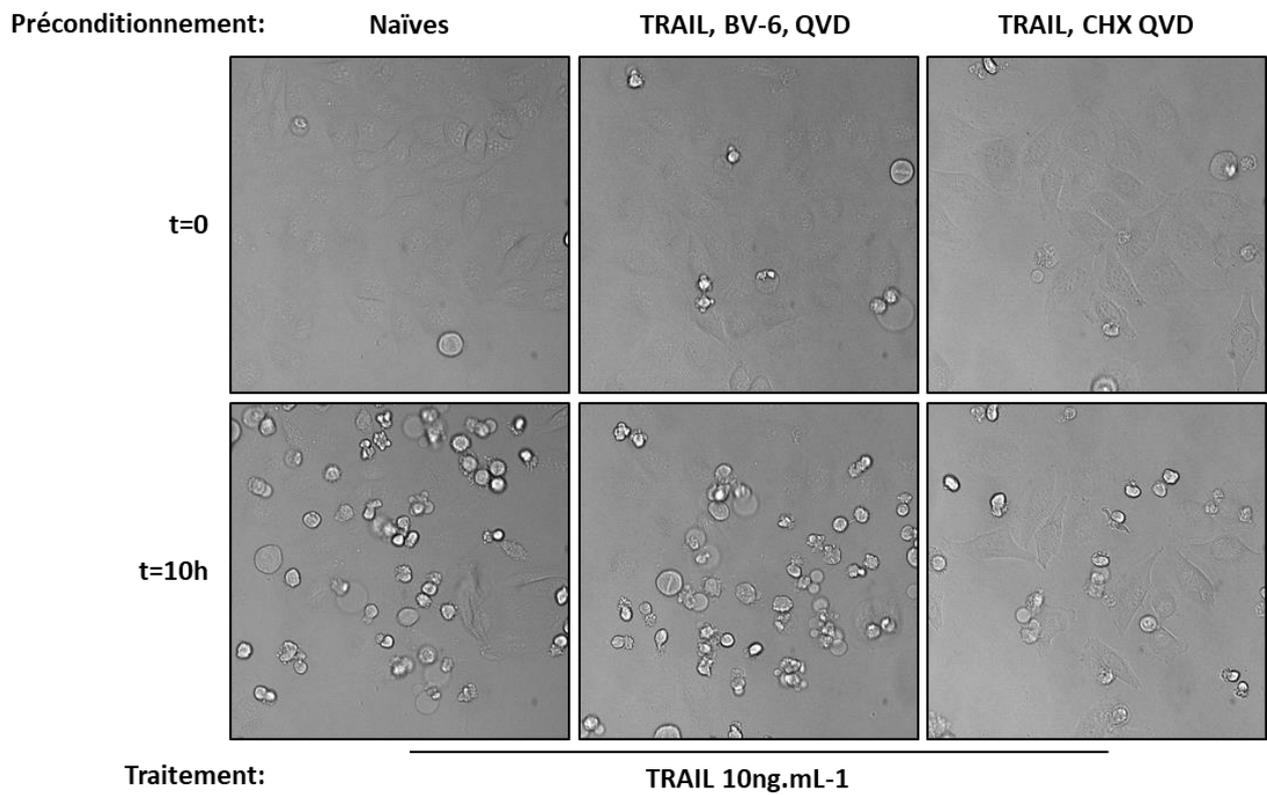


Figure 3-10 : Résistance à l'apoptose induit par TRAIL des cellules préconditionnées à la nécroptose.

Analyse de l'effet d'une alternance des séquences de modalités de mort cellulaire. Les cellules HeLa IC RIPK3-mCherry sont préconditionnées ou non avec deux combinaisons de traitement inducteurs de nécroptose T.C.Q et T.B.Q (TRAIL (20 ng.mL⁻¹), QVD (20 μM) et CHX (2.5 ng.mL⁻¹) ou BV-6 (0,2 μM)) pendant 20h. **(A)** Les cellules survivantes et naïves sont ensemencées après 9h de récupération sur plaque en verre prétraitées au collagène pour analyse sous LCM du second traitement par TRAIL (20 ng.mL⁻¹) 24h après la fin du premier. La viabilité cellulaire est récoltée à 10h dans chaque condition. **(B)** Images des cellules à l'origine du second traitement t₀ ainsi qu'à la fin (10h).

L'apoptose suivie de la nécroptose entraîne une sensibilité des cellules à la mort cellulaire

Sachant que l'induction de la nécroptose peut protéger d'un second traitement apoptotique (ainsi que nécroptotique), c'est maintenant par un préconditionnement apoptotique que nous allons vérifier notre hypothèse, à savoir si des cellules rendues résistantes à l'apoptose peuvent-elles devenir plus sensibles à de la nécroptose ?

Les cellules ont donc été préconditionnées à l'apoptose induite par TRAIL (20 ng.mL⁻¹) ou non pendant 20h. Les cellules survivantes et naïves sont réensemencées et traitées pour un traitement nécroptotique en vidéo-microscopie. Pour la première fois dans nos expériences, le préconditionnement n'induit pas de résistance mais bien une sensibilité. Les cellules survivantes au préconditionnement TRAIL sont environs deux fois plus sensibles aux traitements nécroptotiques T.B.Q ainsi qu'au T.C.Q en comparaison des cellules naïves du préconditionnement (Figure 3.11 A).

Malgré la présence de quelques cellules en apoptose dans les conditions préconditionnées, les cellules meurent exclusivement de nécroptose lors du second challenge et beaucoup plus rapidement que les cellules naïves.

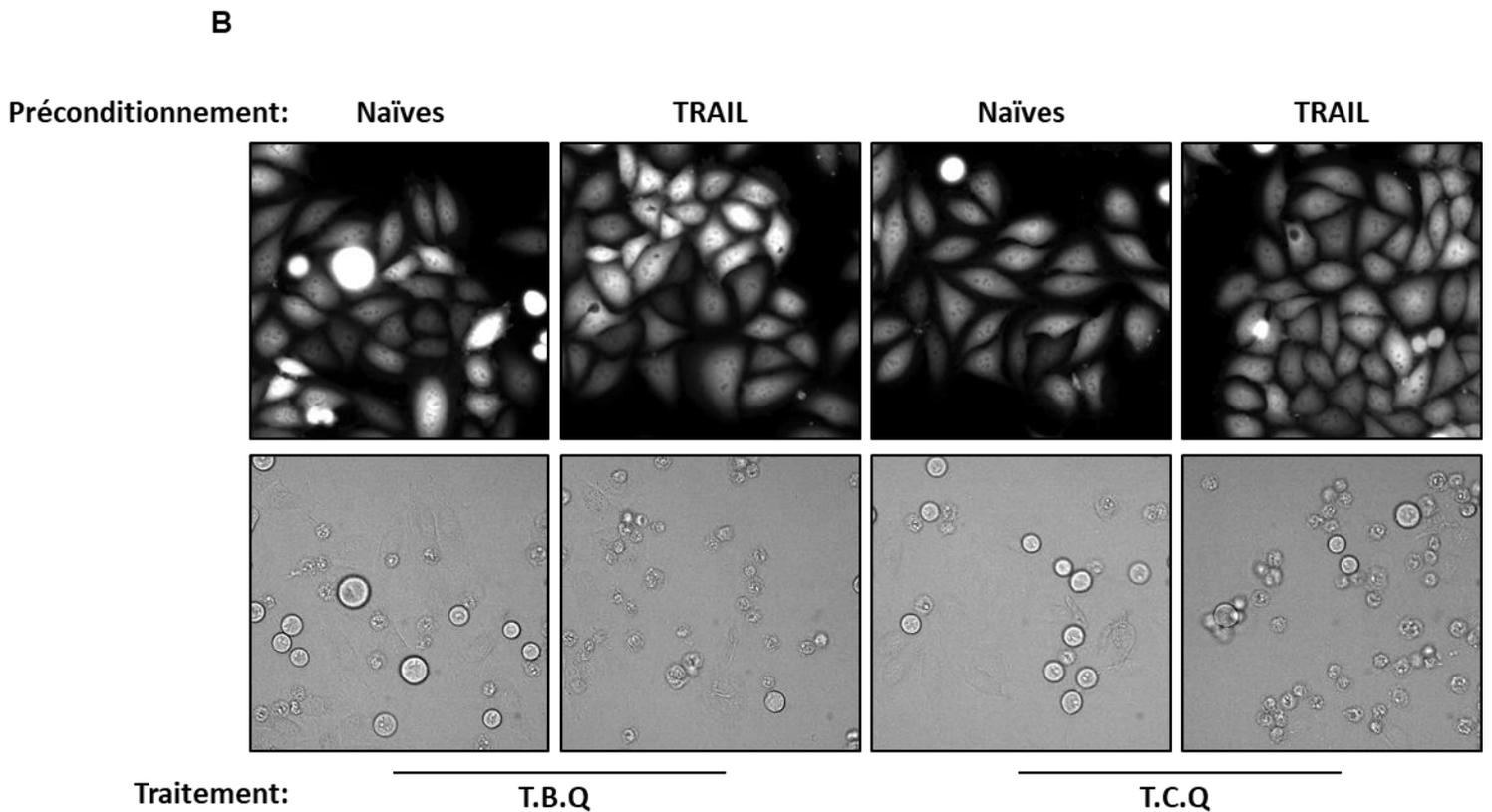
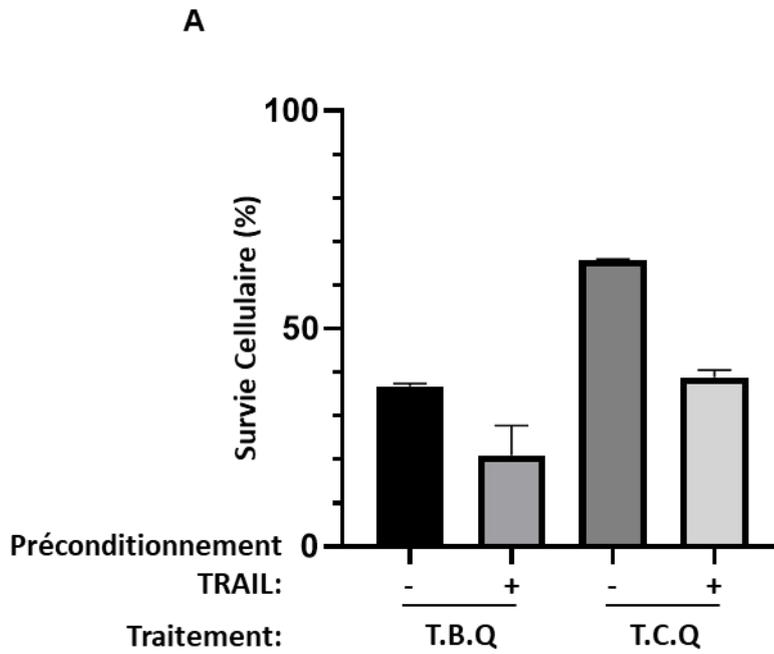


Figure 3-11 : Sensibilité des cellules à la nécroptose après une induction apoptotique par TRAIL.

Analyse de l'effet d'une alternance des séquences de modalités de morts cellulaires, maintenant en commençant par l'induction apoptotique. Les cellules HeLa IC RIPK3-mCherry sont préconditionnées ou non par TRAIL (20 ng.mL⁻¹) pendant 20h. Les cellules survivantes et

naïves sontensemencées après 9h de repos sur plaque en verre prétraitées au collagène pour analyse sous LCM des deux traitements inducteurs de nécroptose T.C.Q et T.B.Q (TRAIL (20 ng.mL⁻¹), QVD (20 µM) et CHX (2.5 ng.mL⁻¹) ou BV-6 (0,2 µM)). (A) La viabilité cellulaire est récoltée dans chaque conditions à 10h. (B) Images des cellules à l'origine du second traitement t=0 ainsi qu'à 10h.

3.3.6 L'apoptose induit une sensibilisation au traitement nécroptotique successif par une augmentation de RIPK3.

Afin de déterminer quelle pouvait être l'origine de cette sensibilité induite par TRAIL à un second challenge nécroptotique, nous avons analysé les niveaux de RIPK3 dans nos cellules survivantes lors de la précédente expérience (Fig 3.11. A) sous microscope.

Le niveau de RIPK3 retrouvé dans les cellules survivantes au TRAIL a considérablement augmenté en comparaison des cellules naïves (Figure 3.12 A) et pourrait expliquer cette sensibilité accrue. L'expression ectopique de RIPK3 n'étant pas contrôlée au niveau de son promoteur endogène, il semblerait que le préconditionnement par TRAIL a eu pour conséquence une accumulation de RIPK3 dans les cellules survivantes.

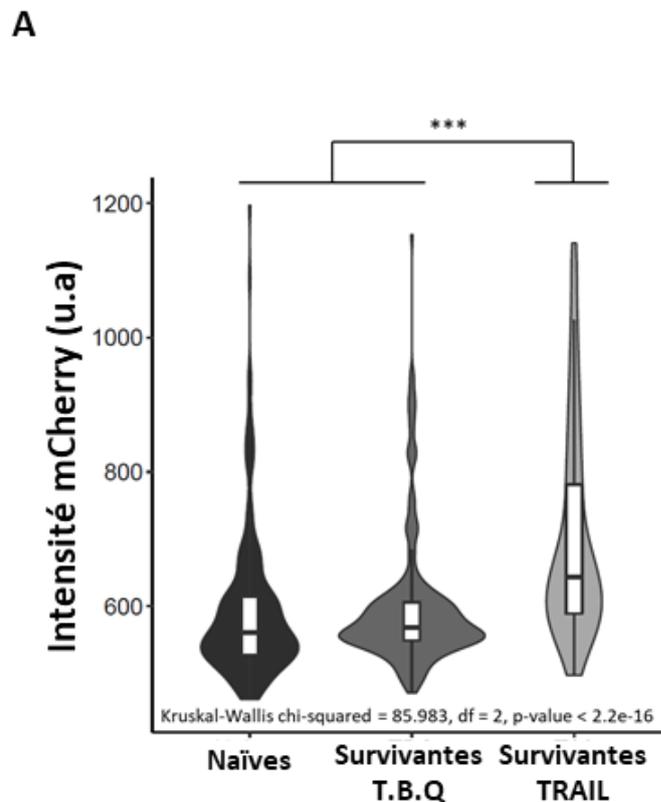


Figure 3-12 : Effet du préconditionnement par TRAIL sur les niveaux de RIPK3 des cellules survivantes.

Lors de l'expérience 3.11 (A) et (B), analyse des niveaux RIPK3 cherry et des maximums d'activités caspase-8 en fonction du préconditionnement par TRAIL en comparaison des cellules naïves. (A) Le niveau d'intensité de fluorescence cherry est mesuré dans chaque cellule pour analyse de la dispersion dans la population naïve en comparaison des préconditionnées par TRAIL.

3.3.7 La séquence des modalités de mort cellulaire induites impacte l'évolution de la réponse au traitement.

Nous avons alors mis en place une expérience de viabilité, afin de déterminer *in vitro* quel était le traitement le plus efficace après un préconditionnement nécroptotique T.C.Q. Nous avons sélectionné une dose de TRAIL (40ng. mL⁻¹) capable de tuer 90% des cellules et proche de la dose à effet maximal que nous avons utilisé pour le traitement apoptotique et nécroptotique en combinaison avec le QVD (20 µM.mL⁻¹) et le CHX (2.5 ng.mL⁻¹).

Le préconditionnement T.C.Q tue 90 % des cellules en 15h. Une fois les cellules lavées et le milieu renouvelé, les cellules sont laissées aux repos durant 9h, elles prolifèrent alors faiblement dû à l'inhibiteur de la traduction CHX. Retraiter les cellules 9h après par un second traitement T.C.Q s'avère alors complètement inefficace. Les cellules HeLa prolifèrent plus vite qu'elles ne meurent lors du second traitement. On obtient une population certes moins dense que si elle n'avait pas été retraitée, mais plus importante néanmoins qu'à la fin du premier traitement.

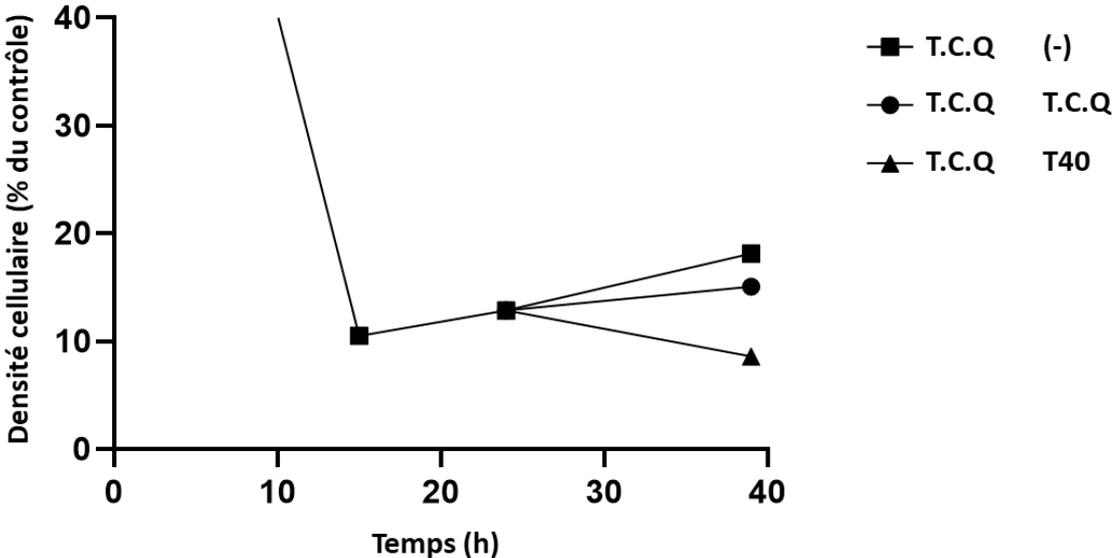
Les cellules résistent aussi à un second challenge apoptotique par TRAIL, n'atteignant pas le potentiel d'efficacité obtenu lors d'un premier challenge. Dans cette expérience, malgré la résistance induite dans les cellules survivantes aux différentes modalités de morts cellulaires, alterner le traitement semble plus efficace afin de réduire la population de cellule cancéreuse totale. (Figure 3.13 A).

Le préconditionnement par TRAIL 40 ng.mL⁻¹ tue 90% de la population d'origine, avec la même efficacité que le traitement nécroptotique T.C.Q. Retraiter les cellules par TRAIL se révèle inefficace pour réduire la population. Cela limite à peine les effets de la prolifération et nous constatons un plus grand nombre de cellules survivantes lors du second traitement en comparaison du nombre retrouvé à la fin du premier. Par contre, en traitant pour la deuxième fois les cellules au traitement nécroptotique T.C.Q, nous éliminons cette fois-ci la quasi-totalité

de la population cellulaire (seules quelques colonies persistent) avec plus d'efficacité que lors du premier traitement T.C.Q (Figure 3.13 B).



A



B

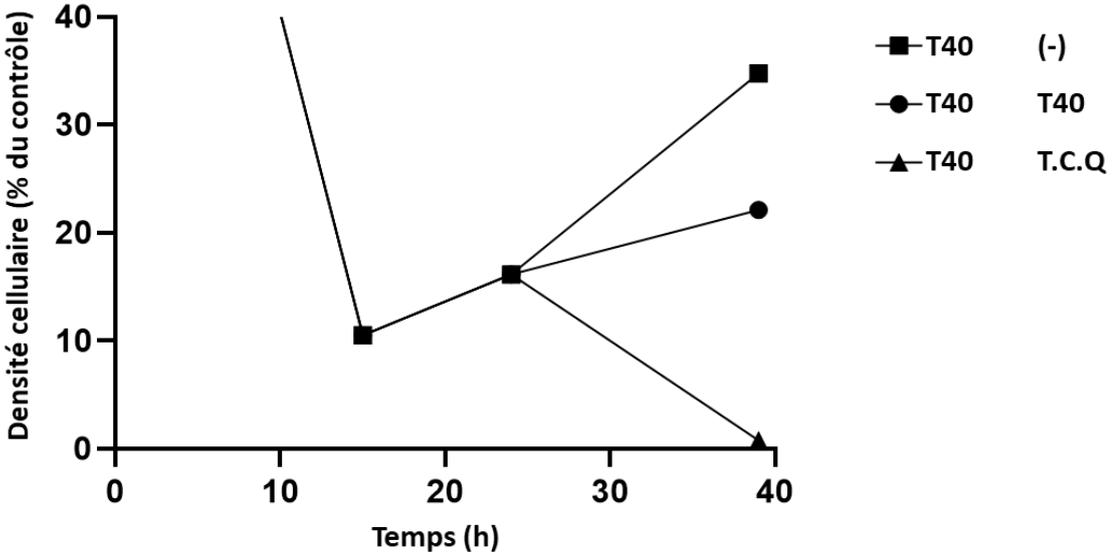


Figure 3-13 : L'apoptose suivie de la nécroptose permet une quasi-totale réduction de la densité cellulaire.

Expérience de survie de la population en fonction des séquences de traitements et de la prolifération. Les cellules HeLa IC RIPK3 sontensemencées à l'identique dans des puits plastiques. Mesure par amido black de la viabilité à $t=0$ (population à l'origine), $t15h$ survie du traitement ou $24h$ pour la repousse avant le second traitement et à $40h$ fin de l'expérience. (A) Premier traitement nécroptotique T.C.Q (TRAIL (40 ng.mL^{-1}), QVD ($20\text{ }\mu\text{M}$) et CHX (2.5 ng.mL^{-1})) ou (B) apoptotique TRAIL (40 ng.mL^{-1}) pendant $15h$. Les cellules sont retraitées ou non pour un second traitement pour une induction apoptotique par TRAIL (40 ng.mL^{-1}) et nécroptotique T.C.Q (TRAIL (40 ng.mL^{-1}), QVD ($20\text{ }\mu\text{M}$) et CHX (2.5 ng.mL^{-1})).

3.4 Discussion

TRAIL induit une résistance transitoire dans les cellules non-sensibles à un premier traitement par un mécanisme d'inhibition de l'activité caspase-8 via TAK-1.

Nous avons pu démontrer que cette résistance transitoire était liée à une diminution d'activité caspase-8 dans les cellules survivantes au TRAIL. Cette réduction d'activité caspase est bien en accord avec de précédents travaux qui montrent que la sensibilité des cellules aux TRAIL dépend du niveau d'activation de la caspase-8 (Roux et al., 2015a). De plus, Flusberg *et al.* ont observé dans leurs études que la quantité de caspase-8 clivée était retrouvée moins importante dans les cellules survivantes après 3h de second traitement (Flusberg et al., 2013a). Cependant TAK-1 n'avait encore jamais été rapportée comme étant responsable de la mise en place de cette résistance induite, pourtant précédemment décrite comme liée à la résistance générale par l'activation de NF- κ B et des MAP kinases (Santoro et al., 2017). Il était connu que son inhibition sensibilisait les cellules au TRAIL dans l'induction de l'apoptose et la nécroptose (Choo et al., 2006; Goodall et al., 2016). Lors d'une expérience de viabilité de 24h (Figure 3.3), l'inhibition d'IKK1 et IKK2 par le BMS 345541 et de P38 par le SB 202190 lors d'un co-traitement par TRAIL ont tous deux permis de limiter la résistance des cellules survivantes lors du second traitement. Les niveaux de ces deux protéines phosphorylées sont retrouvés augmentés dans la lignée HeLa lors d'expériences 'single-cell' de cytométrie de masse, après deux heures d'induction par TRAIL dans des travaux indépendants (Baskar et al., 2019). Inversement, l'inhibition de JNK par l'inhibiteur pharmacologique SP600125 durant le préconditionnement augmente alors la résistance des cellules survivantes au second traitement de TRAIL. Pourtant il a été rapporté que JNK était impliqué dans la résistance au TRAIL, qu'une forte expression de JNK permettait de suractiver le processus autophagique limitant l'apoptose induite par TRAIL (Lim et al., 2016). En effet, l'emploi de l'inhibiteur lors du préconditionnement sensibilise bien les cellules au TRAIL. Cependant les cellules survivantes au préconditionnement sont alors plus résistantes. Ce phénomène pourrait potentiellement être lié au fait que JNK active le facteur de transcription AP-1 (Protéine activatrice 1). L'activation d'AP-1 semble induire des effets contradictoires dans la littérature. Il a été observé qu'il pouvait agir en tant que répresseur de l'induction génique par NF- κ B (Kriehuber et al., 2005) en induisant des gènes pro-apoptotiques. D'autre part, il a aussi été observé que l'induction d'AP1 pouvait aussi induire des gènes anti-apoptotiques. D'autres expériences sont nécessaires pour confirmer ces résultats et déterminer l'existence d'un système de compensation ou de

rétrocontrôle par amplification d'une voie auxiliaire par P38, en plus de NF- κ B, tous deux sous contrôle de TAK-1. Trouver le ou les facteurs de transcription responsables de la mise en place de la résistance ou d'un acteur plus en aval de la voie de TAK serait crucial pour mettre en place des stratégies afin de sensibiliser les cellules cancéreuses au TRAIL en clinique. Inhiber TAK-1 afin de sensibiliser les cellules cancéreuses aux traitements TRAIL est une piste qui a déjà été suggérée, et malheureusement qui n'a pu aboutir : l'inhibition de TAK-1 sensibilise aussi bien les cellules tumorales que les cellules saines à l'apoptose induite par TRAIL (Morioka et al., 2009).

Il est important de noter que la voie JNK qui induit AP-1 est suractivée dans la lignée HeLa. Il a été montré que le facteur de transcription AP-1 pouvait, lorsqu'il était faiblement activé, favoriser la transcription de gènes impliqués dans la résistance à l'apoptose. Une importante activation du facteur de transcription AP-1 induit la transcription de gène favorisant cette fois-ci la voie de l'apoptose. Ces éléments motiveraient une confirmation de ce mécanisme dans d'autres lignées ainsi qu'une investigation du phénomène d'induction de gènes pro et anti apoptotiques par le facteur de transcription AP-1.

Les expériences de la figure 3-3 sont des résultats préliminaires, non répétés. Cependant, plusieurs expériences non comparables en termes de doses employées montrent des tendances identiques, et confirment l'implication de la voie TAK-1 dans la mise en place de la résistance au TRAIL. Il faudra, lors de répétitions futures, confirmer que les inhibiteurs utilisés sont effectifs. En effet, malgré l'augmentation de la sensibilité des cellules à l'apoptose en présence des inhibiteurs et co-traitées par TRAIL, il est impératif de vérifier par des approches de Western Blot l'inhibition de la voie TAK (par exemple à l'aide d'anticorps reconnaissant la phosphorylation de MKK ou P38).

Des doses croissantes de TAKi ont été employées afin de s'assurer que l'inhibiteur permet bien d'inhiber la mise en place de la résistance à l'apoptose, et non d'induire une sensibilité qui simulerait l'absence de résistance. En effet, nous nous demandions si l'inhibiteur de TAK-1 ne pouvait pas persister dans les cellules survivantes, induisant une sensibilité accrue au second traitement et ainsi simulant l'absence de résistance. Dans ce sens, les doses ont été augmentées afin d'observer une éventuelle dose réponse : au cas où l'inhibiteur de TAK-1 persisterait dans les cellules survivantes, nous aurions aperçu une augmentation de la sensibilité en augmentant les doses, alors que dans le cas où l'inhibiteur a bien permis de bloquer la résistance induite, nous aurions observé un plateau. Lors de ces expériences, nous observons que des doses

croissantes de l'inhibiteur de TAK atteignent un plateau dès la dose minimale utilisée (figure (3-3 C), ce qui favorise l'hypothèse de l'inhibition de la résistance génique et non celle de l'augmentation de la sensibilité des cellules survivantes. Il serait intéressant d'utiliser une gamme de concentration d'inhibiteur plus faible cette fois-ci, afin d'observer un effet dose dépendant, une inhibition progressive de la résistance dépendante de la voie de TAK-1.

Un préconditionnement nécroptotique permet de résister à un second challenge à la nécroptose.

Y-a-t-il une induction génique induite lors du traitement nécroptotique permettant cette résistance ? Nous envisageons de réaliser une étude transcriptomique (séquençage mRNA) des cellules traitées versus naïves qui permettrait de visualiser l'induction génique lors de traitements nécroptotiques différents ou encore par des systèmes inductibles des protéines RIP3/MLKL (pour forcer leurs oligomérisations (Orozco et al., 2019)) afin de s'assurer que la réponse est spécifique du traitement ou bien encore de la modalité de mort cellulaire. Il a été décrit que la voie inflammatoire NF- κ B était activée durant la nécroptose induite par TNF, via l'utilisation d'un système inductible permettant de déterminer si ce relargage de chimiokines (ici CXCL8) était dû au traitement TNF ou à l'exécution de la nécroptose. Les auteurs ont, grâce à ce système, déterminé que la simple oligomérisation de MLKL suffisait pour activer la voie NF- κ B et induire une légère production de CXCL8.

Flusberg *et al.* ont pu constater que la résistance à l'apoptose induite par TRAIL était transitoire. Il reste ici à déterminer si cette résistance à la nécroptose est aussi transitoire et quel est le temps requis avant un retour à la sensibilité d'origine. En fonction des gènes induits retrouvés différemment exprimés lors d'une étude transcriptomique, nous pourrions alors trouver des facteurs de transcription potentiellement responsables de cette régulation en réponse au traitement nécroptotique. *In fine*, l'objectif serait de trouver des facteurs moléculaires responsables de la résistance induite par les traitements nécroptotiques comme nous venons de le faire avec TAK-1. En effet, l'inhibition de TAK-1 durant un premier traitement nécroptotique augmente considérablement la résistance des cellules survivantes à un second traitement (nécroptotique).

Enfin, il est important de rappeler que nous utilisons des inducteurs de nécroptose basés sur les ligands de mort. Il existe d'autres façons d'induire la nécroptose : les TLR, le LPS, la Shikonine, et même la cisplatine qui est un inducteur de la voie intrinsèque apoptotique classiquement

utilisé en chimiothérapie (Xu et al., 2017). Nous pourrions enfin déterminer si cette résistance est spécifique de notre inducteur ou si elle peut être commune à la nécroptose en règle générale.

L'apoptose sensibilise à la nécroptose par l'augmentation du niveau protéique de RIPK3

Nous avons démontré qu'un traitement par TRAIL augmentait la sensibilité des cellules à la nécroptose induite par TRAIL par l'augmentation du niveau RIPK3 dans les cellules survivantes.

Bien que nous ayons pu démontrer une corrélation entre le niveau d'expression de RIPK3 et la sensibilité des cellules (Figure 3-7), des expériences restent à être réalisées afin de comprendre sa régulation. L'emploi d'une fusion traductionnelle RIPK3-mCherry nous a permis de corréler indirectement le niveau protéique de RIPK3 avec l'intensité de fluorescence de la protéine mCherry. Cependant, nous devons nous assurer que cette fusion traductionnelle reste intacte, et n'est pas clivée. Le Western Blot réalisé en figure 3-5 montre que RIPK3 n'existe que sous forme fusionnée à mCherry, et non sous-forme libre signifiant que la construction reste intacte lorsqu'elle se trouve exprimée dans la lignée HeLa. De plus, il existe de nombreuses régulations post-traductionnelles, telles que la phosphorylation ou encore l'ubiquitination qui pourraient moduler le niveau d'expression et l'activité de la protéine RIPK3. Même si le niveau de la protéine fluorescente mCherry reflèterait le niveau de RIPK3, il devient plus difficile de s'en assurer dans certaines conditions. En effet, RIPK3 est clivé par la caspase-8 puis dégradé par autophagie. La protéine mCherry est une protéine fluorescente plus tolérante aux dégradations acides. Il est donc possible que la fluorescence puisse ne pas diminuer lors du clivage de RIPK3 par la caspase-8 et sa dégradation par les autophagolysosomes, tandis que la forme cytoplasmique disponible de RIPK3 serait en fait grandement réduite (Kimura et al., 2007). Il faudrait vérifier cette possibilité par Western Blot pour le clivage de RIPK3, ou encore la quantité de phospho-RIPK3 (forme active de RIPK3) après le second traitement.

L'expression de la construction RIPK3-mCherry sous le contrôle du promoteur rétroviral CMV (du vecteur rétroviral pQCXIP) ne permet pas d'observer la régulation transcriptionnelle du gène RIPK3. L'utilisation de lignées qui expriment la version endogène de RIPK3 (telle que HT-29) sous le contrôle du promoteur natif de RIPK3 ainsi que le suivi de la quantité de RIPK3 par Western Blot permettrait de nous assurer que ce phénomène d'accumulation de RIPK3 après un préconditionnement par TRAIL ne serait pas contrebalancé par des régulations transcriptionnelles.

Chapitre 4. Conclusions et Perspectives

Conclusions

L'hétérogénéité intra-tumorale est un frein majeur aux thérapies anticancéreuses actuelles. Elle est associée en partie à l'apparition de néomutations au sein de la tumeur faisant émerger de nouveaux clones résistants, qui peuvent être sélectionnés lors du traitement. Des études ont pu aussi démontrer l'existence de multiples états cellulaires (en alternance et régulés) dans une population de cellules tumorales expliquant la réponse partielle « fractional killing » d'une population clonale (Inde et al., 2020; Pisco and Huang, 2015). Les thérapies basées sur la stimulation des récepteurs de mort aux TRAIL-ligands apparaissent prometteuses. En effet, leur spécificité à cibler les cellules tumorales et l'absence de cytotoxicité retrouvée chez le patient à l'instar des thérapies basées sur les autres membres ligands de morts de la famille du TNF en fait une thérapie de choix. Les tests cliniques ont révélé de nombreuses résistances provenant de multiples facteurs dont l'hétérogénéité de réponse (den Hollander et al., 2013; Roux et al., 2015a). Les cellules cancéreuses survivantes au traitement acquièrent alors un phénotype résistant (ou plusieurs comme ont pu le démontrer Baskar *et al.* (Baskar et al., 2019)), par la réponse génique induite. Cette réponse génique, induite et transitoire, maintient une résistance au nouveau challenge par TRAIL en plus de conférer des propriétés invasives, une caractéristique des cancers dits agressifs et/ou métastatiques et ce pendant une durée de trois jours jusqu'au retour à l'état d'équilibre, où la sensibilité d'origine de la population est finalement restaurée (Flusberg et al., 2013a; Ramirez et al., 2016).

De nouvelles stratégies basées sur TRAIL continuent d'être développées: des co-traitements permettent de sensibiliser l'ensemble de la population tout en restreignant l'hétérogénéité intra-clonale, car les cellules sont alors « synchronisées » d'une certaine façon de par la réponse au co-traitement (Flusberg and Sorger, 2013). D'ailleurs, les thérapies actuelles basées sur TRAIL en cours d'essais cliniques ne sont que des combinaisons de traitements (Dianat-Moghadam et al., 2020; Thapa et al., 2020). La nécroptose est aussi testée dans le domaine de l'oncologie afin de contourner les résistances à l'apoptose rencontrées dans de nombreuses lignées cancéreuses. La nécroptose est une nécrose cellulaire programmée fortement immunogène qui permet lors de test sur la souris d'induire la mise en place d'une vaccination antitumorale. Elle est inhibée par l'apoptose via l'initiation des caspases, clivant alors les acteurs moléculaires déterminants de la nécroptose que sont RIP1 et RIP3 (Huang et al., 2018).

Notre méthode de prédiction basée sur l'activité caspase-8 a permis l'étude des états transcriptomiques à l'origine de la résistance et de la sensibilité au TRAIL.

L'étude de l'hétérogénéité moléculaire est enfin devenue possible à l'échelle de la cellule unique depuis l'essor des technologies 'single-cell'. En oncologie, l'hétérogénéité est étudiée pour sa conséquence sur la réponse aux traitements. Mon équipe a préalablement démontré l'existence de seuils d'activations qui régissent le destin cellulaire d'une population de cellule cancéreuse clonale face à un traitement en utilisant l'imagerie dynamique pour mesurer l'activité caspase 8 dans chaque cellule traitée au TRAIL. La réponse partielle d'une population clonale de cellule, est dans ce cas due à une hétérogénéité de dynamique d'activation de la caspase 8 dans chaque cellule, elle-même liée aux différents états cellulaires accordant des états de pré-résistances au sein de la population et ce à des fréquences stables et apparemment régulées. Il était actuellement impossible de relier les états cellulaires avec leurs implications sur le destin de la cellule : la cellule sensible voit son contenu cellulaire dégradée au cours du processus de mort, alors que la cellule résistante survivante va quant à elle se modifier en réponse au traitement. Ces études renseignent des mécanismes mis en place pour résister au sein d'une population, permettent de visualiser la reprogrammation d'expression génique et de montrer que plus les mécanismes de résistances sont variées au sein d'une population, plus la résistance générale de la population face à un traitement est importante (Baskar et al., 2019; Hammerlindl and Schaidler, 2018). Cependant si les états cellulaires permettant la pré-résistance sont souvent cités, ils n'ont pu être étudié directement (Schuh et al., 2020).

Notre système prédictif basé sur les dynamiques d'activation de la caspase-8 a permis l'étude de l'état transcriptomique associé au phénotype de réponse cellulaire (résistance et sensibilité).

Nous avons pu lors de ces travaux pour la première fois mesurer le transcriptome en cellule unique de cellules prédites pour leurs sensibilités ou résistances d'un traitement TRAIL en cours. Les activités caspase-8 permettant la prédiction sont dans notre cas les dynamiques d'activations extrêmes retrouvées dans la population traitée à 25 ng/mL de TRAIL au bout de 50 minutes.

L'analyse par séquençage d'ARNm de 10.000 cellules en repos versus traitées depuis 50 minutes nous a permis de confirmer que l'analyse effectuée dans notre approche en cellule unique n'est pas confondue à la reprogrammation adaptative liée au traitement. Les gènes retrouvés différentiellement exprimés entre les cellules sensibles et résistantes après analyse

bio-informatique ont pu être validés pour leurs fonctions par des étapes de surexpression stable via transduction rétrovirale ainsi que pharmacologiquement.

Nous avons prouvé que la méthode de criblage était fonctionnelle. Nous avons pu retrouver dans les gènes les plus différentiellement exprimés entre cellules sensibles et résistantes SIVA1 et DRP1. DRP1 ainsi que SIVA1 étaient tous deux déjà connus pour moduler la sensibilité au TRAIL (pour DRP1 (Wu et al., 2020a)) ou pour modifier l'activité caspase-8 (pour SIVA1 (Py et al., 2004)), ce qui démontre la pertinence des résultats du criblage obtenus par cette méthodologie. De plus, presque tous les gènes testés (BLOC1S1, DRP1, PRSS56, SIVA1, SLC25A1, UBE2D4, UQCC3) étaient bien responsables de la modulation de sensibilité au TRAIL.

Si des acteurs tel que DRP1 et SIVA1 était déjà connu pour accorder la résistance ou la sensibilité au TRAIL respectivement et ont permis de valider notre approche (Ke et al., 2017; Suzuki-Karasaki et al., 2015), les autres acteurs BLOC1S1, PRSS56, SLC25A1, UBE2D4 et UQCC3 étaient encore inconnus. Notre méthode de criblage permet de dégager de nouveaux acteurs moléculaires impactant la sensibilité au TRAIL afin de révéler de nouvelles cibles thérapeutiques. Elle pourrait permettre d'analyser d'autres ligand caspase-8 dépendant (en cours) et doit être appliquée à d'autres lignées que les HeLa afin de permettre des analyses croisées en espérant faire ressurgir des mécanismes communs de résistance. Cette méthode est certainement applicable à d'autres phénomènes sous conditions de retrouver un facteur prédictif basé par exemple sur des seuils de dynamique d'activation et ce de façon suffisamment précoce afin d'éviter la reprogrammation génique, pourrait permettre le criblage des états cellulaires à l'origine de la résistance cellulaires à de nombreuses drogues pharmacologiques.

La résistance induite par le traitement TRAIL est dépendante de TAK et sensibilise les cellules à la nécroptose par la stabilisation de la protéine RIPK3.

Cette étude est centrée sur la réponse adaptative induite par le traitement TRAIL dans les cellules survivantes, entraînant la reprogrammation des cellules pour un phénotype plus agressif et résistant. Flusberg *et al.* ont pu étudier cette réponse au TRAIL, et ont démontré l'aspect régulé et transitoire de ce phénomène, où trois jours plus tard les cellules survivantes retrouvent la sensibilité de la population d'origine (Flusberg et al., 2013a). L'activation de NF- κ B est connue pour permettre la résistance initiale au TRAIL de par les gènes sous son contrôle qui sont alors exprimés tel que FLIP (Micheau et al., 2001). Etonnamment, l'inhibition de NF- κ B

durant le traitement, même s'il sensibilise à l'apoptose induite par TRAIL, ne bloque pas la réponse adaptative de la lignée traitée. Nous avons pu lors de ces travaux déterminer que c'était TAK-1 qui semblait être le principal acteur de la résistance mise en place. TAK-1 contrôle de nombreuses autres voies dont celles de NF- κ B et des MAP kinases, régulant elles-mêmes de nombreux facteurs de transcription. Une étude moléculaire plus approfondie est nécessaire afin de déterminer la/les voie/s en aval qui contrôle cette adaptation au TRAIL. Nous avons aussi démontré pour la première fois que cette adaptation au TRAIL permettait de sensibiliser à un traitement nécroptotique à base de TRAIL, et ce par l'augmentation du niveau de RIPK3 dans la cellule. L'antagonisme existant entre les voies apoptotique et nécroptotique est quelque chose de bien connu, qui suggère ici le rationnel d'utiliser la nécroptose afin de contourner les résistances à l'apoptose des cellules cancéreuses. Cependant, aucune stratégie n'exploite encore la réponse adaptative liée à un traitement apoptotique afin de sensibiliser les cellules résistantes à un traitement nécroptotique. Utiliser un traitement afin de tuer la majorité des cellules tumorales et synchroniser les cellules survivantes dans une réponse génique et états protéiques leur octroyant sensibilité pourrait être testée comme une nouvelle solution potentielle pour développer de nouvelles stratégies thérapeutiques plus efficaces. Notamment, TRAIL est un traitement hautement spécifique des cellules cancéreuses mais qui manque d'efficacité afin d'éliminer l'entière population, alors qu'un traitement nécroptotique sur des cellules sensibilisées permettrait l'utilisation de doses plus faibles et pourrait être fortement immunogène avec une probabilité accrue d'induire une vaccination antitumorale.

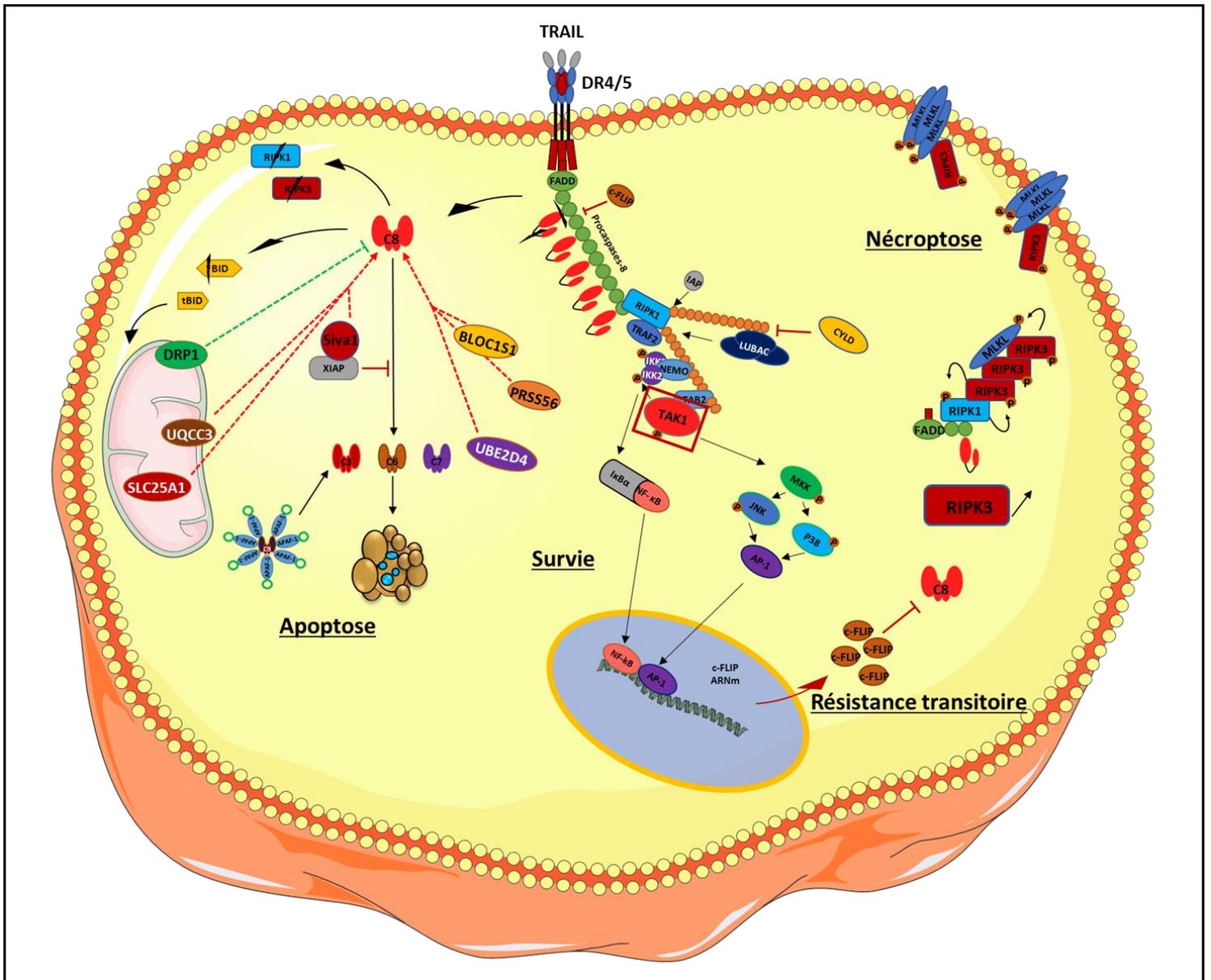


Figure 4-1 : Schéma de conclusion.

La liaison de TRAIL aux récepteurs de morts DR4 et DR5 induit la voie de l'apoptose dans les cellules cancéreuses par l'activation des procaspases-8 en caspases-8 actives lors du recrutement du DISC. Dans les cellules de type 1 pour l'apoptose, la caspase-8 active déclenche l'apoptose directement par l'activation des caspases effectrices 3, 6 et 7. Pour les cellules de types 2, un phénomène d'amplification mitochondriale est requis afin de déclencher le signal apoptotique. Nous avons pu montrer que BLOC1S1, PRSS56, SIVA1, SLC25A1, UBE2D4 et UQCC3 participent à la sensibilité à l'apoptose des cellules cancéreuses par l'augmentation indirecte de l'activité caspase-8 alors que DRP1 accorde la résistance à l'apoptose (Chap. 2). En parallèle de la voie apoptotique, TRAIL induit via la kinase TAK1 (MAP3K7) aussi des voies de survie par l'activation de NF-κB et des MAP kinases. TAK1 semble responsable de la mise en place de la résistance transitoire des cellules traitées par TRAIL caractérisée dans les

travaux de D. Flusberg par une augmentation de c-FLIP dans la cellule inhibant l'activation de la caspase-8. La diminution d'activité caspase-8 induit une accumulation de RIPK3, composante majeure de la nécroptose, favorisant le déclenchement de la nécroptose des cellules survivantes au traitement apoptotique TRAIL.

Perspectives

Chapitre 2

L'objectif dans la continuité du projet est de procéder au criblage dans de nombreuses lignées cellulaires en réponse à des ligands des récepteurs de mort. En effet, toutes les expériences ont été réalisées sur la lignée HeLa. La lignée HeLa est communément utilisée en tant que modèle dans de nombreuses publications dans l'étude du cancer car elle est facile à étudier et bien caractérisée. Cependant il a été observé que la population HeLa possédait de nombreuses aberrations chromosomiques, ainsi qu'une accumulation de dérives génétiques au cours du temps observable entre différents laboratoires internationaux (Mittelman and Wilson, 2013; Tang, 2019), révélant que ce modèle cellulaire doit être complété par d'autres modèles dans l'étude de l'hétérogénéité du cancer.

Nos expériences ont été réalisées in-vitro sur une lignée clonale, afin d'observer l'hétérogénéité qui existe au sein de la population. Cette méthodologie est nouvelle et nous en avons fait la preuve de concept. Il est maintenant important d'étudier sur d'autres modèles cellulaires l'implication de nos gènes candidats retrouvés comme participant à la sensibilité au TRAIL. L'utilisation de cellules tumorales directement prélevées sur des patients atteints de cancer couplées à des analyses de « single-cell » pourrait dévoiler de meilleures cibles thérapeutiques afin de sensibiliser les tumeurs aux traitements apoptotiques par TRAIL, bien que de telles études sur une population aussi hétérogène par des analyses « single-cell » puissent être compliquées à analyser.

Nous pourrions alors déterminer si chaque lignée possède aussi des cellules fortement et faiblement répondeuses à TRAIL discernables après un court temps d'activation de la voie apoptotique par TRAIL afin de nous assurer d'une prédiction possible. Le but est maintenant de pratiquer un criblage croisé sur toutes ces différentes lignées afin de déterminer par des échantillonnages plus importants si les mécanismes de résistances sont des mécanismes généraux ou s'ils sont spécifiques d'une lignée. Nous pourrions alors mettre en lumière des gènes impliqués dans la sensibilité au TRAIL encore inconnus et proposer de nouvelles cibles thérapeutiques pour sensibiliser les cellules tumorales aux ligands de morts. Nous pourrions ensuite élargir l'étude en analysant par cette méthode les cellules tumorales provenant directement de tissus cancéreux prélevés chez le patient pour des thérapies ciblées.

Les gènes retrouvés ainsi différenciellement exprimés devraient alors être testés par d'autres techniques single-cell permettant l'analyse du protéome afin de confirmer directement l'activation des protéines endogènes et l'engagement des voies de signalisation. Comme ont pu le faire Baskar *et al.* dans leurs expériences de cytométrie de masse, il serait intéressant d'analyser les cellules prédites résistantes et sensibles par notre méthode caspase-8 afin d'observer une corrélation avec l'expression de nos gènes cibles et l'activation réelle des protéines qu'ils encodent. L'aspect corrélatif serait cependant une limitation de taille, dans cette technique de cytométrie de masse, des anticorps monoclonaux couplés à des isotopes non radioactifs de métaux lourds permettent la détection des protéines cibles. Cette technique impose la destruction cellulaire des cellules étudiées et ne peut permettre d'associer une analyse transcriptomique de la même cellule à l'analyse protéomique (Baskar et al., 2019). Mais de nouvelles méthodes pourraient à ce jour le permettre : les techniques de CITE-seq et REAP-seq permettent toutes deux d'associer l'analyse du transcriptome avec une analyse du protéome dans une seule et même cellule. Cependant toutes deux fonctionnent préférentiellement sur les protéines de surface, car les protocoles de fixation et de lyses fixent aussi les ARN et induisent trop de bruits et de pertes de signal dans la détection des protéines intracellulaires (Labib and Kelley, 2020). Une méthode conceptualisée par l'équipe de Mulder a permis l'analyse des protéines intracellulaires en plus du transcriptome dans une même cellule (Gerlach et al., 2019). Cette méthode RAID (pour RNA and Immunodetection) pourrait nous permettre de vérifier l'expression de nos gènes cibles directement dans nos cellules prédites sensibles/résistantes tout en retrouvant en fonction des états cellulaires préalablement analysés, l'états d'activation des voies ou le niveau protéique de nos gènes cibles.

Un échantillonnage plus important nous permettrait cette fois-ci d'augmenter la force de l'étude biostatistique afin d'étudier les états cellulaires de pré-résistances/sensibilités des lignées testées. Dans notre étude, nous sommes plus dans une analyse des gènes différenciellement exprimés que dans une réelle analyse des états cellulaires. Les états cellulaires sont des contextes transcriptomiques, où des schémas d'expressions géniques peuvent être retrouvés. Cependant notre échantillonnage actuel était insuffisant afin de procéder à cette étude. Nous pourrions alors procéder à l'analyse des états cellulaires associés à la pré-résistance des cellules tumorales pour une thérapie spécifique. Associé aux études de la relation transcriptome/épigénome (Xing et al., 2020) ainsi que la relation transcriptome/protéome (Nagaraj et al., 2011), nous pourrions accumuler des datas bases suffisamment complètes pour, à terme, permettre des thérapies ciblées plus pertinentes. Ces thérapies se baseraient sur la

comparaison des analyses des tissus tumoraux avec des nouveaux marqueurs d'états cellulaires recensés comme étant associés à la pré-résistance aux thérapies.

Depuis l'essor du single-cell, l'étude des profils transcriptomiques induits par des composés (drogues thérapeutiques, chimiothérapies, inhibiteurs) est en plein démarrage. Par une technique nommée sci-Plex, un scRNA-seq où la reconnaissance se fait à l'aide d'un marquage labellisé des noyaux contenant les ARN en cours de transcriptions, trois lignées cancéreuses ont pu être criblées lors de traitements par 188 composés différents et obtenir ainsi la réponse génique de la lignée au composé (Srivatsan et al., 2020). Combiner notre méthode de prédiction de profil sensible avec l'étude des profils induits par de nombreux composés chimiques permettrait alors un criblage rapide du meilleur inhibiteur à utiliser en fonction de la thérapie en co-traitement afin de sensibiliser la tumeur. La médecine personnalisée est de même en pleine ascension, un patient de 44 ans ayant développé une hypersensibilité médicamenteuse avec symptômes systémiques a pu être soignée par une médecine personnalisée. Les chercheurs ont pu étudier par scRNA-seq des cellules de peau et de sang et ont pu déterminer que l'hypersensibilité provenait d'une dérégulation de la voie JAK-STAT des LTCD4+ lié à une infection par le virus de l'herpès 6B (Kim et al., 2020). Une médecine personnalisée qui s'appuierait sur des modèles basés sur l'identification des profils de résistance à une thérapie que nous pourrions fournir en plus des profils induits par d'autres inhibiteurs pourrait permettre l'identification des meilleures combinaisons de thérapies pour la rémission du patient.

Je pense qu'il serait intéressant de caractériser et de déterminer le phénomène d'accumulation spatiale des récepteurs DR4 et DR5 à la membrane, qui ont un rôle important pour l'efficacité de la transduction du signal apoptotique, et déterminer son rôle dans l'induction de la voie de la nécroptose. La localisation des récepteurs au TRAIL dans les radeaux lipidiques influence la voie engagée sous les récepteurs de TRAIL : la voie apoptotique lorsque les récepteurs relocalisent au radeaux (Xie, 2011) ou la voie non canonique de survie NF- κ B lors de la localisation membranaire (Song et al., 2007). Il a été montré que les modifications post traductionnelles de N-Glycosylation sur DR4 favorisait le signal apoptotique par formation de super cluster de récepteurs et que l'emploi de dulanermin combiné aux anticorps anti DR5 permet le même type de formation plus efficace pour l'induction de la mort (Dufour et al., 2017; Naval et al., 2019). Tout comme l'étude montrant l'effet de l'accumulation spatiale de MLKL à la membrane, nous pourrions suivre par imagerie dynamique le regroupement de DR4 et 5 en utilisant de plus hautes résolutions d'images que celles utilisées pour le projet (Samson et al., 2020). Il serait possible alors de comparer les activités caspase 8 en fonction de l'accumulation

du récepteur à la membrane. S'il est possible de déterminer par cette étude des phénomènes de sensibilité/résistance liés à la relocalisation des TRAIL-R, il sera aussi possible par notre méthode prédictive d'étudier les états cellulaires responsables de ces configurations. Les mêmes types d'expériences devraient être reproduites pour la nécroptose induite par TRAIL afin de déterminer si la localisation du récepteur importe pour la transduction du signal nécroptotique.

Chapitre 3

Il serait important de vérifier si cette sensibilité induite par le traitement TRAIL est spécifique à TRAIL ou généralisable aux autres ligands de morts, puis aux traitements apoptotiques tels que la cisplatine. Il y'a un réel intérêt médical à déterminer quels sont les traitements qui permettent d'induire la sensibilité à la nécroptose. En effet, comme cité dans l'introduction, la nécroptose est largement étudiée afin de contourner les résistances observées de la tumeur aux traitements apoptotiques (Huang et al., 2018; Wang et al., 2018b). Cependant, la nécroptose n'a été étudiée que pour contourner cette résistance. Nous montrons de notre côté que la reprogrammation génique par un traitement TRAIL permettant la résistance transitoire à l'apoptose permet une vraie sensibilisation à la nécroptose. Cela permettrait de proposer des thérapies basées sur une alternance de traitements apoptotiques suivis de traitements nécroptotiques.

Il est connu que TRAIL puisse induire l'apoptose des cellules cancéreuses spécifiquement tout en épargnant les cellules saines. Un traitement nécroptotique à base de TRAIL serait-il tout aussi spécifique ? Il a notamment été décrit que les SMACs mimétiques pouvaient sensibiliser les cellules cancéreuses à l'apoptose déclenchée par TRAIL, et surtout sans affecter les cellules saines (El-Mesery et al., 2016; Finlay et al., 2014). Un traitement *in vitro* avec les SMAC mimétiques (APG-1387, un inhibiteur des IAP actuellement en test clinique) réduit la quantité des cIAPs en induisant leur dégradation mais sans affecter la viabilité cellulaire. En revanche, lors de traitements *in vivo* dans un modèle de xénogreffe HCCML3 (lignée de carcinome hépatocellulaire) sur souris NOD-SCID (non-obese diabetic and severe combined immunodeficiency), la co-injection d'APG-1387 et de NK activés permet de sensibiliser les cellules cancéreuses à l'apoptose médiée par les cellules NK, et donc de favoriser l'élimination

tumorale par le système immunitaire (Chen et al., 2018b). Cet inhibiteur des IAPs a passé la phase I des tests cliniques en monothérapie ou en combinaison avec le pembrolizumab (un anticorps monoclonal anti PD-1) et est maintenant annoncé pour passer les phases Ib/II des tests cliniques en combinaison de chimiothérapies –Ascentage Pharma (Rasco et al., 2019). Les SMACS mimétiques sont aussi connus pour favoriser la nécroptose dans des conditions caspase-8 déficiente (Safferthal et al., 2017) et ont aussi permis de sensibiliser des lignées HNSCC (Head and Neck Squamous Carcinoma) à la nécroptose lors de test *in vivo* en combinaison d'une radiothérapie et d'un inhibiteur des caspases (Uzunparmak et al., 2020).

A l'avenir, il serait important de vérifier si des traitements apoptotiques à base de TRAIL combinés avec l'inhibiteur APG-1387 puissent rester sans toxicité pour les cellules saines (même si cela a été partiellement démontré). De la même façon, il serait intéressant de tester si des traitements à base de TRAIL combiné à l'APG-1387 et un inhibiteur des caspases (tel que l'emricasan, un pan caspase inhibiteur bien toléré par les patients lors des tests cliniques (Garcia-Tsao et al., 2020)) pourrait induire la nécroptose spécifiquement des cellules cancéreuses sans affecter les cellules saines, pour vérifier par la suite le bénéfice d'une alternance dans la séquence des traitements, comme nous avons pu le montrer.

Des expériences de co-culture de cellules cancéreuses avec des cellules dendritiques permettraient de vérifier dans un premier temps l'efficacité d'activation des cellules dendritiques lors de traitements nécroptotiques des cellules cancéreuses. Dans un second temps, il faudrait aussi vérifier quel serait l'effet de l'alternance des traitements sur l'impact de l'activation des cellules dendritiques. Dans un second temps, déterminer quels traitements pourraient alors permettre l'induction de la nécroptose des cellules cancéreuses de lignée de souris tout en épargnant les cellules saines, cela afin de commencer les expériences *in vivo* sur modèle murin.

Références

- Aaes, T.L., Kaczmarek, A., Delvaeye, T., De Craene, B., De Koker, S., Heyndrickx, L., Delrue, I., Taminau, J., Wiernicki, B., De Groote, P., et al. (2016). Vaccination with Necroptotic Cancer Cells Induces Efficient Anti-tumor Immunity. *Cell Reports* 15, 274–287.
- Abbas, R., and Larisch, S. (2020). Targeting XIAP for Promoting Cancer Cell Death—The Story of ARTS and SMAC. *Cells* 9, 663.
- Albeck, J.G., Burke, J.M., Aldridge, B.B., Zhang, M., Lauffenburger, D.A., and Sorger, P.K. (2008). Quantitative Analysis of Pathways Controlling Extrinsic Apoptosis in Single Cells. *Molecular Cell* 30, 11–25.
- Ashkenazi, A., Pai, R.C., Fong, S., Leung, S., Lawrence, D.A., Marsters, S.A., Blackie, C., Chang, L., McMurtrey, A.E., Hebert, A., et al. (1999). Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand. *J. Clin. Invest.* 104, 155–162.
- Baader, E., Toloczko, A., Fuchs, U., Schmid, I., Beltinger, C., Ehrhardt, H., Debatin, K.-M., and Jeremias, I. (2005). Tumor Necrosis Factor–Related Apoptosis-Inducing Ligand–Mediated Proliferation of Tumor Cells with Receptor-Proximal Apoptosis Defects. *Cancer Res* 65, 7888–7895.
- Ballweg, R., Paek, A.L., and Zhang, T. (2017). A dynamical framework for complex fractional killing. *Sci Rep* 7, 8002.
- Baskar, R., Fienberg, H.G., Khair, Z., Favaro, P., Kimmey, S., Green, D.R., Nolan, G.P., Plevritis, S., and Bendall, S.C. (2019). TRAIL-induced variation of cell signaling states provides nonheritable resistance to apoptosis. *Life Sci. Alliance* 2, e201900554.
- Baud, V., and Jacque, E. (2008). Voie alternative d’activation de NF- κ B et cancer: Amis ou ennemis ? *Med Sci (Paris)* 24, 1083–1088.
- Bertaux, F., Stoma, S., Drasdo, D., and Batt, G. (2014). Modeling Dynamics of Cell-to-Cell Variability in TRAIL-Induced Apoptosis Explains Fractional Killing and Predicts Reversible Resistance. *PLoS Comput Biol* 10, e1003893.
- Bertsch, U., Röder, C., Kalthoff, H., and Trauzold, A. (2014). Compartmentalization of TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) death receptor functions: emerging role of nuclear TRAIL-R2. *Cell Death Dis* 5, e1390–e1390.
- Boddu, P., Carter, B.Z., Verstovsek, S., and Pemmaraju, N. (2019). SMAC mimetics as potential cancer therapeutics in myeloid malignancies. *Br J Haematol* 185, 219–231.
- Bodmer, J.L., Meier, P., Tschopp, J., and Schneider, P. (2000). Cysteine 230 is essential for the structure and activity of the cytotoxic ligand TRAIL. *J Biol Chem* 275, 20632–20637.
- Bodmer, J.-L., Schneider, P., and Tschopp, J. (2002). The molecular architecture of the TNF superfamily. *Trends in Biochemical Sciences* 27, 19–26.
- Bonavida, B., Ng, C.P., Jazirehi, A., Schiller, G., and Mizutani, Y. (1999). Selectivity of TRAIL-mediated apoptosis of cancer cells and synergy with drugs: the trail to non-toxic cancer therapeutics (review). *Int J Oncol*.

- Brincks, E.L., Katewa, A., Kucaba, T.A., Griffith, T.S., and Legge, K.L. (2008). CD8 T Cells Utilize TRAIL to Control Influenza Virus Infection. *J Immunol* *181*, 4918–4925.
- Brouckaert, P.G.G., Leroux-Roels, G.G., Guisez, Y., Tavernier, J., and Fiers, W. (1986). In vivo anti-tumour activity of recombinant human and murine TNF, alone and in combination with murine IFN- γ , on a syngeneic murine melanoma. *Int. J. Cancer* *38*, 763–769.
- Bury-Moné, S., and Sclavi, B. (2017). Stochasticity of gene expression as a motor of epigenetics in bacteria: from individual to collective behaviors. *Research in Microbiology* *168*, 503–514.
- Cai, Z., Jitkaew, S., Zhao, J., Chiang, H.-C., Choksi, S., Liu, J., Ward, Y., Wu, L., and Liu, Z.-G. (2014). Plasma membrane translocation of trimerized MLKL protein is required for TNF-induced necroptosis. *Nat Cell Biol* *16*, 55–65.
- Cai, Z., Zhang, A., Choksi, S., Li, W., Li, T., Zhang, X.-M., and Liu, Z.-G. (2016). Activation of cell-surface proteases promotes necroptosis, inflammation and cell migration. *Cell Res* *26*, 886–900.
- Campbell, K.J., and Tait, S.W.G. (2018). Targeting BCL-2 regulated apoptosis in cancer. *Open Biol.* *8*, 180002.
- Cao, X., Pobezinskaya, Y.L., Morgan, M.J., and Liu, Z. (2011). The role of TRADD in TRAIL-induced apoptosis and signaling. *FASEB j.* *25*, 1353–1358.
- Caplan, H., Olson, S.D., Kumar, A., George, M., Prabhakara, K.S., Wenzel, P., Bedi, S., Toledano-Furman, N.E., Triolo, F., Kamhieh-Milz, J., et al. (2019). Mesenchymal Stromal Cell Therapeutic Delivery: Translational Challenges to Clinical Application. *Front. Immunol.* *10*, 1645.
- Carswell, E.A., Old, L.J., Kassel, R.L., Green, S., Fiore, N., and Williamson, B. (1975). An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *72*, 3666–3670.
- Chan, F.K.-M., Shisler, J., Bixby, J.G., Felices, M., Zheng, L., Appel, M., Orenstein, J., Moss, B., and Lenardo, M.J. (2003). A role for tumor necrosis factor receptor-2 and receptor-interacting protein in programmed necrosis and antiviral responses. *J. Biol. Chem.* *278*, 51613–51621.
- Chang, D.W. (2002). c-FLIPL is a dual function regulator for caspase-8 activation and CD95-mediated apoptosis. *The EMBO Journal* *21*, 3704–3714.
- Chaplin, D.D. (2010). Overview of the immune response. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* *125*, S3–S23.
- Chen, Q., and Zhang, H. (2018). Smac combined with DDP can inhibit drug resistance of ovarian cancer through regulation of Survivin expression. *CBM* *22*, 1–6.
- Chen, J., Jin, S., Abraham, V., Huang, X., Liu, B., Mitten, M.J., Nimmer, P., Lin, X., Smith, M., Shen, Y., et al. (2011). The Bcl-2/Bcl-XL/Bcl-w Inhibitor, Navitoclax, Enhances the Activity of Chemotherapeutic Agents In Vitro and In Vivo. *Molecular Cancer Therapeutics* *10*, 2340–2349.

- Chen, P.-Y., Muzumdar, M.D., Dorans, K.J., Robbins, R., Bhutkar, A., del Rosario, A., Mertins, P., Qiao, J., Schafer, A.C., Gertler, F., et al. (2018a). Adaptive and Reversible Resistance to Kras Inhibition in Pancreatic Cancer Cells. *Cancer Res* 78, 985–1002.
- Chen, Z., Chen, J., Liu, H., Dong, W., Huang, X., Yang, D., Hou, J., and Zhang, X. (2018b). The SMAC Mimetic APG-1387 Sensitizes Immune-Mediated Cell Apoptosis in Hepatocellular Carcinoma. *Front Pharmacol* 9, 1298.
- Cheong, H.-J., Lee, K.S., Woo, I.S., Won, J.-H., and Byun, J.H. (2011). Up-regulation of the DR5 Expression by Proteasome Inhibitor MG132 Augments TRAIL-Induced Apoptosis in Soft Tissue Sarcoma Cell Lines. *Cancer Res Treat* 43, 124–130.
- Chien, H.-T., Cheng, S.-D., Chuang, W.-Y., Liao, C.-T., Wang, H.-M., and Huang, S.-F. (2016). Clinical Implications of FADD Gene Amplification and Protein Overexpression in Taiwanese Oral Cavity Squamous Cell Carcinomas. *PLoS ONE* 11, e0164870.
- Chyuan, I.-T., Tsai, H.-F., Wu, C.-S., Sung, C.-C., and Hsu, P.-N. (2018). TRAIL-Mediated Suppression of T Cell Receptor Signaling Inhibits T Cell Activation and Inflammation in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Front. Immunol.* 9, 15.
- Ciesielski, L., and Modzelewski, B. (1995). Pathogenesis and treatment of multiorgan failure dysfunction syndrome in shock. *Rocz. Akad. Med. Bialymst.* 40, 13–24.
- Colbert, L.E., Fisher, S.B., Hardy, C.W., Hall, W.A., Saka, B., Shelton, J.W., Petrova, A.V., Warren, M.D., Pantazides, B.G., Gandhi, K., et al. (2013). Pronecrotic mixed lineage kinase domain-like protein expression is a prognostic biomarker in patients with early-stage resected pancreatic adenocarcinoma: MLKL Expression is a Prognostic Biomarker. *Cancer* 119, 3148–3155.
- Conev, N.V., Dimitrova, E.G., Bogdanova, M.K., Kashlov, Y.K., Chaushev, B.G., Radanova, M.A., Petrov, D.P., Georgiev, K.D., Bachvarov, C.H., Todorov, G.N., et al. (2019). RIPK3 expression as a potential predictive and prognostic marker in metastatic colon cancer. *CIM* 42, E31–E38.
- Cretney, E., Takeda, K., Yagita, H., Glaccum, M., Peschon, J.J., and Smyth, M.J. (2002). Increased Susceptibility to Tumor Initiation and Metastasis in TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand-Deficient Mice. *J Immunol* 168, 1356–1361.
- Cursons, J., Souza-Fonseca-Guimaraes, F., Foroutan, M., Anderson, A., Hollande, F., Hediye-Zadeh, S., Behren, A., Huntington, N.D., and Davis, M.J. (2019). A Gene Signature Predicting Natural Killer Cell Infiltration and Improved Survival in Melanoma Patients. *Cancer Immunol Res* 7, 1162–1174.
- Danish, L., Stöhr, D., Scheurich, P., and Pollak, N. (2017). TRAIL-R3/R4 and Inhibition of TRAIL Signalling in Cancer. In *TRAIL, Fas Ligand, TNF and TLR3 in Cancer*, O. Micheau, ed. (Cham: Springer International Publishing), pp. 27–57.
- Davies, A., Sage, B., Kolluri, K., Alrifai, D., Graham, R., Weil, B., Rego, R., Bain, O., Patrick, P.S., Champion, K., et al. (2019). TACTICAL: A phase I/II trial to assess the safety and efficacy of MSCTRAIL in the treatment of metastatic lung adenocarcinoma. *JCO* 37, TPS9116–TPS9116.

- Degli-Esposti, M.A., Smolak, P.J., Walczak, H., Waugh, J., Huang, C.P., DuBose, R.F., Goodwin, R.G., and Smith, C.A. (1997a). Cloning and characterization of TRAIL-R3, a novel member of the emerging TRAIL receptor family. *J. Exp. Med.* *186*, 1165–1170.
- Degli-Esposti, M.A., Dougall, W.C., Smolak, P.J., Waugh, J.Y., Smith, C.A., and Goodwin, R.G. (1997b). The Novel Receptor TRAIL-R4 Induces NF- κ B and Protects against TRAIL-Mediated Apoptosis, yet Retains an Incomplete Death Domain. *Immunity* *7*, 813–820.
- Degterev, A., Huang, Z., Boyce, M., Li, Y., Jagtap, P., Mizushima, N., Cuny, G.D., Mitchison, T.J., Moskowitz, M.A., and Yuan, J. (2005). Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. *Nat Chem Biol* *1*, 112–119.
- Dianat-Moghadam, H., Heidarifard, M., Mahari, A., Shahgolzari, M., Keshavarz, M., Nouri, M., and Amoozgar, Z. (2020). TRAIL in oncology: From recombinant TRAIL to nano- and self-targeted TRAIL-based therapies. *Pharmacological Research* *155*, 104716.
- Dickens, L.S., Boyd, R.S., Jukes-Jones, R., Hughes, M.A., Robinson, G.L., Fairall, L., Schwabe, J.W.R., Cain, K., and MacFarlane, M. (2012). A Death Effector Domain Chain DISC Model Reveals a Crucial Role for Caspase-8 Chain Assembly in Mediating Apoptotic Cell Death. *Molecular Cell* *47*, 291–305.
- Dillon, C.P., Weinlich, R., Rodriguez, D.A., Cripps, J.G., Quarato, G., Gurung, P., Verbist, K.C., Brewer, T.L., Llambi, F., Gong, Y.-N., et al. (2014). RIPK1 Blocks Early Postnatal Lethality Mediated by Caspase-8 and RIPK3. *Cell* *157*, 1189–1202.
- Dorothee, G., Vergnon, I., Menez, J., Echchakir, H., Grunenwald, D., Kubin, M., Chouaib, S., and Mami-Chouaib, F. (2002). Tumor-Infiltrating CD4⁺ T Lymphocytes Express APO2 Ligand (APO2L)/TRAIL upon Specific Stimulation with Autologous Lung Carcinoma Cells: Role of IFN- α on APO2L/TRAIL Expression and -Mediated Cytotoxicity. *J Immunol* *169*, 809–817.
- Dostert, C., Grusdat, M., Letellier, E., and Brenner, D. (2019). The TNF Family of Ligands and Receptors: Communication Modules in the Immune System and Beyond. *Physiological Reviews* *99*, 115–160.
- Dufour, F., Rattier, T., Shirley, S., Picarda, G., Constantinescu, A.A., Morlé, A., Zakaria, A.B., Marcion, G., Causse, S., Szegezdi, E., et al. (2017). N-glycosylation of mouse TRAIL-R and human TRAIL-R1 enhances TRAIL-induced death. *Cell Death Differ* *24*, 500–510.
- Ehrhardt, H., Fulda, S., Schmid, I., Hiscott, J., Debatin, K.-M., and Jeremias, I. (2003). TRAIL induced survival and proliferation in cancer cells resistant towards TRAIL-induced apoptosis mediated by NF- κ B. *Oncogene* *22*, 3842–3852.
- El-Mesery, M., Shaker, M.E., and Elgaml, A. (2016). The SMAC mimetic BV6 induces cell death and sensitizes different cell lines to TNF- α and TRAIL-induced apoptosis. *Exp Biol Med (Maywood)* *241*, 2015–2022.
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol* *35*, 495–516.

- Emery, J.G., McDonnell, P., Burke, M.B., Deen, K.C., Lyn, S., Silverman, C., Dul, E., Appelbaum, E.R., Eichman, C., DiPrinzio, R., et al. (1998). Osteoprotegerin Is a Receptor for the Cytotoxic Ligand TRAIL. *J. Biol. Chem.* *273*, 14363–14367.
- Fallahi-Sichani, M., Honarnejad, S., Heiser, L.M., Gray, J.W., and Sorger, P.K. (2013). Metrics other than potency reveal systematic variation in responses to cancer drugs. *Nat Chem Biol* *9*, 708–714.
- Falschlehner, C., Schaefer, U., and Walczak, H. (2009). Following TRAIL's path in the immune system. *Immunology* *127*, 145–154.
- Fan, W., Guo, J., Gao, B., Zhang, W., Ling, L., Xu, T., Pan, C., Li, L., Chen, S., Wang, H., et al. (2019). Flotillin-mediated endocytosis and ALIX–syntenin-1–mediated exocytosis protect the cell membrane from damage caused by necroptosis. *Sci. Signal.* *12*, eaaw3423.
- Fanger, N.A., Maliszewski, C.R., Schooley, K., and Griffith, T.S. (1999). Human Dendritic Cells Mediate Cellular Apoptosis via Tumor Necrosis Factor–Related Apoptosis-Inducing Ligand (Trail). *Journal of Experimental Medicine* *190*, 1155–1164.
- Fianco, G., Mongiardi, M.P., Levi, A., De Luca, T., Desideri, M., Trisciuglio, D., Del Bufalo, D., Cinà, I., Di Benedetto, A., Mottolese, M., et al. (2017). Caspase-8 contributes to angiogenesis and chemotherapy resistance in glioblastoma. *ELife* *6*, e22593.
- Finlay, D., Vamos, M., Gonzalez-Lopez, M., Ardecky, R.J., Ganji, S.R., Yuan, H., Su, Y., Cooley, T.R., Hauser, C.T., Welsh, K., et al. (2014). Small-Molecule IAP Antagonists Sensitize Cancer Cells to TRAIL-Induced Apoptosis: Roles of XIAP and cIAPs. *Molecular Cancer Therapeutics* *13*, 5–15.
- Flusberg, D.A., and Sorger, P.K. (2013). Modulating cell-to-cell variability and sensitivity to death ligands by co-drugging. *Phys. Biol.* *10*, 035002.
- Flusberg, D.A., and Sorger, P.K. (2015). Surviving apoptosis: life–death signaling in single cells. *Trends in Cell Biology* *25*, 446–458.
- Flusberg, D.A., Roux, J., Spencer, S.L., and Sorger, P.K. (2013a). Cells surviving fractional killing by TRAIL exhibit transient but sustainable resistance and inflammatory phenotypes. *MBoC* *24*, 2186–2200.
- Forero-Torres, A., Infante, J.R., Waterhouse, D., Wong, L., Vickers, S., Arrowsmith, E., He, A.R., Hart, L., Trent, D., Wade, J., et al. (2013). Phase 2, multicenter, open-label study of tigatuzumab (CS-1008), a humanized monoclonal antibody targeting death receptor 5, in combination with gemcitabine in chemotherapy-naïve patients with unresectable or metastatic pancreatic cancer. *Cancer Med* *2*, 925–932.
- Fu, Z., Deng, B., Liao, Y., Shan, L., Yin, F., Wang, Z., Zeng, H., Zuo, D., Hua, Y., and Cai, Z. (2013). The anti-tumor effect of shikonin on osteosarcoma by inducing RIP1 and RIP3 dependent necroptosis. *BMC Cancer* *13*, 580.
- Galluzzi, L., Kepp, O., Chan, F.K.-M., and Kroemer, G. (2017). Necroptosis: Mechanisms and Relevance to Disease. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* *12*, 103–130.

- Galluzzi, L., Vitale, I., Aaronson, S.A., Abrams, J.M., Adam, D., Agostinis, P., Alnemri, E.S., Altucci, L., Amelio, I., Andrews, D.W., et al. (2018). Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ* 25, 486–541.
- Galon, J., Costes, A., Sanchez-Cabo, F., Kirilovsky, A., Mlecnik, B., Lagorce-Pagès, C., Tosolini, M., Camus, M., Berger, A., Wind, P., et al. (2006). Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* 313, 1960–1964.
- Gandini, M., Gras, C., Azeredo, E.L., Pinto, L.M. de O., Smith, N., Despres, P., da Cunha, R.V., de Souza, L.J., Kubelka, C.F., and Herbeuval, J.-P. (2013). Dengue Virus Activates Membrane TRAIL Relocalization and IFN- α Production by Human Plasmacytoid Dendritic Cells In Vitro and In Vivo. *PLoS Negl Trop Dis* 7, e2257.
- Garcia-Tsao, G., Bosch, J., Kayali, Z., Harrison, S.A., Abdelmalek, M.F., Lawitz, E., Satapathy, S.K., Ghabril, M., Shiffman, M.L., Younes, Z.H., et al. (2020). Randomized placebo-controlled trial of emricasan for non-alcoholic steatohepatitis-related cirrhosis with severe portal hypertension. *Journal of Hepatology* 72, 885–895.
- Gdynia, G., Grund, K., Eckert, A., Bock, B.C., Funke, B., Macher-Goeppinger, S., Sieber, S., Herold-Mende, C., Wiestler, B., Wiestler, O.D., et al. (2007). Basal Caspase Activity Promotes Migration and Invasiveness in Glioblastoma Cells. *Molecular Cancer Research* 5, 1232–1240.
- Gerlach, Jan.P., van Buggenum, J.A.G., Tanis, S.E.J., Hogeweg, M., Heuts, B.M.H., Muraro, M.J., Elze, L., Rivello, F., Rakszewska, A., van Oudenaarden, A., et al. (2019). Combined quantification of intracellular (phospho-)proteins and transcriptomics from fixed single cells. *Sci Rep* 9, 1469.
- Goncharenko-Khaider, N., Lane, D., Matte, I., Rancourt, C., and Piché, A. (2010). The inhibition of Bid expression by Akt leads to resistance to TRAIL-induced apoptosis in ovarian cancer cells. *Oncogene* 29, 5523–5536.
- Gong, Y.-N., Guy, C., Olauson, H., Becker, J.U., Yang, M., Fitzgerald, P., Linkermann, A., and Green, D.R. (2017). ESCRT-III Acts Downstream of MLKL to Regulate Necroptotic Cell Death and Its Consequences. *Cell* 169, 286-300.e16.
- Goodall, M.L., Fitzwalter, B.E., Zahedi, S., Wu, M., Rodriguez, D., Mulcahy-Levy, J.M., Green, D.R., Morgan, M., Cramer, S.D., and Thorburn, A. (2016a). The Autophagy Machinery Controls Cell Death Switching between Apoptosis and Necroptosis. *Developmental Cell* 37, 337–349.
- Goodall, M.L., Cramer, S.D., and Thorburn, A. (2016b). Autophagy complexes cell death by necroptosis. *Oncotarget* 7, 50818–50819.
- Goodman, L.S. (1946). NITROGEN MUSTARD THERAPY: Use of Methyl-Bis(Beta-Chloroethyl)amine Hydrochloride and Tris(Beta-Chloroethyl)amine Hydrochloride for Hodgkin's Disease, Lymphosarcoma, Leukemia and Certain Allied and Miscellaneous Disorders. *JAMA* 132, 126.
- Goodman, L.S. (1984). Landmark article Sept. 21, 1946: Nitrogen mustard therapy. Use of methyl-bis(beta-chloroethyl)amine hydrochloride and tris(beta-chloroethyl)amine

hydrochloride for Hodgkin's disease, lymphosarcoma, leukemia and certain allied and miscellaneous disorders. By Louis S. Goodman, Maxwell M. Wintrobe, William Dameshek, Morton J. Goodman, Alfred Gilman and Margaret T. McLennan. *JAMA: The Journal of the American Medical Association* 251, 2255–2261.

Goossens, V., Grooten, J., De Vos, K., and Fiers, W. (1995). Direct evidence for tumor necrosis factor-induced mitochondrial reactive oxygen intermediates and their involvement in cytotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92, 8115–8119.

Graf, T., and Stadtfeld, M. (2008). Heterogeneity of Embryonic and Adult Stem Cells. *Cell Stem Cell* 3, 480–483.

Graves, J.D., Kordich, J.J., Huang, T.-H., Piasecki, J., Bush, T.L., Sullivan, T., Foltz, I.N., Chang, W., Douangpanya, H., Dang, T., et al. (2014). Apo2L/TRAIL and the Death Receptor 5 Agonist Antibody AMG 655 Cooperate to Promote Receptor Clustering and Antitumor Activity. *Cancer Cell* 26, 177–189.

Grooten, J., Goossens, V., Vanhaesebroeck, B., and Fiers, W. (1993). Cell membrane permeabilization and cellular collapse, followed by loss of dehydrogenase activity: Early events in tumour necrosis factor-induced cytotoxicity. *Cytokine* 5, 546–555.

Grunert, M., Gottschalk, K., Kapahnke, J., Gündisch, S., Kieser, A., and Jeremias, I. (2012). The adaptor protein FADD and the initiator caspase-8 mediate activation of NF- κ B by TRAIL. *Cell Death Dis* 3, e414–e414.

Grzywa, T.M., Paskal, W., and Włodarski, P.K. (2017). Intratumor and Intertumor Heterogeneity in Melanoma. *Translational Oncology* 10, 956–975.

Guo, Z.L., Li, J.Z., Ma, Y.Y., Qian, D., Zhong, J.Y., Jin, M.M., Huang, P., Che, L.Y., Pan, B., Wang, Y., et al. (2018). Shikonin sensitizes A549 cells to TRAIL-induced apoptosis through the JNK, STAT3 and AKT pathways. *BMC Cell Biol* 19, 29.

Halaas, Vik, Ashkenazi, and Espevik (2000). Lipopolysaccharide Induces Expression of APO2 Ligand/TRAIL in Human Monocytes and Macrophages. *Scand J Immunol* 51, 244–250.

Hammerlindl, H., and Schaidler, H. (2018). Tumor cell-intrinsic phenotypic plasticity facilitates adaptive cellular reprogramming driving acquired drug resistance. *J. Cell Commun. Signal.* 12, 133–141.

Hartwig, T., Montinaro, A., von Karstedt, S., Sevko, A., Surinova, S., Chakravarthy, A., Taraborrelli, L., Draber, P., Lafont, E., Arce Vargas, F., et al. (2017). The TRAIL-Induced Cancer Secretome Promotes a Tumor-Supportive Immune Microenvironment via CCR2. *Molecular Cell* 65, 730-742.e5.

Haselmann, V., Kurz, A., Bertsch, U., Hübner, S., Olempska-Müller, M., Fritsch, J., Häsler, R., Pickl, A., Fritsche, H., Annawanter, F., et al. (2014). Nuclear Death Receptor TRAIL-R2 Inhibits Maturation of Let-7 and Promotes Proliferation of Pancreatic and Other Tumor Cells. *Gastroenterology* 146, 278–290.

He, G.-W., Günther, C., Thonn, V., Yu, Y.-Q., Martini, E., Buchen, B., Neurath, M.F., Stürzl, M., and Becker, C. (2017). Regression of apoptosis-resistant colorectal tumors by induction of necroptosis in mice. *J. Exp. Med.* 214, 1655–1662.

- He, S., Liang, Y., Shao, F., and Wang, X. (2011). Toll-like receptors activate programmed necrosis in macrophages through a receptor-interacting kinase-3-mediated pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, 20054–20059.
- Heilig, R., Dilucca, M., Boucher, D., Chen, K.W., Hancz, D., Demarco, B., Shkarina, K., and Broz, P. (2020). Caspase-1 cleaves Bid to release mitochondrial SMAC and drive secondary necrosis in the absence of GSDMD. *Life Sci. Alliance* 3, e202000735.
- Henry, C.M., and Martin, S.J. (2017). Caspase-8 Acts in a Non-enzymatic Role as a Scaffold for Assembly of a Pro-inflammatory “FADDosome” Complex upon TRAIL Stimulation. *Molecular Cell* 65, 715-729.e5.
- Herbst, R.S., Eckhardt, S.G., Kurzrock, R., Ebbinghaus, S., O’Dwyer, P.J., Gordon, M.S., Novotny, W., Goldwasser, M.A., Tohnya, T.M., Lum, B.L., et al. (2010). Phase I Dose-Escalation Study of Recombinant Human Apo2L/TRAIL, a Dual Proapoptotic Receptor Agonist, in Patients With Advanced Cancer. *JCO* 28, 2839–2846.
- Hernandez, A. (2001). Sensitization of human colon cancer cells to TRAIL-mediated apoptosis. *Journal of Gastrointestinal Surgery* 5, 56–65.
- Hirata, Y., Takahashi, M., Morishita, T., Noguchi, T., and Matsuzawa, A. (2017). Post-Translational Modifications of the TAK1-TAB Complex. *IJMS* 18, 205.
- Hlodan, R., and Pain, R.H. (1995). The Folding and Assembly Pathway of Tumour Necrosis Factor TNF α , a Globular Trimeric Protein. *Eur J Biochem* 231, 381–387.
- den Hollander, M.W., Gietema, J.A., de Jong, S., Walenkamp, A.M.E., Reyners, A.K.L., Oldenhuis, C.N.A.M., and de Vries, E.G.E. (2013). Translating TRAIL-receptor targeting agents to the clinic. *Cancer Letters* 332, 194–201.
- Holler, N., Zaru, R., Micheau, O., Thome, M., Attinger, A., Valitutti, S., Bodmer, J.-L., Schneider, P., Seed, B., and Tschopp, J. (2000). Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule. *Nat Immunol* 1, 489–495.
- Hoogwater, F.J.H., Nijkamp, M.W., Smakman, N., Steller, E.J.A., Emmink, B.L., Westendorp, B.F., Raats, D.A.E., Sprick, M.R., Schaefer, U., Van Houdt, W.J., et al. (2010). Oncogenic K-Ras Turns Death Receptors Into Metastasis-Promoting Receptors in Human and Mouse Colorectal Cancer Cells. *Gastroenterology* 138, 2357–2367.
- Hopkins-Donaldson, S., Bodmer, J.L., Bouloud, K.B., Brognara, C.B., Tschopp, J., and Gross, N. (2000). Loss of caspase-8 expression in highly malignant human neuroblastoma cells correlates with resistance to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis. *Cancer Res.* 60, 4315–4319.
- Horn, S., Hughes, M.A., Schilling, R., Sticht, C., Tenev, T., Ploesser, M., Meier, P., Sprick, M.R., MacFarlane, M., and Leverkus, M. (2017). Caspase-10 Negatively Regulates Caspase-8-Mediated Cell Death, Switching the Response to CD95L in Favor of NF- κ B Activation and Cell Survival. *Cell Reports* 19, 785–797.

- Hu, W.-H., Johnson, H., and Shu, H.-B. (1999). Tumor Necrosis Factor-related Apoptosis-inducing Ligand Receptors Signal NF- κ B and JNK Activation and Apoptosis through Distinct Pathways. *J. Biol. Chem.* *274*, 30603–30610.
- Huang, S. (2009). Non-genetic heterogeneity of cells in development: more than just noise. *Development* *136*, 3853–3862.
- Huang, K., Zhang, J., O’Neill, K.L., Gurusurthy, C.B., Quadros, R.M., Tu, Y., and Luo, X. (2016). Cleavage by Caspase 8 and Mitochondrial Membrane Association Activate the BH3-only Protein Bid during TRAIL-induced Apoptosis. *J. Biol. Chem.* *291*, 11843–11851.
- Huang, X., Xiao, F., Li, Y., Qian, W., Ding, W., and Ye, X. (2018). Bypassing drug resistance by triggering necroptosis: recent advances in mechanisms and its therapeutic exploitation in leukemia. *J Exp Clin Cancer Res* *37*, 310.
- Huet, H.A., Growney, J.D., Johnson, J.A., Li, J., Bilic, S., Ostrom, L., Zafari, M., Kowal, C., Yang, G., Royo, A., et al. (2014). Multivalent nanobodies targeting death receptor 5 elicit superior tumor cell killing through efficient caspase induction. *MAbs* *6*, 1560–1570.
- Hughes, M.A., Powley, I.R., Jukes-Jones, R., Horn, S., Feoktistova, M., Fairall, L., Schwabe, J.W.R., Leverkus, M., Cain, K., and MacFarlane, M. (2016). Co-operative and Hierarchical Binding of c-FLIP and Caspase-8: A Unified Model Defines How c-FLIP Isoforms Differentially Control Cell Fate. *Molecular Cell* *61*, 834–849.
- Ikeda, T., Hirata, S., Fukushima, S., Matsunaga, Y., Ito, T., Uchino, M., Nishimura, Y., and Senju, S. (2010). Dual Effects of TRAIL in Suppression of Autoimmunity: The Inhibition of Th1 Cells and the Promotion of Regulatory T Cells. *J.I.* *185*, 5259–5267.
- Indarte, M., Puentes, R., Maruggi, M., Ihle, N.T., Grandjean, G., Scott, M., Ahmed, Z., Meuillet, E.J., Zhang, S., Lemos, R., et al. (2019). An Inhibitor of the Pleckstrin Homology Domain of CNK1 Selectively Blocks the Growth of Mutant KRAS Cells and Tumors. *Cancer Res* *79*, 3100–3111.
- Inde, Z., Forcina, G.C., Denton, K., and Dixon, S.J. (2020). Kinetic Heterogeneity of Cancer Cell Fractional Killing. *Cell Reports* *32*, 107845.
- Ishimura, N., Isomoto, H., Bronk, S.F., and Gores, G.J. (2006). Trail induces cell migration and invasion in apoptosis-resistant cholangiocarcinoma cells. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* *290*, G129–G136.
- Jia, B., Xue, Y., Yan, X., Li, J., Wu, Y., Guo, R., Zhang, J., Zhang, L., Li, Y., Liu, Y., et al. (2018a). Autophagy inhibitor chloroquine induces apoptosis of cholangiocarcinoma cells via endoplasmic reticulum stress. *Oncol Lett.*
- Jia, Y., Wang, F., Guo, Q., Li, M., Wang, L., Zhang, Z., Jiang, S., Jin, H., Chen, A., Tan, S., et al. (2018b). Curcumol induces RIPK1/RIPK3 complex-dependent necroptosis via JNK1/2-ROS signaling in hepatic stellate cells. *Redox Biology* *19*, 375–387.
- Jiang, X. (2012). Combination of TRAIL and actinomycin D liposomes enhances antitumor effect in non-small cell lung cancer. *IJN* *1449*.

- Jo, M., Kim, T.-H., Seol, D.-W., Esplen, J.E., Dorko, K., Billiar, T.R., and Strom, S.C. (2000). Apoptosis induced in normal human hepatocytes by tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *Nat Med* 6, 564–567.
- Jost, P.J., Grabow, S., Gray, D., McKenzie, M.D., Nachbur, U., Huang, D.C.S., Bouillet, P., Thomas, H.E., Borner, C., Silke, J., et al. (2009). XIAP discriminates between type I and type II FAS-induced apoptosis. *Nature* 460, 1035–1039.
- Jouan-Lanhouet, S., Arshad, M.I., Piquet-Pellorce, C., Martin-Chouly, C., Le Moigne-Muller, G., Van Herreweghe, F., Takahashi, N., Sergent, O., Lagadic-Gossmann, D., Vandenabeele, P., et al. (2012). TRAIL induces necroptosis involving RIPK1/RIPK3-dependent PARP-1 activation. *Cell Death Differ* 19, 2003–2014.
- Julien, O., and Wells, J.A. (2017). Caspases and their substrates. *Cell Death Differ* 24, 1380–1389.
- Kaczmarek, A., Vandenabeele, P., and Krysko, D.V. (2013). Necroptosis: The Release of Damage-Associated Molecular Patterns and Its Physiological Relevance. *Immunity* 38, 209–223.
- Kaiser, W.J., Sridharan, H., Huang, C., Mandal, P., Upton, J.W., Gough, P.J., Sehon, C.A., Marquis, R.W., Bertin, J., and Mocarski, E.S. (2013). Toll-like receptor 3-mediated necrosis via TRIF, RIP3, and MLKL. *J. Biol. Chem.* 288, 31268–31279.
- Kalkavan, H., and Green, D.R. (2018). MOMP, cell suicide as a BCL-2 family business. *Cell Death Differ* 25, 46–55.
- Kanayama, A., Seth, R.B., Sun, L., Ea, C.-K., Hong, M., Shaito, A., Chiu, Y.-H., Deng, L., and Chen, Z.J. (2004). TAB2 and TAB3 Activate the NF- κ B Pathway through Binding to Polyubiquitin Chains. *Molecular Cell* 15, 535–548.
- Ke, S., Zhou, T., Yang, P., Wang, Y., Zhang, P., Cheng, K., Ren, L., and Ye, S. (2017). Gold nanoparticles enhance TRAIL sensitivity through Drp1-mediated apoptotic and autophagic mitochondrial fission in NSCLC cells. *IJN Volume* 12, 2531–2551.
- Keane, M.M., Rubinstein, Y., Cuello, M., Ettenberg, S.A., Banerjee, P., Nau, M.M., and Lipkowitz, S. (2000). Inhibition of NF- κ B Activity Enhances TRAIL Mediated Apoptosis in Breast Cancer Cell Lines. *Breast Cancer Res Treat* 64, 211–219.
- Kelley, S.K., Harris, L.A., Xie, D., Deforge, L., Totpal, K., Bussiere, J., and Fox, J.A. (2001). Preclinical studies to predict the disposition of Apo2L/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in humans: characterization of in vivo efficacy, pharmacokinetics, and safety. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 299, 31–38.
- Kerr, J.F.R. (2002). History of the events leading to the formulation of the apoptosis concept. *Toxicology* 181–182, 471–474.
- Khoury, M.K., Gupta, K., Franco, S.R., and Liu, B. (2020). Necroptosis in the Pathophysiology of Disease. *The American Journal of Pathology* 190, 272–285.

- Kim, D., Kobayashi, T., Voisin, B., Jo, J.-H., Sakamoto, K., Jin, S.-P., Kelly, M., Pasiaka, H.B., Naff, J.L., Meyerle, J.H., et al. (2020). Targeted therapy guided by single-cell transcriptomic analysis in drug-induced hypersensitivity syndrome: a case report. *Nat Med* 26, 236–243.
- Kim, E., Kim, J.-Y., Smith, M.A., Haura, E.B., and Anderson, A.R.A. (2018). Cell signaling heterogeneity is modulated by both cell-intrinsic and -extrinsic mechanisms: An integrated approach to understanding targeted therapy. *PLoS Biol* 16, e2002930.
- Kim, H.S., Lee, J.W., Soung, Y.H., Park, W.S., Kim, S.Y., Lee, J.H., Park, J.Y., Cho, Y.G., Kim, C.J., Jeong, S.W., et al. (2003). Inactivating mutations of caspase-8 gene in colorectal carcinomas. *Gastroenterology* 125, 708–715.
- Kim, J.-Y., Lee, J.-Y., Kim, D.-G., Koo, G.-B., Yu, J.-W., and Kim, Y.-S. (2011). TRADD is critical for resistance to TRAIL-induced cell death through NF- κ B activation. *FEBS Letters* 585, 2144–2150.
- Kimura, S., Noda, T., and Yoshimori, T. (2007). Dissection of the Autophagosome Maturation Process by a Novel Reporter Protein, Tandem Fluorescent-Tagged LC3. *Autophagy* 3, 452–460.
- Kischkel, F.C., Lawrence, D.A., Chuntharapai, A., Schow, P., Kim, K.J., and Ashkenazi, A. (2000). Apo2L/TRAIL-Dependent Recruitment of Endogenous FADD and Caspase-8 to Death Receptors 4 and 5. *Immunity* 12, 611–620.
- Kitanaka, C., and Kuchino, Y. (1999). Caspase-independent programmed cell death with necrotic morphology. *Cell Death Differ* 6, 508–515.
- Kolb, W.P., and Granger, G.A. (1968). Lymphocyte in vitro cytotoxicity: characterization of human lymphotoxin. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 61, 1250–1255.
- Koo, G.-B., Morgan, M.J., Lee, D.-G., Kim, W.-J., Yoon, J.-H., Koo, J.S., Kim, S.I., Kim, S.J., Son, M.K., Hong, S.S., et al. (2015). Methylation-dependent loss of RIP3 expression in cancer represses programmed necrosis in response to chemotherapeutics. *Cell Res* 25, 707–725.
- Krajewska, M., Zapata, J.M., Meinhold-Heerlein, I., Hedayat, H., Monks, A., Bettendorf, H., Shabaik, A., Bubendorf, L., Kallioniemi, O.-P., Kim, H., et al. (2002). Expression of Bcl-2 Family Member Bid in Normal and Malignant Tissues. *Neoplasia* 4, 129–140.
- Kriehuber, E., Bauer, W., Charbonnier, A.-S., Winter, D., Amatschek, S., Tamandl, D., Schweifer, N., Stingl, G., and Maurer, D. (2005). Balance between NF- κ B and JNK/AP-1 activity controls dendritic cell life and death. *Blood* 106, 175–183.
- Kroemer, G., Galluzzi, L., Kepp, O., and Zitvogel, L. (2013). Immunogenic Cell Death in Cancer Therapy. *Annu. Rev. Immunol.* 31, 51–72.
- Kuang, A.A., Diehl, G.E., Zhang, J., and Winoto, A. (2000). FADD Is Required for DR4- and DR5-mediated Apoptosis: LACK OF TRAIL-INDUCED APOPTOSIS IN FADD-DEFICIENT MOUSE EMBRYONIC FIBROBLASTS. *J. Biol. Chem.* 275, 25065–25068.
- Labib, M., and Kelley, S.O. (2020). Single-cell analysis targeting the proteome. *Nat Rev Chem* 4, 143–158.

- Lafont, E., Kantari-Mimoun, C., Draber, P., De Miguel, D., Hartwig, T., Reichert, M., Kupka, S., Shimizu, Y., Taraborrelli, L., Spit, M., et al. (2017). The linear ubiquitin chain assembly complex regulates TRAIL -induced gene activation and cell death. *EMBO J* 36, 1147–1166.
- Lai, J.-Z., Zhu, Y.-Y., Ruan, M., Chen, L., and Zhang, Q.-Y. (2019). Local Irradiation Sensitized Tumors to Adoptive T Cell Therapy via Enhancing the Cross-Priming, Homing, and Cytotoxicity of Antigen-Specific CD8 T Cells. *Front. Immunol.* 10, 2857.
- Lalaoui, N., Merino, D., Giner, G., Vaillant, F., Chau, D., Liu, L., Kratina, T., Pal, B., Whittle, J.R., Etemadi, N., et al. (2020). Targeting triple-negative breast cancers with the Smac-mimetic birinapant. *Cell Death Differ.*
- Laster, S.M., Wood, J.G., and Gooding, L.R. (1988). Tumor necrosis factor can induce both apoptotic and necrotic forms of cell lysis. *J. Immunol.* 141, 2629–2634.
- Lawrence, D., Shahrokh, Z., Marsters, S., Achilles, K., Shih, D., Mounho, B., Hillan, K., Totpal, K., DeForge, L., Schow, P., et al. (2001). Differential hepatocyte toxicity of recombinant Apo2L/TRAIL versions. *Nat Med* 7, 383–385.
- Le Tourneau, C., Paoletti, X., Servant, N., Bièche, I., Gentien, D., Rio Frio, T., Vincent-Salomon, A., Servois, V., Romejon, J., Mariani, O., et al. (2014). Randomised proof-of-concept phase II trial comparing targeted therapy based on tumour molecular profiling vs conventional therapy in patients with refractory cancer: results of the feasibility part of the SHIVA trial. *Br J Cancer* 111, 17–24.
- Lee, J.H., Soung, Y.H., Lee, J.W., Park, W.S., Kim, S.Y., Cho, Y.G., Kim, C.J., Seo, S.H., Kim, H.S., Nam, S.W., et al. (2004). Inactivating mutation of the pro-apoptotic gene BID in gastric cancer. *J. Pathol.* 202, 439–445.
- Lee, S.H., Shin, M.S., Kim, H.S., Lee, H.K., Park, W.S., Kim, S.Y., Lee, J.H., Han, S.Y., Park, J.Y., Oh, R.R., et al. (2001). Somatic mutations of TRAIL-receptor 1 and TRAIL-receptor 2 genes in non-Hodgkin's lymphoma. *Oncogene* 20, 399–403.
- Lees, A., McIntyre, A.J., Falcone, F., Crawford, N.T., McCann, C., Quinn, G.P., Roberts, J.Z., Sessler, T., Gallagher, P.F., Gregg, G.M.A., et al. (2019). FLIP(L) determines p53 induced life or death (Cancer Biology).
- Leverkus, M., Sprick, M.R., Wachter, T., Mengling, T., Baumann, B., Serfling, E., Bröcker, E.-B., Goebeler, M., Neumann, M., and Walczak, H. (2003). Proteasome Inhibition Results in TRAIL Sensitization of Primary Keratinocytes by Removing the Resistance-Mediating Block of Effector Caspase Maturation. *MCB* 23, 777–790.
- Li, H., Zhu, H., Xu, C., and Yuan, J. (1998). Cleavage of BID by Caspase 8 Mediates the Mitochondrial Damage in the Fas Pathway of Apoptosis. *Cell* 94, 491–501.
- Li, J., McQuade, T., Siemer, A.B., Napetschnig, J., Moriwaki, K., Hsiao, Y.-S., Damko, E., Moquin, D., Walz, T., McDermott, A., et al. (2012). The RIP1/RIP3 Necrosome Forms a Functional Amyloid Signaling Complex Required for Programmed Necrosis. *Cell* 150, 339–350.

- Liang, C., Xu, Y., Li, G., Zhao, T., Xia, F., Li, G., Zhang, D., and Wu, J. (2017). Downregulation of DcR3 sensitizes hepatocellular carcinoma cells to TRAIL-induced apoptosis. *OTT Volume 10*, 417–428.
- Lim, S.-C., Jeon, H.J., Kee, K.H., Lee, M.J., Hong, R., and Han, S.I. (2016). Involvement of DR4/JNK pathway-mediated autophagy in acquired TRAIL resistance in HepG2 cells. *International Journal of Oncology 49*, 1983–1990.
- Lin, S.-Y., Hsieh, S.-Y., Fan, Y.-T., Wei, W.-C., Hsiao, P.-W., Tsai, D.-H., Wu, T.-S., and Yang, N.-S. (2018). Necroptosis promotes autophagy-dependent upregulation of DAMP and results in immunosurveillance. *Autophagy 14*, 778–795.
- Lin, Y., Devin, A., Cook, A., Keane, M.M., Kelliher, M., Lipkowitz, S., and Liu, Z. (2000). The Death Domain Kinase RIP Is Essential for TRAIL (Apo2L)-Induced Activation of I κ B Kinase and c-Jun N-Terminal Kinase. *Mol. Cell. Biol. 20*, 6638–6645.
- Ling, J., Herbst, R.S., Mendelson, D.S., Eckhardt, S.G., O'Dwyer, P., Ebbinghaus, S., Osborne, R., Cheu, M., Lieberman, G., and Lum, B.L. (2006). Apo2L/TRAIL pharmacokinetics in a phase 1a trial in advanced cancer and lymphoma. *JCO 24*, 3047–3047.
- Liu, L., Liu, C., Quintero, A., Wu, L., Yuan, Y., Wang, M., Cheng, M., Leng, L., Xu, L., Dong, G., et al. (2019). Deconvolution of single-cell multi-omics layers reveals regulatory heterogeneity. *Nat Commun 10*, 470.
- Liu, Z., Ding, Y., Ye, N., Wild, C., Chen, H., and Zhou, J. (2016). Direct Activation of Bax Protein for Cancer Therapy: DIRECT ACTIVATION OF Bax FOR CANCER THERAPY. *Med. Res. Rev. 36*, 313–341.
- Lluis, J.M., Nachbur, U., Cook, W.D., Gentle, I.E., Moujalled, D., Moulin, M., Wong, W.W.-L., Khan, N., Chau, D., Callus, B.A., et al. (2010). TAK1 Is Required for Survival of Mouse Fibroblasts Treated with TRAIL, and Does So by NF- κ B Dependent Induction of cFLIPL. *PLoS ONE 5*, e8620.
- Loewer, A., and Lahav, G. (2011). We are all individuals: causes and consequences of non-genetic heterogeneity in mammalian cells. *Current Opinion in Genetics & Development 21*, 753–758.
- Lopes, R.B., Gangeswaran, R., McNeish, I.A., Wang, Y., and Lemoine, N.R. (2007). Expression of the IAP protein family is dysregulated in pancreatic cancer cells and is important for resistance to chemotherapy. *Int. J. Cancer 120*, 2344–2352.
- Lovric, M.M., and Hawkins, C.J. (2010). TRAIL treatment provokes mutations in surviving cells. *Oncogene 29*, 5048–5060.
- Lu, G., Janjic, B.M., Janjic, J., Whiteside, T.L., Storkus, W.J., and Vujanovic, N.L. (2002). Innate Direct Anticancer Effector Function of Human Immature Dendritic Cells. II. Role of TNF, Lymphotoxin- α 1 β 2, Fas Ligand, and TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand. *J Immunol 168*, 1831–1839.
- MacFarlane, M., Ahmad, M., Srinivasula, S.M., Fernandes-Alnemri, T., Cohen, G.M., and Alnemri, E.S. (1997). Identification and Molecular Cloning of Two Novel Receptors for the Cytotoxic Ligand TRAIL. *J. Biol. Chem. 272*, 25417–25420.

- MacLean, A.L., Hong, T., and Nie, Q. (2018). Exploring intermediate cell states through the lens of single cells. *Current Opinion in Systems Biology* 9, 32–41.
- Marie, P., and Halbout, P. (2008). OPG/RANKL: Implication et cible thérapeutique dans l'ostéoporose. *Med Sci (Paris)* 24, 105–110.
- Mariño, G., Niso-Santano, M., Baehrecke, E.H., and Kroemer, G. (2014). Self-consumption: the interplay of autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15, 81–94.
- Marín-Rubio, J.L., Vela-Martín, L., Fernández-Piqueras, J., and Villa-Morales, M. (2019). FADD in Cancer: Mechanisms of Altered Expression and Function, and Clinical Implications. *Cancers (Basel)* 11.
- Marsters, S.A., Sheridan, J.P., Pitti, R.M., Huang, A., Skubatch, M., Baldwin, D., Yuan, J., Gurney, A., Goddard, A.D., Godowski, P., et al. (1997). A novel receptor for Apo2L/TRAIL contains a truncated death domain. *Curr Biol* 7, 1003–1006.
- Martínez-Lorenzo, M.J., Anel, A., Gamen, S., Monleón, I., Lasiera, P., Larrad, L., Piñeiro, A., Alava, M.A., and Naval, J. (1999). Activated human T cells release bioactive Fas ligand and APO2 ligand in microvesicles. *J. Immunol.* 163, 1274–1281.
- Matsuzaki, H., Schmied, B.M., Ulrich, A., Standop, J., Schneider, M.B., Batra, S.K., Picha, K.S., and Pour, P.M. (2001). Combination of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) and actinomycin D induces apoptosis even in TRAIL-resistant human pancreatic cancer cells. *Clin. Cancer Res.* 7, 407–414.
- McQuade, T., Cho, Y., and Chan, F.K.-M. (2013). Positive and negative phosphorylation regulates RIP1- and RIP3-induced programmed necrosis. *Biochemical Journal* 456, 409–415.
- Melaiu, O., Lucarini, V., Cifaldi, L., and Fruci, D. (2020). Influence of the Tumor Microenvironment on NK Cell Function in Solid Tumors. *Front. Immunol.* 10, 3038.
- Merchant, M.S., Geller, J.I., Baird, K., Chou, A.J., Galli, S., Charles, A., Amaoko, M., Rhee, E.H., Price, A., Wexler, L.H., et al. (2012). Phase I Trial and Pharmacokinetic Study of Lexatumumab in Pediatric Patients With Solid Tumors. *JCO* 30, 4141–4147.
- Mérino, D., Lalaoui, N., Morizot, A., Schneider, P., Solary, E., and Micheau, O. (2006). Differential Inhibition of TRAIL-Mediated DR5-DISC Formation by Decoy Receptors 1 and 2. *MCB* 26, 7046–7055.
- Metwalli, A.R., Khanbolooki, S., Jinesh, G., Sundi, D., Shah, J.B., Shrader, M., Choi, W., Lashinger, L.M., Chunduru, S., McConkey, D.J., et al. (2010). Smac mimetic reverses resistance to TRAIL and chemotherapy in human urothelial cancer cells. *Cancer Biology & Therapy* 10, 885–892.
- Miao, J., Chen, G.G., Chun, S.-Y., Yun, J.-P., Chak, E.C.W., Ho, R.L.K., and Lai, P.B.S. (2006). Adenovirus-mediated tBid overexpression results in therapeutic effects on p53-resistant hepatocellular carcinoma. *Int. J. Cancer* 119, 1985–1993.
- Micheau, O. (2018). Regulation of TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand Signaling by Glycosylation. *IJMS* 19, 715.

- Micheau, O., and Tschopp, J. (2003). Induction of TNF Receptor I-Mediated Apoptosis via Two Sequential Signaling Complexes. *Cell* 114, 181–190.
- Micheau, O., Lens, S., Gaide, O., Alevizopoulos, K., and Tschopp, J. (2001). NF- κ B Signals Induce the Expression of c-FLIP. *Mol. Cell. Biol.* 21, 5299–5305.
- Micheau, O., Thome, M., Schneider, P., Holler, N., Tschopp, J., Nicholson, D.W., Briand, C., and Grütter, M.G. (2002). The long form of FLIP is an activator of caspase-8 at the Fas death-inducing signaling complex. *J Biol Chem* 277, 45162–45171.
- Micheau, O., Shirley, S., and Dufour, F. (2013). Death receptors as targets in cancer: TRAIL clinical trials. *Br J Pharmacol* 169, 1723–1744.
- Mihaly, S.R., Ninomiya-Tsuji, J., and Morioka, S. (2014). TAK1 control of cell death. *Cell Death Differ* 21, 1667–1676.
- Mittelman, D., and Wilson, J.H. (2013). The fractured genome of HeLa cells. *Genome Biol* 14, 111.
- Monma, H., Iida, Y., Moritani, T., Okimoto, T., Tanino, R., Tajima, Y., and Harada, M. (2018). Chloroquine augments TRAIL-induced apoptosis and induces G2/M phase arrest in human pancreatic cancer cells. *PLoS ONE* 13, e0193990.
- Moquin, D.M., McQuade, T., and Chan, F.K.-M. (2013). CYLD Deubiquitinates RIP1 in the TNF α -Induced Necrosome to Facilitate Kinase Activation and Programmed Necrosis. *PLoS ONE* 8, e76841.
- Morioka, S., Omori, E., Kajino, T., Kajino-Sakamoto, R., Matsumoto, K., and Ninomiya-Tsuji, J. (2009). TAK1 kinase determines TRAIL sensitivity by modulating reactive oxygen species and cIAP. *Oncogene* 28, 2257–2265.
- Morioka, S., Broglie, P., Omori, E., Ikeda, Y., Takaesu, G., Matsumoto, K., and Ninomiya-Tsuji, J. (2014). TAK1 kinase switches cell fate from apoptosis to necrosis following TNF stimulation. *The Journal of Cell Biology* 204, 607–623.
- Mühlenbeck, F., Haas, E., Schwenzler, R., Schubert, G., Grell, M., Smith, C., Scheurich, P., and Wajant, H. (1998). TRAIL/Apo2L Activates c-Jun NH₂-terminal Kinase (JNK) via Caspase-dependent and Caspase-independent Pathways. *J. Biol. Chem.* 273, 33091–33098.
- Müller, I., Strozyk, E., Schindler, S., Beissert, S., Oo, H.Z., Sauter, T., Lucarelli, P., Raeth, S., Hausser, A., Al Nakouzi, N., et al. (2020). Cancer Cells Employ Nuclear Caspase-8 to Overcome the p53-Dependent G2/M Checkpoint through Cleavage of USP28. *Molecular Cell* 77, 970-984.e7.
- Nagaraj, N., Wisniewski, J.R., Geiger, T., Cox, J., Kircher, M., Kelso, J., Pääbo, S., and Mann, M. (2011). Deep proteome and transcriptome mapping of a human cancer cell line. *Mol Syst Biol* 7, 548.
- Nahacka, Z., Svadlenka, J., Peterka, M., Ksandrova, M., Benesova, S., Neuzil, J., and Andera, L. (2018). TRAIL induces apoptosis but not necroptosis in colorectal and pancreatic cancer cells preferentially via the TRAIL-R2/DR5 receptor. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1865, 522–531.

- Nailwal, H., and Chan, F.K.-M. (2019). Necroptosis in anti-viral inflammation. *Cell Death Differ* 26, 4–13.
- Naimi, A., Movassaghpour, A.A., Hagh, M.F., Talebi, M., Entezari, A., Jadidi-Niaragh, F., and Solali, S. (2018). TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) as the potential therapeutic target in hematological malignancies. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 98, 566–576.
- Naval, J., de Miguel, D., Gallego-Lleyda, A., Anel, A., and Martinez-Lostao, L. (2019). Importance of TRAIL Molecular Anatomy in Receptor Oligomerization and Signaling. Implications for Cancer Therapy. *Cancers* 11, 444.
- Navin, N.E. (2014). Cancer genomics: one cell at a time. *Genome Biol* 15, 452.
- Nazim, U., and Park, S. (2018). Attenuation of autophagy flux by 6-shogaol sensitizes human liver cancer cells to TRAIL-induced apoptosis via p53 and ROS. *Int J Mol Med*.
- Nazim, U.Md., and Park, S.-Y. (2015). Genistein enhances TRAIL-induced cancer cell death via inactivation of autophagic flux. *Oncology Reports* 34, 2692–2698.
- Nazim, U., Jeong, J.-K., Seol, J.-W., Hur, J., Eo, S.-K., Lee, J.-H., and Park, S.-Y. (2015). Inhibition of the autophagy flux by gingerol enhances TRAIL-induced tumor cell death. *Oncology Reports* 33, 2331–2336.
- Nazim, U.MD., Moon, J.-H., Lee, Y.-J., Seol, J.-W., Kim, Y.J., and Park, S.-Y. (2017). Glipizide sensitizes lung cancer cells to TRAIL-induced apoptosis via Akt/mTOR/autophagy pathways. *Oncotarget* 8, 100021–100033.
- Neumann, S., Hasenauer, J., Pollak, N., and Scheurich, P. (2014). Dominant Negative Effects of Tumor Necrosis Factor (TNF)-related Apoptosis-inducing Ligand (TRAIL) Receptor 4 on TRAIL Receptor 1 Signaling by Formation of Heteromeric Complexes. *J. Biol. Chem.* 289, 16576–16587.
- Ni, X., Zhuo, M., Su, Z., Duan, J., Gao, Y., Wang, Z., Zong, C., Bai, H., Chapman, A.R., Zhao, J., et al. (2013). Reproducible copy number variation patterns among single circulating tumor cells of lung cancer patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110, 21083–21088.
- Oakes, S.R., Vaillant, F., Lim, E., Lee, L., Breslin, K., Feleppa, F., Deb, S., Ritchie, M.E., Takano, E., Ward, T., et al. (2012). Sensitization of BCL-2-expressing breast tumors to chemotherapy by the BH3 mimetic ABT-737. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109, 2766–2771.
- Oberst, A., Dillon, C.P., Weinlich, R., McCormick, L.L., Fitzgerald, P., Pop, C., Hakem, R., Salvesen, G.S., and Green, D.R. (2011). Catalytic activity of the caspase-8–FLIPL complex inhibits RIPK3-dependent necrosis. *Nature* 471, 363–367.
- O'Donnell, M.A., Perez-Jimenez, E., Oberst, A., Ng, A., Massoumi, R., Xavier, R., Green, D.R., and Ting, A.T. (2011). Caspase 8 inhibits programmed necrosis by processing CYLD. *Nat Cell Biol* 13, 1437–1442.

- Ogasawara, J., Watanabe-Fukunaga, R., Adachi, M., Matsuzawa, A., Kasugai, T., Kitamura, Y., Itoh, N., Suda, T., and Nagata, S. (1993). Lethal effect of the anti-Fas antibody in mice. *Nature* 364, 806–809.
- Orning, P., Weng, D., Starheim, K., Ratner, D., Best, Z., Lee, B., Brooks, A., Xia, S., Wu, H., Kelliher, M.A., et al. (2018). Pathogen blockade of TAK1 triggers caspase-8–dependent cleavage of gasdermin D and cell death. *Science* 362, 1064–1069.
- Orozco, S.L., Daniels, B.P., Yatim, N., Messmer, M.N., Quarato, G., Chen-Harris, H., Cullen, S.P., Snyder, A.G., Ralli-Jain, P., Frase, S., et al. (2019). RIPK3 Activation Leads to Cytokine Synthesis that Continues after Loss of Cell Membrane Integrity. *Cell Reports* 28, 2275–2287.e5.
- Orzechowska, E.J., Kozłowska, E., Czuby, A., Kozłowski, P., Staron, K., and Trzcinska-Danielewicz, J. (2014). Controlled delivery of BID protein fused with TAT peptide sensitizes cancer cells to apoptosis. *BMC Cancer* 14, 771.
- Paek, A.L., Liu, J.C., Loewer, A., Forrester, W.C., and Lahav, G. (2016). Cell-to-Cell Variation in p53 Dynamics Leads to Fractional Killing. *Cell* 165, 631–642.
- Pan, G. (1997a). An Antagonist Decoy Receptor and a Death Domain-Containing Receptor for TRAIL. *Science* 277, 815–818.
- Pan, G. (1997b). The Receptor for the Cytotoxic Ligand TRAIL. *Science* 276, 111–113.
- Papadopoulos, K.P., Isaacs, R., Bilic, S., Kentsch, K., Huet, H.A., Hofmann, M., Rasco, D., Kundamal, N., Tang, Z., Cooksey, J., et al. (2015). Unexpected hepatotoxicity in a phase I study of TAS266, a novel tetravalent agonistic Nanobody® targeting the DR5 receptor. *Cancer Chemother Pharmacol* 75, 887–895.
- Park, E.J., Min, K., Choi, K.S., Kubatka, P., Kruzliak, P., Kim, D.E., and Kwon, T.K. (2016). Chloroquine enhances TRAIL-mediated apoptosis through up-regulation of DR5 by stabilization of mRNA and protein in cancer cells. *Sci Rep* 6, 22921.
- Peltzer, N., Darding, M., and Walczak, H. (2016). Holding RIPK1 on the Ubiquitin Leash in TNFR1 Signaling. *Trends in Cell Biology* 26, 445–461.
- Peppas, D., Gill, U.S., Reynolds, G., Easom, N.J.W., Pallett, L.J., Schurich, A., Micco, L., Nebbia, G., Singh, H.D., Adams, D.H., et al. (2013). Up-regulation of a death receptor renders antiviral T cells susceptible to NK cell-mediated deletion. *The Journal of Experimental Medicine* 210, 99–114.
- Pisco, A.O., and Huang, S. (2015). Non-genetic cancer cell plasticity and therapy-induced stemness in tumour relapse: ‘What does not kill me strengthens me.’ *Br J Cancer* 112, 1725–1732.
- Pitti, R.M., Marsters, S.A., Ruppert, S., Donahue, C.J., Moore, A., and Ashkenazi, A. (1996). Induction of Apoptosis by Apo-2 Ligand, a New Member of the Tumor Necrosis Factor Cytokine Family. *J. Biol. Chem.* 271, 12687–12690.
- Pluta, P., Jeziorski, A., Cebula-Obrzut, A.P., B., Wierzbowska, A., Piekarski, J., and Smolewski, P. (2015). Expression of IAP family proteins and its clinical importance in breast cancer patients. *Neo* 62, 666–673.

- Prager, I., and Watzl, C. (2019). Mechanisms of natural killer cell-mediated cellular cytotoxicity. *J Leukoc Biol* *105*, 1319–1329.
- Proserpio, V., and Lönnberg, T. (2016). Single-cell technologies are revolutionizing the approach to rare cells. *Immunol Cell Biol* *94*, 225–229.
- Py, B., Slomianny, C., Auberger, P., Petit, P.X., and Benichou, S. (2004). Siva-1 and an Alternative Splice Form Lacking the Death Domain, Siva-2, Similarly Induce Apoptosis in T Lymphocytes via a Caspase-Dependent Mitochondrial Pathway. *The Journal of Immunology* *172*, 4008–4017.
- Qiao, X., Wang, X., Shang, Y., Li, Y., and Chen, S. (2018). Azithromycin enhances anticancer activity of TRAIL by inhibiting autophagy and up-regulating the protein levels of DR4/5 in colon cancer cells in vitro and in vivo. *Cancer Communications* *38*, 43.
- Raj, A., and van Oudenaarden, A. (2008). Nature, Nurture, or Chance: Stochastic Gene Expression and Its Consequences. *Cell* *135*, 216–226.
- Ramirez, M., Rajaram, S., Steininger, R.J., Osipchuk, D., Roth, M.A., Morinishi, L.S., Evans, L., Ji, W., Hsu, C.-H., Thurley, K., et al. (2016). Diverse drug-resistance mechanisms can emerge from drug-tolerant cancer persister cells. *Nat Commun* *7*, 10690.
- Rasco, D.W., Li, Y., Tang, Y., Men, L., Wang, H., Ji, J., Liang, Z., Sun, J., Amaya, A., Huang, Y., et al. (2019). A phase I study of a novel IAP inhibitor APG-1387 as a monotherapy or in combination with pembrolizumab in treatments of patients with advanced solid tumors. *JCO* *37*, 3125–3125.
- Ren, X., Ye, F., Jiang, Z., Chu, Y., Xiong, S., and Wang, Y. (2007). Involvement of cellular death in TRAIL/DR5-dependent suppression induced by CD4+CD25+ regulatory T cells. *Cell Death Differ* *14*, 2076–2084.
- Riley, J.S., Hutchinson, R., McArt, D.G., Crawford, N., Holohan, C., Paul, I., Van Schaeybroeck, S., Salto-Tellez, M., Johnston, P.G., Fennell, D.A., et al. (2013). Prognostic and therapeutic relevance of FLIP and procaspase-8 overexpression in non-small cell lung cancer. *Cell Death Dis* *4*, e951–e951.
- Rippo, M.R., Moretti, S., Vescovi, S., Tomasetti, M., Orecchia, S., Amici, G., Catalano, A., and Procopio, A. (2004). FLIP overexpression inhibits death receptor-induced apoptosis in malignant mesothelial cells. *Oncogene* *23*, 7753–7760.
- Robinson, N., McComb, S., Mulligan, R., Dudani, R., Krishnan, L., and Sad, S. (2012). Type I interferon induces necroptosis in macrophages during infection with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Nat Immunol* *13*, 954–962.
- Rogers, C., Fernandes-Alnemri, T., Mayes, L., Alnemri, D., Cingolani, G., and Alnemri, E.S. (2017). Cleavage of DFNA5 by caspase-3 during apoptosis mediates progression to secondary necrotic/pyroptotic cell death. *Nat Commun* *8*, 14128.
- Roux, J., Hafner, M., Bandara, S., Sims, J.J., Hudson, H., Chai, D., and Sorger, P.K. (2015a). Fractional killing arises from cell-to-cell variability in overcoming a caspase activity threshold. *Molecular Systems Biology* *11*, 803

- Roux, J., Gouzé, J.-L., and Hofman, P. (2015c). L'hétérogénéité intraclonale des tumeurs et son impact sur la médecine de précision: Les promesses de l'imagerie de cellules vivantes couplée à la modélisation mathématique. *Med Sci (Paris)* *31*, 28–31.
- Rozga, P., Kloska, D., Pawlak, S., Teska-Kaminska, M., Galazka, M., Bukato, K., Pieczykolan, A., Jaworski, A., Molga-Kaczmarek, A., Kopacz, A., et al. (2020). Novel engineered TRAIL-based chimeric protein strongly inhibits tumor growth and bypasses TRAIL resistance. *Int. J. Cancer* *147*, 1117–1130.
- Sachet, M., Liang, Y.Y., and Oehler, R. (2017). The immune response to secondary necrotic cells. *Apoptosis* *22*, 1189–1204.
- Safa, A.R. (2012). c-FLIP, a master anti-apoptotic regulator. *Exp. Oncol.* *34*, 176–184.
- Safa, A.R., and Pollok, K.E. (2011). Targeting the Anti-Apoptotic Protein c-FLIP for Cancer Therapy. *Cancers* *3*, 1639–1671.
- Safferthal, C., Rohde, K., and Fulda, S. (2017). Therapeutic targeting of necroptosis by Smac mimetic bypasses apoptosis resistance in acute myeloid leukemia cells. *Oncogene* *36*, 1487–1502.
- Samir, P., Malireddi, R.K.S., and Kanneganti, T.-D. (2020). The PANoptosome: A Deadly Protein Complex Driving Pyroptosis, Apoptosis, and Necroptosis (PANoptosis). *Front. Cell. Infect. Microbiol.* *10*, 238.
- Samson, A.L., Zhang, Y., Geoghegan, N.D., Gavin, X.J., Davies, K.A., Mlodzianoski, M.J., Whitehead, L.W., Frank, D., Garnish, S.E., Fitzgibbon, C., et al. (2020). MLKL trafficking and accumulation at the plasma membrane control the kinetics and threshold for necroptosis. *Nat Commun* *11*, 3151.
- Sanlioglu, A.D., Dirice, E., Aydin, C., Erin, N., Koksoy, S., and Sanlioglu, S. (2005). Surface TRAIL decoy receptor-4 expression is correlated with TRAIL resistance in MCF7 breast cancer cells. *BMC Cancer* *5*, 54.
- Santoro, R., Carbone, C., Piro, G., Chiao, P.J., and Melisi, D. (2017). TAK -ing aim at chemoresistance: The emerging role of MAP3K7 as a target for cancer therapy. *Drug Resistance Updates* *33–35*, 36–42.
- Sanz, G., Singh, M., Peugeot, S., and Selivanova, G. (2019). Inhibition of p53 inhibitors: progress, challenges and perspectives. *Journal of Molecular Cell Biology* *11*, 586–599.
- Sarhan, J., Liu, B.C., Muendlein, H.I., Li, P., Nilson, R., Tang, A.Y., Rongvaux, A., Bunnell, S.C., Shao, F., Green, D.R., et al. (2018). Caspase-8 induces cleavage of gasdermin D to elicit pyroptosis during *Yersinia* infection. *Proc Natl Acad Sci USA* *115*, E10888–E10897.
- Sarker, M., Ruiz-Ruiz, C., Robledo, G., and López-Rivas, A. (2002). Stimulation of the mitogen-activated protein kinase pathway antagonizes TRAIL-induced apoptosis downstream of BID cleavage in human breast cancer MCF-7 cells. *Oncogene* *21*, 4323–4327.
- Sato, K., Hida, S., Takayanagi, H., Yokochi, T., Kayagaki, N., Takeda, K., Yagita, H., Okumura, K., Tanaka, N., Taniguchi, T., et al. (2001). Antiviral response by natural killer cells through TRAIL gene induction by IFN-alpha/beta. *Eur. J. Immunol.* *31*, 3138–3146.

- Schmiedel, J.M., Carey, L.B., and Lehner, B. (2019). Empirical mean-noise fitness landscapes reveal the fitness impact of gene expression noise. *Nat Commun* *10*, 3180.
- Schneider, P., Bodmer, J.-L., Thome, M., Hofmann, K., Holler, N., and Tschopp, J. (1997a). Characterization of two receptors for TRAIL¹. *FEBS Letters* *416*, 329–334.
- Schneider, P., Thome, M., Burns, K., Bodmer, J.-L., Hofmann, K., Kataoka, T., Holler, N., and Tschopp, J. (1997b). TRAIL Receptors 1 (DR4) and 2 (DR5) Signal FADD-Dependent Apoptosis and Activate NF- κ B. *Immunity* *7*, 831–836.
- Schneider, P., Holler, N., Bodmer, J.-L., Hahne, M., Frei, K., Fontana, A., and Tschopp, J. (1998). Conversion of Membrane-bound Fas(CD95) Ligand to Its Soluble Form Is Associated with Downregulation of Its Proapoptotic Activity and Loss of Liver Toxicity. *Journal of Experimental Medicine* *187*, 1205–1213.
- Schuh, L., Saint-Antoine, M., Sanford, E.M., Emert, B.L., Singh, A., Marr, C., Raj, A., and Goyal, Y. (2020). Gene Networks with Transcriptional Bursting Recapitulate Rare Transient Coordinated High Expression States in Cancer. *Cell Systems* *10*, 363-378.e12.
- Sedger, L.M., Shows, D.M., Blanton, R.A., Peschon, J.J., Goodwin, R.G., Cosman, D., and Wiley, S.R. (1999). IFN-gamma mediates a novel antiviral activity through dynamic modulation of TRAIL and TRAIL receptor expression. *J. Immunol.* *163*, 920–926.
- Seifert, L., Werba, G., Tiwari, S., Giao Ly, N.N., Alothman, S., Alqunaibit, D., Avanzi, A., Barilla, R., Daley, D., Greco, S.H., et al. (2016). The necrosome promotes pancreatic oncogenesis via CXCL1 and Mincle-induced immune suppression. *Nature* *532*, 245–249.
- Shaffer, S.M., Dunagin, M.C., Torborg, S.R., Torre, E.A., Emert, B., Krepler, C., Beqiri, M., Sproesser, K., Brafford, P.A., Xiao, M., et al. (2017). Rare cell variability and drug-induced reprogramming as a mode of cancer drug resistance. *Nature* *546*, 431–435.
- Sharma, A., Merritt, E., Hu, X., Cruz, A., Jiang, C., Sarkodie, H., Zhou, Z., Malhotra, J., Riedlinger, G.M., and De, S. (2019). Non-Genetic Intra-Tumor Heterogeneity Is a Major Predictor of Phenotypic Heterogeneity and Ongoing Evolutionary Dynamics in Lung Tumors. *Cell Reports* *29*, 2164-2174.e5.
- Shekhar, T.M., Burvenich, I.J.G., Harris, M.A., Rigopoulos, A., Zanker, D., Spurling, A., Parker, B.S., Walkley, C.R., Scott, A.M., and Hawkins, C.J. (2019). Smac mimetics LCL161 and GDC-0152 inhibit osteosarcoma growth and metastasis in mice. *BMC Cancer* *19*, 924.
- Shin, M.S., Kim, H.S., Lee, S.H., Park, W.S., Kim, S.Y., Park, J.Y., Lee, J.H., Lee, S.K., Lee, S.N., Jung, S.S., et al. (2001). Mutations of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor 1 (TRAIL-R1) and receptor 2 (TRAIL-R2) genes in metastatic breast cancers. *Cancer Res.* *61*, 4942–4946.
- Shindo, R., Ohmuraya, M., Komazawa-Sakon, S., Miyake, S., Deguchi, Y., Yamazaki, S., Nishina, T., Yoshimoto, T., Kakuta, S., Koike, M., et al. (2019). Necroptosis of Intestinal Epithelial Cells Induces Type 3 Innate Lymphoid Cell-Dependent Lethal Ileitis. *IScience* *15*, 536–551.
- Shlyakhtina, Y., Pavet, V., and Gronemeyer, H. (2017). Dual role of DR5 in death and survival signaling leads to TRAIL resistance in cancer cells. *Cell Death Dis* *8*, e3025–e3025.

Simons, M.P., Leidal, K.G., Nauseef, W.M., and Griffith, T.S. (2008). TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) is expressed throughout myeloid development, resulting in a broad distribution among neutrophil granules. *Journal of Leukocyte Biology* 83, 621–629.

Snijder, B., and Pelkmans, L. (2011). Origins of regulated cell-to-cell variability. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12, 119–125.

Song, J.H., Tse, M.C.L., Bellail, A., Phuphanich, S., Khuri, F., Kneteman, N.M., and Hao, C. (2007). Lipid Rafts and Nonrafts Mediate Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand-Induced Apoptotic and Nonapoptotic Signals in Non-Small Cell Lung Carcinoma Cells. *Cancer Res* 67, 6946–6955.

Sosna, J., Voigt, S., Mathieu, S., Lange, A., Thon, L., Davarnia, P., Herdegen, T., Linkermann, A., Rittger, A., Chan, F.K.-M., et al. (2014). TNF-induced necroptosis and PARP-1-mediated necrosis represent distinct routes to programmed necrotic cell death. *Cell. Mol. Life Sci.* 71, 331–348.

Sosna, J., Philipp, S., Fuchslocher Chico, J., Saggau, C., Fritsch, J., Föll, A., Plenge, J., Arenz, C., Pinkert, T., Kalthoff, H., et al. (2016). Differences and Similarities in TRAIL- and Tumor Necrosis Factor-Mediated Necroptotic Signaling in Cancer Cells. *Mol. Cell. Biol.* 36, 2626–2644.

Soung, Y.H., Lee, J.W., Kim, S.Y., Nam, S.W., Park, W.S., Kim, S.H., Lee, J.Y., Yoo, N.J., and Lee, S.H. (2004). Mutation of FADD gene is rare in human colon and stomach cancers. *Apmis* 112, 595–597.

Soung, Y.H., Lee, J.W., Kim, S.Y., Jang, J., Park, Y.G., Park, W.S., Nam, S.W., Lee, J.Y., Yoo, N.J., and Lee, S.H. (2005). CASPASE-8 gene is inactivated by somatic mutations in gastric carcinomas. *Cancer Res.* 65, 815–821.

Spencer, S.L., Gaudet, S., Albeck, J.G., Burke, J.M., and Sorger, P.K. (2009). Non-genetic origins of cell-to-cell variability in TRAIL-induced apoptosis. *Nature* 459, 428–432.

Sprick, M.R. (2002). Caspase-10 is recruited to and activated at the native TRAIL and CD95 death-inducing signalling complexes in a FADD-dependent manner but can not functionally substitute caspase-8. *The EMBO Journal* 21, 4520–4530.

Sprick, M.R., Weigand, M.A., Rieser, E., Rauch, C.T., Juo, P., Blenis, J., Krammer, P.H., and Walczak, H. (2000). FADD/MORT1 and Caspase-8 Are Recruited to TRAIL Receptors 1 and 2 and Are Essential for Apoptosis Mediated by TRAIL Receptor 2. *Immunity* 12, 599–609.

Srivatsan, S.R., McFaline-Figueroa, J.L., Ramani, V., Saunders, L., Cao, J., Packer, J., Pliner, H.A., Jackson, D.L., Daza, R.M., Christiansen, L., et al. (2020). Massively multiplex chemical transcriptomics at single-cell resolution. *Science* 367, 45–51.

Stadel, D., Mohr, A., Ref, C., MacFarlane, M., Zhou, S., Humphreys, R., Bachem, M., Cohen, G., Möller, P., Zwacka, R.M., et al. (2010). TRAIL-induced apoptosis is preferentially mediated via TRAIL receptor 1 in pancreatic carcinoma cells and profoundly enhanced by XIAP inhibitors. *Clin. Cancer Res.* 16, 5734–5749.

Strebhardt, K., and Ullrich, A. (2008). Paul Ehrlich's magic bullet concept: 100 years of progress. *Nat Rev Cancer* 8, 473–480.

- Stupack, D.G. (2013). Caspase-8 as a therapeutic target in cancer. *Cancer Letters* 332, 133–140.
- Sun, S.-C. (2010). CYLD: a tumor suppressor deubiquitinase regulating NF- κ B activation and diverse biological processes. *Cell Death Differ* 17, 25–34.
- Sun, C., Wang, L., Huang, S., Heynen, G.J.J.E., Prahallad, A., Robert, C., Haanen, J., Blank, C., Wesseling, J., Willems, S.M., et al. (2014). Reversible and adaptive resistance to BRAF(V600E) inhibition in melanoma. *Nature* 508, 118–122.
- Sun, H., McKeen, T., Wang, H., and Ni, H.-M. (2019). Necroptosis in ischemia-reperfusion injury of lean and steatotic livers. *Liver Research* 3, 227–233.
- Sung, E.-S., Park, K.-J., Choi, H.-J., Kim, C.-H., and Kim, Y.-S. (2012). The proteasome inhibitor MG132 potentiates TRAIL receptor agonist-induced apoptosis by stabilizing tBid and Bik in human head and neck squamous cell carcinoma cells. *Experimental Cell Research* 318, 1564–1576.
- Suzuki-Karasaki, Y., Fujiwara, K., Saito, K., Suzuki-Karasaki, M., Ochiai, T., and Soma, M. (2015). Distinct effects of TRAIL on the mitochondrial network in human cancer cells and normal cells: role of plasma membrane depolarization. *Oncotarget* 6, 21572–21588.
- Swann, J.B., and Smyth, M.J. (2007). Immune surveillance of tumors. *J. Clin. Invest.* 117, 1137–1146.
- Tang, L. (2019). Investigating heterogeneity in HeLa cells. *Nat Methods* 16, 281–281.
- Tang, W., Wang, W., Zhang, Y., Liu, S., Liu, Y., and Zheng, D. (2009). TRAIL receptor mediates inflammatory cytokine release in an NF- κ B-dependent manner. *Cell Res* 19, 758–767.
- Tang, X., Huang, Y., Lei, J., Luo, H., and Zhu, X. (2019). The single-cell sequencing: new developments and medical applications. *Cell Biosci* 9, 53.
- Teixeira, M.R., Pandis, N., Bardi, G., Andersen, J.A., Mitelman, F., and Heim, S. (1995). Clonal heterogeneity in breast cancer: Karyotypic comparisons of multiple intra—and extra—tumorous samples from 3 patients. *Int. J. Cancer* 63, 63–68.
- Thapa, B., Kc, R., and Uludağ, H. (2020). TRAIL therapy and prospective developments for cancer treatment. *Journal of Controlled Release* 326, 335–349.
- Thibault, B., Genre, L., Le Naour, A., Broca, C., Mery, E., Vuagniaux, G., Delord, J.P., Wiedemann, N., and Couderc, B. (2018). DEBIO 1143, an IAP inhibitor, reverses carboplatin resistance in ovarian cancer cells and triggers apoptotic or necroptotic cell death. *Sci Rep* 8, 17862.
- Thon, L., Möhlig, H., Mathieu, S., Lange, A., Bulanova, E., Winoto-Morbach, S., Schütze, S., Bulfone-Paus, S., and Adam, D. (2005). Ceramide mediates caspase-independent programmed cell death. *FASEB j.* 19, 1945–1956.
- Tisch, N., Freire-Valls, A., Yerbes, R., Paredes, I., La Porta, S., Wang, X., Martín-Pérez, R., Castro, L., Wong, W.W.-L., Coultas, L., et al. (2019). Caspase-8 modulates physiological and

pathological angiogenesis during retina development. *Journal of Clinical Investigation* 129, 5092–5107.

Tourneur, L., Mistou, S., Michiels, F.-M., Devauchelle, V., Renia, L., Feunteun, J., and Chiocchia, G. (2003). Loss of FADD protein expression results in a biased Fas-signaling pathway and correlates with the development of tumoral status in thyroid follicular cells. *Oncogene* 22, 2795–2804.

Trauzold, A., Siegmund, D., Schniewind, B., Sipos, B., Egberts, J., Zorenkov, D., Emme, D., Röder, C., Kalthoff, H., and Wajant, H. (2006). TRAIL promotes metastasis of human pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncogene* 25, 7434–7439.

Tsuchiya, Y., Nakabayashi, O., and Nakano, H. (2015). FLIP the Switch: Regulation of Apoptosis and Necroptosis by cFLIP. *IJMS* 16, 30321–30341.

Tu, M.M., Mahmoud, A.B., and Makrigiannis, A.P. (2016). Licensed and Unlicensed NK Cells: Differential Roles in Cancer and Viral Control. *Front. Immunol.* 7.

Tummers, B., and Green, D.R. (2017). Caspase-8: regulating life and death. *Immunol Rev* 277, 76–89.

Upton, J.W., Kaiser, W.J., and Mocarski, E.S. (2012). DAI/ZBP1/DLM-1 Complexes with RIP3 to Mediate Virus-Induced Programmed Necrosis that Is Targeted by Murine Cytomegalovirus vIRA. *Cell Host & Microbe* 11, 290–297.

Uzunparmak, B., Gao, M., Lindemann, A., Erikson, K., Wang, L., Lin, E., Frank, S.J., Gleber-Netto, F.O., Zhao, M., Skinner, H.D., et al. (2020). Loss of Caspase-8 function in combination with SMAC mimetic treatment sensitizes Head and Neck Squamous Carcinoma to radiation through induction of necroptosis (*Cancer Biology*).

Varfolomeev, E., Goncharov, T., Fedorova, A.V., Dzynek, J.N., Zobel, K., Deshayes, K., Fairbrother, W.J., and Vucic, D. (2008). c-IAP1 and c-IAP2 Are Critical Mediators of Tumor Necrosis Factor α (TNF α)-induced NF- κ B Activation. *J. Biol. Chem.* 283, 24295–24299.

Vercammen, D., Beyaert, R., Denecker, G., Goossens, V., Van Loo, G., Declercq, W., Grooten, J., Fiers, W., and Vandenabeele, P. (1998). Inhibition of Caspases Increases the Sensitivity of L929 Cells to Necrosis Mediated by Tumor Necrosis Factor. *Journal of Experimental Medicine* 187, 1477–1485.

Verma, S., Loewendorf, A., Wang, Q., McDonald, B., Redwood, A., and Benedict, C.A. (2014). Inhibition of the TRAIL Death Receptor by CMV Reveals Its Importance in NK Cell-Mediated Antiviral Defense. *PLoS Pathog* 10, e1004268.

Vidalain, P.-O., Azocar, O., Lamouille, B., Astier, A., Rabourdin-Combe, C., and Servet-Delprat, C. (2000). Measles Virus Induces Functional TRAIL Production by Human Dendritic Cells. *Journal of Virology* 74, 556–559.

Vidalain, P.-O., Azocar, O., Yagita, H., Rabourdin-Combe, C., and Servet-Delprat, C. (2001). Cytotoxic Activity of Human Dendritic Cells Is Differentially Regulated by Double-Stranded RNA and CD40 Ligand. *J Immunol* 167, 3765–3772.

- von Karstedt, S., Conti, A., Nobis, M., Montinaro, A., Hartwig, T., Lemke, J., Legler, K., Annenwenter, F., Campbell, A.D., Taraborrelli, L., et al. (2015). Cancer Cell-Autonomous TRAIL-R Signaling Promotes KRAS-Driven Cancer Progression, Invasion, and Metastasis. *Cancer Cell* 27, 561–573.
- Wagner, K.W., Punnoose, E.A., Januario, T., Lawrence, D.A., Pitti, R.M., Lancaster, K., Lee, D., von Goetz, M., Yee, S.F., Totpal, K., et al. (2007). Death-receptor O-glycosylation controls tumor-cell sensitivity to the proapoptotic ligand Apo2L/TRAIL. *Nat Med* 13, 1070–1077.
- Wajant, H. (2017). TRAIL - and TNF -induced signaling complexes—so similar yet so different. *EMBO J* 36, 1117–1119.
- Walczak, H., Miller, R.E., Ariail, K., Gliniak, B., Griffith, T.S., Kubin, M., Chin, W., Jones, J., Woodward, A., Le, T., et al. (1999). Tumoricidal activity of tumor necrosis factor–related apoptosis–inducing ligand in vivo. *Nat Med* 5, 157–163.
- Wang, D., Sun, H., Wei, J., Cen, B., and DuBois, R.N. (2017a). CXCL1 Is Critical for Premetastatic Niche Formation and Metastasis in Colorectal Cancer. *Cancer Res* 77, 3655–3665.
- Wang, L., Chang, X., Feng, J., Yu, J., and Chen, G. (2020). TRADD Mediates RIPK1-Independent Necroptosis Induced by Tumor Necrosis Factor. *Front. Cell Dev. Biol.* 7, 393.
- Wang, M.-J., Liu, S., Liu, Y., and Zheng, D. (2007). Actinomycin D enhances TRAIL-induced caspase-dependent and -independent apoptosis in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Neuroscience Research* 59, 40–46.
- Wang, N., Liu, W., Zheng, Y., Wang, S., Yang, B., Li, M., Song, J., Zhang, F., Zhang, X., Wang, Q., et al. (2018a). CXCL1 derived from tumor-associated macrophages promotes breast cancer metastasis via activating NF- κ B/SOX4 signaling. *Cell Death Dis* 9, 880.
- Wang, X., Jiang, W., Yan, Y., Gong, T., Han, J., Tian, Z., and Zhou, R. (2014). RNA viruses promote activation of the NLRP3 inflammasome through a RIP1-RIP3-DRP1 signaling pathway. *Nat Immunol* 15, 1126–1133.
- Wang, Y., Gao, W., Shi, X., Ding, J., Liu, W., He, H., Wang, K., and Shao, F. (2017b). Chemotherapy drugs induce pyroptosis through caspase-3 cleavage of a gasdermin. *Nature* 547, 99–103.
- Wang, Y., Hao, F., Nan, Y., Qu, L., Na, W., Jia, C., and Chen, X. (2018b). PKM2 Inhibitor Shikonin Overcomes the Cisplatin Resistance in Bladder Cancer by Inducing Necroptosis. *Int. J. Biol. Sci.* 14, 1883–1891.
- Weinlich, R., Oberst, A., Beere, H.M., and Green, D.R. (2017). Necroptosis in development, inflammation and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 18, 127–136.
- Wiley, S.R., Schooley, K., Smolak, P.J., Din, W.S., Huang, C.-P., Nicholl, J.K., Sutherland, G.R., Smith, T.D., Rauch, C., Smith, C.A., et al. (1995). Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity* 3, 673–682.

- de Wilt, L.H.A.M., Kroon, J., Jansen, G., de Jong, S., Peters, G.J., and Kruyt, F.A.E. (2013). Bortezomib and TRAIL: A perfect match for apoptotic elimination of tumour cells? *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 85, 363–372.
- Wu, B., Xiong, J., Zhou, Y., Wu, Y., Song, Y., Wang, N., Chen, L., and Zhang, J. (2020a). Luteolin enhances TRAIL sensitivity in non-small cell lung cancer cells through increasing DR5 expression and Drp1-mediated mitochondrial fission. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 692, 108539.
- Wu, W., Wang, X., Berleth, N., Deitersen, J., Wallot-Hieke, N., Böhler, P., Schlütermann, D., Stuhldreier, F., Cox, J., Schmitz, K., et al. (2020b). The Autophagy-Initiating Kinase ULK1 Controls RIPK1-Mediated Cell Death. *Cell Reports* 31, 107547.
- Wu, Y.-Y., Chang, Y.-C., Hsu, T.-L., Hsieh, S.-L., and Lai, M.-Z. (2004). Sensitization of Cells to TRAIL-induced Apoptosis by Decoy Receptor 3. *J. Biol. Chem.* 279, 44211–44218.
- Xia, B., Fang, S., Chen, X., Hu, H., Chen, P., Wang, H., and Gao, Z. (2016). MLKL forms cation channels. *Cell Res* 26, 517–528.
- Xie, C. (2011). Redistribution of DR4 and DR5 in lipid rafts accounts for the sensitivity to TRAIL in NSCLC cells. *Int J Oncol.*
- Xing, Q.R., Farran, C.A.E., Zeng, Y.Y., Yi, Y., Warriar, T., Gautam, P., Collins, J.J., Xu, J., Dröge, P., Koh, C.-G., et al. (2020). Parallel bimodal single-cell sequencing of transcriptome and chromatin accessibility. *Genome Res.* 30, 1027–1039.
- Xu, Y., Ma, H., Fang, Y., Zhang, Z., Shao, J., Hong, M., Huang, C., Liu, J., and Chen, R. (2017). Cisplatin-induced necroptosis in TNF α dependent and independent pathways. *Cellular Signalling* 31, 112–123.
- Yatim, N., Jusforgues-Saklani, H., Orozco, S., Schulz, O., Barreira da Silva, R., Reis e Sousa, C., Green, D.R., Oberst, A., and Albert, M.L. (2015). RIPK1 and NF- κ B signaling in dying cells determines cross-priming of CD8 $^{+}$ T cells. *Science* 350, 328–334.
- Yin, X.-M., Wang, K., Gross, A., Zhao, Y., Zinkel, S., Klocke, B., Roth, K.A., and Korsmeyer, S.J. (1999). Bid-deficient mice are resistant to Fas-induced hepatocellular apoptosis. *Nature* 400, 886–891.
- Yonehara, S., Ishii, A., and Yonehara, M. (1989). A cell-killing monoclonal antibody (anti-Fas) to a cell surface antigen co-downregulated with the receptor of tumor necrosis factor. *The Journal of Experimental Medicine* 169, 1747–1756.
- Yu, J.W., Jeffrey, P.D., and Shi, Y. (2009). Mechanism of procaspase-8 activation by c-FLIPL. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106, 8169–8174.
- Zerafa, N., Westwood, J.A., Cretney, E., Mitchell, S., Waring, P., Iezzi, M., and Smyth, M.J. (2005). Cutting Edge: TRAIL Deficiency Accelerates Hematological Malignancies. *J Immunol* 175, 5586–5590.
- Zhang, L., and Fang, B. (2005). Mechanisms of resistance to TRAIL-induced apoptosis in cancer. *Cancer Gene Ther* 12, 228–237.

Zhang, L., Blackwell, K., Workman, L.M., Chen, S., Pope, M.R., Janz, S., and Habelhah, H. (2015). RIP1 Cleavage in the Kinase Domain Regulates TRAIL-Induced NF- κ B Activation and Lymphoma Survival. *Mol. Cell. Biol.* *35*, 3324–3338.

Zhu, F., Zhang, W., Yang, T., and He, S. (2019a). Complex roles of necroptosis in cancer. *J. Zhejiang Univ. Sci. B* *20*, 399–413.

Zhu, H., Li, Y., Liu, Y., and Han, B. (2019b). Bivalent SMAC Mimetics for Treating Cancer by Antagonizing Inhibitor of Apoptosis Proteins. *ChemMedChem* *14*, 1951–1962.

Zhu, W., Zhan, D., Wang, L., Ma, D., Cheng, M., Wang, H., Zhao, J., Cai, Y., and Cheng, Z. (2016). Proteasome inhibitor MG132 potentiates TRAIL-induced apoptosis in gallbladder carcinoma GBC-SD cells via DR5-dependent pathway. *Oncology Reports* *36*, 845–852.

Zong, H., Yin, B., Chen, J., Ma, B., Cai, D., and He, X. (2009). Over-Expression of c-FLIP Confers the Resistance to TRAIL-Induced Apoptosis on Gallbladder Carcinoma. *Tohoku J. Exp. Med.* *217*, 203–208.