



Thèse présentée par

Emilie VOLTZ

En vue de l'obtention du titre de
Docteur de l'Université Louis Pasteur de Strasbourg

Sciences du Vivant

Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie

**Apoptose tumeur-spécifique : Mécanisme et
potentiel thérapeutique de la voie de
signalisation de TRAIL**

Soutenue le 24 Novembre 2006 devant la commission d'examen

Président du jury
Rapporteur externe
Rapporteur externe
Rapporteur interne
Directeur de thèse

Prof. Claude KEDINGER
Dr. Patrick MEHLEN
Dr. Olivier MICHEAU
Dr. Marie-Christine RIO
Dr. Hinrich GRONEMEYER

Je remercie tout d'abord Claude Kédinger, Marie-Christine Rio, Patrick Mehlen et Olivier Micheau d'avoir accepté de lire et juger ma thèse.

Je remercie Hinrich pour m'avoir permis de réaliser ma thèse dans cet environnement privilégié, pour m'avoir laissée libre tout au long de ma thèse, pour toutes nos discussions, plus particulièrement pendant la rédaction de ce manuscrit, et pour son soutien. Vos remarques critiques m'ont permis de mûrir tout au long de ces années.

Je tiens à remercier tous les membres de l'équipe, encore présents ou déjà partis, pour la bonne ambiance au labo et leur réel soutien : Ana, Nicole, Irina, Tawna, Pierre, Sébastien, Fabio, Lilian, Per, Céline, Catherine (merci pour tes muffins), Claudine, Astrid et Audrey.

Plus particulièrement, je remercie Cathie pour sa tranquillité et sa bonne humeur légendaires, pour sa serviabilité et ses conseils,

Irene, également pour sa bonne humeur et son aide, comment dire... nécessaire pour les corrections de mon anglais parfois trop français !

Sandra, pour ta franchise et également pour ton calme et ton aide dans les derniers moments... A ton tour maintenant !!

Shankar, le grand frère du labo, puits de science et d'anecdotes loufoques, pour ta bonne humeur, tes conseils et ton aide. Je n'oublierai pas « cleaning is a process, not an event ! » et aussi qu'il faut « couper les têtes » le plus vite possible !

Michèle, ma petite mimiche, ces années au labo n'auraient pas eu le même goût sans toi, merci pour m'avoir initiée à la course fractionnée, ces moments dans la forêt m'ont fait beaucoup de bien : merci pour ton écoute patiente et ta sensibilité. Ne change rien !

Un énorme merci à Jean Marie G., pour son aide plus que précieuse dans nos multiples clonages et pour sa bonne humeur communicative.

Merci aux filles du service de culture pour avoir inlassablement essayé de résoudre nos problèmes de culture avec gentillesse, et merci à « Alex de l'animalerie » pour sa patience dans nos essais d'expérimentations animales.

Merci également à Doris et Hélène, de vous être si bien occupées de nous pendant notre période de rédaction à la bibliothèque. Une petite touche spéciale pour Maïté, l'ange gardien de la Splash, pour ton aide et tes petits mots qui remontent le moral...

Merci à « l'équipe Cécile », Gaétan (pour ses blagues !), Nathalie, Christine et plus particulièrement Sébastien, le pt'it seb, merci pour ton calme, ta capacité à relativiser et pour ton écoute. Ne t'inquiète pas, je suis sûre que tu réussiras un jour à finir ton appart', j'espère juste que je serai encore là pour ta pendaison de crémaillère... et Merci d'avoir pris le temps de relire ma thèse et d'avoir corrigé les phrases sans verbe...

Merci à la tribu du midi, Sarah, Seb, Jérôme et Giovanni, véritable bouffée d'air frais dans la journée.

Une petite note pour les gens du RU, qui par leurs sourires et leur gentillesse ont rendu notre pitance quotidienne plus digeste.

Merci à tous ceux qui, au détour d'un couloir ou le temps d'une pause clope, m'ont redonné du courage... Particulièrement les « mecs de chez Jean Marc Egly », les gentils animateurs du 4^{ème} !

Manue, Heidi, ma moitié au labo, ma chopine, merci pour cette « merveilleuse aventure humaine » !. Les Em's sont mortes avec ton départ, et c'est bien triste... Je ne sais pas ce que je serais devenue sans toi...j'espère que tes nouveaux collaborateurs mesurent la chance qu'ils ont ! Ces trois ans de travail avec toi resteront, malgré tout ce qu'on a enduré, une super expérience, et je t'en remercie sincèrement.

Lucie, ma Grosse lu, adhérente à la société pomologique du Berry (si si, vérifie !), je n'oublierai pas les soirées rinquinquin-ragots, et je suis ravie d'avoir pu apprendre à mieux te connaître et pu découvrir tes fragilités qui font tout ton charme...

Anne, le meilleur remonte moral que je connaisse, l'amie idéale, tu sais déjà à quel point tu comptes pour moi... merci pour tout.

Merci à Mel pour les coups de fil de deux heures qui font du bien, Gilbert pour son sarcasme et ta tendresse ; Ju et Mir, pour toutes les soirées ratées et votre soutien sans faille, Fioflo pour avoir essayé de m'inculquer les bienfaits de cet art martial dont j'ai encore oublié le nom en faisant des répèts en salle de culture, Jabier, Franck, et Johan qui j'espère poursuivra ses efforts en course fractionnée !!

Je tiens vraiment à remercier « les luxos », que j'ai rencontrés en arrivant à Strasbourg et qui comptent beaucoup pour moi ; Vinc', Jean-Marie, Anne-So

(presque luxo), Florian (aussi presque luxo), Manette (merci pour les pizzas) et Tom, pour les nombreuses et néanmoins mémorables soirées !

Plus particulièrement, je remercie Luc, mon compagnon de galère pendant la rédaction, pour m'avoir supportée, écouté et épaulée pendant cette période, et pour toutes les petites attentions qu'il a eu à mon égard ; Marc, pour m'avoir fait découvrir « the surfers » et toute l'attitude qui va avec, pour sa capacité à garder son calme pendant mes crises de paranoïa aiguës, pour m'avoir appris mes premiers mots en luxo et tout simplement pour son amitié.

Alain, je te remercie pour tout ce que tu m'as apporté, pour ta présence, pour m'avoir sans cesse rassurée et toujours essayé de me comprendre ; si ces années à Strasbourg ont été si bien pour moi, c'est en partie grâce à toi...

Un petit mot pour mes grands-mères qui se demandent ce que je fais depuis 4 ans, merci pour votre présence et vos encouragements afin que je cherche enfin un vrai métier !

Merci à mon frère adoré, Fred, sans doute le meilleur frère au monde, pour tout le réconfort qu'il m'a apporté dans mes moments de doute et qui me manque énormément depuis qu'il a décidé de quitter notre belle Lorraine...

Enfin, mes parents, vous remercier pour tout ce que vous avez toujours fait pour moi serait beaucoup trop long mais sachez que je vous en suis très reconnaissante. Merci d'avoir toujours respecté mes choix, de m'avoir soutenu sans cesse ; vous êtes le meilleur fan club au monde !!!

LISTE DES ABREVIATIONS

Abréviations

A	ADN: Acide désoxyribonucléique	F	FADD: Fas-Associated Death Domain
	AKT/ PKB : protein kinase B		FasL: Fas ligand
	ALT: alternative lengthening telomeres		FBW7: ubiquitine ligase E3
	AML: acute myeloid leukemia		FLIP: FADD-like ICE inhibitory protein
	AP1: activating protein 1		FOXO: forkhead transcription factor
	Apaf-1: apoptosis protease-activating factor-1		
	APC: adenomatous polyposis coli	G	GAPs: GTPase activating proteins
	APL: acute promyelocytic leukemia		GSK3: glycogen synthase kinase-3
	AR: acide rétinoïque		
	ARF: alternative reading frame	H	HATs: Histone acetyltransferases
	ARN: Acide ribonucléique		HDACs: Histone Déacétylases
	ATP: Adénosine triphosphate		HDACis: HDAC inhibitors
	ATRA: All-trans rétinoïc acid		hdm2: human double minute 2 protein
B	Bcl-2: B-cell leukemia/lymphoma 2		HER: human ERBB2
	BER : base-excision repair		HGS: Human Genome Science
	BRAF: v-raf murine sarcoma virus homologue B		HMTs: Histone methyltransferases
	BRCA1: breast cancer 1		HSP: Heat Shock Protein
	BR/HLH/LZ: basic region/helix-loop-helix/leucine zipper		hTERC: human telomerase RNA gene
			hTERT: human telomerase reverse transcriptase
			HtrA2/
			Omi : high temperature requirement (HtrA) serine peptidase 2
C	CBP: CREB binding protein	I	IAPs: inhibitors of apoptosis
	CDC: Complement Dependent Cytotoxicity		IFNs: interférons
	Cdk: Cyclin-dependent kinase		INK4a p16/
	CIN: chromosomal instability		CDKN2A: cyclin-dependent kinase inhibitor 2A
	CRABP II: Cellular retinoïc acid-binding protein II		
	CSCs : cellules souches cancéreuses	J	JmJc: Jumonji C
D	DcRs: Decoy receptors		JNK: Jun N-terminal kinase
	DD: death domain		
	DED: death effector domain	L	LDH-A: L-lactate dehydrogenase A chain
	DHFR: dihydrofolate réductase		LSD-1: lysine-specific demethylase-1
	DISC : death inducing signaling complex		LT: large T Antigen
	DN-hTERT: dominant-negative human catalytic subunit of telomerase		
	DNMT: DNA Methyltransferase	M	Mad1-4: (myc associated factor x) Max dimerisation protein 1-4
	DOT1/DOT1L: Disruptor of telomeric silencing		Mag: myelin-associated glycoprotein
	DR: death receptor		MAPK/
E	E2F-2: E2 promoter binding factor		ERK : mitogen-activated protein kinase/ Extracellular signal-regulated kinases
	EGFR : epidermal growth factor receptor		MBPs : methyl-binding proteins
	eIF-2 α : α subunit of translation initiation factor 2		MEK1/2 : mitogen-activated protein kinase (MAPK) kinases
	ELK1: member of erythroblast transformation specific (ETS) oncogene family		
	ERBB: epidermal growth factor (EGF) receptors		MEFs : Mouse embryonic fibroblasts

MMP-7 :	matrix metalloproteinase 7		
MMR :	mismatch repair		
Mnt :	Max binding protein		
mTOR:	mammalian target of rapamycin		
N			
NAD+:	nicotinamide adenosine dinucleotide		
NcoR:	nuclear hormone receptor co-repressor		
NEMO:	I kB kinase gamma		
NER:	nucleotide-excision repair		
NF1:	neurofibromine		
NF-kB:	nuclear factor kappa B		
NK:	natural killer		
Numa:	nuclear mitotic apparatus		
O			
OPG:	osteoprotegerin		
P			
P-TEFb :	positive transcription elongation factor b		
PI3K :	phosphatidylinositol 3-kinase		
PIN1 :	peptidylprolyl isomerase		
PLAD :	pre-ligand assembling domain		
PLZF :	promyelocytic leukemia zinc finger		
PML :	promyelocytic leukemia		
PP2A :	phosphatase-2A		
pRb:	protein of retinoblastoma		
PRMT :	Protein arginine methyltransferase		
PTEN :	phosphatase and tensin homologue		
R			
RalGDS:	Ral guanine nucleotide dissociation stimulator		
RARa :	retinoic acid receptor alpha		
Ras :	Harvey rat sarcoma virus oncogene		
RB1 :	retinoblastoma 1		
RIP :	receptor interacting protein		
RXR :	retinoid X receptor		
S			
SAHA :	Suberoylanilide hydroxamic acid		
SCF-SPK2:	SCF ubiquitin ligases S-phase kinase associated protein 2		
Ser ou S :	Sérine		
SET:	Su(var)3-9, Enhancer of zeste, Trithorax		
shARN :	short hairpin ARN		
siRNAs :	short interfering RNA		
Smac/			
DIABLO:	second mitochondria-derived activator of caspase/direct IAP-binding protein		
SMRT :	silencing mediator for retinoic acid receptor and thyroid-hormone receptor		
NOD-SCID:	non-obese diabetic severe combined immunodeficiency		
st :	short T antigen		
SWI/SNF :	switching deficient /sucrose non-fermenting		
T			
tBid :	truncated Bid		
Thr ou T :	Thréonine		
TNF :	Tumour Necrosis Factor		
TNFR:	TNF receptor		
TP53 :	Tumour Protein p53		
TRADD:	TNFR-associated death domain		
TRAF2 :	TNFR-associated factor 2		
TRAIL:	TNF-related apoptosis-inducing ligand		
TRAIL-R:	TRAIL receptor		
TRRAP :	transformation/transcription domain-associated protein		
TSA :	trichostatine A		
U			
UV :	ultraviolet		
V			
VEGF:	vascular endothelial growth factor		
VHL :	Von Hippel-Lindau disease		
W			
WAF1/			
CIP1:	cyclin independent kinase inhibitor 1		
X			
XIAP:	X-linked mammalian inhibitor of apoptosis protein		
5-FU :	5-fluorouracile		

INTRODUCTION

<

I. Le cancer

A. Généralités

Le cancer désigne un groupe de maladies qui affectent le fonctionnement intrinsèque de nos cellules qui, progressivement, échappent aux mécanismes normaux de contrôle de la croissance, de la différenciation et de l'apoptose. La rupture de l'équilibre entre ces mécanismes conduit à une prolifération cellulaire incontrôlée.

Le développement et l'évolution d'un cancer peuvent être divisés en trois grandes phases : (i) la transformation maligne d'une cellule normale en cellule cancéreuse (tumorigenèse ou carcinogenèse) et sa prolifération incontrôlée (désordre monoclonal) ; (ii) l'angiogenèse et l'extension locale de la tumeur ; (iii) l'invasion ganglionnaire (invasion régionale) puis métastatique (invasion à distance) (McCormick, 1999; Nowell, 1989).

B. Genèse d'un cancer : deux dogmes

Depuis plusieurs dizaines d'années, le développement d'une tumeur est vu comme un processus multi-étapes mettant en jeu plusieurs altérations génétiques et sélections clonales successives (Nowell, 1976). Cette théorie se concentre plus sur la nature et le nombre de mutations requis pour former une tumeur que sur les propriétés de la cellule dans laquelle ces modifications se produisent. Malgré certaines limitations, les principes et concepts de cette théorie ont été au fur et à mesure intégrés dans le modèle classique de la recherche en cancérologie (Grander, 1998; Hahn and Weinberg, 2002).

Grâce aux progrès technologiques, la vision de la tumorigenèse est pourtant actuellement en train de changer. En effet, de nombreuses données indiquent que certains cancers pourraient provenir d'une cellule unique non différenciée, nommée cellule souche cancéreuse, qui aurait subi de fréquentes modifications génétiques et épigénétiques (Marx, 2003; Reya et al., 2001). Bien que ces deux théories ne soient mutuellement exclusives, nous allons les aborder distinctement afin d'en souligner les caractéristiques.

1. La tumorigenèse est un processus multi-étapes

Cette théorie, majoritairement basée sur l'observation et l'analyse de tumeurs solides, postule que le cancer est une maladie génétique des cellules somatiques. Ces dernières subiraient plusieurs mutations successives au niveau de gènes cruciaux pour les fonctions vitales des cellules, leur permettant d'échapper à tout contrôle et de proliférer sans limite.

Ces mutations somatiques peuvent être causées par des facteurs environnementaux tels que les radiations, certains produits chimiques, des virus ou encore des imperfections dans la machinerie de réplication de l'ADN et conduire à des fonctions cellulaires anormales (Vogelstein and Kinzler, 1998; Zhang et al., 1995). Des mutations génétiques contribuant à la transformation d'une cellule normale en cellule cancéreuse peuvent aussi être héritées de façon Mendélienne (Knudson, 1991). Selon la théorie de Knudson, appelée « two-hit hypothesis », une mutation unique héritée est rarement suffisante pour initier la tumorigenèse et donc une mutation additionnelle ou la perte d'un second allèle est requise (Knudson, 1971; Tamura et al., 2004). En effet, il a été estimé qu'il fallait entre trois et sept mutations pour qu'une tumeur solide soit formée (Vogelstein and Kinzler, 1998).

Toutes ces mutations provoquent ainsi une prolifération accrue, une résistance à l'apoptose, un contrôle du cycle cellulaire déficient, une capacité à métastaser et à vasculariser la tumeur (Hanahan and Weinberg, 2000; Rieger, 2004; Zhang et al., 1995). Il semblerait que le nombre de mutations puisse avoir une influence sur l'agressivité des tumeurs. En effet, des tumeurs bénignes contiennent moins de mutations que des néoplasmes malins, progressifs. De plus, les tumeurs solides (composées de cellules épithéliales ou mésenchymateuses, normalement immobiles) nécessitent quant à elles un plus grand nombre de mutations que les tumeurs diffuses (composées de cellules néoplasiques normalement mobiles, telles que les leucémies et les lymphomes). Ceci pourrait expliquer le plus grand temps de latence nécessaire à l'apparition de petites tumeurs solides après le stimulus mutagène initial, comparé aux tumeurs diffuses (Vogelstein and Kinzler, 1998; Vogelstein and Kinzler, 2004).

a) Anomalies génétiques et cancer

Trois types majeurs de gènes sont connus pour être liés au développement d'un cancer : les proto-oncogènes, les gènes suppresseurs de tumeur (ces deux types étant aussi qualifiés de « gatekeepers ») et les gènes de stabilité (ou « caretakers »). Des mutations dans ces trois classes de gènes peuvent avoir lieu dans la lignée germinale, provoquant des prédispositions héréditaires au cancer (mais ne provoquant pas un cancer *per se*), mais également dans les cellules somatiques, conduisant à la formation de tumeurs sporadiques (Fearon and Vogelstein, 1990; Vogelstein and Kinzler, 2004). Un phénotype transformé, lorsqu'il est combiné avec une capacité de métastaser, implique à la fois l'activation d'oncogènes et la perte ou l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs (figure 1) (Bast et al., 2000).

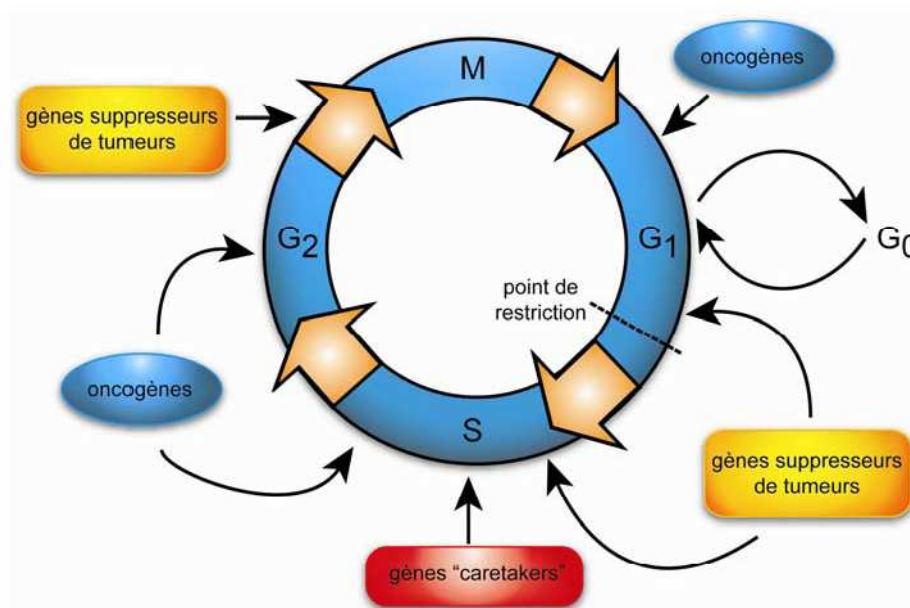


Figure 1 : Gènes associés au développement d'un cancer et implication dans le cycle cellulaire. Les produits des oncogènes et les formes mutées des gènes suppresseurs de tumeur et des gènes « caretakers » altèrent les phases G₁, S et G₂ du cycle cellulaire, permettant la croissance tumorale et la transformation cellulaire.

(1) Les (proto-)oncogènes

Les proto-oncogènes codent pour des protéines possédant un rôle crucial dans la régulation de la prolifération cellulaire, la différenciation ou l'apoptose. Les produits des proto-oncogènes (incluant de nombreux facteurs de croissance et leurs récepteurs, des transducteurs de signal et des facteurs de transcription) contrôlent la croissance et la différenciation des cellules (Aaronson, 1991) (Bast et al., 2000). Ces proto-oncogènes peuvent être activés et devenir des oncogènes suite à une mutation, une amplification ou un réarrangement chromosomique avec pour résultat une structure du proto-oncogène altérée ou une expression de ce proto-oncogène accrue (Bast et al., 2000). Ces gènes étant dominants, une mutation somatique dans un seul allèle d'un oncogène est généralement suffisante pour procurer un avantage de croissance à cette cellule qui peut alors éventuellement être transformée (Vogelstein and Kinzler, 2004).

Voyons l'exemple de deux oncogènes remarquables, auxquels nous nous sommes intéressés au cours de nos travaux : *myc* et *ras*

(a) Myc est un facteur de transcription

myc, un des premiers oncogènes à avoir été identifié, participe à la régulation de trois fonctions cellulaires majeures : prolifération, différenciation et apoptose. Myc agit via ses activités dans le remodelage de la chromatine et dans le contrôle transcriptionnel de nombreux gènes-cibles, certains codant pour des régulateurs essentiels du cycle cellulaire (cycline D1, cycline D2, cycline A, cdk4, p15, p21), d'autres étant impliqués dans la croissance et le métabolisme (DHFR, LDH-A), dans la transformation (hTERT), dans les processus de transcription (E2F-2, eIF-2 α) ou l'apoptose (p19ARF, p53, p21, Bim, Bax) (Adhikary and Eilers, 2005; Bouchard et al., 2001; McMahon et al., 2000; Pelengaris et al., 2002).

Pour assurer sa fonction d'activation de transcription, c-Myc doit former un complexe hétérodimérique avec Max, via son domaine BR/HLH/LZ (basic region/helix-loop-helix/leucine zipper)(Blackwood et al., 1992). Une fois formés, ces complexes reconnaissent des séquences spécifiques présentes sur le promoteur des gènes-cibles de c-Myc, appelées E-boxes (CACA/GTG) (Adhikary and Eilers, 2005). L'accès de c-Myc à la protéine Max est

antagonisé par d'autres protéines de la famille Mad qui comprend 6 protéines différentes (figure 2) (Mad1-4, Mnt et Mga) (Pelengaris et al., 2002).

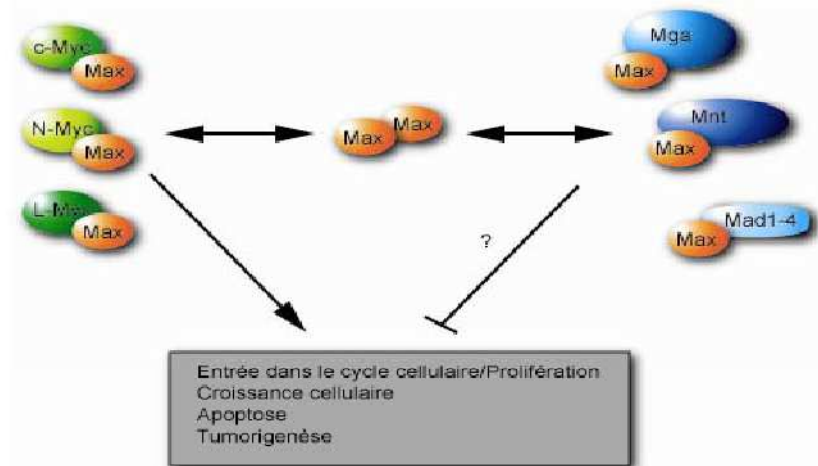


Figure 2 : Le réseau Myc/Max/Mad. Les complexes Mad-Max, Max-Max ou Mnt-Max, qui n'ont pas de domaine de transactivation, bloquent l'effet biologique de Myc-Max par une compétition pour l'occupation de la séquence E-box et répriment alors la transcription du gène-cible (Ayer et al., 1993)

Fixés sur l'ADN, les dimères Myc-Max se comportent comme des sites d'appel pour plusieurs co-facteurs de transcription (CBP/p300, le complexe SWI/SNF, SCF-SPK2, P-TEFb ou encore TRRAP-HAT), permettant la stimulation de la transcription, via un effet sur la structure chromatinienne, l'acétylation des histones ou directement sur le complexe polymérase.

A côté de son rôle de transactivateur, le complexe Myc-Max peut également agir comme transrépresseur selon un mécanisme qui implique un troisième partenaire, Miz-1 (Blackwell et al., 1993; Peukert et al., 1997; Prendergast and Ziff, 1991). Deux modes d'actions non mutuellement exclusifs sont proposés pour expliquer l'effet de transrépression : Myc-Max agirait en inhibant la fixation de facteur positifs de la transcription et en recrutant l'ADN méthyltransférase DNMT3A (Brenner et al., 2005).

c-Myc est le membre le plus connu et le plus étudié de la famille Myc, composée de 4 autres protéines (N-Myc, L-Myc, S-Myc et B-Myc) dont seuls c-Myc, N-Myc et L-Myc semblent impliqués dans la cancérogenèse (Cole and McMahon, 1999; Prendergast, 1999). L'extrémité N-terminale de c-Myc comporte trois éléments hautement conservés, appelés boîtes Myc (Mycbox I-III). Mycbox I est impliquée dans la demi-vie de Myc. Mycbox II est essentielle à toutes les activités biologiques connues de c-Myc. Mycbox III régule également la stabilité de Myc et est nécessaire pour la transactivation/transrépression de certains gènes-cibles (figure 3) (Adhikary and Eilers, 2005; Stone et al., 1987).

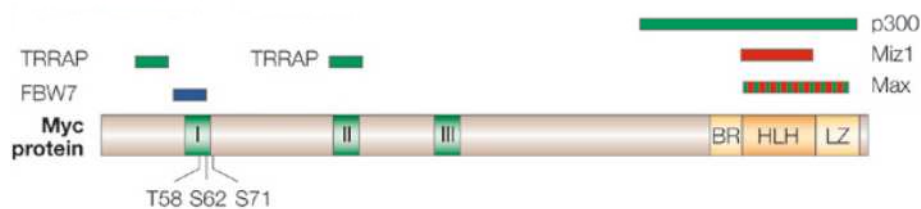


Figure 3 : Représentation des domaines de Myc et des sites de liaison de certaines protéines partenaires. Les boîtes Myc sont situées en N-terminal et le domaine BR/HLH/LZ en C-terminal. T58, S62 et T71 sont les sites de phosphorylation de Myc, respectivement ciblés par la glycogène synthase kinase-3 (GSK3), la MAP kinase et une kinase dépendante de Rho. L'interaction de Myc avec les protéines représentées (i) en vert résulte en une transactivation du gène-cible ; (ii) en rouge résulte en une transrépression ; (iii) en bleu a pour conséquence la répression de Myc ; (iv) en rouge barré de vert peut conduire à la transactivation ou la transrépression du gène-cible. p300 est une acétyltransférase d'histones ; TRRAP est une protéine adaptatrice faisant partie d'un complexe de co-activateurs.

(b) Myc et transformation cellulaire

Les altérations génétiques conduisant à l'activation oncogénique de Myc ont été trouvées dans un grand nombre de tumeurs humaines, notamment le sein, le colon, le carcinome du poumon à petites cellules, le glioblastome, les leucémies myéloïdes, le lymphome de Burkitt ou l'ostéosarcome (Cole, 1986; Marcu et al., 1992; Spencer and Groudine, 1991), et font de *myc* un oncogène majeur dans les processus tumorigènes humains (Boxer and Dang, 2001).

Myc participe à de nombreux aspects du processus de tumorigenèse, tels que l'immortalisation, via l'induction de la télomérase (Xu et al., 2001), l'instabilité génomique en permettant aux cellules de continuer à proliférer malgré la présence de mutations ou de lésions sur l'ADN (Felsher and Bishop, 1999), et l'angiogenèse, notamment en induisant l'expression de VEGF (vascular endothelial growth factor) (Pelengaris et al., 2002) et en inhibant la thrombospondine-1, un inhibiteur de l'angiogenèse (Janz et al., 2000). Malgré tout, l'expression dérégulée de Myc seule ne suffit pas pour convertir des cellules normales (de rongeurs ou humaines) en cellules tumorales. Ainsi, des mutations additionnelles sont nécessaires. Un exemple caractéristique est la coopération de Myc avec des oncogènes de la voie de signalisation de Ras permettant la transformation cellulaire et la tumorigenèse (Drayton et al., 2003; Land et al., 1986).

Dans ce cas, la régulation du pouvoir transformant de Myc par Ras permet d'une part de stabiliser la protéine c-Myc (figure 4). D'autre part, plusieurs gènes-cibles de Myc, impliqués dans la prolifération cellulaire sont co-régulés par des facteurs de transcription de la famille FOXO, qui lorsqu'ils ne sont pas phosphorylés par la protéine kinase AKT (activée par Ras), se lient à ces gènes-cibles et répriment leur expression (Bouchard et al., 2004). Enfin, l'activation de la voie PI3K/AKT par Ras permet la phosphorylation de Miz1 qui ne peut alors plus activer p21^{CIP1}, empêchant ainsi la capacité de Miz1 d'inhiber la prolifération cellulaire (Wanzel et al., 2005).

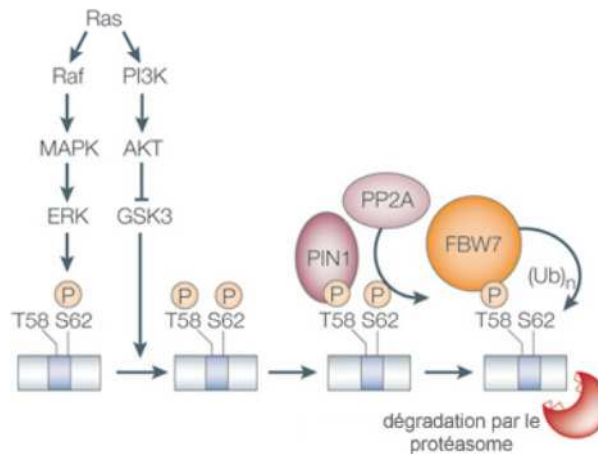


Figure 4 : Régulation de la stabilité de Myc par les voies de signalisation dépendantes de Ras. Ras contrôle la stabilité de Myc en induisant sa phosphorylation sur deux résidus, Thr58 (T58) et Ser62 (S62) (Sears et al., 2000). La phosphorylation de Myc sur le résidu S62 par la voie MAPK/ERK et l'inhibition de la GSK3 (glycogen synthase kinase-3) via l'activation de la voie PI3K/Akt permettent la stabilisation de Myc. La T58 peut être phosphorylée par GSK3 si la S62 est phosphorylée (Gregory et al., 2003). La T58 phosphorylée est, elle, reconnue par la prolyl isomérase (PIN1), ce qui permet à la phosphatase-2A (PP2A) de déphosphoryler la S62. L'ubiquitine ligase E3 (FBW7) reconnaît la T58 phosphorylée, ubiquitinyne Myc qui est alors dégradé par le protéasome (Welcker et al., 2004). (Adapté de Adhikary S. et Eilers M., 2005)

(c) *ras*

Premier oncogène non viral découvert, *ras* est devenu l'oncogène emblématique de la transformation maligne d'une cellule. En effet, environ 30 % des tumeurs humaines, toutes tumeurs confondues, portent des mutations dans un de trois des membres de la famille Ras, H-Ras, K-Ras ou N-Ras, conduisant à l'activation constitutive de Ras (Lowy and Willumsen, 1993).

Les protéines Ras font partie de la superfamille des petites protéines G (se liant au GTP) et interviennent dans le contrôle de la croissance cellulaire. Pour être actives, les protéines Ras doivent être modifiées post-traductionnellement par farnésylation et également être liées au GTP. Lorsque Ras est sous forme Ras-GTP, elle est alors capable de lier et d'activer plusieurs enzymes effectrices entraînant une cascade de phosphorylations/activations. L'activation de ces voies de signalisation, impliquées dans une panoplie de processus cellulaires complexes, permet notamment aux cellules de proliférer, de survivre, et de se différencier (Downward, 2003).

Le premier effecteur de Ras à avoir été caractérisé est la kinase à sérine/thréonine Raf, qui, lorsqu'elle est activée, peut à son tour phosphoryler et activer les kinases MEK1 et MEK2 (mitogen-activated protein kinase (MAPK) kinases). MEK1/2 phosphorylent et activent les MAPKs ERK1 et ERK2 (extracellular signaling-regulated kinases 1 et 2) dont les substrats sont différentes protéines nucléaires et cytosoliques. Parmi ces substrats, on peut citer ELK1 et c-Myc, qui régulent la transcription de gènes stimulant la prolifération cellulaire et Bcl-2, une protéine anti-apoptotique. ERK1/2 phosphoryle également c-Jun, qui active alors le facteur de transcription AP1 (constitué d'hétérodimères Fos-Jun). Ce dernier stimule par exemple l'expression de gènes contrôlant le cycle cellulaire, comme la cycline D1, ou codant pour des métalloprotéinases, tel que MMP-7, favorisant l'angiogenèse (figure 5) (Smakman et al., 2005).

Ras peut également interagir avec la sous-unité catalytique de la PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase), qui possède elle aussi de nombreux effecteurs dont AKT (PKB), une protéine exerçant une forte activité anti-apoptotique via la phosphorylation de nombreuses cibles et qui constitue donc une part importante des signaux de survie générés par Ras (figure 5) (Khwaja et al., 1997).

Une troisième famille importante d'effecteurs de Ras comprend les facteurs d'échange des protéines Ral : les RalGDS (Ral guanine nucleotide dissociation stimulator), grâce auxquels Ras peut activer Ral. CDC42, une des protéines-cibles de Ras inhibe les facteurs de transcription Forkhead, de la famille FOXO. Ces facteurs sont impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire et dans l'activation de l'apoptose via l'expression de Bim et de FasL (figure 5) (De Ruiter et al., 2001).

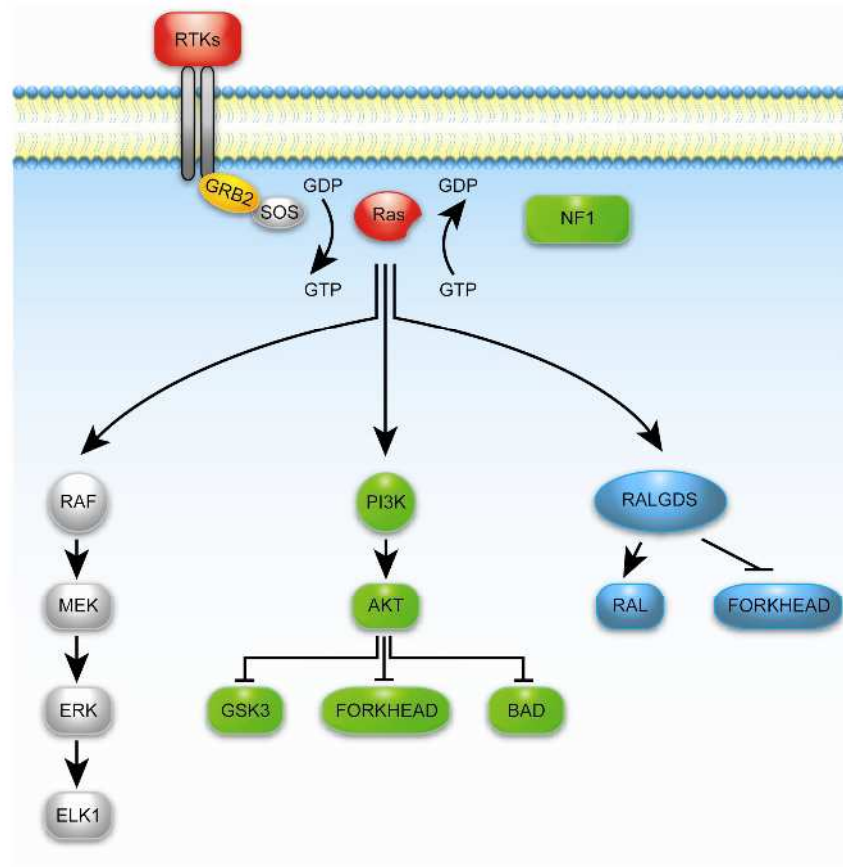


Figure 5 : Voies de signalisation dépendantes de Ras. Suite à l'activation de récepteurs à tyrosine-kinase (RTKs), Ras est activé, sous forme Ras-GTP. Trois des voies de signalisation induites par Ras sont représentées : la voie des MAP Kinases, la voie de la PI3 Kinase et la voie des Ral GDS.

Communément, Ras peut être constitutivement activé dans les tumeurs humaines, suite à une mutation ponctuelle (Bos, 1989) ou à la perte des GAPs (GTPase activating proteins) tels que la neurofibromine, NF1, enzyme responsable de l'hydrolyse de l'ATP (figure 5) (Downward, 2003). Les voies de signalisation de Ras sont aussi fréquemment activées dans les tumeurs dans lesquelles un récepteur de croissance de type tyrosine kinase est surexprimé, comme par exemple EGFR et ERBB2/HER2/Neu dans certains cancers du sein ou des ovaires (Mendelsohn and Baselga, 2000). En effet, la voie Ras-Raf-MAPK est la voie de signalisation prépondérante de ces récepteurs et leur surexpression conduit donc à l'activation soutenue de Ras et, par conséquent, à la prolifération cellulaire incontrôlée. Enfin, certains gènes codant pour des effecteurs de Ras peuvent être mutés ou amplifiés, comme c'est le cas pour *BRAF*, ou délétés, comme le gène suppresseur de tumeur *PTEN* (phosphatase and tensin homologue), codant pour une protéine qui empêche l'accumulation de messagers secondaires formés par

PI3K (Simpson and Parsons, 2001). De la même façon, ces mutations ou délétions provoquent l'activation des voies de survie activées par Ras et donc une prolifération accrue des cellules.

Les propriétés de transformation de Ras sont efficaces dans des cellules immortalisées mais pas dans des cellules primaires. En effet, l'expression ectopique de l'oncogène Ras induit la sénescence des cellules de rongeurs et humaines non immortalisées principalement via la cascade des MAPKs qui permet l'activation des protéines p16 et/ou ARF qui elles, activent pRb et p53 respectivement. p53 et pRb contrôlent des effecteurs tels que p21^{CIP1} qui permettent l'arrêt de croissance des cellules en phase G1 (Collado et al., 2005; Serrano et al., 1997).

La sénescence induite par les oncogènes tels que *ras* dans des cellules normales empêche donc la croissance de cellules transformées, maintenant ainsi la tumeur dans un état non agressif, pré-malin.

(d) Coopération Ras/Myc

Le fait que l'action conjuguée des deux oncogènes Ras et c-Myc puisse permettre la transformation de cellules primaires a été établi il y a 20 ans (Land et al., 1983), mais la nature de cette coopération n'est toujours pas clairement identifiée. Il semblerait que c-Myc puisse empêcher l'arrêt du cycle cellulaire induit par l'expression ectopique de Ras dans les cellules primaires et que, inversement, Ras, étant donné sa capacité à stabiliser la protéine labile c-Myc (Yeh et al., 2004), puisse inhiber l'apoptose induite par Myc via l'activation de la voie de signalisation de survie de la PI3K (Kauffmann-Zeh et al., 1997) (figure 6).

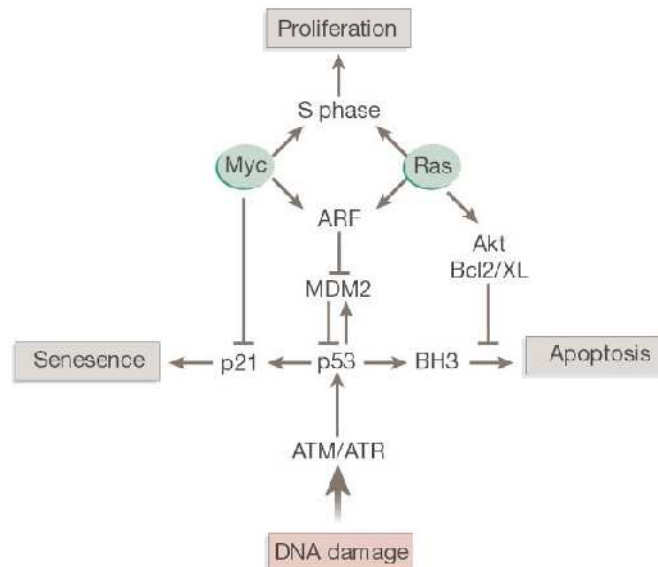


Figure 6 : Représentation schématique du circuit moléculaire impliqué dans la transformation par Ras et Myc. Lorsque Ras et Myc sont surexprimés (ou constitutivement actifs), l'équilibre fragile entre les voies de signalisation induites ou réprimées par chacun des facteurs est perturbé. Alors que Myc induit normalement p53 pour induire l'apoptose de la cellule, tout en bloquant la sénescence via la répression de p21 ; Ras active p53 afin d'activer la sénescence et bloque l'apoptose en inhibant la protéine pro-apoptotique BH3. Les activités apparemment opposées de Ras et Myc conduisent à l'entrée des cellules en phase S du cycle cellulaire et à leur prolifération.

(2) Les gènes suppresseurs de tumeur

(a) Définition

Egalement appelés anti-oncogènes, les gènes suppresseurs codent pour des protéines responsables de l'inhibition de croissance des tumeurs, permettant par exemple le blocage ou l'arrêt du cycle cellulaire, ou en induisant la mort des cellules tumorales (McCormick, 2001).

Contrairement aux oncogènes, les gènes suppresseurs de tumeur sont récessifs et les deux allèles du gène doivent être perdus ou mutés afin d'inhiber leur rôle protecteur et de conférer un avantage sélectif à la cellule (Vogelstein and Kinzler, 2004).

Etant donné que ces gènes sont des facteurs limitants pour la croissance tumorale, ils sont inactivés lors de la transformation afin de bloquer le contrôle normal du cycle cellulaire et d'augmenter la probabilité de formation d'une tumeur (Knudson, 2001; Vogelstein and Kinzler, 2004).

En accord avec l'hypothèse de Knudson, les individus qui ont une prédisposition pour un type de cancer ont hérité d'une copie endommagée d'un de ces gènes et une seule mutation

supplémentaire est suffisante pour initier la formation d'une tumeur. L'inactivation d'un de ces gènes conduit donc à un type particulier de cancer. Par exemple, la mutation du gène *APC* conduit à la formation de tumeurs dans le colon, et la mutation du gène *VHL* prédispose au cancer des reins. Les gènes suppresseurs de tumeur les mieux caractérisés sont *RBI* (Francke and Kung, 1976; Friend et al., 1986; Knudson et al., 1976), *WT1* (Call et al., 1990; Gessler et al., 1990), *TP53* (Finlay et al., 1989), *APC* (Ichii et al., 1992) et *BRCA1* et *2* (Miki et al., 1994; Steichen-Gersdorf et al., 1994; Wooster et al., 1995). Les gènes suppresseurs de tumeur peuvent être inactivés suite à une mutation non-sens sur des résidus essentiels à l'activité de l'anti-oncogène, des mutations qui résultent en une protéine tronquée, des délétions ou insertions ou encore des modifications épigénétiques (Vogelstein and Kinzler, 2004).

(b) Exemple d'un suppresseur de tumeur hors norme : le gène *dcc*

Le gène *dcc* (Deleted in Colorectal Cancer) codant pour le récepteur transmembranaire de la Nétrine-1 (DCC) est situé dans une région du chromosome 18q dont la délétion (perte d'hétérozygotie) est associée à plus de 70 % des cancers du colon (Fearon and Vogelstein, 1990). DCC semble intervenir dans l'étape de progression plutôt que dans l'initiation du cancer colorectal (Fearon and Vogelstein, 1990). Il a ensuite été montré que l'expression de *dcc* était complètement inhibée ou fortement réduite dans la majorité des cancers du colon, dans certains cas de tumeurs du pancréas, du sein, de la prostate, de l'œsophage, de l'estomac, de la vessie, dans des gliomes, des neuroblastomes et quelques leucémies (Cho and Fearon, 1995).

DCC fait partie de la famille des récepteurs à dépendance caractérisés par leur capacité à induire l'apoptose uniquement en l'absence de leur ligand (Keino-Masu et al., 1996). Outre le rôle du couple DCC/Nétrine-1 dans le guidage axonal lors du développement du système nerveux, en absence de ligand DCC agirait en tant que suppresseur de tumeur en induisant l'apoptose des cellules tumorales pendant la formation de métastases ou au cours de la croissance tumorale (Mazelin et al., 2004). En effet, une partie des cellules tumorales ayant acquis la capacité de migrer peuvent se trouver dans un environnement contenant une quantité limitée de Nétrine-1. Dans ce cas, nombre de ces cellules vont exhiber un récepteur DCC dépourvu de ligand, entraînant l'activité pro-apoptotique de DCC et donc l'apoptose de ces cellules, permettant alors la régression tumorale (Mehlen and Llambi, 2005). La perte de *dcc*

fournit donc un avantage prolifératif à la cellule, celle-ci n'étant plus dépendante de la quantité de Nétrine-1 présente dans son environnement (figure 7).

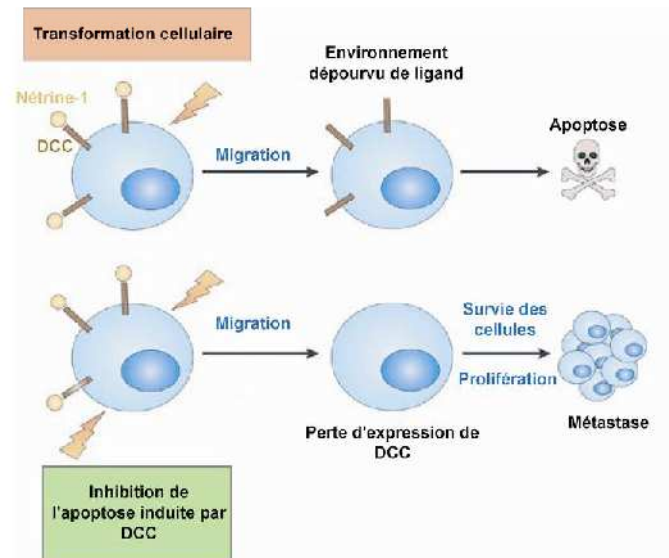


Figure 7 : Régulation de la métastase par DCC/Nétrine-1. Une cellule normale exprimant DCC prolifère si le ligand (Nétrine-1) est présent, faute de quoi la cellule entre en apoptose. Une cellule tumorale ayant acquis des capacités métastatiques va envahir d'autres organes, qui peuvent être dépourvus de Nétrine-1. Dans ce cas, la cellule entre en apoptose. En revanche, il est possible qu'au cours de la transformation le gène codant pour DCC soit perdu ; les cellules perdent alors leur dépendance vis-à-vis du ligand et peuvent former des métastases.

A présent, plus de 10 récepteurs remplissent ces critères de récepteurs à dépendance, parmi lesquels $p75^{\text{NTR}}$ (récepteur du NGF), les récepteurs de la nétrine-1 DCC, UNC5H1, -2 et -3, le récepteur des androgènes (AR) ou Patched, le récepteur de sonic hedgehog.

Le mécanisme d'induction de l'apoptose repose sur le clivage des récepteurs par les caspases actives générant ainsi un fragment pro-apoptotique ou l'exposition de domaines pro-apoptotiques préalablement masqués. Dans un cas comme dans l'autre, ils induisent l'activation des caspases et l'apoptose des cellules. Récemment, il a été démontré que lorsque le récepteur UNC5H2 est clivé par les caspases, il recrute et active la kinase DAP, en partie responsable de la transduction du signal apoptotique (Llambi et al., 2005).

Il reste néanmoins à déterminer comment les caspases sont activées pour ensuite assurer le clivage des récepteurs à dépendance, et le mécanisme moléculaire qui permet au ligand de bloquer l'apoptose.

(3) Gènes de stabilité : « caretakers »

Contrairement aux gènes « gatekeepers », leur inactivation ne favorise pas directement la croissance tumorale mais provoque une instabilité génétique favorisant l'apparition d'autres mutations. Les deux allèles de ces gènes doivent être mutés pour permettre l'accélération du développement tumoral (Kinzler and Vogelstein, 1997).

Certains de ces gènes ont un rôle crucial dans un des trois mécanismes impliqués dans la réparation de l'ADN, et sont indispensables au maintien de l'intégrité du génome au cours de la prolifération cellulaire. Des mutations dans les gènes codant pour les protéines du MMR (mismatch repair), NER (nucleotide-excision repair) ou BER (base-excision repair) atténuent ou inactivent la machinerie de réparation de l'ADN et interfèrent donc avec la stabilité génétique, augmentant l'incidence de mutations ultérieures sur d'autres gènes (Fedier and Fink, 2004) et la probabilité de transformation de la cellule (Eshleman and Markowitz, 1996).

D'autres gènes de stabilité contrôlent les processus impliquant de grandes portions de chromosomes, tels que les gènes responsables des recombinaisons mitotiques et de la ségrégation chromosomique, comme par exemple les gènes *BLM* et *ATM* (dont l'inactivation peut participer à l'apparition de leucémies ou lymphomes) (Gruber et al., 2002; Gummy-Pause et al., 2006; Zhang et al., 2006).

b) Instabilité génétique et cancer

Le concept d'instabilité génétique dans la formation et le développement d'une tumeur est loin d'être nouveau. Il est en effet établi depuis longtemps que la plupart des tumeurs présentent des anomalies chromosomiques, tant au niveau de la structure des chromosomes que de leur nombre, mais également une instabilité chromosomique. Cette instabilité génétique, qui peut être vue comme une propriété intrinsèque des cellules cancéreuses, a été proposée comme participant à la fois à l'initiation et à la progression d'une tumeur et même comme ayant un rôle causal dans ces différentes étapes dans certaines circonstances (Lengauer et al., 1998).

L'étude de la carcinogenèse colorectale a largement contribué à la compréhension de l'instabilité génétique et de sa contribution dans la formation d'un cancer. Ainsi, trois grandes catégories d'altérations génétiques ont été décrites comme pouvant jouer un rôle dans l'initiation d'un cancer : les mutations ponctuelles au niveau de la séquence ADN, l'aneuploïdie, qui rend compte d'un nombre anormal de chromosomes et l'aneusomie, qui concerne la structure anormale des chromosomes (Duesberg and Li, 2003). Ces trois types d'altérations peuvent se produire à deux niveaux et deux types d'instabilité génétique ont été définis : la première est située au niveau nucléotidique et la seconde est située au niveau chromosomique (chromosomal instability, CIN) (Lengauer et al., 1998). L'instabilité génétique est acquise lorsque les gènes et les protéines qui normalement protègent le génome en détectant et en réparant les dommages créés au niveau de l'ADN chromosomique (gènes « gatekeepers ») sont inactivés. Cette inactivation facilite alors l'apparition de mutations au niveau des gènes « caretakers » (oncogènes et suppresseurs de tumeur). De plus, les mécanismes cellulaires (dont l'apoptose) chargés d'éliminer les cellules possédant un ADN endommagé sont eux-aussi souvent inactivés dans les cellules tumorales. Le résultat est donc la survie de cellules mutantes et leur possibilité de continuer à proliférer.

Toutefois, la chronologie exacte de ces événements n'est pas encore formellement identifiée et la place de l'instabilité génétique dans le processus d'initiation de la cancérogenèse n'est pas bien définie. D'autre part, il faut souligner que même si cette instabilité génétique peut être observée dans la plupart des cellules cancéreuses, elle ne semble pas une condition *sine qua non* pour l'initiation et le développement tumoral.

2. Hypothèse des cellules souches cancéreuses

a) Bases de l'hypothèse

Même si le modèle « multi-étapes » a permis l'identification d'oncogènes, de gènes suppresseurs de tumeur et la compréhension de nombreux aspects du développement et de la progression du cancer, il ne permet pas par exemple d'expliquer comment une cellule somatique différenciée pourrait acquérir au cours de sa vie assez de mutations amenant à sa transformation en cellule cancéreuse, initiatrice d'une tumeur. La théorie des cellules souches cancéreuses permet au moins en partie de répondre à cette question.

Le concept de cellules souches cancéreuses (CSCs) ou de cellules initiatrices de tumeurs était déjà présent dans certains esprits dès les années 1960, mais ce n'est qu'au milieu des années 1990 que ces cellules ont pu être identifiées et caractérisées. Les premiers travaux sur ces cellules initiatrices ont souligné le fait que la plupart des tumeurs sont constituées d'une population hétérogène de cellules arborant des différences tant au niveau de leur potentiel prolifératif que de leur capacité à reconstituer une tumeur après transplantation. Il est en effet apparu que la masse tumorale contient une sous-population d'un phénotype cellulaire particulier ayant la capacité de former des colonies ou de nouvelles tumeurs *in vivo* et ce de manière très efficace : les cellules souches cancéreuses (pour revue, voir (Reya et al., 2001)).

Ces CSCs ont des propriétés similaires à celles des cellules souches normales, à savoir la capacité d'auto-renouvellement et de différenciation en de multiples types cellulaires. En revanche, ces cellules souches auraient acquis au cours du temps certaines mutations au niveau des gènes précédemment évoqués, leur conférant la possibilité d'initier un cancer (figure 8).

La théorie des CSCs peut en partie s'accorder avec le modèle « multi-étapes » : les cellules souches ayant une durée de vie plus longue que leur progéniture différenciée, elles pourraient accumuler au fur et à mesure des années plusieurs mutations somatiques génétiques et épigénétiques (Grander, 1998).

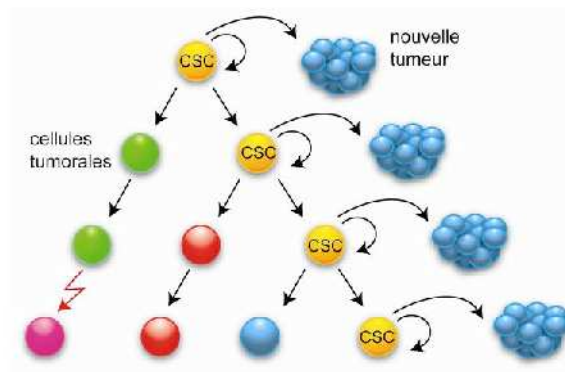


Figure 8 : Cellules souches cancéreuses (CSCs). Les cellules constituant les tumeurs sont hétérogènes mais seules les CSCs (jaunes) ont les capacités de proliférer longtemps et de former de nouvelles tumeurs. (Adapté de Reya T. *et al.*, Nature, 2001)

b) Travaux-clés

Les premières preuves de l'existence de CSCs sont venues de l'étude de maladies hématologiques. Les études pionnières ont été réalisées par l'équipe de J. Dick qui a pu montrer que seule une minorité de cellules leucémiques possédaient la pluripotence nécessaire pour la reconstitution de tumeurs dans la moelle de souris NOD-SCID (Bonnet and Dick, 1997). Après transplantation de cellules humaines issues de patients atteints de leucémie myéloïde aiguë (AML, acute myeloid leukemia) dans des souris immunodéficientes, cette équipe a réussi à identifier des cellules initiatrices de cette leucémie, possédant des marqueurs caractéristiques de cellules souches ($CD34^+/CD38^-$). Lors de cette étude, les auteurs ont également constaté que des blastes provenant des mêmes patients atteints d'AML, et portant les marqueurs $CD34^+/CD38^+$ n'étaient, dans la plupart des cas, pas capables d'initier une leucémie *in vivo*.

Une autre étude, tout aussi importante réalisée en 2003 par Lessard *et al.*, a permis de souligner l'importance de la régulation de la prolifération des cellules souches normales et leucémiques par le gène *Bmi1*. Ce gène du groupe Polycomb est connu pour avoir un rôle clé dans la régulation de la prolifération des cellules souches et des cellules progénitrices normales lié à sa capacité à réprimer des gènes tels que *Ink4a* et *Arf*, responsables de l'induction prématurée de la sénescence et de la mort cellulaire (Molofsky et al., 2005). En effet, cette équipe a remarqué que des cellules souches et des cellules progénitrices

leucémiques déficientes pour le gène *Bmi1* ne proliféraient plus et entraient en apoptose, empêchant ainsi la récurrence de la leucémie après transplantation de ces cellules *in vivo* (Lessard and Sauvageau, 2003).

D'autre part, en plus du gène *Bmi1*, les voies de signalisation qui jouent un rôle clé dans l'auto-renouvellement des cellules souches normales, telles que PTEN, Wnt, Hh et Notch, participent elles aussi activement au développement d'un cancer indiquant un lien étroit entre cellules souches normales et cancéreuses (Pardal et al., 2003) (Al-Hajj and Clarke, 2004).

L'extension de ces études dans les tumeurs solides a été ralentie par l'absence de marqueurs spécifiques des cellules souches qui permettent la caractérisation de ces lignées cellulaires dans les tissus normaux et cancéreux. Néanmoins, différents marqueurs de surface ont pu être identifiés dans le poumon, le cerveau, la prostate et le sein. Ces marqueurs ont ainsi permis l'isolement des cellules souches et des progéniteurs capables de s'auto-renouveler et de se différencier en cellules cancéreuses phénotypiquement différentes et possédant un potentiel de prolifération limité (Kim et al., 2005; Singh et al., 2004; Xin et al., 2005). La preuve la plus flagrante de l'existence de CSCs mammaires provient du travail de Al-Hadjj *et al.* qui, en utilisant les marqueurs de surface CD44⁺/CD24⁻ a pu identifier une population candidate qui ne possédait pas les marqueurs normalement présents dans les cellules épithéliales différenciées et qui présentait un très fort potentiel tumorigène comparé aux cellules provenant de la masse tumorale d'origine (Al-Hajj and Clarke, 2004; Al-Hajj et al., 2003). Il reste à présent à étudier plus en détails cette sous-population de cellules afin d'identifier les altérations présentes ou les molécules spécifiquement exprimées par ces cellules, qui permettraient leur ciblage thérapeutique.

Tous ces travaux ont provoqué un regain d'intérêt pour les CSCs et soulignent l'importance de cibler les « bonnes » cellules en thérapie anti-cancéreuse. En effet, les thérapies actuelles, telles que la chimiothérapie ou la radiothérapie, ciblent les cellules en division, complètement différenciées qui constituent la plus grande partie de la masse tumorale. Or les CSCs sont relativement quiescentes et donc résistantes aux traitements et peuvent éventuellement, malgré leur faible proportion dans les tumeurs, permettre la régénération de la tumeur une fois le traitement arrêté (figure 9) (Al-Hajj et al., 2003; Reya et al., 2001).

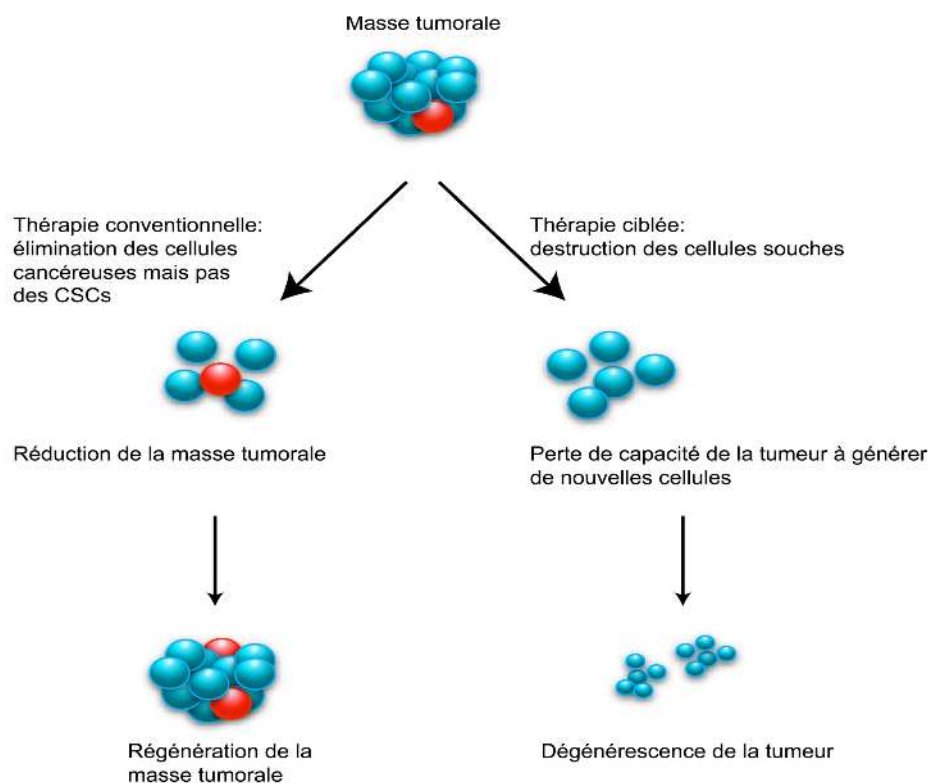


Figure 9 : Thérapie conventionnelle versus thérapie ciblant les cellules souches cancéreuses. Le ciblage des CSCs permettrait peut-être l'éradication de la tumeur, contrairement aux thérapies conventionnelles qui, elles, affectent majoritairement les cellules différenciées de la masse tumorale. Après arrêt du traitement conventionnel, la croissance tumorale est ralentie mais les CSCs permettent de régénérer la masse tumorale. (Adapté de Houghton J.M. *et al.*, 2006)

Plusieurs questions restent pourtant en suspens :

- Quelles sont les différences entre les voies de signalisation des cellules souches normales et cancéreuses ? Les CSCs présentent-elles des altérations génétiques ou épigénétiques par rapport aux cellules souches normales ?
- Quelle est l'origine des CSCs ? Dérivent-elles de cellules souches normales du tissu d'origine, de cellules souches de la moëlle ou de cellules matures qui auraient subi un processus de dé-différentiation ou de trans-différentiation ? Certaines expériences *in vitro* ont prouvé que des cellules différenciées étaient capables, elles aussi d'être à l'origine de la formation d'une tumeur, ce qui tendrait à dire que les cellules différenciées et les cellules progénitrices immatures, dans certaines conditions, peuvent se (dé-)différencier en CSCs (Bachoo *et al.*, 2002). D'autre part, Weissman *et al.* ont

suggéré que les cellules progénitrices pouvaient elles aussi être transformées et donner des tumeurs (Cozzio et al., 2003).

3. Modifications épigénétiques et cancer

Depuis peu, l'implication des modifications non génétiques, ou épigénétiques est considérée comme ayant un rôle prépondérant dans l'apparition et le développement de tumeurs. Il semblerait même qu'il existe une coopération entre les effets génétiques et épigénétiques (Chen et al., 2004). Un exemple de cette coopération est évident dans le développement de la Leucémie Promyélocytaire Aiguë (APL). La base de cette maladie est génétique, une translocation chromosomique entre les gènes codant pour PML et RAR α , qui conduit à la formation d'une protéine de fusion. La conséquence de cet événement génétique est une dérégulation épigénétique, à savoir le recrutement aberrant de complexes HDACs (Histone Déacétylases), qui ont pour effet la répression de gènes cibles normalement exprimés.

Les modifications épigénétiques sont associées à un contrôle de l'expression de nombreux gènes ainsi qu'aux mécanismes de réparation de l'ADN et autres processus ADN dépendants, tels que la réplication ou la réparation de l'ADN (Ehrenhofer-Murray, 2004). Ces phénomènes sont héréditaires, réversibles, ne modifient pas la séquence d'ADN mais conditionnent l'expression des gènes. Nous allons développer dans cette partie comment l'altération du patron de ces modifications peut faciliter le développement tumoral.

a) Définition de la chromatine et de l'épigénétique

La chromatine est un assemblage nucléoprotéique composé d'ADN et de protéines histones. Dans les organismes eucaryotes, on observe cinq classes majeures de protéines histones : H2A, H2B, H3, H4 (protéines nucléosomales) et l'histone H1 (histone « linker »). L'unité de base de la chromatine est le nucléosome. Il est composé d'une séquence d'ADN de 147pb entourant un octamère d'histones composé de deux copies de chacune des histones

H2A, H2B, H3 et H4 (figure 10). Tandis que la partie centrale du nucléosome adopte une conformation stable, les extrémités N-terminales des histones présentent une grande flexibilité structurale. Elles n'interagissent pas avec la partie centrale du nucléosome, à la surface duquel elles émergent.

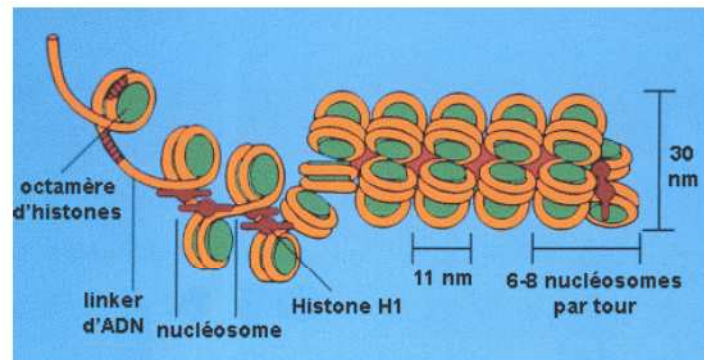


Figure 10 : Compaction de l'ADN en nucléosomes

La plupart des travaux relatifs au rôle de la chromatine ont porté sur la méthylation de l'ADN et les modifications des extrémités N-terminales des histones, ces événements étant étroitement liés et cruciaux à la régulation de l'expression transcriptionnelle et l'état de compaction de la chromatine (Cheung et al., 2000).

b) Méthylation de l'ADN

La méthylation des cytosines, modification chimique spécifique de l'ADN, apparaît de plus en plus comme un niveau de contrôle transcriptionnel important et représente un mécanisme de verrouillage de l'expression des gènes crucial au cours du développement. L'ADN est méthylé par des ADN méthyltransférases (DNMT1, DNMT3A, DNMT3B), dans des régions génomiques spécifiques au sein de dinucléotides CpG. Le patron de méthylation est établi au cours du développement et est normalement maintenu tout au long de la vie d'un individu. Cependant il arrive que ce patron soit modifié et l'altération de la méthylation peut alors conduire à l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs et à un processus de tumorigenèse.

L'hyperméthylation de nombreux promoteurs et l'hypométhylation globale du reste du génome ont été observées dans de nombreux cancers, responsables à la fois de l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs et de l'instabilité génomique, fournissant un avantage sélectif aux cellules néoplasiques, tout comme les mutations génétiques (Hoffmann and Schulz, 2005). Ainsi il a été démontré que l'expression d'un des récepteurs à l'acide rétinoïque, RAR β 2, considéré comme un suppresseur de tumeur potentiel, pouvait être éteinte suite à une hyperméthylation de son promoteur, et que cette modification pouvait être un marqueur précoce de tumorigenèse, notamment dans le cas de cancers du sein (Sirchia et al., 2000). Un autre exemple est le gène *BRCA1*, connu pour son importance dans le cancer du sein d'origine familiale (via une mutation sur ce gène dans la lignée germinale), qui peut également être réprimé suite à une hyperméthylation dans les formes sporadiques de cancer du sein (Esteller et al., 2000; Hedenfalk et al., 2001). L'inhibiteur du cycle cellulaire *p16INK4A* est lui aussi fréquemment hyperméthylé dans les tumeurs, permettant aux cellules d'échapper à la sénescence et donc de proliférer sans contrôle (Merlo et al., 1995). Lorsque l'ADN est méthylé, il est spécifiquement reconnu par des protéines MBPs (methyl-binding proteins) qui peuvent interagir fonctionnellement avec des complexes possédant une activité HDAC (histone déacétylase), ce qui a pour effet de maintenir la chromatine dans un état condensé et ainsi de réprimer la transcription (Jones et al., 1998; Nan et al., 1998).

c) Modifications des histones

Les histones sont la cible de modifications covalentes variées : acétylation, méthylation, phosphorylation, ubiquitinylation, sumoylation, ADP-ribosylation, biotinylation et carbonylation (figure 11). Elles peuvent également subir des modifications non-covalentes telles que l'isomérisation des prolines (Nelson et al., 2006), la dé-imination des arginines (Cuthbert et al., 2004). Le type de modification, la nature du résidu affecté ainsi que sa position, jouent un rôle fondamental dans l'état de compaction de la chromatine. Jusqu'à présent seules les variations des méthylations, acétylations et phosphorylations des histones ont été rapportées comme pouvant être liées à la formation d'une tumeur (Esteller, 2006).

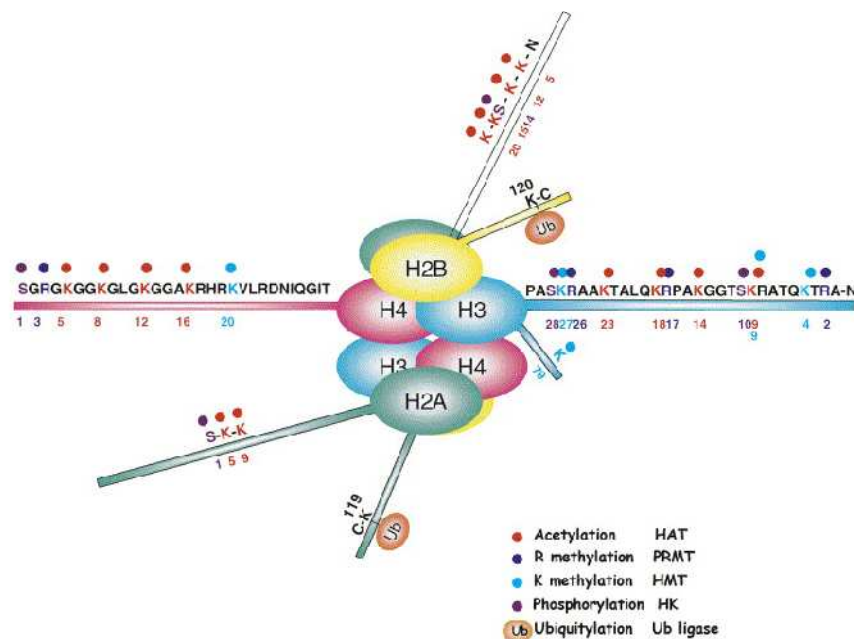


Figure 11 : Illustration des modifications post-traductionnelles connues sur les queues des histones. (Adapté de Altucci *et al.*, 2005)

Ces modifications étant réversibles et catalysées par différentes enzymes, celles-ci peuvent constituer de potentielles cibles thérapeutiques, d'où l'intérêt d'en analyser et comprendre les dérégulations au cours du processus de tumorigenèse. Toutefois, il est désormais établi que ces modifications peuvent « s'associer » pour former des combinaisons d'altérations, apportant un degré supplémentaire de complexité au système.

(1) Méthylation des histones

La méthylation des histones est effectuée par différentes familles de méthyltransférases d'histones (HMTs) sur les résidus arginine et lysine. Les arginines peuvent être mono- et di-méthylées par des PRMT (proteine arginine méthyltransferase) alors que les lysines peuvent être mono-, di- ou tri-méthylées par des protéines contenant un domaine SET ou par des protéines de la famille DOT1/DOT1L (Lacoste *et al.*, 2002; Zhang and Reinberg, 2001). La méthylation des lysines des histones peut conduire à l'activation ou la répression de l'expression de gènes cibles, suivant le résidu méthylé. Il semble que seules les lysines des

histones H3 et de H4 soient méthylées dans leur domaine N terminal. Ce phénomène était considéré comme relativement statique jusqu'à la découverte en 2004 d'une déméthylase spécifique des lysines K4 et K9 de l'histone H3 (LSD-1, lysine-specific demethylase-1) (Shi et al., 2004). Une autre classe de déméthylases, contenant un domaine Jumonji C (JmjC) et catalysant la déméthylation des histones par une réaction oxydative a été identifiée cette année (Klose et al., 2006). Quoiqu'il en soit, il est maintenant clair que la méthylation des histones peut être régulée de façon dynamique, comme l'acétylation ou la phosphorylation.

(2) Acétylation des histones

Les histones peuvent être acétylées par des acétyltransférases d'histones (HATs) et déacétylées par des déacétylases d'histones (HDACs). Les HATs peuvent être divisées en trois familles MYST, GNAT et p300/CBP, selon la présence de motifs structuraux conservés. Les HDACs peuvent être réparties en quatre classes ; la classe I (HDAC 1-3 et 8), la classe II (HDAC 4-7 et 9), la classe III (protéines dont l'activité dépend de NAD⁺) et la classe IV (HDAC 11). Contrairement à la méthylation, l'acétylation des histones H3 et H4 provoque l'ouverture de la chromatine, et donc l'activation transcriptionnelle de gènes cibles. De façon similaire à la méthylation de l'ADN, le patron d'acétylation des lysines des histones est lui aussi perturbé dans les cellules cancéreuses.

(3) Modifications des histones et cancer

Même si à ce jour il n'a pas été défini que les modifications épigénétiques peuvent être à la base du développement tumoral, il a tout de même été démontré que certaines modifications des extrémités N-terminales des histones peuvent avoir un lien avec l'apparition d'un cancer.

Ainsi, en plus du recrutement aberrant de HDACs à certains loci, caractéristique dans les leucémies telles que la leucémie promyélocytaire aiguë, l'altération de l'expression/activité des HATs/HDACs a également été rapportée dans certaines tumeurs solides. Par exemple, la mutation fonctionnelle de CBP ayant une activité HAT est associée au syndrome de Rubinstein-Taybi, maladie qui prédispose au développement de cancer. La

perte d'hétérozygotie au niveau du locus de p300, possédant lui aussi une activité HAT est, elle, associée au développement de cancers colorectaux ou du sein (Bolden et al., 2006; Johnstone, 2002; Minucci and Pelicci, 2006). Les translocations chromosomiques impliquant CBP et p300 provoquant l'altération de leur activité HAT se produisent fréquemment dans les leucémies (Goodman and Smolik, 2000; Johnstone, 2002; Liang et al., 1998). En revanche les inactivations ou mutations n'ont, à ce jour, pas été observées sur les HDACs, ceux-ci étant plutôt surexprimés dans les cellules cancéreuses (Iyer et al., 2004). Ceci pourrait indiquer que les HDACs participent au verrouillage de nombreux gènes dans la cellule cancéreuse mais qu'ils ne sont pas à l'origine de la tumorigénèse.

Les HATs/HDACs peuvent aussi réguler de manière post-traductionnelle des protéines non-histones. Par exemple, l'acétylation de p53 régule sa stabilité, son interaction avec l'ADN et son activité transcriptionnelle (Bode and Dong, 2004; Minucci and Pelicci, 2006). HSP90, quant à elle, est déstabilisée lorsqu'elle est acétylée ce qui a pour conséquence l'augmentation de la dégradation par le protéasome de protéines-cibles incluant Raf, ERBB1 et ERBB2 (Yu et al., 2002).

Récemment l'équipe de M. Esteller, en comparant des cellules normales et cancéreuses et en utilisant un modèle murin de carcinogenèse de la peau, a trouvé que les cellules cancéreuses présentent une perte des formes monoacétylées et triméthylées de l'histone H4 au niveau des résidus Lys 16 et 20 respectivement. Ces changements apparaissent tôt, s'accumulent pendant le processus de tumorigénèse et sont associés avec l'hypométhylation globale de l'ADN, caractéristique classique des cellules cancéreuses (Fraga et al., 2005).

Une meilleure compréhension des modifications évoquées ainsi que la potentielle implication des autres modifications des histones dans les cancers est maintenant nécessaire pour le développement de nouveaux inhibiteurs sélectifs des enzymes impliquées dans ces modifications (acétyltransférases, méthyltransférases, déméthylases...).

Les nombreuses années de recherche sur les cancers permettent de dire, de façon très synthétique, que les cancers peuvent être vus comme des maladies complexes, caractérisées par l'accumulation de défauts au niveau de mécanismes régulant la croissance cellulaire, la prolifération et la différenciation. Ainsi la compréhension des facteurs et des voies de signalisation importantes pour l'acquisition d'un phénotype malin reste délicate, malgré le

développement de nombreux modèles murins. En effet, ceux-ci ne reflètent pas toujours les phénomènes se produisant chez l'homme. Une approche alternative, réductionniste, *via* la modélisation *in vitro* du processus de cancérogenèse *in vitro*, quoiqu'en partie artificielle, permet d'aborder l'analyse des événements conduisant à la transformation cellulaire.

C. Etude du processus de tumorigenèse *in vitro*

Quelles que soient les anomalies moléculaires génétiques ou épigénétiques à l'origine d'un cancer, les cellules transformées acquièrent toutes des capacités communes. Hanahan et Weinberg ont répertorié six caractéristiques nécessaires à une cellule pour qu'elle soit considérée comme maligne : indépendance vis-à-vis des facteurs de croissance, insensibilité aux signaux anti-prolifératifs, résistance à l'apoptose, acquisition de l'immortalité grâce à un potentiel répliatif illimité, angiogénèse maintenue et capacité d'envahir le tissu environnant et de métastaser (Hanahan and Weinberg, 2000). L'ordre chronologique et la manière d'acquérir ces caractéristiques peuvent varier d'une tumeur à l'autre et l'altération d'un seul gène peut participer à la régulation de plusieurs de ces capacités.

De nombreux efforts ont été portés sur la compréhension du mécanisme de transformation cellulaire, en essayant de reproduire ce phénomène en utilisant des cellules primaires maintenues en culture. Les premiers travaux ont pour la plupart été réalisés dans des cellules de rongeur, qui ne semblent requérir que l'activation de deux oncogènes en coopération tels que c-Myc et Ras activé (Hahn and Weinberg, 2002; Land et al., 1986; Ruley, 1983).

Les mêmes essais ont ensuite été réalisés avec des cellules primaires humaines. Nombre de ces essais furent infructueux, souvent lié à une des différences fondamentales qui existent entre cellules humaines et murines, à savoir la biologie des télomères.

1. Modèles de transformation multi-étapes (W.C. Hahn et R.A. Weinberg)

La première démonstration découle du travail des Drs. Hahn et Weinberg qui ont pu induire la transformation de cellules humaines, des fibroblastes de peau normaux et des cellules embryonnaires de rein, en combinant plusieurs transgènes humains et viraux antérieurement identifiés en les exprimant de manière ectopique par des infections rétrovirales successives (Hahn et al., 1999a). Les transgènes choisis miment les perturbations caractéristiques des cancers, telles que l'acquisition du potentiel répliatif illimité (immortalité), l'indépendance vis-à-vis des facteurs de croissance, la résistance à l'apoptose, l'insensibilité aux signaux d'arrêt de croissance et l'évasion face au système immunitaire. Plus spécifiquement, les transgènes utilisés étaient les suivants : les antigènes T (LT, large T) et t (st, small t) de la région précoce du virus simien 40 (SV40 ER), la sous-unité catalytique de la télomérase humaine (hTERT) et l'oncogène H-Ras (H-Ras^{G12V}).

Dans ce modèle, la réactivation de la **télomérase** immortalise les cellules en leur conférant un potentiel de réplication illimité, **LT** permet l'abrogation des fonctions des protéines suppresseurs de tumeur p53 et pRb, **st** inhibe PP2A et empêche également la phosphorylation de Myc sur le résidu T58 qui est normalement le signal pour la dégradation par le protéasome, ce qui a pour conséquence la stabilisation de Myc, et enfin **H-Ras^{G12V}** permet la prolifération aberrante des cellules en activant de façon constitutive les voies de signalisation mitogènes.

L'équipe de Weinberg puis d'autres équipes ont pu transformer d'autres types cellulaires humains, telles que des cellules épithéliales mammaires, des myoblastes, des cellules gliales, des cellules épithéliales de prostate et des cellules épithéliales des bronches, prouvant ainsi que le processus initialement observé n'était pas limité à un type cellulaire spécifique (Elenbaas et al., 2001; Linardic et al., 2005; Lundberg et al., 2002; MacKenzie et al., 2002; Rich et al., 2001).

D'autres combinaisons de transgènes ont également été testées. Par exemple, la co-expression de LT, hTERT, c-Myc et d'un allèle activé de la PI3K permet la transformation de cellules épithéliales mammaires, de fibroblastes et de cellules épithéliales de prostate, indiquant que ces molécules induisent des effets similaires à ceux provoqués par l'introduction de H-Ras et st (Berger et al., 2004; Zhao et al., 2003).

Contrairement aux modèles de carcinogenèse induite chimiquement ou par irradiation, dans un tel modèle le nombre, la nature des altérations génétiques et les voies de signalisation perturbées sont connus (Kang et al., 1998; McCormick et al., 1990). Ceci facilite donc l'étude de molécules spécifiques dans des contextes génétiques définis comme par exemple la comparaison des effets d'une molécule potentiellement utilisable en thérapie sur des cellules à différents stades de transformation. De plus, ce modèle est homogène, car toutes les cellules expriment les transgènes introduits, à la différence des modèles de carcinogenèse chimique dans lesquels toutes les cellules ne sont pas touchées de la même manière par l'agent mutagène. Enfin, même si ce modèle ne permet pas de mimer tous les types de cancers, les oncogènes utilisés tels que *ras* ou *myc*, sont souvent associés au développement tumoral.

2. Voies de signalisation critiques dans l'établissement du modèle de tumorigenèse : immortalisation, crise et transformation

a) Sénescence répllicative et crise

(1) Définition

La sénescence a été définie initialement par Hayflick comme l'ensemble des processus qui accompagnent la fin de la capacité répllicative de fibroblastes humains en culture (Hayflick, 1965). Bien que ces cellules gardent une activité métabolique, elles n'expriment pas les gènes requis pour la prolifération, même dans un contexte mitogène. Elles se distinguent en cela des cellules quiescentes qui, elles, sont capables de répondre à un environnement mitogène. (Dimri et al., 1995).

La capacité proliférative limitée est due à l'absence d'une enzyme, la télomérase, dans les cellules somatiques adultes (Harley, 1997; Harley et al., 1990). Cette perte entraîne un raccourcissement des télomères au fur et à mesure des divisions cellulaires. Lorsque les télomères atteignent une taille critique, les cellules sont alors bloquées en phase G0 du cycle cellulaire : c'est la sénescence répllicative ou M1, qui dépend de l'activation de p53 (Hayflick and Moorhead, 1961). L'introduction de certaines oncoprotéines virales (SV40LT par exemple) ou l'ablation de gènes suppresseurs de tumeur tel que p53 et pRb permettent aux

cellules humaines d'échapper à la sénescence, mais ces cellules post-sénescences accumulent des réarrangements chromosomiques résultant de l'apparition de télomères instables (Chin et al., 2004). Cette instabilité finit par atteindre un seuil critique et les cellules rencontrent alors une seconde barrière de prolifération, appelée crise ou M2, caractérisée par l'apoptose massive de ces cellules (figure 12) (Stewart and Weinberg, 2006; Wright and Shay, 1992).

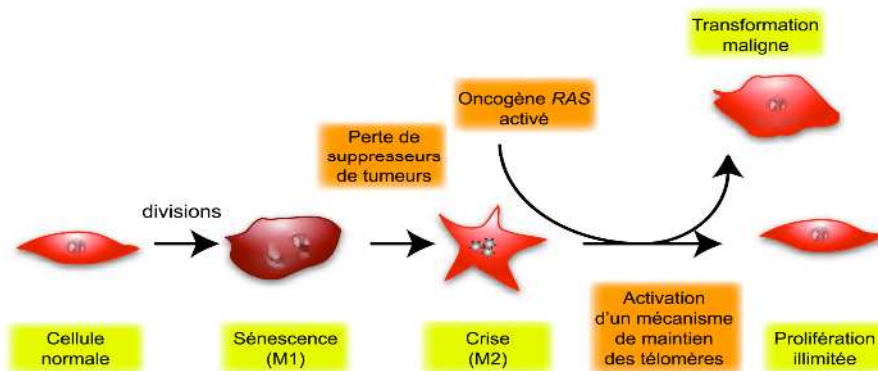


Figure 12 : Sénescence et immortalisation. Les cellules somatiques normales sortent du cycle cellulaire (c'est-à-dire deviennent sénescences) après un nombre limité de divisions cellulaires. Les cellules peuvent toutefois échapper temporairement à la barrière que représente la sénescence si elles perdent la fonction de gènes suppresseurs de tumeur capitaux, tels que *TP53* et/ou *pRB*. Elles peuvent néanmoins entrer en « crise » et mourir, à moins d'être immortalisées. Dans ce dernier cas, les cellules immortalisées peuvent éventuellement acquérir un phénotype malin suite à la transformation par un oncogène tel que *ras*. (Inspiré de Neumann *et al.*, Nature Reviews Cancer, 2002)

La sénescence répliquative constitue une barrière importante contre la transformation maligne puisqu'elle permet de limiter la prolifération cellulaire anormale. Les cellules cancéreuses doivent donc dépasser cet obstacle et atteindre l'immortalité avant de pouvoir former des tumeurs (Sager, 1991). Dans les cellules immortalisées ou cancéreuses, la longueur des télomères est stable, indiquant que l'immortalité répliquative est atteinte grâce à la stabilisation de la longueur des télomères (Hahn, 2005). Dans la plupart des tumeurs, cette stabilisation semble être effectuée via l'expression de la télomérase, qui maintient et allonge les télomères par synthèse d'ADN télomérique *de novo*. Dans certains types de tumeurs, un mécanisme alternatif d'élongation de l'ADN télomérique, appelé ALT (alternative

lengthening of telomeres), fondé sur des échanges non réciproques entre chromosomes est mis en place (Bryan et al., 1997).

(2) Télomères et Télomérase

Chez les mammifères, les télomères sont constitués de milliers de répétitions en tandem d'une séquence hexanucléotidique TTAGGG. Les télomères sont situés aux extrémités des chromosomes et essentielles à leur structure et fonction correctes (figure 13) (Harley et al., 1990).

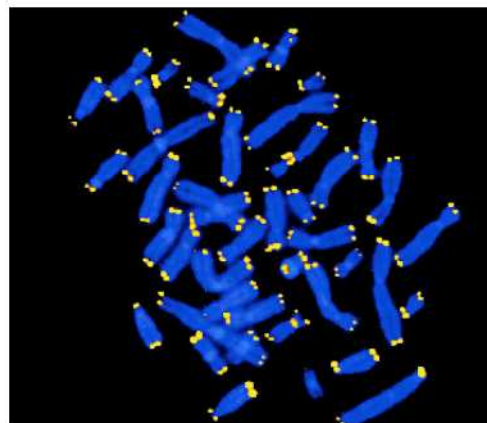


Figure 13 : Localisation des télomères de chromosomes en métaphase dans des cellules HeLa. Le marquage spécifique des télomères avec une sonde fluorescente (en jaune) est détecté par la technique de FISH (fluorescence in situ hybridisation).

L'holoenzyme télomérase est un complexe protéique, composé d'une sous-unité ARN, hTERC, et d'une sous-unité catalytique, hTERT, qui possède une activité de transcriptase inverse (Nakamura and Cech, 1998). Le niveau d'expression de hTERT est l'élément limitant de ce complexe. En effet, la plupart des cellules somatiques normales humaines ne possèdent pas d'activité télomérase détectable et n'expriment pas hTERT, contrairement à la majorité des cellules germinales et des cellules immortalisées (Masutomi et al., 2003).

L'expression ectopique de hTERT dans des cellules pré-sénescences ou en pré-crise ne possédant pas la télomérase leur permet d'échapper à la sénescence (Bodnar et al., 1998; Yang et al., 1999) ou à la crise (Counter et al., 1998; Halvorsen et al., 1999).

L'équipe de Weinberg a pu montrer, en exprimant un dominant négatif de hTERT (DN-hTERT) dans plusieurs lignées cellulaires cancéreuses humaines, que la longueur des télomères diminuait dans ces cellules et que leur prolifération était alors limitée. Ces cellules arrêtaient de se diviser puis entraient en apoptose. Ils ont également montré qu'une de ces lignées cellulaires exprimant DN-hTERT n'était plus capable de former des tumeurs dans des souris immunodéficientes indiquant que le maintien de l'expression de hTERT dans les cellules cancéreuses est nécessaire au maintien du phénotype malin (Hahn et al., 1999b). L'expression de la télomérase, trouvée dans 80-90% des cancers humains est donc essentielle pour la croissance illimitée des cellules malignes et n'est pas un marqueur secondaire de la transformation (Boehm and Hahn, 2005; Hahn et al., 1999a).

L'activité télomérase *per se* n'induit pas la transformation (Morales et al., 1999), et bien que la télomérase soit nécessaire pour l'immortalisation, hTERT n'est pas considérée comme un oncogène (Hahn, 2002; Hahn et al., 1999b). Toutefois, l'activation de la télomérase peut fournir un avantage de croissance aux cellules épithéliales transfectées avec hTERT dans le but de maintenir des altérations épigénétiques ou génétiques et de devenir ainsi immortelles (Farwell et al., 2000).

Il a également été démontré que l'expression seule de hTERT n'était pas suffisante pour immortaliser certains types de cellules humaines, telles que les myoblastes, les cellules épithéliales mammaires et les kératinocytes. Ces cellules nécessitent également l'altération génétique d'autres voies de signalisation (Kiyono et al., 1998; Seigneurin-Venin et al., 2000).

Le maintien de la stabilité génétique suite à l'activation de la télomérase pourrait être un important moyen de défense contre le cancer et certaines maladies dégénératives. En effet, des patients portant des mutations altérant les gènes intervenant dans les fonctions télomériques ont une susceptibilité accrue à la formation de tumeurs (Brunori and Gilson, 2005; Brunori et al., 2005). D'autre part, il semble qu'une certaine activité télomérase soit requise pour maintenir les divisions cellulaires et l'homéostasie des cellules souches humaines et des cellules progénitrices d'un grand nombre de tissus humains (Forsyth et al.,

2002; Masutomi et al., 2003). Ceci fait des cellules souches des cibles de choix pour l'initiation de cancers.

L'activation de la télomérase a donc au moins deux conséquences distinctes : le fait de permettre la réplication illimitée des cellules favorise la transformation mais la présence de la télomérase permet également le maintien de la stabilité génétique. De plus, d'autres rôles potentiels ont été rapportés pour la télomérase, tel que le maintien de la structure des chromosomes dans d'autres domaines que les télomères et dans la réparation de l'ADN, ajoutant un niveau de complexité supplémentaire à la compréhension de ce complexe protéique (Stewart and Weinberg, 2006).

(3) Voies de signalisation de pRb et p53

Les deux premiers gènes suppresseurs de tumeur historiquement identifiés, *RB* et *TP53*, se sont avérés coder pour des protéines cruciales pour la physiologie d'une cellule normale. Situées à l'intersection de voies de signalisation régulant à la fois la prolifération et la mort des cellules, p53 et pRb sont inactivées dans la majorité des cellules cancéreuses humaines afin de permettre aux cellules d'outrepasser la sénescence induite par les signaux mitogènes suite à la surexpression d'oncogènes tels que Ras.

La protéine du rétinoblastome, pRb joue un rôle pivot dans le contrôle du cycle cellulaire en régulant le passage des cellules en phase G1. Cette capacité est liée à son état de phosphorylation : pRb est hyperphosphorylée au début de la phase S et hypophosphorylée après la mitose et à l'entrée de la phase G1 (figure 14). La stimulation de cellules quiescentes induit la phosphorylation de pRb, tandis que la différenciation induit l'hypophosphorylation de pRb. pRb se lie à la famille de facteurs de transcription E2F, permettant la transcription de leurs gènes-cibles.

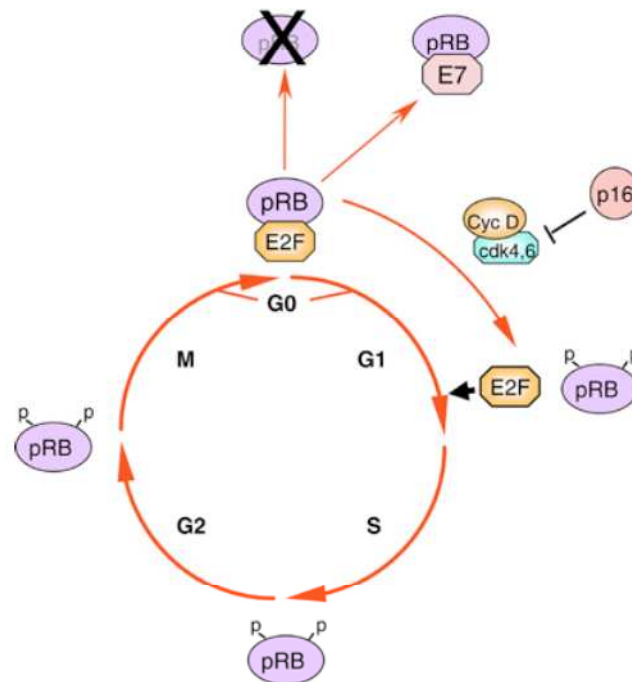


Figure 14 : pRb et contrôle du cycle cellulaire. pRb se lie et inhibe E2F en phase G0 et début de phase G1. Dans les cellules en prolifération, la phosphorylation de pRb par cycline D-Cdk4,6 permet le relargage de E2F, qui induit alors l'expression des gènes responsables de l'entrée en phase S. Dans les cellules tumorales, l'interaction entre pRb et E2F peut être empêchée par une mutation dans le gène *RB* (X), par la liaison de pRb à des oncoprotéines virales (telle que E7 du papillomavirus) ou encore par la phosphorylation inappropriée due à la surexpression des cyclines D, la perte de p16INK4A, inhibiteur de CDK4,6. (Adapté de Cobrinik D., *Oncogene*, 2005).

Des données génétiques et biochimiques ont placé pRb dans une voie de signalisation dérégulée dans la plupart des cancers humains (Lipinski and Jacks, 1999; Weinberg, 1995). Cette voie de signalisation comprend des inhibiteurs de kinases dépendantes des cyclines (CDK) de la famille de protéines INK4, qui sont des régulateurs négatifs de la prolifération cellulaire, et des cyclines de type D qui s'associent avec CDK4 ou CDK6 pour former des complexes kinases actifs. Les CDKs phosphorylent pRb, ce qui abolit son activité (figure 15).

De nombreux mécanismes génétiques/épigénétiques tels que des mutations, méthylations *de novo* et délétions ciblent le locus *INK4a p16/CDKN2A* afin de l'inactiver (Sarkar et al., 2000). L'activité des CDKs et donc de pRb est régulée par des facteurs (anti-) mitogènes externes. Il est maintenant accepté que l'inactivation de la voie de signalisation de

pRb est une étape obligatoire dans le processus de cancérogenèse, permettant aux cellules d'être insensibles aux signaux anti-mitogènes.

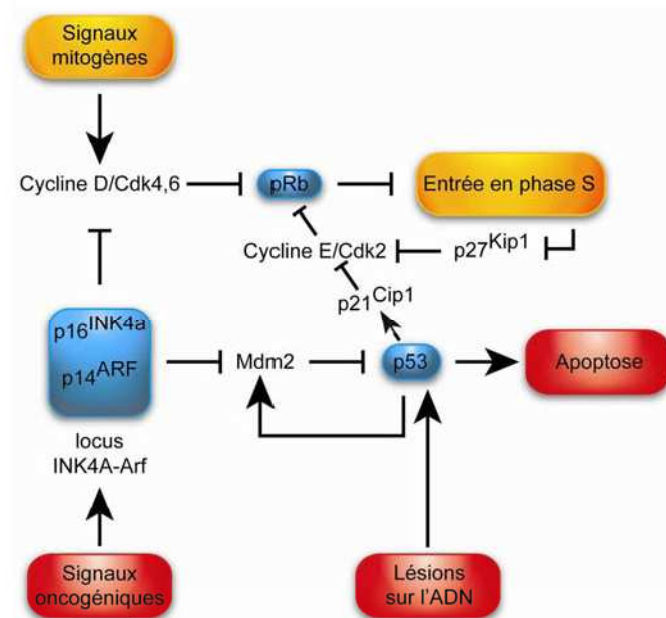


Figure 15 : Régulation des points de contrôle du cycle cellulaire par pRb et p53. Les signaux mitogènes activent les cyclines D dépendantes des kinases (Cdk4, 6), qui phosphorylent pRb afin de faciliter l'entrée en phase S. L'inhibiteur de Cdk2, p27^{Kip1}, fortement exprimé dans les cellules quiescentes, est dégradé au moment où les cellules entrent en phase S. Des signaux oncogéniques constitutifs peuvent activer le locus *INK4a/ARF*. La protéine p14^{ARF} inhibe alors Mdm2 afin d'induire p53, conduisant à l'apoptose des cellules ou à l'induction de p21^{Cip1} et à l'arrêt du cycle cellulaire dépendant de pRb. (Adapté de Sherr C.J., Cell, 2004)

L'altération des fonctions de **p53** dans différents cancers a mis en évidence l'importance de cette protéine dans le contrôle de la croissance cellulaire, la protection de la cellule contre les réarrangements chromosomiques ou l'accumulation de mutations et dans l'inhibition de la transformation cellulaire causée par l'activation d'un oncogène ou la perte d'un suppresseur de tumeur (pour revue, voir (Levine, 1997)). La présence de signaux de stress, tels que les irradiations γ , les UV ou les drogues chimiothérapeutiques peuvent induire la stabilisation et l'activation de p53 (Giaccia and Kastan, 1998). Une fois activée, p53 peut

induire un arrêt du cycle cellulaire ou l'apoptose de la cellule, selon le type cellulaire, la nature et la force du stimulus (figure 15).

p53 régule également l'expression de nombreux facteurs dont plusieurs médiateurs pro-apoptotiques incluant les membres de la famille Bcl-2 et ceux de la famille de TNF (Hickman et al., 2002; Miyashita et al., 1994).

Dans de nombreuses tumeurs humaines, le gène *TP53* ou les facteurs intervenant dans sa stabilisation ou son activité, sont mutés ou délétés. Par exemple, l'oncogène *hdm2* (homologue humain du gène *mdm2* murin) qui cible p53 pour sa dégradation peut être surexprimé, ou l'expression de *p14^{ARF}*, codant pour un antagoniste de HDM2 peut être supprimée (par délétion du gène ou par méthylation de son promoteur).

b) Transformation : stimulation mitogène

Contrairement aux cellules normales dont la prolifération dépend de la présence de facteurs de croissance dans leur environnement, les cellules cancéreuses peuvent proliférer même en absence de stimulation extérieure (McCormick, 1999). Cette indépendance est acquise suite à l'activation d'oncogènes tels que *ras*, capables de générer constitutivement des signaux mitogènes (voir paragraphe « *ras* », page 12) (Ellis and Clark, 2000; Hunter, 1991) ou suite à l'altération ou la surexpression de récepteurs de facteurs de croissance à la surface de la cellule tels que EGFR (Press et al., 1990; Ross and Fletcher, 1999). D'autre part, le niveau d'expression de Ras est associé à la taille de la tumeur lorsque des cellules transformées par Ras sont greffées sur des souris immunodéprimées, illustrant la nécessité de ce fort signal mitogène.

3. Limites du modèle et création de nouveaux modèles

Malgré l'intérêt évident du modèle de tumorigenèse multi-étapes de Hahn et Weinberg, un des problèmes est l'utilisation de gènes viraux pour la transformation. En effet, même si les antigènes LT et st ont été très étudiés, tous leurs effets ne sont pas encore déterminés. De plus, très peu de tumeurs humaines sont formées suite à l'introduction d'un gène viral (Gandhi and Khanna, 2005; Gandhi et al., 2004).

Les essais de transformation de cellules primaires humaines ultérieurs ont donc été réalisés en utilisant uniquement des gènes humains ou leurs orthologues mammifères afin de tenter de mimer de manière plus fidèle la formation réelle d'une tumeur humaine.

Ainsi, une pléthore de publications ont rapporté la transformation de cellules variées, par exemple en remplaçant LT par des dominants négatifs ou des shARN de pRb et p53 (Hahn et al., 2002; Voorhoeve and Agami, 2003) ; en mimant l'effet inhibiteur de st sur PP2A via l'utilisation de shARN ou des mutants de la région de PP2A impliquée dans l'interaction avec st (Moreno et al., 2004; Ruediger et al., 2001) et pour revue, voir (Boehm and Hahn, 2005).

Boehm *et al.* ont ainsi montré que l'introduction d'une protéine inhibant la voie de signalisation de p53, à savoir un dominant négatif, combinée à l'expression de la cycline D1 et d'un mutant de CDK4 favorisant l'hyperphosphorylation de pRb et donc l'inhibition de sa fonction de contrôle du cycle cellulaire, permettaient de remplacer LT dans le processus de transformation (Boehm et al., 2005).

D'autre part, l'utilisation de c-Myc muté au niveau du résidu T58 permet de remplacer st, et sa combinaison avec hTERT, LT et H-RasG12V permet de transformer des cellules humaines embryonnaires de rein (Yeh et al., 2004).

Cinq autres publications ont aussi décrit la transformation de cellules humaines primaires en utilisant uniquement des éléments génétiques non viraux (Chudnovsky et al., 2005; Drayton et al., 2003; Goessel et al., 2005; Kendall et al., 2005; Lazarov et al., 2002). Bien que les gènes introduits diffèrent légèrement d'un travail à l'autre selon le type cellulaire étudié, globalement les voies de signalisation affectées sont les mêmes :

- le maintien des télomères est essentiel pour la transformation, même si la façon d'assurer ce maintien peut varier. De plus, même pour les modèles dans lesquels le maintien des télomères n'était pas activé de manière intentionnelle (Chudnovsky et

al., 2005; Lazarov et al., 2002), l'analyse des cellules tumorales a révélé que la télomérase était tout de même activée via une modification génétique ou épigénétique suggérant un rôle plus complexe de la télomérase dans la tumorigenèse ;

- la voie de signalisation de Ras est toujours activée ;
- l'abrogation de la fonction de p53 est, elle aussi, cruciale pour le développement d'un cancer, excepté dans le cas de cellules humaines dérivées de peau qui peuvent être transformées en gardant la voie de signalisation de p53 intacte (Drayton et al., 2003; Lazarov et al., 2002)
- le contrôle du cycle cellulaire est altéré en inactivant de manière indirecte pRb ;
- dans trois des travaux, la surexpression de c-Myc est nécessaire pour la tumorigenèse, soulignant l'importance de la coopération Ras-Myc (Drayton et al., 2003; Goessel et al., 2005; Kendall et al., 2005). Toutefois, dans les autres publications, l'expression de c-Myc n'a pas été évaluée.

Il faut souligner plus particulièrement le travail de Chudnovsky *et al.* qui ont pu créer dans un modèle murin un environnement proche de celui trouvé dans les tumeurs humaines, permettant alors d'étudier les interactions entre les cellules tumorales et les cellules stromales lors de la transformation (Chudnovsky et al., 2005).

L'élaboration d'un tel modèle orthotopique permet d'envisager la possibilité à terme de modéliser la formation de tumeurs *in vivo* de façon encore plus proche de la réalité, où les cellules cancéreuses échappent au système immunitaire, attirent les vaisseaux sanguins assurant leur survie et diffusent dans tout l'organisme. En effet, jusqu'à présent les combinaisons de transgènes utilisées permettent la formation de tumeurs chez la souris mais n'induisent pas de comportement métastatique (Boehm and Hahn, 2005).

Rappelons que le but de ces modélisations de cancers, que ce soit *in vitro* ou *in vivo*, est de (i) comprendre les mécanismes moléculaires qui sous-tendent la transformation maligne, et (ii) de pouvoir, à partir de ces connaissances améliorer les traitements anti-cancéreux actuels ou en développer de nouveaux.

II. Thérapies anti-cancéreuses

L'organisme a développé au moins deux systèmes de défense contre les agressions extérieures et les cellules ayant subi des dérèglements trop importants. Il s'agit de la voie de signalisation de p53 (Vousden and Lu, 2002), détaillée précédemment, et du système immunitaire inné. Malgré cela, le développement de thérapies est nécessaire lorsque ces systèmes sont déficients ou inactivés lors de la formation d'un cancer.

Idéalement, les thérapies anti-cancéreuses ont pour but de prévenir la croissance tumorale, ou de pouvoir éliminer le plus sélectivement possible les cellules malignes. Cependant, en réalité, la plupart des thérapies actuelles agissent à un stade de développement de la maladie trop avancé et/ou manquent de sélectivité et/ou ne sont pas assez efficaces. C'est pourquoi un « nouveau » style de thérapie est actuellement en plein essor ; les thérapies ciblées.

A. Thérapies conventionnelles

Classiquement, les cancers sont traités grâce à la chirurgie, la chimiothérapie ou la radiothérapie, ce type de thérapies représentant 80 % des cas traités. Cependant, en plus de l'avantage de prolifération, les mutations à l'origine de la cancérogenèse peuvent augmenter la résistance des cellules tumorales à ces différents traitements, assurant ainsi la survie des cellules cancéreuses et la poursuite de la croissance tumorale (Fojo and Bates, 2003; Orlowski and Baldwin, 2002).

L'inconvénient majeur de ces traitements est leur manque de sélectivité pour les cellules malignes. Les effets secondaires, observés sur les tissus sains actifs, sont dus à l'absorption des drogues par les cellules qui se multiplient rapidement, notamment les cellules sanguines, les cellules de la moelle osseuse, des cheveux, de la peau, des muqueuses et de la bouche, empêchant l'utilisation de posologies suffisamment élevées pour éliminer toutes les cellules tumorales de l'organisme. Par ailleurs, les phénomènes de résistances, spontanée ou acquise, de certaines tumeurs aux agents chimiothérapeutiques limitent leur efficacité. Enfin, les

traitements tels que la chimiothérapie peuvent provoquer l'apparition de cancers secondaires, provoqués par les effets génotoxiques (effet mutagène) de ce type de thérapie.

Il est donc souhaitable de mettre au point des agents anti-cancéreux ciblés, adaptés au phénotype tumoral, de façon à réduire les effets pernicioeux des chimiothérapies sur les organes sains, tout en les concentrant sur les cellules à détruire. De plus, l'agressivité des cancers provenant essentiellement de leur potentiel à métastaser, la conception de drogues toxiques ciblées, capables de s'opposer à la formation de métastases est une piste qu'il est important d'explorer.

B. Thérapies ciblées

Le terme thérapie ciblée désigne des thérapeutiques dirigées contre des cibles moléculaires supposées jouer un rôle dans la transformation néoplasique de la cellule. Il ne s'agit pas d'un concept nouveau en oncologie : les traitements hormonaux des cancers du sein et de la prostate font partie des thérapies ciblées, et sont étudiés de longue date. Les thérapies ciblées peuvent être classées en trois catégories : (i) celles qui ciblent les anomalies moléculaires causales, directement responsables de la transformation néoplasique, (ii) celles qui ciblent les anomalies moléculaires plus tardives, qui contribuent à la progression tumorale mais qui ne constituent pas l'étape initiale de la transformation et (iii) celles qui visent des cibles moléculaires impliquées de façon indirecte dans la transformation.

1. Thérapies ciblant une signature caractéristique des cellules tumorales

La meilleure compréhension des bases moléculaires de la formation tumorale a permis la conception de nombreux agents actuellement en développement clinique. Une classification de ces agents peut être faite en fonction des caractéristiques des cellules cancéreuses ciblées :

- **Inhibiteurs de récepteurs tyrosine kinase** et de leurs **voies de signalisation intracellulaires** : ciblent les voies de signalisation mitogènes constitutivement

activées dans les cellules cancéreuses, telles que les récepteurs de la famille HER (Her2/Neu par exemple), dans le cas des cancers du sein (Ross et al., 2003).

- **Inhibiteurs du cycle cellulaire** : ciblent les protéines qui contrôlent l'entrée dans les différentes phases du cycle cellulaire étant donné que celles-ci sont fréquemment touchées lors de la tumorigenèse (Senderowicz, 2003).
- **Modulateurs de l'apoptose** : ciblent des molécules anti-apoptotiques surexprimées ou mutées dans les cancers, telles que Bcl-2, ou restaurent la fonctionnalité des voies apoptotiques en réactivant une voie de signalisation inhibée, telle que la voie de p53 (Andersen et al., 2005).
- **Agents anti-angiogéniques** : ciblent les protéines telles que VEGF (vascular endothelial growth factor) ou FGF (fibroblast growth factor) impliquées dans la modulation des capacités de prolifération et/ou de migration des cellules endothéliales ainsi que la formation de nouvelles vascularisations (Thiery-Vuillemin et al., 2005).
- **Agents anti-invasifs** : ciblent les protéines impliquées dans le développement de métastases, telles que les MMPs (matrix metalloproteinases), une famille d'enzymes dégradant la matrice extracellulaire, étape nécessaire dans le processus de métastase (Mehlen and Puisieux, 2006).

Pour chaque type de molécule ciblée, différentes approches peuvent être envisagées, basées sur les connaissances de leur fonctionnement, de leur structure, de leurs interactions avec d'autres facteurs...

On peut citer :

- la **thérapie génique somatique**, qui consiste à introduire dans les cellules cancéreuses un gène « médicament » dont le produit doit arrêter ou ralentir la progression de la maladie. Différents types de gènes médicaments peuvent être introduits dans les cellules cibles, notamment des gènes immunothérapeutiques codant pour des protéines qui vont stimuler le système immunitaire, des gènes codant pour des protéines anti-

angiogéniques, des gènes chimio-protectifs introduits dans les cellules souches hématopoïétiques afin d'augmenter leur résistance à la chimiothérapie, ou des gènes-suicide codant pour des enzymes qui convertissent une pro-drogue inoffensive, administrée séparément, en une molécule cytotoxique (Verma and Weitzman, 2005). Cette technique encore très risquée, permet néanmoins un ciblage très spécifique.

- L'utilisation d'**anticorps monoclonaux antagonistes**, comme par exemple le bevacizumab, qui neutralise VEGF, ou le trastuzumab (Herceptine[®]), un anticorps humanisé qui se lie sélectivement et avec une grande affinité au domaine extracellulaire de HER2. L'Herceptine est utilisée pour le traitement de patients ayant un cancer du sein métastatique dont les cellules surexpriment HER2, et permet d'améliorer la réponse à la chimiothérapie (Slamon et al., 2001). Depuis 2000, l'Herceptine est utilisée en combinaison avec le paclitaxel pour le traitement de patients n'ayant jamais eu recours à la chimiothérapie.
- L'utilisation d'**inhibiteurs** tels que le tipifarnib, un inhibiteur de farnésyltransférase, l'enzyme responsable d'une modification post-traductionnelle de Ras (Herrera and Sebolt-Leopold, 2002). Cette modification permet la localisation de la protéine à la membrane cytoplasmique, nécessaire pour que la protéine Ras soit active. On peut également citer le gefitinib (Iressa[®]), molécule inhibant l'activité tyrosine kinase de HER1. Une autre molécule inhibitrice de tyrosine kinase est l'imatinib mésylate (Glivec[®]) connue pour son action sélective d'induction d'apoptose dans les cellules exprimant la protéine de fusion BCR-ABL et dans les blastes de patients atteints de leucémie myéloïde chronique (CML) (Capdeville et al., 2002).
- L'utilisation d'**oligonucléotides antisens** ou technique d'**ARN interférence** afin d'inhiber une protéine surexprimée dans les cancers, par exemple l'Oblimersen dirigé contre Bcl-2, une protéine anti-apoptotique dont l'expression est altérée dans de nombreux néoplasmes (Thiery-Vuillemin et al., 2005)

Toutefois, certaines des drogues touchent des enzymes ou des facteurs également impliqués dans la régulation des cellules normales, limitant le caractère ciblé d'un tel type de thérapie. Un autre désavantage est la relative efficacité de ces traitements, qui doivent souvent

être utilisés en combinaison avec d'autres agents thérapeutiques, tels que la chimiothérapie (Thiery-Vuillemin et al., 2005).

2. Thérapies ciblant l'anomalie moléculaire à la base d'un cancer

a) Définition

Conceptuellement, ce type de thérapie est très prometteur puisqu'il permet en théorie d'éliminer l'élément causal d'un type de cancer. Toutefois, cette stratégie nécessite de pouvoir identifier l'anomalie moléculaire responsable de la formation d'une tumeur et de pouvoir cibler cette anomalie. Ce ciblage est actuellement plus adapté aux leucémies, pour lesquelles l'anomalie étiologique est « unique », souvent une translocation chromosomique, contrairement aux tumeurs solides qui, elles, sont formées suite à plusieurs mutations ou altérations génétiques et épigénétiques.

Un exemple d'une telle stratégie est représenté par l'histoire du développement du Glivec (voir paragraphe précédent). Le développement de cette molécule, depuis l'identification de l'anomalie causale et la compréhension du mécanisme, a duré environ vingt ans. Ceci soulignant la difficulté de réalisation d'un tel type de thérapie.

b) Exemple de l'APL : prototype de l'activité thérapeutique de l'acide rétinoïque

L'APL est caractérisée par une accumulation dans la moelle osseuse et dans le sang de précurseurs myéloïdes immatures bloqués au stade promyélocytaire.

L'origine de l'APL est une translocation chromosomique réciproque impliquant dans 95% des cas le gène codant pour RAR α (retinoic acid receptor) situé sur le chromosome 17 et le gène codant pour PML (promyelocytic leukemia) situé sur le chromosome 15, générant ainsi deux protéines de fusion PML-RAR α et RAR α -PML (de The et al., 1991). De façon très sporadique, d'autres gènes partenaires peuvent conduire à une protéine de fusion avec

RAR α : PLZF (promyelocytic leukemia zinc finger), nucleophosmin, Numa (nuclear mitotic apparatus) ou Stat 5. Ces variants d'APL sont résistants à l'acide rétinoïque (AR).

L'oncoprotéine PML-RAR α , par sa capacité d'oligomérisation accrue, forme des complexes stables avec des complexes de co-répresseurs NCoR et SMRT, qui recrutent à leur tour des complexes contenant des activités histone déacétylase (HDAC) qui ne peuvent être dissociés à des concentrations physiologiques en ATRA (Grignani et al., 1998; Lin and Evans, 2000; Minucci et al., 2000). De plus, ces complexes co-répresseurs recrutent également des enzymes de méthylation de l'ADN (DNMT1, DNMT3a et DNMT3b), ce qui a pour effet de maintenir la chromatine dans un état répressif pour la transcription et donc d'inhiber l'expression des gènes cibles de RAR α tels que RAR β 2 (Di Croce et al., 2002; Fazi et al., 2005). Seule l'addition d'une concentration élevée en AR permet la dissociation des complexes co-répresseurs puis le recrutement de complexes co-activateurs permettant ainsi l'activation de la transcription des gènes cibles de l'AR, la différenciation des cellules myéloïdes et la rémission clinique (figure 16).

Outre le fait qu'il permette la dissociation des complexes co-répresseurs, le traitement à l'AR induit également (i) une diminution d'expression des différentes DNMTs et de leur recrutement au niveau des promoteurs de gènes cibles (Fazi et al., 2005), (ii) une dégradation de PML-RAR α par l'action des caspases (Nervi et al., 1998) et l'activation de la voie ubiquitine/protéasome (Kopf et al., 2000).

Dans le cas particulier de PLZF-RAR α , les complexes de co-répresseurs se lient aux deux entités apo-RAR α et PLZF et l'exposition à l'AR ne permet pas la dissociation des complexes HDACs (Grignani et al., 1998; He et al., 1998). Des doses pharmacologiques d'inhibiteurs sélectifs de HDACs (HDACis) permettent de restaurer une réponse à l'AR et d'induire une différenciation des cellules myéloïdes (figure 16) (Ferrara et al., 2001).

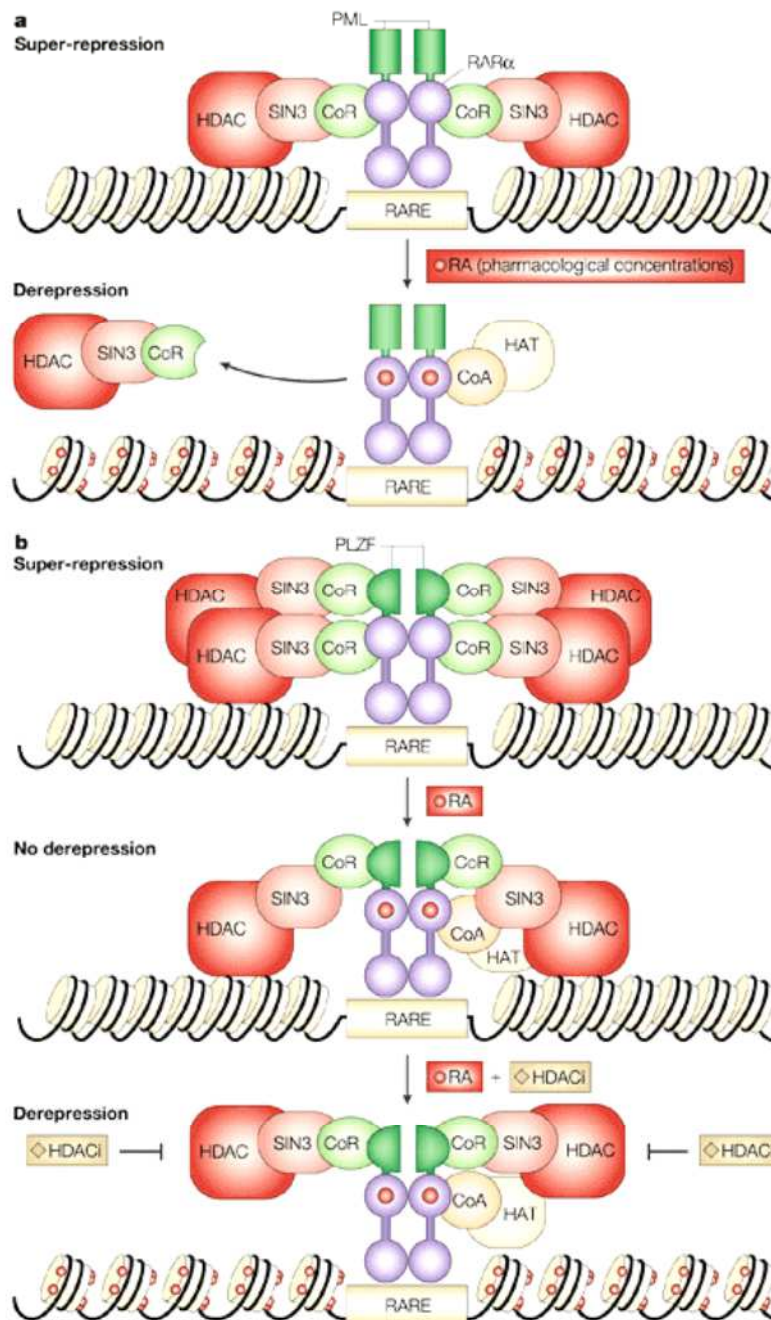


Figure 16 : Bases de la réponse à l'AR dans les cellules APL.

- a.** la protéine PML-RAR α , contrairement à RAR α , dimérise ou oligomérisse et recrute plusieurs complexes HDACs induisant un état réprimé de la chromatine. Des concentrations pharmacologiques d'AR sont nécessaires pour induire la dissociation des complexes co-répresseurs, le recrutement de complexes co-activateurs et l'activation de la transcription des gènes cibles de RAR α .
- b.** La protéine de fusion PLZF-RAR α contient 2 domaines d'interaction avec les co-répresseurs. L'addition d'AR ne parvient à dissocier que les complexes liés à la partie RAR α . Cependant, la combinaison avec un inhibiteur de HDAC (HDACi) bloque l'activité de l'enzyme et reverse l'état de répression de la chromatine, permettant la transcription des gènes cibles. (Adapté de Altucci et al., Nature Reviews Cancer, 2001)

Toutefois, même si cette thérapie ciblée a prouvé son efficacité, elle ne permet pourtant qu'une rémission de courte durée (environ 6 mois) et dans de nombreux cas une résistance à l'AR est développée. De plus, les doses d'AR utilisées induisent des effets secondaires nombreux et sévères (Altucci and Gronemeyer, 2001).

La combinaison de l'AR avec la chimiothérapie augmente la durée de rémission mais dans 30% des cas le phénomène de résistance est également observé. Cette résistance est expliquée par une augmentation du catabolisme de l'AR via le système P450 ou la séquestration de l'AR par les protéines cytoplasmiques CRABP1 (Freemantle et al., 2003), ce qui provoque une diminution de la disponibilité de l'AR dans les cellules APL. De plus, les doses d'agents chimiothérapeutiques nécessaires étant élevées, des effets secondaires sont également observés.

Parallèlement à la découverte de l'effet de l'AR, le trioxyde d'arsenic a été approuvé pour le traitement des cas d'APL résistants à l'AR (Zhu et al., 2002), étant donné son efficacité de dégradation de la protéine de fusion PML-RAR α en ciblant la partie PML et l'effet synergique observé en co-traitement avec l'AR (Lallemand-Breitenbach et al., 1999).

Toutefois, une possibilité très prometteuse vient du co-traitement des HDACis, tel que le SAHA, avec des DNMTis comme le 5-aza-2-deoxycytidine et qui permet une réactivation plus efficace des gènes suppresseurs de tumeur (Cameron et al., 1999; Esteller, 2003; Jones and Baylin, 2002)

3. Thérapie ciblant un évènement indirect dans l'apparition d'une tumeur : exemple de la thérapie épigénétique

Le caractère réversible des modifications épigénétiques fait de celles-ci des cibles thérapeutiques majeures. Seuls deux types de drogues épigénétiques, qui ont déjà fait leurs preuves au cours d'essais pré-cliniques, sont actuellement impliqués dans de nombreux essais cliniques : les inhibiteurs de DNMTs tel que le 5-aza-2'-deoxycytidine et les inhibiteurs de HDACs tels que le MS275, le SAHA ou encore l'acide valproïque (Marks et al., 2001) (Minucci and Pelicci, 2006).

a) Agents déméthylants

Le traitement de cellules cancéreuses avec des agents déméthylants conduit à la réactivation de gènes cruciaux pour le contrôle de la prolifération, de la différenciation et de l'apoptose, tels que p16 ou pRb (Yoo and Jones, 2006). Il a également été prouvé que l'administration de 5-aza-2'-déoxycytidine permet la réduction du nombre d'adénomes dans un modèle murin de néoplasie intestinale (Laird et al., 1995). Des dérivés du 5-aza-2'-déoxycytidine tels que la Décitabine ou la Zébularine capables de former des complexes covalents avec les ADN méthyltransférases, ont eux aussi montré des effets antitumoraux prometteurs dans des modèles de xénogreffes et de lymphomes chez la souris (Esteller, 2006). Toutefois, même si la Zebularine présente quelques avantages majeurs tels que sa stabilité chimique, sa faible toxicité et la possibilité de l'administrer oralement (Yoo et al., 2004), jusqu'à présent, ces agents déméthylants n'ont réellement prouvé leur efficacité que dans le traitement de maladies hématologiques tels que le syndrome myélodysplasique (Esteller, 2005).

b) Inhibiteurs de HDACs (HDACis)

Les HDACis, d'origine naturelle ou synthétique, sont structuralement hétérogènes et peuvent être classés selon leur nature chimique et leur mécanisme d'inhibition (pour revue, voir (Bolden et al., 2006)). In vitro, les HDACis induisent un arrêt de prolifération, la différenciation et l'apoptose de nombreuses cellules cancéreuses (Dokmanovic and Marks, 2005). Dans des études pré-cliniques, différentes classes de HDACis ont montré une activité anti-cancéreuse couplée à une spécificité tumorale prometteuse. D'autres essais cliniques ont également démontré leur potentiel thérapeutique dans le cas de cancers hématologiques tels que le lymphome cutané des cellules T et le lymphome diffus des cellules B (Bolden et al., 2006).

Bien qu'il soit irréfutable que les HDACis peuvent amener à la mort des cellules tumorales, les voies de signalisation engagées pour engendrer cet effet sont encore à élucider. Etant donné que les HDACis ont des effets biologiques pléiotropes, il semble improbable qu'une seule voie de signalisation puisse être identifiée pour tous les HDACis dans tous les types cellulaires. Néanmoins, certaines réponses induites par les HDACis sont connues et peuvent permettre d'expliquer leur activité anti-tumorale, au moins en partie :

- tous les HDACs découverts jusqu'alors (à l'exception d'un seul) peuvent induire un arrêt du cycle cellulaire, celui-ci étant souvent associé à l'induction indépendante de p53 de p21^{WAF1/CIP1}. Toutefois, les HDACs peuvent induire ou réprimer d'autres gènes impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire (figure 17) (Johnstone, 2002; Minucci and Pelicci, 2006; Richon et al., 2000).
- De nombreuses protéines non-histones étant régulées par les HATs/HDACs, les HDACs pourraient permettre l'augmentation de l'acétylation de protéines impliquées dans des voies de signalisation critiques pour la cellule, avec pour conséquence la modification du cycle cellulaire, de la différenciation et de l'apoptose (Minucci and Pelicci, 2006). Par exemple, l'induction de l'acétylation de Hsp90, la protéine chaperone d'oncoprotéines telles que AKT et c-RAF a pour conséquence la dégradation de ces protéines de survie (Hellebrekers et al., 2006).
- D'autres données indiquent que les HDACs peuvent induire la répression de facteurs de croissance oncogéniques, comme par exemple les tyrosine-kinases telles que BCR-ABL, via leur ubiquitinylation et l'inhibition de HDAC6 (Bolden et al., 2006).
- Plusieurs études ont démontré que certains récepteurs de la famille de TNF ainsi que leurs ligands peuvent être transcriptionnellement activés suite au traitement par les HDACs et certaines de ces études ont corrélé l'apoptose induite par les HDACs avec l'induction de ces acteurs apoptotiques (figure 17) (Altucci et al., 2005; Insinga et al., 2005; Minucci and Pelicci, 2006; Nebbioso et al., 2005). Toutefois, il n'est pas établi que les récepteurs de mort soient toujours nécessaires à l'induction d'apoptose par les HDACs. On ne sait pas non plus si les HDACs induisent un changement global du pattern d'expression des gènes, altérant alors la balance entre les gènes anti- et pro-apoptotiques ou bien si l'induction d'apoptose par les HDACs est un mécanisme plus spécifique, dû à l'activation d'une protéine ou d'une voie de signalisation particulière (Bolden et al., 2006).
- Les HDACs ont également été montrés comme étant capables d'inhiber l'angiogénèse tumorale, ainsi que l'activité télomérase, nécessaires aux cellules cancéreuses pour pouvoir se répliquer indéfiniment (figure 17) (Drummond et al., 2005).

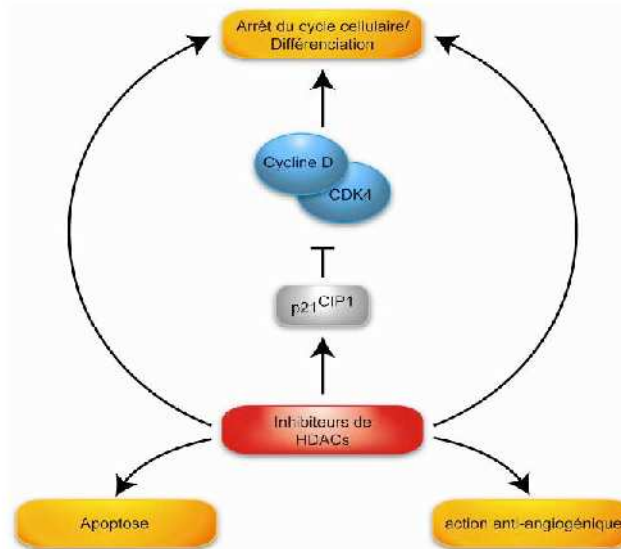


Figure 17 : Effets des inhibiteurs de HDACs (IIDACs) dans les cancers humains. Les HDACs empêchent l'hypométhylation des histones, permettant ainsi le remodelage de la chromatine, l'activité transcriptionnelle et la régression du phénotype malin. Presque tous les HDACs induisent l'expression de p21^{CIP1}, permettant l'inhibition du cycle cellulaire et l'induction de la différenciation. Les HDACs ont également des effets anti-angiogéniques et peuvent induire l'apoptose.

Les premières études sur l'utilisation clinique des HDACs ont été publiées récemment. Ces rapports confirment généralement les résultats obtenus lors d'essais pré-cliniques concernant la faible toxicité des HDACs chez les patients en comparaison avec les autres traitements classiques anti-cancéreux. Les effets toxiques des HDACs sont plus probablement dûs au manque de spécificité de ces molécules plutôt qu'à l'inhibition des HDACs *per se*. Toutefois, l'identification des cibles des HDACs est nécessaire pour optimiser les traitements utilisant ces molécules (Minucci and Pelicci, 2006). De plus, les propriétés pharmacocinétiques des HDACs (métabolisme et élimination rapides) pourraient limiter leur utilisation en clinique. De fait, le potentiel majeur des HDACs réside dans leur capacité à moduler l'activité d'autres agents thérapeutiques.

De nombreuses combinaisons ont donné des résultats encourageants : le co-traitement avec des agents chimiothérapeutiques utilisés communément, les ligands de certains récepteurs nucléaires, des antagonistes de Hsp90, des inhibiteurs du protéasome, et les agents déméthylant l'ADN. De nombreux essais de combinaison d'HDACs et de DNMTs ont été réalisés et ont montré un effet synergique d'inhibition de croissance tumorale et de ré-expression de gènes réprimés (Yoo and Jones, 2006).

III. TRAIL : une cible privilégiée pour le traitement de cancers

Depuis sa découverte et la description initiale de ses propriétés antitumorales, les études menées pour mieux comprendre le mécanisme de TRAIL encouragent encore aujourd'hui la perspective de son utilisation, seul ou combiné à d'autres molécules pour le traitement des cancers.

A. TRAIL et ses récepteurs

1. TRAIL, membre de la famille de TNF

L'identification de Apo2L/TRAIL a été réalisée en 1995 par deux groupes indépendants, par homologie de séquence avec $\text{TNF}\alpha$ et FasL avec qui il partage respectivement 23% et 28% d'identité de séquence (Pitti et al., 1996; Wiley et al., 1995). Tout comme la grande majorité des ligands de la superfamille de TNF, TRAIL est une protéine transmembranaire de type II (partie N-terminale intra-cellulaire et partie C-terminale extra-cellulaire) d'environ 33-35kDa qui peut aussi exister sous forme soluble suite à un clivage protéolytique de sa région extracellulaire par des protéases à cystéine. Des études cristallographiques ont permis de révéler que TRAIL forme un homotrimer stabilisé par un atome de zinc situé à l'interface et coordonné à trois résidus cystéines situés en position 230 de chaque monomère (figure 18) (Hymowitz et al., 2000).

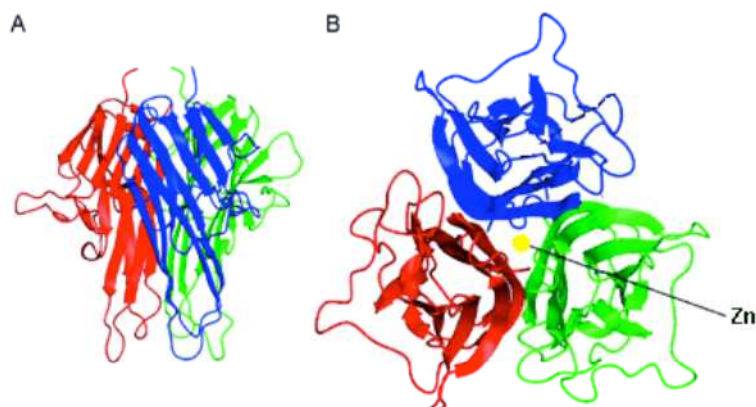


Figure 18 : Structure d'un trimère de TRAIL. (A) Vue latérale montrant les trois monomères en vert, rouge et bleu. **(B)** Autre vue du même complexe. L'atome de Zinc est représenté en jaune (Adapté de Van der Sloot et al., Protein Eng Des Sel., 2004)

2. Récepteurs de TRAIL

L'effet biologique de TRAIL est déclenché par sa fixation et l'activation subséquente de ses récepteurs. Chez l'homme, contrairement aux autres membres de la famille de TNF, le système de récepteurs de TRAIL est complexe et comprend cinq récepteurs pouvant lier le ligand avec des affinités différentes : TRAIL-R1/DR4 (Pan et al., 1997), TRAIL-R2/DR5/TRICK2/Apo2/Killer (Chaudhary et al., 1997; MacFarlane M, 1997; Walczak et al., 1997), TRAIL-R3/DcR1/TRID/LIT (Degli-Esposti et al., 1997b; MacFarlane M, 1997; Pan et al., 1998; Sheridan et al., 1997), TRAIL-R4/DcR2/TRUNDD (Degli-Esposti et al., 1997a; Marsters et al., 1997) et OPG (Emery et al., 1998). TRAIL-R1, TRAIL-R2 et TRAIL-R4 sont des protéines transmembranaires de type I et TRAIL-R3 est une protéine transmembranaire de type III qui ne contient pas de domaine intracellulaire, et enfin, l'OPG est une protéine soluble. (Ashkenazi, 2002) (figure 19).

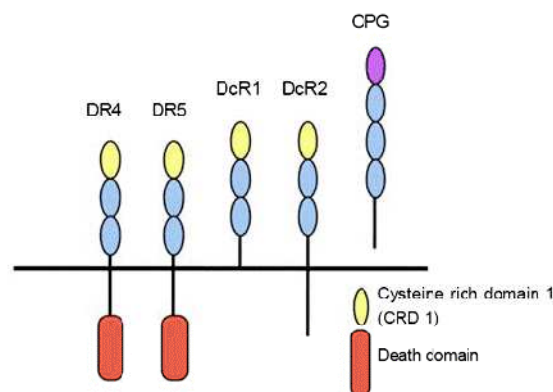


Figure 19 : Vue schématique des 5 récepteurs de TRAIL : DR4/TRAIL-R1, DR5/TRAIL-R2, DcR1/TRAIL-R3, DcR2/TRAIL-R4 et OPG.

a) Récepteurs de mort

TRAIL-R1 et TRAIL-R2 peuvent former des homo- ou des hétérotrimères, bien que la présence d'hétérotrimères soit moins fréquente (Kischkel et al., 2000). Ces récepteurs sont qualifiés de « récepteurs de mort » car ils contiennent tous deux un domaine cytoplasmique appelé domaine de mort (death domain, DD) et sont à l'origine du signal pro-apoptotique de TRAIL (figure 19). Toutefois, plusieurs travaux tendent à prouver que ces deux récepteurs, comme d'autres récepteurs de la famille de TNF, auraient également des fonctions non-

apoptotiques (Park et al., 2005). En effet, la liaison intracytoplasmique des récepteurs DR4 et DR5 à la kinase RIP (receptor interacting protein) au sein du DISC (death inducing complex) active la voie de NF- κ B (Chaudhary et al., 1997), responsable d'un effet prolifératif induit par TRAIL (Ehrhardt et al., 2003), observé dans plusieurs lignées cellulaires tumorales ou saines (Baader et al., 2005). Cette capacité d'induction de signalisation de survie est également observée dans le cas des systèmes Fas/FasL et TNF/TNFR1 (Alderson et al., 1994; Chen and Goeddel, 2002; Hsu et al., 1995; Magnusson and Vaux, 1999).

b) Récepteurs leurres

TRAIL-R3 est ancré à la membrane plasmique par une molécule de glycosyl-phosphatidylinositol et ne possède pas de DD. TRAIL-R4 possède quant à lui un DD tronqué non fonctionnel (figure 19). Ces deux récepteurs ont donc été qualifiés de leurres car ils sont incapables de transmettre le signal induit par TRAIL et régulent donc négativement l'apoptose induite par TRAIL.

L'OPG, seul récepteur soluble (figure 19) qui possède une affinité très faible pour TRAIL pourrait être également qualifié de leurre mais la connexion physiologique entre les deux protéines n'a pas été clairement établie (Truneh et al., 2000).

Chez la souris, un seul récepteur ayant des similarités avec DR4 et DR5 et capable d'initier l'apoptose induite par mTRAIL a été identifié. De plus, deux DcRs dont la séquence est assez éloignée de celle des DcRs humains et un homologue proche de l'OPG ont été récemment découverts (Ashkenazi, 2002; Schneider et al., 2003).

B. Signalisation induite par TRAIL

1. Voie apoptotique extrinsèque

Cette voie est induite au niveau de la membrane cytoplasmique par les récepteurs de mort, DR4 ou DR5, selon un mécanisme commun aux récepteurs de mort de la famille du TNFR tels que TNFR1 ou Fas/Apo1 (Wajant, 2003).

De façon comparable à l'apoptose induite par Fas, la liaison de TRAIL à DR4 ou DR5 induit une trimérisation des récepteurs et un recrutement via leur DD de la protéine adaptatrice FADD (Fas-Associated Death Domain). Cette dernière recrute, par son domaine effecteur de mort (DED : death effector domain), les pro-caspases -8 ou -10, qualifiées de caspases initiatrices, au sein d'un complexe appelé DISC (Death Inducing Signaling Complex) (Bodmer et al., 2000; Kischkel et al., 2000; Sprick et al., 2000). La proximité des molécules de pro-caspases initiatrices à l'intérieur du DISC permet leur activation par auto-clivage ou clivage catalytique mutuel (Muzio et al., 1998). Le clivage de la caspase-8, effectué en deux étapes consécutives, produit les sous-unités actives p10 et p18 (Boatright et al., 2003; Riedl and Shi, 2004). Celles-ci, suite à leur tétramérisation et leur relargage dans le cytosol vont activer les caspases dites effectrices telles que les caspases-3, -6 et -7, activant différents substrats à l'origine des modifications cellulaires caractéristiques de l'apoptose (figure 20). Lorsque cette voie d'activation de l'apoptose des récepteurs de mort, qualifiée d'extrinsèque, est majoritairement utilisée par les cellules, celles-ci sont définies comme étant de type I (Scaffidi et al., 1998).

Des données récentes indiquent que le second clivage de la caspase-8 n'est ni nécessaire ni suffisant pour l'activité catalytique de la caspase et ne sert qu'à stabiliser les dimères de caspases-8 actives au sein du DISC (Boatright et al., 2003). Actuellement on pense donc que la caspase-8, active mais pas complètement clivée, pourrait être retenue au niveau du DISC et que les tétramères de caspase-8 seraient relargués dans le cytosol. De ce fait, les différentes formes actives de la caspase-8 pourraient cliver des substrats différents (Thorburn, 2004).

Contrairement à la caspase-8 dont le rôle dans l'apoptose induite par les récepteurs a été largement documenté, l'implication de la caspase-10 au sein du DISC a longtemps été controversée. Il semblerait que la caspase-10 dont la structure est similaire à celle de la

caspase-8 puisse être recrutée au sein du DISC et transmettre le signal apoptotique dans des cellules dépourvues de caspase-8, bien que l'intensité de ce signal soit plus faible que celui transmis par la caspase-8 (Kischkel et al., 2001; Wang et al., 2001). D'autre part, il est à noter que dans des cellules caspase-8^{-/-}, la caspase-10 ne peut pas compenser totalement cette perte de fonction. Ceci pourrait indiquer que la caspase-10 possède un rôle différent dans la régulation de l'apoptose induite par TRAIL ou FasL (Sprick et al., 2002).

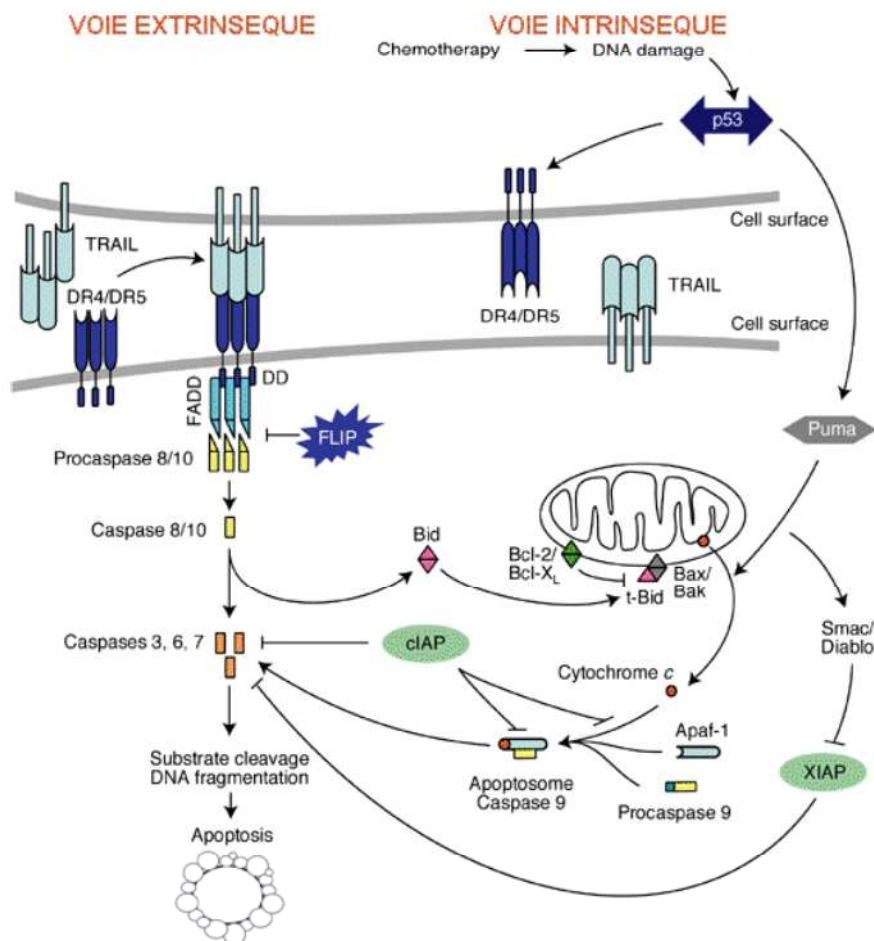


Figure 20 : Induction de l'apoptose par TRAIL. La voie extrinsèque est initiée à la surface cellulaire par des ligands de la famille du TNF α et se propage via l'activation du complexe DISC. La voie intrinsèque est initiée au niveau de la mitochondrie par la perméabilisation de la membrane mitochondriale, le relargage de protéines pro-apoptotiques et l'activation du complexe apoptosome. Dans ces deux complexes, les caspases initiatrices (caspases-8, -9 et -10) sont activées et activent à leur tour les caspases effectrices responsables du clivage des différents substrats cellulaires conduisant à l'apoptose.

2. Voie apoptotique intrinsèque

Cette voie est activée en réponse à des dommages intracellulaires tels que des lésions au niveau de l'ADN, l'activation de voies de stress ou encore l'irradiation par les UV. Tous ces différents stimuli convergent au niveau de la mitochondrie, conduisant à la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe et au relargage dans le cytoplasme de certaines protéines pro-apoptotiques.

De façon similaire à l'apoptose induite par Fas, TRAIL peut activer la voie extrinsèque et/ou intrinsèque selon le type cellulaire (Fulda et al., 2002; Munshi et al., 2001; Ozoren and El-Deiry, 2002; Suliman et al., 2001; Walczak et al., 2000). En effet, dans certains types cellulaires, qualifiés de type II, l'activation de la voie mitochondriale est essentielle pour une apoptose conséquente (Scaffidi et al., 1998). Dans ce cas, la caspase -8 recrute puis clive la protéine Bid (Peter and Krammer, 2003), membre pro-apoptotique de la famille Bcl-2. Une fois activée, tBid (truncated Bid) est transloquée à la membrane mitochondriale et interagit avec deux autres membres pro-apoptotiques de la famille Bcl-2, Bax et Bak. L'activation de Bax et Bak provoque une dissipation du potentiel transmembranaire mitochondrial et le relargage de Smac/DIABLO (second mitochondria-derived activator of caspase/direct IAP-binding protein), du cytochrome c et de la protéase à sérine HtrA2/Omi dans le cytosol (Wang, 2001). Alors que Smac/DIABLO et HtrA2/Omi bloquent l'action des IAPs (inhibitors of apoptosis), des inhibiteurs des caspases, le cytochrome c interagit avec Apaf-1 et avec une autre caspase initiateur, la pro-caspase-9 pour former un complexe appelé apoptosome (Li et al., 1998). Celui-ci permet l'activation de la caspase-9 puis le clivage des caspases effectrices conduisant ainsi au clivage protéolytique d'un grand nombre de substrats, à l'origine des modifications cellulaires caractéristiques de l'apoptose telles que la fragmentation de l'ADN ou la dissociation de l'enveloppe nucléaire (figure 20) (Green and Evan, 2002).

Dans le cas de Fas, il a été suggéré que l'activation de la voie intrinsèque pouvait être déterminée par l'efficacité d'activation de la caspase-8 au sein du DISC (Scaffidi et al., 1998). Ainsi, dans les cellules de type I, la formation du DISC et l'activation de la caspase-8 sont efficaces et la caspase-8 peut directement activer la caspase-3 et induire l'apoptose. En revanche, dans les cellules de type II, il y a une faible formation du DISC et seule une petite quantité de caspase-8 active est produite, insuffisante pour induire le clivage des caspases

effectrices et l'apoptose de la cellule. Des études réalisées en 2004 sur l'apoptose induite par Fas dans des lignées cellulaires de gliomes supportent ce modèle d'activation différentielle de la caspase-8 dans les cellules de type I ou II (Knight et al., 2004). Toutefois, certaines études ont proposé une explication différente selon laquelle le niveau de XIAP pourrait déterminer si une cellule nécessite ou non le recrutement de la voie mitochondriale (Bratton et al., 2002). Dans ces travaux, les cellules de type II expriment fortement XIAP et nécessitent donc le relargage de Smac/DIABLO dans le cytosol pour induire l'apoptose. Les cellules de type I quant à elles expriment très peu XIAP et la voie extrinsèque suffit pour induire l'apoptose.

Concernant TRAIL, il semblerait plutôt que la deuxième hypothèse convienne pour déterminer l'importance de la mitochondrie dans le processus apoptotique. Plusieurs travaux ont montré les rôles critiques de Bax et du relargage de Smac/DIABLO dans l'apoptose induite par TRAIL (Deng et al., 2002; Kandasamy et al., 2003; LeBlanc et al., 2002; Zhang et al., 2001).

3. Complexes secondaires

Contrairement aux événements initiateurs de l'apoptose induite par la liaison de FasL et TRAIL sur leurs récepteurs de mort respectifs, la liaison de TNF sur TNFR1 induit l'activation des voies de signalisation de NF- κ B, JNK et de la p38 MAPK. Après liaison de TNF, TNFR1 se lie à la protéine adaptatrice TRADD (TNFR-associated death domain), qui à son tour recrute deux autres protéines adaptatrices : RIP1, qui permet l'activation des voies de NF- κ B et de p38 ; et TRAF2, qui supporte également l'activation de NF- κ B mais aussi de JNK (figure 21). Dans la plupart des contextes cellulaires, TNF permet l'assemblage d'un complexe primaire, responsable de l'activation des voies de signalisation des kinases, et d'un complexe intracellulaire secondaire, composé de TRADD, RIP1, TRAF2, FADD et la caspase-8, qui peut dans des conditions très particulières telles que l'inhibition de NF- κ B, induire l'apoptose cellulaire (Micheau and Tschopp, 2003; Muddidi et al., 2004).

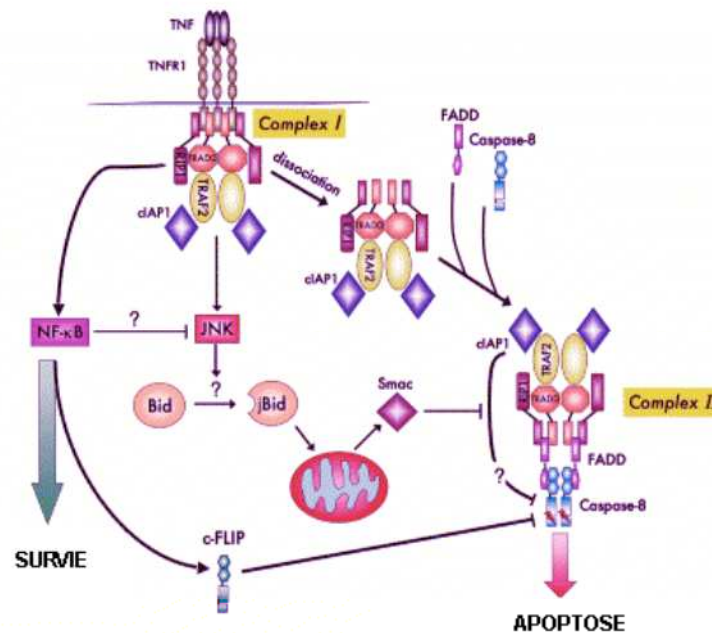


Figure 21 : Signalisation induite par TNF. La liaison de TNF sur TNFR1 provoque la formation du complexe I induisant l'activation de NF-κB. De façon plus tardive, le complexe II peut se former et initier la cascade de caspases et la mort cellulaire. NF-κB inhibe l'apoptose en induisant l'expression de protéines anti-apoptotiques telles que c-FLIP qui peut inhiber l'activation des caspases initiatrices au sein du complexe II. (Adapté de Muppidi J.R. *et al*, Immunity, 2004)

Bien que la signalisation majoritaire de FasL et de TRAIL soit l'induction d'apoptose dans les cellules sensibles (Almasan and Ashkenazi, 2003; Diehl et al., 2004; Kelley and Ashkenazi, 2004; Kimberley and Screaton, 2004; Krammer, 2000), de plus en plus de preuves sont en faveur d'une capacité de ces ligands à activer les voies de signalisation de NF-κB, JNK et p38, même si la majorité de ces études ont été réalisées dans des conditions non physiologiques (surexpression de récepteurs) (Sheridan et al., 1997; Wajant, 2004).

Dernièrement l'équipe de A. Ashkenazi a pu montrer que, dans des conditions physiologiques, TRAIL pouvait effectivement activer les voies de signalisation des kinases, via la formation d'un complexe secondaire intracellulaire (Varfolomeev et al., 2005). La liaison de TRAIL à DR5 induirait tout d'abord la formation du DISC et pourrait également former un second complexe constitué de FADD, de la caspase-8, de RIP1, de TRAF2 et de NEMO si le complexe primaire est enlevé. En opposition à TNF, TRAIL assemblerait donc

un complexe primaire activateur de l'apoptose, et un complexe secondaire responsable de l'activation des voies des kinases. Dans le cas de TNF et de TRAIL, l'association du complexe secondaire dépendrait de la formation du complexe primaire et nécessiterait probablement la dissociation préalable du complexe primaire du récepteur. A présent, il reste à déterminer le rôle biologique et la spécificité de tels complexes. D'autre part, les conditions dans lesquelles ces complexes secondaires peuvent se former et comment ceux-ci sont régulés sont également des points à élucider.

C. Modulateurs de l'apoptose induite par TRAIL

Malgré les multiples études conduites sur TRAIL, les bases de sa sélectivité cellulaire et les mécanismes moléculaires mis en place pour la résistance de certaines cellules tumorales à ses effets ne sont toujours pas compris. Plusieurs mécanismes d'action ont été proposés sans pour autant permettre d'établir de corrélations strictes. Certains modulateurs sont ici présentés. Toutefois, il faut noter que selon les études et donc les types cellulaires et les méthodologies utilisés, l'importance accordée aux différents modulateurs varie. D'autre part, actuellement aucun consensus n'est établi quant à la stoechiométrie et la composition des complexes impliqués dans la régulation de l'apoptose induite par TRAIL.

1. Expression des récepteurs leurres

La plupart des lignées cellulaires tumorales examinées expriment les deux récepteurs DR4 et DR5 et pourtant seulement environ 50% d'entre elles sont sensibles aux effets apoptotiques de TRAIL. Contrairement à ce qui était pensé à l'origine, cette résistance ne peut être uniquement expliquée par l'action anti-apoptotique des récepteurs leurres DcR1 ou DcR2 étant donné leur faible niveau d'expression dans ces mêmes lignées. Même si il a été montré que l'expression des récepteurs de TRAIL peut être réprimée spécifiquement suite à une méthylation aberrante des promoteurs des DcRs ou des DRs, un tel type de régulation n'a été trouvé que dans certains types de cancers (Hopkins-Donaldson et al., 2003; Horak et al.,

2005; van Noesel et al., 2002). De plus, aucune étude comparant les niveaux d'expression des quatre récepteurs de TRAIL dans des lignées normales et cancéreuses n'a pu montrer de corrélation stricte entre les niveaux d'expression relatifs des récepteurs et la résistance à TRAIL (Evdokiou et al., 2002; Petak et al., 2000). Toutefois, il faut souligner que la plupart des analyses reposent sur des profils d'expression des ARNm qui ne tiennent pas compte des régulations post-transcriptionnelles et post-traductionnelles et ne reflètent donc pas forcément l'expression des récepteurs fonctionnels. Cependant même une analyse du niveau d'expression des récepteurs au niveau protéique serait en partie limitée car les DcRs peuvent être séquestrés à l'intérieur de la cellule et non pas exprimés à la surface de la cellule, rendant difficile toute conclusion quant à l'importance de l'expression des DcRs dans la résistance à TRAIL (Zhang et al., 2000).

Si le rôle inhibiteur d'apoptose des Dc-Rs n'est plus à prouver, il n'en reste pas moins que le mécanisme par lequel ils peuvent conférer aux cellules la résistance à TRAIL n'est toujours pas défini. Une étude publiée très récemment et conduite par l'équipe de O. Micheau a permis de clarifier en partie ce phénomène, en montrant que Dc-R1 et Dc-R2 inhibent l'apoptose induite par TRAIL selon deux mécanismes bien distincts (Merino et al., 2006). Il semblerait que Dc-R1, localisé au sein de microdomaines appelés radeaux lipidiques via sa queue glycosyl-phosphatidylinositol inhibe la mort induite par TRAIL par un mécanisme de compétition avec les DRs pour la liaison du ligand (figure 22, A). Ainsi, lorsque TRAIL se lie à Dc-R1, la formation du DISC ne peut avoir lieu et la signalisation apoptotique est donc altérée.

En revanche, Dc-R2 n'empêcherait ni la liaison de TRAIL à DR5 ni la formation du DISC. Pourtant, il ne permettrait pas l'activation des caspases initiatrices au sein du complexe DISC, par un mécanisme encore inconnu. Les résultats de ce travail montrent également une association de DR5 et de Dc-R2 en hétérotrimère suite à la liaison de TRAIL, avec pour conséquence une possible altération de la composition du DISC qui expliquerait l'effet anti-apoptotique de Dc-R2 (figure 22, B). Ceci est en partie contradictoire avec les données obtenues par Clancy *et al.*, qui ont montré que Dc-R2 peut réguler l'apoptose induite par TRAIL en se liant à DR5 même en l'absence de TRAIL (Clancy et al., 2005) (figure 22, D). En effet, cette équipe a montré que l'inhibition de l'apoptose par TRAIL-R4 ne dépend pas de la liaison du ligand au récepteur. Cette inhibition dépendrait en réalité de la formation de complexes indépendants de TRAIL, entre TRAIL-R2 et TRAIL-R4 via des domaines riches

en cystéines situés en N-terminal des deux protéines, initialement identifiés dans le cas de Fas. Ces domaines sont appelés domaines d'assemblage du pré-ligand (PLAD). Ainsi, les PLADs de TRAIL-R4 et TRAIL-R2 permettraient l'oligomérisation des récepteurs de façon indépendante du ligand, régulant alors l'induction d'apoptose (Clancy et al., 2005).

D'autre part, plusieurs équipes ont montré que DcR2 était capable d'activer NF- κ B (Degli-Esposti et al., 1997a; Hu et al., 1999). Cela a conduit à la formulation d'une troisième hypothèse selon laquelle l'activation de molécules anti-apoptotiques par DcR2 pourrait antagoniser l'effet de TRAIL (figure 22, C). Mais cet effet n'est pas retrouvé par toutes les équipes ayant testé cette hypothèse, et de plus, l'induction de la voie de survie ne semble être qu'un événement secondaire dans la signalisation induite par TRAIL (Varfolomeev et al., 2005).

Les mécanismes moléculaires de l'inhibition d'apoptose par Dc-R2 restent donc partiellement à décoder et pourraient éventuellement expliquer la résistance des cellules qui l'expriment, non seulement à TRAIL mais également aux agents chimiothérapeutiques (Liu et al., 2005).

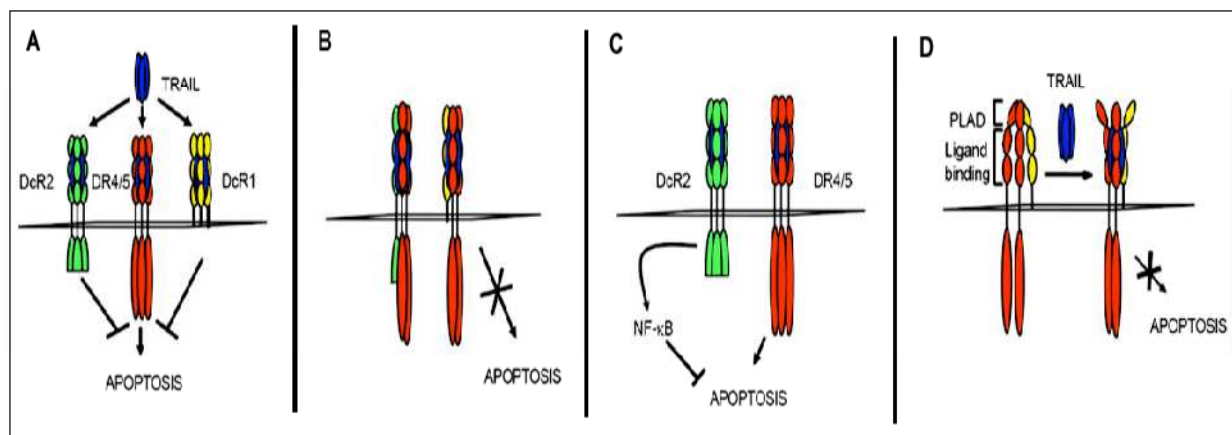


Figure 22 : Modèles d'activité des DcRs. (A) théorie traditionnelle de compétition, selon laquelle les DcRs entrent en compétition avec les DRs pour la liaison à TRAIL. (B) Formation de complexes mixtes entre les DcRs et les DRs ne pouvant ainsi pas induire l'apoptose. (C) L'induction de NF- κ B par DcR2, permet de bloquer l'apoptose induite par la liaison de TRAIL aux DRs, par exemple en induisant l'expression de DcR1. (D) Formation de pré-complexes via les PLADs entre les DcRs et les DRs bloquant l'apoptose.

2. FLIP

Plusieurs régulateurs agissent au niveau de la formation du DISC. Les plus connus sont les FLIP (FADD-like ICE inhibitory proteins/Casper/I-FLICE/FLAME-/CASH/CLARP/MRIT), des isoformes de caspase 8. Bien qu'il existe différents variants transcriptionnels de FLIP, seuls deux sont exprimés au niveau protéique : une forme longue c-FLIP_L et une forme courte c-FLIP_S. c-FLIP_S est uniquement composé de deux DEDs, très similaires aux prodomaines des caspases-8 et -10. En revanche, c-FLIP_L contient en plus des deux DEDs en N-terminal, un domaine « caspase-like » mais celui-ci ne possède pas les résidus clés pour pouvoir former un site protéase actif, rendant c-FLIP_L enzymatiquement inactif (figure 23).

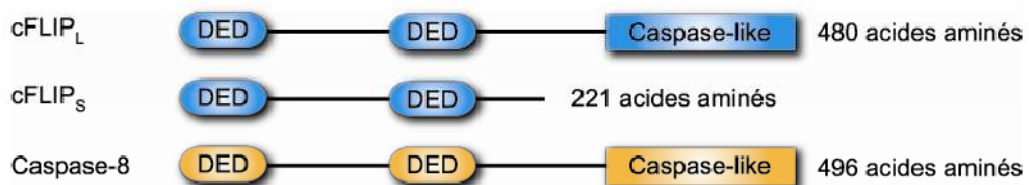


Figure 23 : Représentation des domaines de la caspase-8 et de ses inhibiteurs, c-FLIP_L et c-FLIP_S. La région C-terminale des molécules de FLIP varie en longueur et en séquence. c-FLIP_L possède un domaine « caspase-like » inactif en C-terminal, qui lui confère une homologie de structure avec la caspase-8 et -10. Ce domaine est absent dans la forme courte de c-FLIP.

Bien que toutes deux soient capables de bloquer un signal de mort induit par TRAIL ou Fas, elles sembleraient agir à des niveaux différents du clivage de la pro-caspase 8 (Krueger et al., 2001). Contrairement à c-FLIP_S qui ne possède pas de site de clivage et qui n'est donc pas modifié au sein du DISC, c-FLIP_L est clivé entre sa grande (p20) et sa petite (p12) sous-unité par les caspases apicales. Le second clivage normalement effectué entre la grande sous-unité et les DEDs situés en N-terminal des caspases ne peut en revanche pas avoir lieu sur c-FLIP_L, celui-ci ne possédant pas de site de clivage conservé (Scaffidi et al., 1999).

Contrairement à c-FLIP_S, dont le rôle d'inhibiteur de l'apoptose induite par les récepteurs de mort est établi depuis longtemps, l'implication spécifique de c-FLIP_L dans la modulation du signal transmis par les récepteurs de mort reste controversée.

Initialement identifié comme un compétiteur des caspases-8 ou -10 et donc un inhibiteur de la formation du DISC (Hu et al., 1997; Irmeler et al., 1997; Rasper et al., 1998; Srinivasula et al., 1997), certains résultats indiquaient que FLIP_L pouvait tout aussi bien avoir des effets pro-apoptotiques (Han et al., 1997; Inohara et al., 1997; Shu et al., 1997).

Les données obtenues à partir de MEFs FLIP^{-/-} allaient en faveur d'un rôle anti-apoptotique de FLIP, ceux-ci présentant une sensibilité accrue à l'apoptose induite par les récepteurs de mort (Bin et al., 2002; Yeh et al., 2000). Toutefois, deux études réalisées sur le DISC de Fas ont ensuite démontré que c-FLIP_L était également capable d'activer la pro-caspase-8 ; Chang *et al.* ont établi d'une part que le domaine « caspase-like » de c-FLIP_L pouvait s'hétérodimériser avec la pro-caspase-8 et l'activer, et d'autre part que des faibles niveaux d'expression de c-FLIP_L sensibilisaient les cellules à l'apoptose induite par Fas, alors que des forts niveaux d'expression de c-FLIP_L bloquaient cette apoptose (Chang et al., 2002). Puis, Micheau *et al.* ont montré que c-FLIP_L activait effectivement le premier clivage de la pro-caspase-8 au sein du DISC mais empêchait le second clivage qui permet normalement le relargage de la caspase-8 activée dans le cytosol. Dans ce cas, il semblerait que la caspase-8 ne puisse cliver que des substrats proches du DISC, tels que RIP (receptor-interacting protein) (Micheau et al., 2002).

Quoi qu'il en soit, l'utilisation de siRNAs dirigés contre c-FLIP_S et c-FLIP_L endogènes augmente la sensibilité à l'apoptose induite par TRAIL (Ganten et al., 2004; Sharp et al., 2005; Zhang et al., 2004). Ainsi, malgré la capacité de c-FLIP_L à participer à l'activation de la caspase-8 par hétérodimérisation, le rôle dominant de c-FLIP_L endogène semble être d'inhiber l'apoptose induite par les ligands de mort dont TRAIL.

Si FLIP exerce un contrôle-clé de la sensibilité à TRAIL, comment est-il régulé ?

Il existe au moins trois voies de signalisation qui peuvent influencer l'expression de FLIP et la sensibilité à TRAIL dans les cellules tumorales :

(i) c-Myc est activé dans un grand nombre de tumeurs et il a récemment été montré qu'il pouvait inhiber la transcription de FLIP (et activer l'expression de DR4/DR5),

sensibilisant ainsi les cellules à TRAIL (Ricci et al., 2004; Wang et al., 2004; Wang et al., 2005).

(ii) La voie de signalisation de Ras est elle aussi activée dans une grande variété de tumeurs et il a été montré que l'expression de Ras activé, via la voie de signalisation MEK-ERK, augmente l'activation de caspase-8 au sein du DISC (Nesterov et al., 2004; Wang et al., 2005) Il semblerait que ce phénomène puisse être lié à la capacité de MEK-ERK d'inhiber l'expression de FLIP.

(iii) Une étude avait suggéré que l'expression de FLIP_S pouvait être régulée transcriptionnellement par Akt et ainsi provoquer la résistance de cellules gastriques cancéreuses à TRAIL (Nam et al., 2003). Puis, Panner et al. ayant également identifié FLIP_S comme responsable de la résistance à TRAIL de cellules de glioblastome, ont pu montrer que dans ces cellules, l'activation d'Akt est corrélée avec une forte expression de FLIP_S et que la traduction de celui-ci est positivement régulée par mTOR (mammalian target of rapamycin), une cible directe de Akt (Panner et al., 2005).

3. Autres modulateurs

Un grand nombre de facteurs pouvant potentiellement expliquer la résistance/sensibilité des cellules à TRAIL ont été décrits. Toutefois, pour la majorité d'entre eux, les effets observés sont limités à un type cellulaire particulier ou aucune corrélation stricte n'a pu être établie. Ils ne seront donc pas détaillés par la suite. On peut quand même citer de façon non exhaustive :

- Les **IAPs** et **Smac/DIABLO** : Les protéines de la famille des IAPs, parmi lesquelles cIAP-1, cIAP-2, XIAP ou la survivine représentent la seule famille d'inhibiteurs de caspases endogènes connus chez les mammifères pouvant intervenir au niveau de la voie extrinsèque ou de la voie mitochondriale (Deveraux et al., 1997). Les données obtenues suggèrent que Smac/DIABLO joue un rôle critique dans le blocage des inhibiteurs de caspases lors de l'induction d'apoptose par TRAIL-R1 et TRAIL-R2 dans les cellules de type II (Fulda et al., 2002; Srinivasula et al., 2000).

- **Mutation ou perte de la caspase-8 ou de FADD** : Ces deux facteurs sont nécessaires à la transduction du signal apoptotique (Zhang and Fang, 2005). Le promoteur de la caspase-8 peut être méthylé, causant la répression de l'expression de la caspase initiateur, comme c'est le cas dans certains neuroblastomes, tumeurs du cerveau et rétinoblastomes (Duiker et al., 2006).
- **Protéines de la famille Bcl-2** : Les protéines pro- et anti-apoptotiques de cette famille jouent un rôle important dans la régulation de la voie mitochondriale et ont montré une contribution variable dans l'apoptose induite par TRAIL selon le type cellulaire (LeBlanc and Ashkenazi, 2003; Zhang and Fang, 2005).
- **NF- κ B** : Il active la transcription de nombreux gènes-cibles, parmi lesquels on retrouve des protéines anti-apoptotiques telles que cIAP-1, cIAP-2, TRAF1, TRAF2, Bfl-1, Bcl-XL et FLIP (Chen et al., 2000; Micheau et al., 2001; Stehlik et al., 1998) mais également des protéines pro-apoptotiques parmi lesquelles Fas, FasL, DR4, DR5 ou TRAIL lui-même (Oya et al., 2001; Ravi et al., 2001). Les effets de NF- κ B sur la signalisation de TRAIL sont beaucoup discutés, des publications indiquant un rôle protecteur de NF- κ B contre l'apoptose induite par TRAIL (Franco et al., 2001; Oya et al., 2001) (Jeremias et al., 1998; Mitsiades et al., 2001; Spalding et al., 2002; Trauzold et al., 2001) et d'autres travaux montrant un effet pro-apoptotique de NF- κ B (Shetty et al., 2002). D'autre part, DR4, DR5 et Dc-R2 peuvent activer NF- κ B (Degli-Esposti et al., 1997a). Néanmoins, il semble que TRAIL active NF- κ B uniquement lorsque son activité apoptotique est bloquée, suggérant un rôle différent de NF- κ B selon que l'apoptose est induite par TNF ou par TRAIL (MacFarlane, 2003).

D. TRAIL : une arme naturelle contre le cancer

Contrairement à TNF induisant majoritairement une signalisation anti-apoptotique et participant aux réponses immunes et inflammatoires (Yokota et al., 1988), l'activité biologique majeure de TRAIL semblait tout d'abord être l'induction d'apoptose.

Cependant, le patron d'expression de TRAIL et de ses récepteurs laissait supposer un rôle physiologique bien plus complexe. En effet, par opposition à FasL dont l'expression est restreinte aux cellules B et T activées, aux cellules NK (natural killer) et aux cellules situées dans des sites immuns privilégiés tels que l'œil, l'ARNm de TRAIL est exprimé de façon ubiquitaire.

Parmi les activités physiologiques putatives de TRAIL *in vivo*, sa fonction dans la surveillance tumorale par les cellules NK est la mieux caractérisée, et en particulier dans le cas de maladies hématologiques (Takeda et al., 2005; Takeda et al., 2001; Takeda et al., 2002; Zauli and Secchiero, 2006). La majorité des cellules du système immunitaire (lymphocytes T, lymphocytes B, cellules NK, cellules dendritiques, monocytes, granulocytes) induisent l'expression de TRAIL à leur surface et/ou relarguent TRAIL sous forme soluble suite à des signaux d'activation (pour revue, voir (Smyth et al., 2003)).

Parmi la multitude de cytokines impliquées dans la régulation du système immunitaire, les interférons (IFNs) sont les activateurs les plus puissants de l'expression de TRAIL et de plus en plus de preuves démontrent que TRAIL serait un médiateur important de leurs effets anti-tumoraux et anti-viraux (Sato et al., 2001; Sedger et al., 2002) (pour revue, voir (Almasan and Ashkenazi, 2003)). En effet, les souris dans lesquelles l'expression de TRAIL est abolie par des anticorps neutralisants ainsi que les souris TRAIL^{-/-} sont plus sensibles aux carcinogènes, à la greffe et la croissance de cellules tumorales humaines ou la dissémination de métastases spontanées ou induites (Cretney et al., 2002; Smyth et al., 2001; Takeda et al., 2001; Takeda et al., 2002). D'autre part, l'implication de TRAIL dans l'élimination de cellules infectées a pu être confirmée *in vivo* (Lee et al., 2002). Chez l'homme, TRAIL pourrait agir de manière similaire au cours du développement du cancer mais les preuves sont encore indirectes. Soulignons néanmoins les résultats d'une étude montrant que des cellules NK activées *ex vivo* provenant de patients atteints de leucémie myéloïde aiguë, induisent

l'apoptose des cellules AML via l'induction de TRAIL lorsque celles-ci sont cultivées *ex vivo* mais également *in vivo* dans un modèle murin (Nieda et al., 2001).

Le fait que les souris TRAIL^{-/-} soient viables, fertiles et n'aient pas de problèmes hématologiques suggère que TRAIL n'a pas de fonction essentielle dans le développement. Certains groupes ont rapporté une anomalie au niveau de la sélection négative des thymocytes dans les souris TRAIL^{-/-} indiquant un rôle potentiel de TRAIL dans l'homéostasie du système immunitaire (Lamhamedi-Cherradi et al., 2003), mais ce rôle est encore très controversé. D'autres études indiquent que TRAIL inhiberait l'inflammation auto-immune dans des modèles d'arthrite rhumatoïde, d'encéphalomyélite auto-immune et de certains types de diabète (Zauli and Secchiero, 2006). TRAIL serait aussi impliqué dans la différenciation cellulaire, par exemple en tant que régulateur négatif de l'érythropoïèse (Secchiero et al., 2004) et en tant que promoteur de la différenciation des cellules intestinales (Rimondi et al., 2006).

L'analyse des fonctions physiologiques de TRAIL, même si elles ne sont pas toutes clairement démontrées, souligne une similarité de fonctionnement avec le système Fas/FasL. En effet, ce dernier est très important pour l'homéostasie du système immunitaire, la surveillance immunitaire et l'induction d'apoptose des cellules mutantes ou viralement infectées ainsi que des cellules inflammatoires au niveau des sites immuns privilégiés. Toutefois, de nombreux travaux indiquent que les cellules tumorales pourraient exploiter le système Fas/FasL afin d'échapper au système immunitaire (Hahne et al., 1996), propriété qui n'a pas été démontrée dans le cas de TRAIL.

E. Utilisation de TRAIL en thérapie cancéreuse

1. Monothérapies

L'activation directe de la machinerie apoptotique dans les cellules cancéreuses en utilisant des formes recombinantes solubles des ligands de la famille de TNF a suscité beaucoup d'intérêt, TNF α , FasL et TRAIL possédant tous trois une activité pro-apoptotique dans les tumeurs. Toutefois, la toxicité importante des formes solubles de TNF et de FasL a

considérablement limité leur utilisation thérapeutique (Bremer et al., 2006). En effet, l'induction de la voie de signalisation de Fas s'accompagne d'une hépatotoxicité sévère et les injections de TNF sont à l'origine d'une réponse inflammatoire systémique identique à un choc septique (Ogasawara et al., 1993; Tanaka et al., 1995; Vassalli, 1992).

En revanche, la forme soluble recombinante de TRAIL (rhTRAIL), produite par Genentech Incorporated et Amgen, ne possédant pas de séquence additive autre que TRAIL elle-même, est actuellement en développement (phase I). Elle représente une des molécules « immunitaires » les plus prometteuses pour les patients atteints de cancers, étant donné que lors d'études pré-cliniques, elle a induit la mort de nombreuses lignées cellulaires cancéreuses, y compris celles présentant des mutations dans p53, et cela, sans affecter la majorité des cellules normales (Ashkenazi et al., 1999; LeBlanc and Ashkenazi, 2003; Walczak et al., 1999). *In vivo*, rhTRAIL a démontré une activité anti-tumorale contre des lignées cellulaires établies de cancer de colon (Naka et al., 2002), de gliome (Pollack et al., 2001), du poumon (Jin et al., 2004) et de la prostate (Ray and Almasan, 2003), ainsi que dans le cas de xéno greffes de cellules tumorales humaines isolées de patients et cultivées très brièvement avant transplantation dans les souris (Cretney et al., 2006; Smyth et al., 2003).

Bien que certaines formes de rhTRAIL se soient montrées toxiques pour les hépatocytes (Jo et al., 2000), les cellules épithéliales normales et les kératinocytes (Lawrence et al., 2001; Nitsch et al., 2000), ces effets ont été attribués à la formulation des molécules utilisées (par exemple, l'ajout d'un motif Leucine Zipper) plutôt qu'à TRAIL lui-même (Ashkenazi et al., 1999; LeBlanc and Ashkenazi, 2003). En effet, l'effet toxique observé avec les versions générées portant un motif Leucine Zipper ou un épitope Histidine ou Fc, bien que spécifique de TRAIL puisque neutralisé par des anticorps solubles TRAIL-R2-Fc, s'explique en partie par la puissance d'agrégation de ces versions modifiées de TRAIL. Elles auraient la capacité de s'organiser non seulement en trimères, mais également en multiplexes plus fortement apoptogènes. Ce différentiel apoptogénique est à mettre en relation avec la présence en surface des récepteurs inducteurs de mort, DR4 et DR5 et à la faculté de stimulation des différents complexes : la forme trimère activerait uniquement DR5 alors que les multiplexes formés par les formes substituées de TRAIL stimulerait à la fois DR4 et DR5 potentialisant ainsi la réponse apoptotique (Wajant et al., 2002). L'absence de contrôle strict pour la formation de complexes des formes substituées expliquerait les résultats contradictoires de certaines études (Leverkus et al., 2003; Nesterov et al., 2002). De plus, des évaluations chez

des souris et des primates réalisées avec des formes solubles sans épitope de TRAIL n'ont montré aucune toxicité (Kelley et al., 2001).

De la même façon, plusieurs anticorps agonistes capables d'activer les récepteurs DR4 et DR5 ont été développés et ont montré une capacité à induire uniquement l'apoptose des cellules cancéreuses (Ichikawa et al., 2001) et à ralentir la croissance de tumeurs dans des modèles de xénogreffes sans toxicité systémique (Cretney et al., 2006; Fesik, 2005). L'avantage de ces anticorps est leur spécificité vis-à-vis d'un récepteur et leur demi-vie plus longue que la forme soluble de rhTRAIL. D'ailleurs, certains de ces anticorps monoclonaux, développés par Human Genome Science (HGS) en association avec la société Cambridge Antibody Technologies sont actuellement en cours d'évaluation clinique. L'un est dirigé contre DR4 (HGS-ETR1 en phase 2) et deux sont dirigés contre DR5 (HGS-ETR2 et HGS-TR2J en phase I) (Georgakis et al., 2005; Motoki et al., 2005; Pukac et al., 2005). Même si aucun problème n'a encore été rapporté, la question de la toxicité associée à l'administration de ces anticorps se pose, étant donné que les animaux ont été exposés à des anticorps spécifiques des formes humaines des récepteurs.

Récemment, un anticorps monoclonal agoniste du récepteur DR5 murin a été développé et bien qu'il nécessite un « crosslinking » pour induire l'apoptose de lignées cellulaires cancéreuses, cet anticorps a montré un effet anti-tumoral et anti-métastatique puissant *in vivo*, et a permis le recrutement de cellules du système immunitaire inné telles que les cellules NK, les macrophages et les cellules dendritiques. Aucun signe de toxicité n'a été observé chez les souris, et cet anticorps a induit les cellules T mémoires tumeur-spécifique, permettant ainsi une protection sur le long terme contre le développement d'une nouvelle tumeur (Takeda et al., 2004; Wajant, 2006).

L'utilisation d'anticorps agonistes ciblant DR4 ou DR5 pourrait être plus avantageuse que l'administration de rhTRAIL étant donné que les cellules tumorales sont en partie protégées par l'expression des DcRs. Toutefois, il faut souligner que l'utilité thérapeutique de rhTRAIL et des anticorps agonistes des récepteurs de TRAIL sera limitée aux patients ayant des tumeurs sensibles à l'apoptose induite par TRAIL. Pour les cas où les cellules tumorales sont résistantes, qu'il s'agisse de résistance innée ou acquise au cours du traitement, il convient d'envisager une thérapie combinatoire, reposant sur l'emploi coordonné d'agents

ciblant des voies de signalisation distinctes, dans le but de spécifiquement éliminer les cellules cancéreuses réfractaires aux agents utilisés séparément.

2. Traitements combinés

Malgré le potentiel de TRAIL, certaines tumeurs restent résistantes au traitement. Un grand nombre de publications ont néanmoins rapporté un effet synergique de TRAIL en combinaison avec d'autres drogues cytotoxiques ou des radiations *in vitro* et *in vivo* dans le cas de cancers incluant des gliomes malins, des mélanomes, des leucémies, des carcinomes du sein, du colon ou de la prostate (Debatin and Krammer, 2004).

Ainsi, des co-traitements de TRAIL et d'agents cytotoxiques au mode d'action aussi différent que l'actinomycine D, le 5-fluorouracile (5-FU), la doxorubicine, le cis-platine conduisent à une apoptose synergique (Cuello et al., 2001; Evdokiou et al., 2002; Keane et al., 1999; Lacour et al., 2003; Nimmanapalli et al., 2001). Les mécanismes moléculaires de cette synergie seraient multifactoriels. L'induction de l'expression des récepteurs de mort, qu'il s'agisse d'un phénomène p53-dépendant ou p53-indépendant, et des protéines pro-apoptotiques du DISC telles que la caspase-8 et FADD (Nimmanapalli et al., 2001) serait le mécanisme d'action prépondérant. Par exemple, il a récemment été démontré que l'acide valproïque, un HDACi, induit l'expression de DR5 et de TRAIL dans des cellules leucémiques *in vitro* et *in vivo* et que cette induction est corrélée à l'induction d'apoptose tumeur-spécifique (Insinga et al., 2005). Cependant, des perturbations au niveau des voies apoptotiques mitochondriales (Evdokiou et al., 2002) et/ou des activations de caspases effectrices ont été rapportées (Cuello et al., 2001). De rares données dans des modèles xénogreffés suggèrent que l'effet anti-tumoral ne s'accompagne pas d'une aggravation des effets toxiques. En effet, TRAIL et le 5-FU agissent de façon synergique et permettent la régression et même la rémission de carcinomes humains du colon établis dans des modèles xénogéniques.

D'autres agents biologiques, agissant au niveau de la voie de signalisation de TRAIL permettent également de sensibiliser des cellules initialement résistantes, comme par exemple

l'IFN γ , des inhibiteurs du protéasome, tels que le bortezomib et le MG132, ou des agonistes de Smac (figure 24) (Cretney et al., 2006).

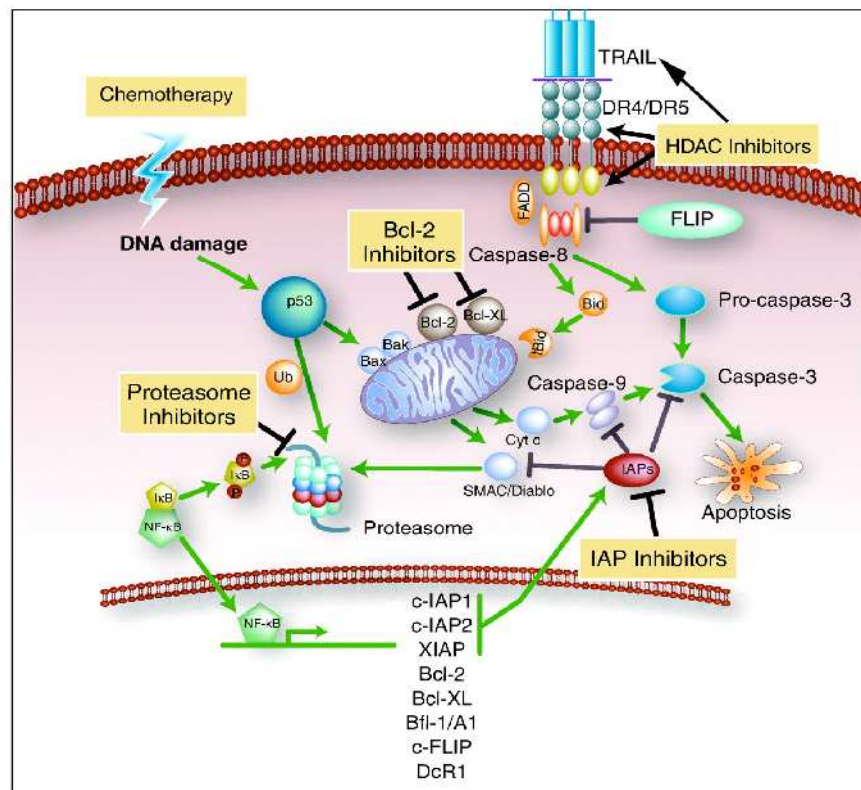


Figure 24 : Interférence d'agents thérapeutiques sur la voie de signalisation de TRAIL. Illustration des moyens utilisés par les agents chimiothérapeutiques, les inhibiteurs de protéasome, les HDACis, les inhibiteurs des membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 (Bcl-2 et Bcl-XL) et les inhibiteurs de IAPs pour interférer dans la voie de signalisation de TRAIL et potentialiser l'effet de rhTRAIL.

RESULTATS

Publication n°1

Tumor suppressor IRF-1 mediates retinoid and interferon anticancer signaling to death ligand TRAIL

Nicole Clarke, Ana M Jimenez-Lara, Emilie Voltz and Hinrich Gronemeyer

EMBO JOURNAL. 2004 Aug ; 23(15), 3051-3060

Tumor suppressor IRF-1 mediates retinoid and interferon anticancer signaling to death ligand TRAIL

Nicole CLARKE, Ana M JIMENEZ-LARA, Émilie VOLTZ and Hinrich GRONEMEYER

The EMBO Journal, 2004, Vol. 23, Pages 3051–3060

Pages 77-86 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Pour les utilisateurs ULP, il est possible de consulter cette publication sur le site de l'éditeur :

<http://dx.doi.org/10.1038/sj.emboj.7600302>

La version imprimée de cette thèse peut être consultée à la bibliothèque ou dans un autre établissement via une demande de prêt entre bibliothèques (PEB) auprès de nos services :

<http://www-sicd.u-strasbg.fr/services/peb/>

Publication n°2

Tumor-selective action of HDAC inhibitors involves TRAIL induction in acute myeloid leukemia cells

Nebbioso A., Clarke N., Voltz E., Germain E., Ambrosino C., Bontempo P.,
Alvarez R., Schiavone E. M., Ferrara F., Bresciani F., Weisz A., de Lera A. R.
Gronemeyer H., and Altucci L.

NATURE MEDECINE. 2005 Jan ; 11(1), 77-84

Publication n°4

Mechanism of Action and Cancer Therapeutic Potential of Retinoids

Voltz E, Germain E., and Gronemeyer H.

NUTRITIONAL GENOMICS. 2006 (Wiley-VCH) 49-73

Mechanism of action and cancer therapeutic potential of retinoids

Émilie VOLTZ, Emmanuelle GERMAIN, Hinrich GRONEMEYER

**in Nutritional genomics : impact on health and disease / edited by Regina
Brigelius-Flohé, Hans-Georg Joost., 2006, Wiley-VCH, Pages 49-73**

Pages 90- :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Il est possible de consulter cette publication sur le site de l'éditeur :

<http://www3.interscience.wiley.com/cgi-bin/summary/112702526/SUMMARY>

DISCUSSION

Discussion

I.

Il est établi de longue date qu'une déficience en vitamine A provoque une augmentation de l'incidence des cancers et de la sensibilité aux agents carcinogènes (Wolbach and Howe, 1925). Il a également été montré que les rétinoïdes permettent la suppression du développement tumoral dans différents modèles de carcinogenèse, tels que ceux de la peau, du sein, du poumon, de la prostate, du pancréas ou du foie (Okuno et al., 2004). L'action préventive ou thérapeutique des rétinoïdes dans un grand nombre de cancers n'est également plus à démontrer (Altucci and Gronemeyer, 2001; Lippman and Lotan, 2000; Lotan, 1996; Sun and Lotan, 2002). Leur potentiel thérapeutique vient du fait qu'ils peuvent réguler l'expression de gènes impliqués dans le contrôle de la prolifération, différenciation et apoptose des cellules cancéreuses traitées (Soprano et al., 2004).

Un modèle fréquemment utilisé pour tester l'activité anti-tumorale des rétinoïdes est la carcinogenèse de la peau, chimiquement induite en deux étapes. L'étape d'initiation est induite par un composé tel que le DMBA (7,12-diméthylbenz(a)anthracène) et l'étape de promotion est induite par un phorbol ester tel que le TPA (12,13-tétradécanoyl phorbol acetate). Des études *in vivo* utilisant ce modèle ont révélé la capacité des rétinoïdes de bloquer l'étape de promotion tumorale, *via* l'inhibition de l'activité AP-1 (facteurs de transcription composés de protéines de la famille de Fos et Jun) induite par le TPA (Huang et al., 1997). Toutefois, les bases moléculaires de cet antagonisme n'ont pas été élucidées.

L'action anti-tumorale des rétinoïdes n'est pas restreinte à cette activité anti-AP-1. En effet, les récepteurs à l'AR peuvent interférer avec d'autres voies de signalisation directement impliquées dans les cancers. Par exemple, les rétinoïdes peuvent réprimer la voie oncogénique de la β -caténine en entrant en compétition avec les partenaires usuels de la β -caténine, empêchant de la sorte tout développement tumoral (Easwaran et al., 1999).

Une autre preuve de l'action des rétinoïdes est leur utilisation pour le traitement de la leucémie promyélocytaire aiguë. La thérapie différenciative fait référence à une approche

fondamentalement différente de la chimiothérapie, cette dernière visant à détruire rapidement les cellules tumorales en croissance. La thérapie différenciative essaie de réactiver des voies de signalisation bloquées, inactivées ou supprimées lors de la tumorigenèse afin de forcer les cellules à adopter un phénotype plus différencié, et de façon optimale, de les conduire jusqu'à l'apoptose. Le challenge de la thérapie différenciative est donc de restaurer une signalisation normale. De fait, le traitement de l'APL avec l'AR combiné à des antracyclines permet de guérir 70-80% des patients (Lengfelder et al., 2005). Néanmoins, le mécanisme à la base de leurs effets anti-tumoraux est longtemps resté indéterminé.

Parmi tous les effets induits par les rétinoïdes, leur impact sur la croissance et la différenciation a majoritairement été étudié. Leur capacité à induire l'apoptose des cellules cancéreuses a quant à elle été l'objet de moins d'attention.

Un des axes de recherche développé au laboratoire depuis plusieurs années consiste en l'étude des activités apoptogéniques des rétinoïdes, en utilisant notamment le modèle de l'APL.

Les cellules promyélocyaires NB4, seul modèle cellulaire de la pathologie APL expriment la protéine de fusion PML-RAR α . Sous l'action d'acide rétinoïque tout trans (ATRA), elles différencient dans la voie granulocytaire et, de manière concomitante, s'arrêtent en phase G1 du cycle cellulaire, caractérisée par une induction de p21. Après la phase de maturation, les cellules meurent par apoptose. Il a pu être prouvé au laboratoire que suite à l'activation de programmes anti-apoptotiques, ATRA induit l'expression du ligand de mort TRAIL dans les cellules NB4 et les blastes de patients APL. Il a également été démontré que TRAIL est effectivement responsable de l'effet apoptogénique de ATRA (Altucci et al., 2001).

Nous avons donc souhaité approfondir l'aspect d'induction de TRAIL par les rétinoïdes afin d'en déterminer le mécanisme moléculaire d'induction de TRAIL par l'AR.

Nous avons effectué cette étude parallèlement dans les cellules NB4 et dans des lignées cellulaires de cancer du sein.

L'induction tardive de TRAIL dans les différents systèmes étudiés impliquait une induction transcriptionnelle indirecte. L'étude du promoteur du gène codant pour TRAIL a révélé la présence d'un site de liaison pour une protéine impliquée dans la voie de l'interféron γ (IFN γ), IRF-1. Nous avons ainsi identifié IRF-1 comme étant le facteur clé responsable de l'induction de TRAIL par l'acide rétinoïque. L'activation transcriptionnelle de IRF-1 par l'AR permet le

recrutement de IRF-1 au niveau du promoteur du gène codant pour TRAIL, au niveau de deux séquences consensus, ISRE et IRF-E, permettant alors son activation.

Plusieurs études ayant décrit un effet synergique de l'IFN γ et de l'AR sur l'inhibition de la prolifération cellulaire dans plusieurs systèmes cancéreux (Pelicano et al., 1997), et étant établi que les voies de signalisation de ces composés convergent vers IRF-1, nous avons étudié l'effet de leur traitement combiné sur l'activation de TRAIL. Nous avons ainsi noté que le traitement des cellules par ces deux agents anti-tumoraux, AR et IFN γ induit la liaison coopérative de IRF-1 sur le promoteur de TRAIL, permettant son induction de manière efficace dans les systèmes cellulaires étudiés. D'autre part, ce traitement combiné permet également le recrutement important de CBP sur le promoteur de TRAIL, indiquant un rôle potentiel des co-activateurs dans ce phénomène. Il serait intéressant de pouvoir identifier les facteurs participant ainsi que la dynamique du complexe formé au niveau du promoteur de TRAIL, conduisant au recrutement de CBP.

Il a déjà été prouvé que d'autres membres de la famille IRF peuvent recruter CBP lorsqu'ils sont liés à l'ADN sous forme d'hétéro/homodimères (Wathelet et al., 1998). Ceci pourrait expliquer la forte corrélation entre le recrutement de CBP et la liaison de IRF-1 au niveau du promoteur de TRAIL. Soulignons qu'un tel effet est significativement réduit lors de traitement avec l'AR ou l'IFN γ seuls.

Une autre observation importante concerne l'induction d'IRF-1. En effet, IRF-1 est décrit comme un suppresseur de tumeur et sa capacité à induire l'expression de TRAIL pourrait être un des moyens mis en place pour exercer sa capacité d'inhiber la croissance tumorale, démontrée pour différentes lignées cellulaires cancéreuses (Tanaka and Taniguchi, 2000). En effet, les bases moléculaires de sa fonction de suppresseur de tumeur ne sont pas complètement élucidées. Outre nos données, deux faits pourraient permettre de relier IRF-1 à TRAIL : (i) IRF-1 est capable d'induire l'apoptose de cellules transformées par un oncogène de façon indépendante de p53, tout comme TRAIL, et (ii) il peut exister une synergie entre IRF-1 et p53, et l'expression d'un des récepteurs de mort de TRAIL, DR5 peut être induite par p53 (Kim et al., 2001; Wang and El-Deiry, 2003; Wu et al., 1997).

Nous avons ensuite pu démontrer par des expériences de co-culture que l'induction de TRAIL dans les cellules de cancer du sein SK-BR-3 permettait d'induire l'apoptose de

cellules cancéreuses hétérologues, résistantes au traitement AR + IFN γ , prouvant ainsi un mode d'action paracrine pour TRAIL.

Enfin, une expérience similaire de co-traitement réalisée avec des cellules T CD4+ normales n'a pas induit la mort de ces dernières, ce résultat allant dans le sens des indications relevées dans la littérature selon lesquelles TRAIL serait capable d'induire sélectivement la mort des cellules tumorales sans affecter les cellules normales. Cette dernière observation a un impact significatif pour l'utilisation de TRAIL en thérapie. En effet, au cours des traitements anti-cancéreux, il est fréquent qu'une partie des cellules cancéreuses acquièrent une résistance à un des traitements. L'induction de TRAIL par les cellules sensibles permettrait de pallier à ce problème, en induisant la mort des cellules environnantes.

D'autre part, une étude est en cours au laboratoire afin de déterminer les mécanismes d'induction de IRF-1 par l'acide rétinoïque. L'induction rapide de IRF-1 par l'acide rétinoïque suggère en effet une régulation directe. Des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine vont nous permettre de déterminer si les récepteurs de l'acide rétinoïque sont recrutés au niveau de ce promoteur, si ce recrutement se fait en réponse à l'acide rétinoïque et lequel des isotypes de RAR est mis en jeu. En effet, RAR α est exprimé dans ces cellules de manière constitutive, mais RAR β , considéré également comme un suppresseur de tumeur est, lui, induit suite au traitement à l'ATRA. Il serait donc intéressant de déterminer si un lien RAR β /IRF-1/TRAIL peut être établi. Toutefois, si ce lien existe, une des limitations envisageables incombe au fait que IRF-1 et RAR β sont tous les deux souvent inhibés au cours du processus tumoral. En effet, dans certaines lignées de cancer du sein, le promoteur de RAR β est hyperméthylé, réprimant ainsi son expression, et le locus de IRF-1 peut lui aussi être hyperméthylé ou perdu.

II.

Un intérêt majeur de notre laboratoire porte sur la recherche de traitements alternatifs du cancer, qui permettraient l'éradication plus spécifique des cellules tumorales et la réduction des effets toxiques des traitements conventionnels. Ainsi, lorsqu'il est apparu dans la littérature que les inhibiteurs de HDACs pouvaient, entre autres effets, induire préférentiellement la mort des cellules tumorales (Marks et al., 2001), nous avons souhaité déterminer l'origine de l'effet de ces inhibiteurs.

Les premières preuves proviennent de l'étude d'un type de leucémie résistante à l'AR. Dans ce cas, ni l'expression ni les fonctions des récepteurs de l'AR ne sont altérées et des mutations dans d'autres facteurs de transcription sont responsables de l'arrêt dans le processus de différenciation (pour revue, voir (Tenen, 2003)). Un recrutement aberrant des HDACs par des facteurs de transcription est responsable de la répression de l'expression de nombreux gènes impliqués dans la régulation de la prolifération, différenciation ou apoptose. Ainsi, La combinaison d'AR et d'HDACis permet d'outrepasser le blocage différenciatif des cellules (Ferrara et al., 2001).

Les modifications épigénétiques ont été récemment identifiées en tant que mécanisme permettant l'inhibition de l'expression de différents suppresseurs de tumeur et l'expression aberrante de certains gènes impliqués dans la croissance tumorale.

Envisageant la possibilité que l'induction d'apoptose par les HDACis pouvait être liée à la stimulation de l'expression de TRAIL, nous avons étudié les effets de trois HDACis (MS-275, SAHA et acide valproïque) dans des cellules leucémiques, ainsi que dans des blastes de patients atteints de leucémie myéloïde aiguë (AML). Le traitement des cellules et des blastes avec chacun des inhibiteurs a causé le ralentissement de la prolifération cellulaire suivi d'un arrêt du cycle cellulaire, de la différenciation des cellules puis de leur apoptose. Une observation importante de cette étude est que le traitement de cellules progénitrices myéloïdes CD34⁺ ne provoque pas leur mort. Ayant remarqué l'induction de p21 et de TRAIL suite au traitement par les HDACis, nous avons confirmé leur implication par la technique d'interférence à l'ARN (RNAi). L'inhibition de p21 abroge l'arrêt du cycle cellulaire mais pas la différenciation ni l'apoptose des cellules. En revanche, lorsque TRAIL est inhibé, l'induction d'apoptose est bloquée sans répercussion sur l'arrêt du cycle cellulaire ni de la

différenciation. La mise en place d'expérimentations *in vivo* nous a apporté la confirmation de l'implication de TRAIL dans ce mécanisme anti-tumoral.

Au même moment, un autre groupe a aussi démontré l'implication de la voie de signalisation de TRAIL et de ses récepteurs de mort dans des modèles murins d'AML, appuyant nos résultats (Insinga et al., 2005).

De plus, nous avons mené une étude mécanistique de l'induction de TRAIL par les HDACis, qui nous a révélé l'acétylation et le recrutement des facteurs SP1 et SP3 sur le promoteur de TRAIL, le facteur SP1 semblant être celui qui médie la réponse aux HDACis. Cependant nous ne connaissons pas encore la conformation finale du modèle et il serait intéressant d'effectuer des expériences de CHIP, afin de confirmer l'implication de SP1.

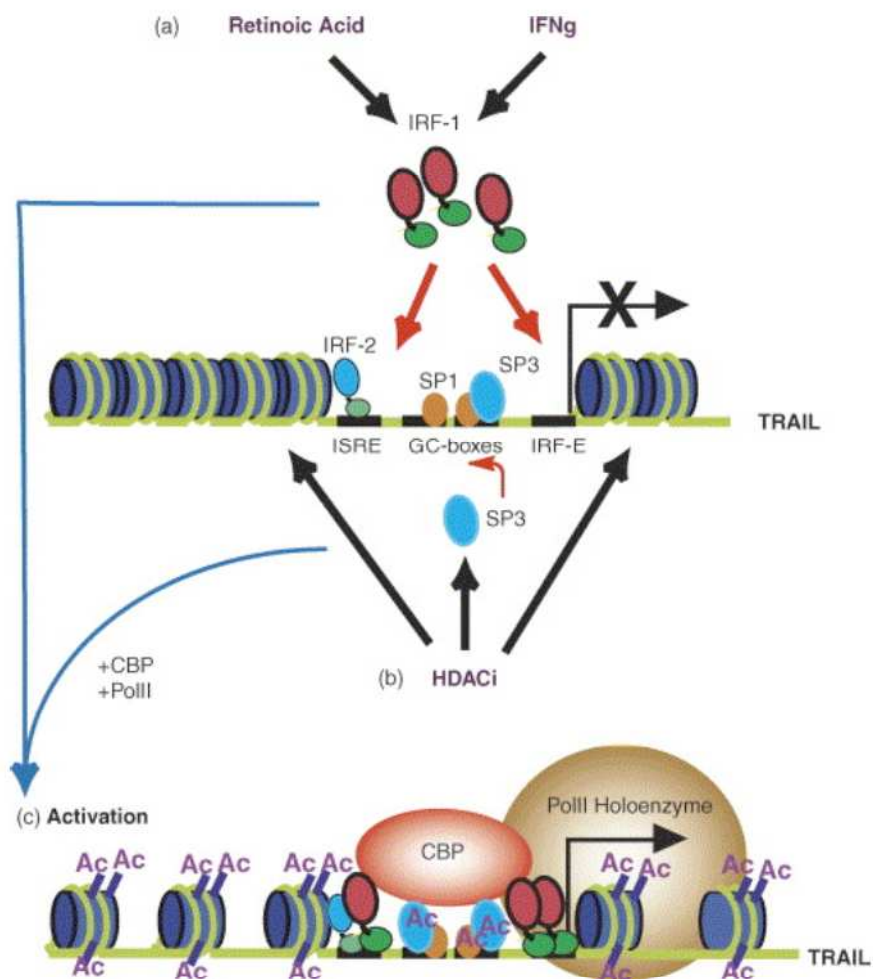


Figure 32 : Activation du promoteur de TRAIL par les rétinoïdes, l'interféron γ , ou les HDACis. (a) le promoteur de TRAIL contient plusieurs séquences consensus, notamment deux boîtes GC, un site IRF-E, un site ISRE. Dans des cellules non stimulées, les facteurs SP1 et SP3 sont liés aux boîtes GC et les sites IRF-E et/ou ISRE sont liés par IRF-2. Le traitement des cellules à l'IFN γ et/ou l'AR induit l'expression de IRF-1, qui est alors recruté sur le promoteur de TRAIL. (b) La présence des boîtes GC est nécessaire pour l'induction de TRAIL par les HDACis qui, de plus, recrutent des protéines SP3 additionnelles au niveau du promoteur. (c) Dans les deux cas décrits ci-dessus, CBP, un co-activateur ayant une activité HAT, ainsi que la Polymérase II sont ultérieurement recrutées au niveau du promoteur, provoquant l'acétylation des histones et la transcription du gène codant pour TRAIL.

Bien que nos résultats apportent une base mécanistique expliquant en partie les effets des HDACis, il est fort probable que ces effets ne soient pas observables dans d'autres types de tumeurs. En effet, des données préliminaires du laboratoire indiquent que dans des lignées cellulaires de différents cancers solides tels que le cancer du sein, de la prostate ou du colon, le traitement avec divers HDACis n'induit pas l'expression de TRAIL, confirmant que celui-ci n'est pas toujours nécessaire à l'induction d'apoptose par les HDACis (Minucci and Pelicci, 2006) et que les HDACis sont donc capables d'exercer leur action tumeur-spécifique par un autre moyen qu'il reste à élucider.

Un autre fait surprenant est l'efficacité des HDACis dans le traitement de cancers. En effet, les enzymes ciblées par ces inhibiteurs régulent la transcription d'un très grand nombre de gènes et pourtant l'action des HDACis est ciblée aux cellules à éliminer et ne provoque pas de désordres globaux au niveau du génome. De fait, nos travaux indiquent que TRAIL serait sélectivement induit par les HDACis ciblant les HDAC1 et 2, tels que le MS275 ou l'acide valproïque. Il est donc envisageable que l'action des HDACis passe par le blocage préférentiel d'une classe particulière de HDACs ou d'un HDAC précis. Quoiqu'il en soit, la détermination des voies de signalisation et des facteurs modulés par chaque HDACi reste nécessaire pour la conception rationnelle de nouveaux agents thérapeutiques, même si les molécules en développement ont déjà fait leurs preuves lors d'essais pré-cliniques.

Ainsi, la combinaison des inhibiteurs de HDACs avec des inhibiteurs de DNA méthyltransférases a démontré son efficacité dans le cas d'APL résistantes à l'AR (Fazi et al., 2005) démontrant que l'alternative à la thérapie différenciative peut être très efficace.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

Références Bibliographiques

A

Adhikary, S., and Eilers, M. (2005). Transcriptional regulation and transformation by Myc proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 635-645.

Alderson, M. R., Tough, T. W., Braddy, S., Davis-Smith, T., Roux, E., Schooley, K., Miller, R. E., and Lynch, D. H. (1994). Regulation of apoptosis and T cell activation by Fas-specific mAb. *Int Immunol* 6, 1799-1806.

Al-Hajj, M., and Clarke, M. F. (2004). Self-renewal and solid tumor stem cells. *Oncogene* 23, 7274-7282.

Al-Hajj, M., Wicha, M. S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S. J., and Clarke, M. F. (2003). Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 3983-3988.

Almasan, A., and Ashkenazi, A. (2003). Apo2L/TRAIL: apoptosis signaling, biology, and potential for cancer therapy. *Cytokine Growth Factor Rev* 14, 337-348.

Altucci, L., Clarke, N., Nebbioso, A., Scognamiglio, A., and Gronemeyer, H. (2005). Acute myeloid leukemia: therapeutic impact of epigenetic drugs. *Int J Biochem Cell Biol* 37, 1752-1762.

Altucci, L., and Gronemeyer, H. (2001). The promise of retinoids to fight against cancer. *Nature Reviews Cancer* 1, 181-193.

Altucci, L., and Gronemeyer, H. (2004). Retinoids and TRAIL: Two cooperating actors to fight against cancer. In *Vitamins and Hormones*, G. Litwack, ed. (Academic Press, Elsevier), pp. 319-345.

Altucci, L., Rossin, A., Raffelsberger, W., Reitmair, A., Chomienne, C., and Gronemeyer, H. (2001). Retinoic acid-induced apoptosis in leukemia cells is mediated by paracrine action of tumor-selective death ligand TRAIL. *Nature Medicine* 7, 680-686.

Altucci, L., Wilhelm, E., and Gronemeyer, H. (2004). Leukemia: beneficial actions of retinoids and rexinoids. *Int J Biochem Cell Biol* 36, 178-182.

Andersen, M. H., Becker, J. C., and Straten, P. (2005). Regulators of apoptosis: suitable targets for immune therapy of cancer. *Nat Rev Drug Discov* 4, 399-409.

Ashkenazi, A. (2002). Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily. *Nat Rev Cancer* 2, 420-430.

Ashkenazi, A., and Dixit, V. M. (1999). Apoptosis control by death and decoy receptors. *Curr Opin Cell Biol* *11*, 255-260.

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.

Ayer, D. E., Kretzner, L., and Eisenman, R. N. (1993). Mad: a heterodimeric partner for Max that antagonizes Myc transcriptional activity. *Cell* *72*, 211-222.

B

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.

Bachoo, R. M., Maher, E. A., Ligon, K. L., Sharpless, N. E., Chan, S. S., You, M. J., Tang, Y., DeFrances, J., Stover, E., Weissleder, R., et al. (2002). Epidermal growth factor receptor and Ink4a/Arf: convergent mechanisms governing terminal differentiation and transformation along the neural stem cell to astrocyte axis. *Cancer Cell* *1*, 269-277.

Bast, R. C., W., K. D., Pollock, R. E., Weichselbaum, R. R., Holland, J. F., and Frei, E. (2000). *Cancer Medicine*, 5th edition.

Berger, R., Febbo, P. G., Majumder, P. K., Zhao, J. J., Mukherjee, S., Signoretti, S., Campbell, K. T., Sellers, W. R., Roberts, T. M., Loda, M., et al. (2004). Androgen-induced differentiation and tumorigenicity of human prostate epithelial cells. *Cancer Res* *64*, 8867-8875.

Bin, L., Li, X., Xu, L. G., and Shu, H. B. (2002). The short splice form of Casper/c-FLIP is a major cellular inhibitor of TRAIL-induced apoptosis. *FEBS Lett* *510*, 37-40.

Blackwell, T. K., Huang, J., Ma, A., Kretzner, L., Alt, F. W., Eisenman, R. N., and Weintraub, H. (1993). Binding of myc proteins to canonical and noncanonical DNA sequences. *Mol Cell Biol* *13*, 5216-5224.

Blackwood, E. M., Luscher, B., and Eisenman, R. N. (1992). Myc and Max associate in vivo. *Genes Dev* *6*, 71-80.

Boatright, K. M., Renatus, M., Scott, F. L., Sperandio, S., Shin, H., Pedersen, I. M., Ricci, J. E., Edris, W. A., Sutherlin, D. P., Green, D. R., and Salvesen, G. S. (2003). A unified model for apical caspase activation. *Mol Cell* *11*, 529-541.

Bode, A. M., and Dong, Z. (2004). Post-translational modification of p53 in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer* *4*, 793-805.

- Bodmer, J. L., Holler, N., Reynard, S., Vinciguerra, P., Schneider, P., Juo, P., Blenis, J., and Tschopp, J. (2000).** TRAIL receptor-2 signals apoptosis through FADD and caspase-8. *Nat Cell Biol* 2, 241-243.
- Bodnar, A. G., Ouellette, M., Frolkis, M., Holt, S. E., Chiu, C. P., Morin, G. B., Harley, C. B., Shay, J. W., Lichtsteiner, S., and Wright, W. E. (1998).** Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* 279, 349-352.
- Boehm, J., and Hahn, W. (2005).** Understanding transformation: progress and gaps. *Curr Opin Genet Dev* 15, 13-17.
- Boehm, J. S., Hession, M. T., Bulmer, S. E., and Hahn, W. C. (2005).** Transformation of human and murine fibroblasts without viral oncoproteins. *Mol Cell Biol* 25, 6464-6474.
- Bolden, J. E., Peart, M. J., and Johnstone, R. W. (2006).** Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors. *Nat Rev Drug Discov* 5, 769-784.
- Bonnet, D., and Dick, J. E. (1997).** Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med* 3, 730-737.
- Bos, J. L. (1989).** ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res* 49, 4682-4689.
- Bouchard, C., Dittrich, O., Kiermaier, A., Dohmann, K., Menkel, A., Eilers, M., and Luscher, B. (2001).** Regulation of cyclin D2 gene expression by the Myc/Max/Mad network: Myc-dependent TRRAP recruitment and histone acetylation at the cyclin D2 promoter. *Genes Dev* 15, 2042-2047.
- Bouchard, C., Marquardt, J., Bras, A., Medema, R. H., and Eilers, M. (2004).** Myc-induced proliferation and transformation require Akt-mediated phosphorylation of FoxO proteins. *Embo J* 23, 2830-2840.
- Bouralexis, S., Findlay, D. M., and Evdokiou, A. (2005).** Death to the bad guys: targeting cancer via Apo2L/TRAIL. *Apoptosis* 10, 35-51.
- Boxer, L. M., and Dang, C. V. (2001).** Translocations involving c-myc and c-myc function. *Oncogene* 20, 5595-5610.
- Bratton, S. B., Lewis, J., Butterworth, M., Duckett, C. S., and Cohen, G. M. (2002).** XIAP inhibition of caspase-3 preserves its association with the Apaf-1 apoptosome and prevents CD95- and Bax-induced apoptosis. *Cell Death Differ* 9, 881-892.
- Bremer, E., van Dam, G., Kroesen, B. J., de Leij, L., and Helfrich, W. (2006).** Targeted induction of apoptosis for cancer therapy: current progress and prospects. *Trends Mol Med* 12, 382-393.
- Brenner, C., Deplus, R., Didelot, C., Loriot, A., Vire, E., De Smet, C., Gutierrez, A., Danovi, D., Bernard, D., Boon, T., et al. (2005).** Myc represses transcription through recruitment of DNA methyltransferase corepressor. *Embo J* 24, 336-346.

Brunori, M., and Gilson, E. (2005). [Telomere and cancer: what's more at the end?]. *Med Sci (Paris)* 21, 37-42.

Brunori, M., Luciano, P., Gilson, E., and Geli, V. (2005). The telomerase cycle: normal and pathological aspects. *J Mol Med* 83, 244-257.

Bryan, T. M., Marusic, L., Bacchetti, S., Namba, M., and Reddel, R. R. (1997). The telomere lengthening mechanism in telomerase-negative immortal human cells does not involve the telomerase RNA subunit. *Hum Mol Genet* 6, 921-926.

C

Call, K. M., Glaser, T., Ito, C. Y., Buckler, A. J., Pelletier, J., Haber, D. A., Rose, E. A., Kral, A., Yeager, H., Lewis, W. H., and et al. (1990). Isolation and characterization of a zinc finger polypeptide gene at the human chromosome 11 Wilms' tumor locus. *Cell* 60, 509-520.

Cameron, E. E., Bachman, K. E., Myohanen, S., Herman, J. G., and Baylin, S. B. (1999). Synergy of demethylation and histone deacetylase inhibition in the re-expression of genes silenced in cancer. *Nat Genet* 21, 103-107.

Capdeville, R., Buchdunger, E., Zimmermann, J., and Matter, A. (2002). Glivec (STI571, imatinib), a rationally developed, targeted anticancer drug. *Nat Rev Drug Discov* 1, 493-502.

Cha, S. S., Sung, B. J., Kim, Y. A., Song, Y. L., Kim, H. J., Kim, S., Lee, M. S., and Oh, B. H. (2000). Crystal structure of TRAIL-DR5 complex identifies a critical role of the unique frame insertion in conferring recognition specificity. *J Biol Chem* 275, 31171-31177.

Chang, D. W., Xing, Z., Pan, Y., Algeciras-Schimmich, A., Barnhart, B. C., Yaish-Ohad, S., Peter, M. E., and Yang, X. (2002). c-FLIP(L) is a dual function regulator for caspase-8 activation and CD95-mediated apoptosis. *Embo J* 21, 3704-3714.

Chaudhary, P. M., Eby, M., Jasmin, A., Bookwalter, A., Murray, J., and Hood, L. (1997). Death receptor 5, a new member of the TNFR family, and DR4 induce FADD-dependent apoptosis and activate the NF-kappaB pathway. *Immunity* 7, 821-830.

Chen, C., Edelstein, L. C., and Gelinas, C. (2000). The Rel/NF-kappaB family directly activates expression of the apoptosis inhibitor Bcl-x(L). *Mol Cell Biol* 20, 2687-2695.

Chen, G., and Goeddel, D. V. (2002). TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. *Science* 296, 1634-1635.

Chen, W., Cooper, T. K., Zahnow, C. A., Overholtzer, M., Zhao, Z., Ladanyi, M., Karp, J. E., Gokgoz, N., Wunder, J. S., Andrulis, I. L., et al. (2004). Epigenetic and genetic loss of Hic1 function accentuates the role of p53 in tumorigenesis. *Cancer Cell* 6, 387-398.

Cheung, P., Allis, C. D., and Sassone-Corsi, P. (2000). Signaling to chromatin through histone modifications. *Cell* 103, 263-271.

- Chin, K., de Solorzano, C. O., Knowles, D., Jones, A., Chou, W., Rodriguez, E. G., Kuo, W. L., Ljung, B. M., Chew, K., Myambo, K., et al. (2004).** In situ analyses of genome instability in breast cancer. *Nat Genet* 36, 984-988.
- Chinnaiyan, A. M., Prasad, U., Shankar, S., Hamstra, D. A., Shanaiah, M., Chenevert, T. L., Ross, B. D., and Rehemtulla, A. (2000).** Combined effect of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand and ionizing radiation in breast cancer therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 1754-1759.
- Cho, K. R., and Fearon, E. R. (1995).** DCC: linking tumour suppressor genes and altered cell surface interactions in cancer? *Eur J Cancer* 314, 1055-1060.
- Chudnovsky, Y., Adams, A. E., Robbins, P. B., Lin, Q., and Khavari, P. A. (2005).** Use of human tissue to assess the oncogenic activity of melanoma-associated mutations. *Nat Genet* 37, 745-749.
- Clancy, L., Mruk, K., Archer, K., Woelfel, M., Mongkolsapaya, J., Screaton, G., Lenardo, M. J., and Chan, F. K. (2005).** Preligand assembly domain-mediated ligand-independent association between TRAIL receptor 4 (TR4) and TR2 regulates TRAIL-induced apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 18099-18104.
- Clarke, N., Jimenez-Lara, A. M., Voltz, E., and Gronemeyer, H. (2004).** Tumor suppressor IRF-1 mediates retinoid and interferon anticancer signaling to death ligand TRAIL. *EMBO J* 23, 3051-3060.
- Cole, M. D. (1986).** Activation of the c-myc oncogene. *Basic Life Sci* 38, 399-406.
- Cole, M. D., and McMahon, S. B. (1999).** The Myc oncoprotein: a critical evaluation of transactivation and target gene regulation. *Oncogene* 18, 2916-2924.
- Collado, M., Gil, J., Efeyan, A., Guerra, C., Schuhmacher, A. J., Barradas, M., Benguria, A., Zaballos, A., Flores, J. M., Barbacid, M., et al. (2005).** Tumour biology: senescence in premalignant tumours. *Nature* 436, 642.
- Counter, C. M., Hahn, W. C., Wei, W., Caddle, S. D., Beijersbergen, R. L., Lansdorp, P. M., Sedivy, J. M., and Weinberg, R. A. (1998).** Dissociation among in vitro telomerase activity, telomere maintenance, and cellular immortalization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 14723-14728.
- Cozzio, A., Passegue, E., Ayton, P. M., Karsunky, H., Cleary, M. L., and Weissman, I. L. (2003).** Similar MLL-associated leukemias arising from self-renewing stem cells and short-lived myeloid progenitors. *Genes Dev* 17, 3029-3035.
- Cretney, E., Shanker, A., Yagita, H., Smyth, M. J., and Sayers, T. J. (2006).** TNF-related apoptosis-inducing ligand as a therapeutic agent in autoimmunity and cancer. *Immunol Cell Biol* 84, 87-98.
- 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.

Cuello, M., Ettenberg, S. A., Nau, M. M., and Lipkowitz, S. (2001). Synergistic induction of apoptosis by the combination of trail and chemotherapy in chemoresistant ovarian cancer cells. *Gynecol Oncol* *81*, 380-390.

Cuthbert, G. L., Daujat, S., Snowden, A. W., Erdjument-Bromage, H., Hagiwara, T., Yamada, M., Schneider, R., Gregory, P. D., Tempst, P., Bannister, A. J., and Kouzarides, T. (2004). Histone deimination antagonizes arginine methylation. *Cell* *118*, 545-553.

D

De Ruiter, N. D., Burgering, B. M., and Bos, J. L. (2001). Regulation of the Forkhead transcription factor AFX by Ral-dependent phosphorylation of threonines 447 and 451. *Mol Cell Biol* *21*, 8225-8235.

de The, H., Lavau, C., Marchio, A., Chomienne, C., Degos, L., and Dejean, A. (1991). The PML-RAR alpha fusion mRNA generated by the t(15;17) translocation in acute promyelocytic leukemia encodes a functionally altered RAR. *Cell* *66*, 675-684.

Debatin, K. M., and Krammer, P. H. (2004). Death receptors in chemotherapy and cancer. *Oncogene* *23*, 2950-2966.

Degli-Esposti, M. A., Dougall, W. C., Smolak, P. J., Waugh, J. Y., Smith, C. A., and Goodwin, R. G. (1997a). The novel receptor TRAIL-R4 induces NF-kappaB and protects against TRAIL-mediated apoptosis, yet retains an incomplete death domain. *Immunity* *7*, 813-820.

Degli-Esposti, M. A., Smolak, P. J., Walczak, H., Waugh, J., Huang, C. P., DuBose, R. F., Goodwin, R. G., and Smith, C. A. (1997b). Cloning and characterization of TRAIL-R3, a novel member of the emerging TRAIL receptor family. *J Exp Med* *186*, 1165-1170.

Deng, Y., Lin, Y., and Wu, X. (2002). TRAIL-induced apoptosis requires Bax-dependent mitochondrial release of Smac/DIABLO. *Genes Dev* *16*, 33-45.

Deveraux, Q. L., Takahashi, R., Salvesen, G. S., and Reed, J. C. (1997). X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. *Nature* *388*, 300-304.

Di Croce, L., Raker, V. A., Corsaro, M., Fazi, F., Fanelli, M., Faretta, M., Fuks, F., Lo Coco, F., Kouzarides, T., Nervi, C., *et al.* (2002). Methyltransferase recruitment and DNA hypermethylation of target promoters by an oncogenic transcription factor. *Science* *295*, 1079-1082.

Diehl, G. E., Yue, H. H., Hsieh, K., Kuang, A. A., Ho, M., Morici, L. A., Lenz, L. L., Cado, D., Riley, L. W., and Winoto, A. (2004). TRAIL-R as a negative regulator of innate immune cell responses. *Immunity* *21*, 877-889.

- Dimri, G. P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., Medrano, E. E., Linskens, M., Rubelj, I., Pereira-Smith, O., and et al. (1995).** A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* *92*, 9363-9367.
- Dokmanovic, M., and Marks, P. A. (2005).** Prospects: histone deacetylase inhibitors. *J Cell Biochem* *96*, 293-304.
- Downward, J. (2003).** Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nat Rev Cancer* *3*, 11-22.
- Drayton, S., Rowe, J., Jones, R., Vatcheva, R., Cuthbert-Heavens, D., Marshall, J., Fried, M., and Peters, G. (2003).** Tumor suppressor p16INK4a determines sensitivity of human cells to transformation by cooperating cellular oncogenes. *Cancer Cell* *4*, 301-310.
- Drummond, D. C., Noble, C. O., Kirpotin, D. B., Guo, Z., Scott, G. K., and Benz, C. C. (2005).** Clinical development of histone deacetylase inhibitors as anticancer agents. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* *45*, 495-528.
- Duesberg, P., and Li, R. (2003).** Multistep carcinogenesis: a chain reaction of aneuploidizations. *Cell Cycle* *2*, 202-210.
- Duiker, E. W., Mom, C. H., de Jong, S., Willemse, P. H., Gietema, J. A., van der Zee, A. G., and de Vries, E. G. (2006).** The clinical trail of TRAIL. *Eur J Cancer*.

E

- Easwaran, V., Pishvaian, M., Salimuddin, and Byers, S. (1999).** Cross-regulation of beta-catenin-LEF/TCF and retinoid signaling pathways. *Curr Biol* *9*, 1415-1418.
- Ehrenhofer-Murray, A. E. (2004).** Chromatin dynamics at DNA replication, transcription and repair. *Eur J Biochem* *271*, 2335-2349.
- 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-kappaB. *Oncogene* *22*, 3842-3852.
- Eilers, M., Picard, D., Yamamoto, K. R., and Bishop, J. M. (1989).** Chimaeras of myc oncoprotein and steroid receptors cause hormone-dependent transformation of cells. *Nature* *340*, 66-68.
- Elenbaas, B., Spirio, L., Koerner, F., Fleming, M. D., Zimonjic, D. B., Donaher, J. L., Popescu, N. C., Hahn, W. C., and Weinberg, R. A. (2001).** Human breast cancer cells generated by oncogenic transformation of primary mammary epithelial cells. *Genes Dev* *15*, 50-65.
- Ellis, C. A., and Clark, G. (2000).** The importance of being K-Ras. *Cell Signal* *12*, 425-434.

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.

Eshleman, J. R., and Markowitz, S. D. (1996). Mismatch repair defects in human carcinogenesis. *Hum Mol Genet* 5 *Spec No*, 1489-1494.

Esteller, M. (2003). Relevance of DNA methylation in the management of cancer. *Lancet Oncol* 4, 351-358.

Esteller, M. (2005). DNA methylation and cancer therapy: new developments and expectations. *Curr Opin Oncol* 17, 55-60.

Esteller, M. (2006). Epigenetics provides a new generation of oncogenes and tumour-suppressor genes. *Br J Cancer* 94, 179-183.

Esteller, M., Silva, J. M., Dominguez, G., Bonilla, F., Matias-Guiu, X., Lerma, E., Bussaglia, E., Prat, J., Harkes, I. C., Repasky, E. A., et al. (2000). Promoter hypermethylation and BRCA1 inactivation in sporadic breast and ovarian tumors. *J Natl Cancer Inst* 92, 564-569.

Evdokiou, A., Bouralexis, S., Atkins, G. J., Chai, F., Hay, S., Clayer, M., and Findlay, D. M. (2002). Chemotherapeutic agents sensitize osteogenic sarcoma cells, but not normal human bone cells, to Apo2L/TRAIL-induced apoptosis. *Int J Cancer* 99, 491-504.

F

Farwell, D. G., Shera, K. A., Koop, J. I., Bonnet, G. A., Matthews, C. P., Reuther, G. W., Coltrera, M. D., McDougall, J. K., and Klingelutz, A. J. (2000). Genetic and epigenetic changes in human epithelial cells immortalized by telomerase. *Am J Pathol* 156, 1537-1547.

Fazi, F., Travaglini, L., Carotti, D., Palitti, F., Diverio, D., Alcalay, M., McNamara, S., Miller, W., Coco, F., Pelicci, P., and Nervi, C. (2005a). Retinoic acid targets DNA-methyltransferases and histone deacetylases during APL blast differentiation in vitro and in vivo. *Oncogene*.

Fazi, F., Travaglini, L., Carotti, D., Palitti, F., Diverio, D., Alcalay, M., McNamara, S., Miller, W. H., Jr., Lo Coco, F., Pelicci, P. G., and Nervi, C. (2005b). Retinoic acid targets DNA-methyltransferases and histone deacetylases during APL blast differentiation in vitro and in vivo. *Oncogene* 24, 1820-1830.

Fearon, E. R., and Vogelstein, B. (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61, 759-767.

Fedier, A., and Fink, D. (2004). Mutations in DNA mismatch repair genes: implications for DNA damage signaling and drug sensitivity (review). *Int J Oncol* 24, 1039-1047.

- Felsher, D. W., and Bishop, J. M. (1999).** Transient excess of MYC activity can elicit genomic instability and tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* *96*, 3940-3944.
- Ferrara, F. F., Fazi, F., Bianchini, A., Padula, F., Gelmetti, V., Minucci, S., Mancini, M., Pelicci, P. G., Lo Coco, F., and Nervi, C. (2001).** Histone deacetylase-targeted treatment restores retinoic acid signaling and differentiation in acute myeloid leukemia. *Cancer Res* *61*, 2-7.
- Fesik, S. W. (2005).** Promoting apoptosis as a strategy for cancer drug discovery. *Nat Rev Cancer* *5*, 876-885.
- Finlay, C. A., Hinds, P. W., and Levine, A. J. (1989).** The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation. *Cell* *57*, 1083-1093.
- Fojo, T., and Bates, S. (2003).** Strategies for reversing drug resistance. *Oncogene* *22*, 7512-7523.
- Forsyth, N. R., Wright, W. E., and Shay, J. W. (2002).** Telomerase and differentiation in multicellular organisms: turn it off, turn it on, and turn it off again. *Differentiation* *69*, 188-197.
- Fournel, S., Wieckowski, S., Sun, W., Trouche, N., Dumortier, H., Bianco, A., Chaloin, O., Habib, M., Peter, J. C., Schneider, P., *et al.* (2005).** C3-symmetric peptide scaffolds are functional mimetics of trimeric CD40L. *Nat Chem Biol* *1*, 377-382.
- Fraga, M. F., Ballestar, E., Villar-Garea, A., Boix-Chornet, M., Espada, J., Schotta, G., Bonaldi, T., Haydon, C., Ropero, S., Petrie, K., *et al.* (2005).** Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer. *Nat Genet* *37*, 391-400.
- Francke, U., and Kung, F. (1976).** Sporadic bilateral retinoblastoma and 13q- chromosomal deletion. *Med Pediatr Oncol* *2*, 379-385.
- Franco, A. V., Zhang, X. D., Van Berkel, E., Sanders, J. E., Zhang, X. Y., Thomas, W. D., Nguyen, T., and Hersey, P. (2001).** The role of NF-kappa B in TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis of melanoma cells. *J Immunol* *166*, 5337-5345.
- Freemantle, S., Spinella, M., and Dmitrovsky, E. (2003).** Retinoids in cancer therapy and chemoprevention: promise meets resistance. *Oncogene* *22*, 7305-7315.
- Friend, S. H., Bernards, R., Rogelj, S., Weinberg, R. A., Rapaport, J. M., Albert, D. M., and Dryja, T. P. (1986).** A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma. *Nature* *323*, 643-646.
- Fulda, S., Wick, W., Weller, M., and Debatin, K. M. (2002).** Smac agonists sensitize for Apo2L/TRAIL- or anticancer drug-induced apoptosis and induce regression of malignant glioma in vivo. *Nat Med* *8*, 808-815.

G

- Gandhi, M. K., and Khanna, R. (2005).** Viruses and lymphoma. *Pathology* 37, 420-433.
- Gandhi, M. K., Tellam, J. T., and Khanna, R. (2004).** Epstein-Barr virus-associated Hodgkin's lymphoma. *Br J Haematol* 125, 267-281.
- Ganten, T. M., Haas, T. L., Sykora, J., Stahl, H., Sprick, M. R., Fas, S. C., Krueger, A., Weigand, M. A., Grosse-Wilde, A., Stremmel, W., et al. (2004).** Enhanced caspase-8 recruitment to and activation at the DISC is critical for sensitisation of human hepatocellular carcinoma cells to TRAIL-induced apoptosis by chemotherapeutic drugs. *Cell Death Differ* 11 Suppl 1, S86-96.
- Georgakis, G. V., Li, Y., Humphreys, R., Andreeff, M., O'Brien, S., Younes, M., Carbone, A., Albert, V., and Younes, A. (2005).** Activity of selective fully human agonistic antibodies to the TRAIL death receptors TRAIL-R1 and TRAIL-R2 in primary and cultured lymphoma cells: induction of apoptosis and enhancement of doxorubicin- and bortezomib-induced cell death. *Br J Haematol* 130, 501-510.
- Gessler, M., Poustka, A., Cavenee, W., Neve, R. L., Orkin, S. H., and Bruns, G. A. (1990).** Homozygous deletion in Wilms tumours of a zinc-finger gene identified by chromosome jumping. *Nature* 343, 774-778.
- Giaccia, A. J., and Kastan, M. B. (1998).** The complexity of p53 modulation: emerging patterns from divergent signals. *Genes Dev* 12, 2973-2983.
- Gianni, M., Terao, M., Fortino, I., LiCalzi, M., Viggiano, V., Barbui, T., Rambaldi, A., and Garattini, E. (1997).** Stat1 is induced and activated by all-trans retinoic acid in acute promyelocytic leukemia cells. *Blood* 89, 1001-1012.
- Goessel, G., Quante, M., Hahn, W. C., Harada, H., Heeg, S., Suliman, Y., Doebele, M., von Werder, A., Fulda, C., Nakagawa, H., et al. (2005).** Creating oral squamous cancer cells: a cellular model of oral-esophageal carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 15599-15604.
- Goodman, R. H., and Smolik, S. (2000).** CBP/p300 in cell growth, transformation, and development. *Genes Dev* 14, 1553-1577.
- Grander, D. (1998).** How do mutated oncogenes and tumor suppressor genes cause cancer? *Med Oncol* 15, 20-26.
- Green, D. R., and Evan, G. I. (2002).** A matter of life and death. *Cancer Cell* 1, 19-30.
- Green, D. R., and Reed, J. C. (1998).** Mitochondria and apoptosis. *Science* 281, 1309-1312.
- Gregory, M. A., Qi, Y., and Hann, S. R. (2003).** Phosphorylation by glycogen synthase kinase-3 controls c-myc proteolysis and subnuclear localization. *J Biol Chem* 278, 51606-51612.

Grignani, F., De Matteis, S., Nervi, C., Tomassoni, L., Gelmetti, V., Cioce, M., Fanelli, M., Ruthardt, M., Ferrara, F. F., Zamir, I., et al. (1998). Fusion proteins of the retinoic acid receptor-alpha recruit histone deacetylase in promyelocytic leukaemia. *Nature* *391*, 815-818.

Gronemeyer, H., Gustafsson, J. A., and Laudet, V. (2004). Principles for modulation of the nuclear receptor superfamily. *Nat Rev Drug Design* *3*, 950-964.

Gruber, S. B., Ellis, N. A., Scott, K. K., Almog, R., Kolachana, P., Bonner, J. D., Kirchhoff, T., Tomsho, L. P., Nafa, K., Pierce, H., et al. (2002). BLM heterozygosity and the risk of colorectal cancer. *Science* *297*, 2013.

Gumy-Pause, F., Wacker, P., Maillet, P., Betts, D. R., and Sappino, A. P. (2006). ATM variants and predisposition to childhood T-lineage acute lymphoblastic leukaemia. *Leukemia* *20*, 526-527; author reply 527.

H

Hahn, W., Counter, C., Lundberg, A., Beijersbergen, R., Brooks, M., and Weinberg, R. (1999a). Creation of human tumour cells with defined genetic elements. *Nature* *400*, 464-468.

Hahn, W. C. (2002). Immortalization and transformation of human cells. *Mol Cells* *13*, 351-361.

Hahn, W. C. (2005). Telomere and telomerase dynamics in human cells. *Curr Mol Med* *5*, 227-231.

Hahn, W. C., Dessain, S. K., Brooks, M. W., King, J. E., Elenbaas, B., Sabatini, D. M., DeCaprio, J. A., and Weinberg, R. A. (2002). Enumeration of the simian virus 40 early region elements necessary for human cell transformation. *Mol Cell Biol* *22*, 2111-2123.

Hahn, W. C., Stewart, S. A., Brooks, M. W., York, S. G., Eaton, E., Kurachi, A., Beijersbergen, R. L., Knoll, J. H., Meyerson, M., and Weinberg, R. A. (1999b). Inhibition of telomerase limits the growth of human cancer cells. *Nat Med* *5*, 1164-1170.

Hahn, W. C., and Weinberg, R. A. (2002). Modelling the molecular circuitry of cancer. *Nat Rev Cancer* *2*, 331-341.

Hahne, M., Rimoldi, D., Schroter, M., Romero, P., Schreier, M., French, L. E., Schneider, P., Bornand, T., Fontana, A., Lienard, D., et al. (1996). Melanoma cell expression of Fas(Apo-1/CD95) ligand: implications for tumor immune escape. *Science* *274*, 1363-1366.

Halvorsen, T. L., Leibowitz, G., and Levine, F. (1999). Telomerase activity is sufficient to allow transformed cells to escape from crisis. *Mol Cell Biol* *19*, 1864-1870.

Han, D. K., Chaudhary, P. M., Wright, M. E., Friedman, C., Trask, B. J., Riedel, R. T., Baskin, D. G., Schwartz, S. M., and Hood, L. (1997). MRIT, a novel death-effector

domain-containing protein, interacts with caspases and BclXL and initiates cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* *94*, 11333-11338.

Hanahan, D., and Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* *100*, 57-70.

Harley, C. B. (1997). Human ageing and telomeres. *Ciba Found Symp* *211*, 129-139; discussion 139-144.

Harley, C. B., Futcher, A. B., and Greider, C. W. (1990). Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* *345*, 458-460.

Hayflick, L. (1965). The Limited in Vitro Lifetime of Human Diploid Cell Strains. *Exp Cell Res* *37*, 614-636.

Hayflick, L., and Moorhead, P. S. (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* *25*, 585-621.

He, L. Z., Guidez, F., Tribioli, C., Peruzzi, D., Ruthardt, M., Zelent, A., and Pandolfi, P. P. (1998). Distinct interactions of PML-RARalpha and PLZF-RARalpha with co-repressors determine differential responses to RA in APL. *Nat Genet* *18*, 126-135.

Hedenfalk, I., Duggan, D., Chen, Y., Radmacher, M., Bittner, M., Simon, R., Meltzer, P., Gusterson, B., Esteller, M., Kallioniemi, O. P., et al. (2001). Gene-expression profiles in hereditary breast cancer. *N Engl J Med* *344*, 539-548.

Hellebrekers, D. M., Griffioen, A. W., and van Engeland, M. (2006). Dual targeting of epigenetic therapy in cancer. *Biochim Biophys Acta*.

Herold, S., Wanzel, M., Beuger, V., Frohme, C., Beul, D., Hillukkala, T., Syvaioja, J., Saluz, H. P., Haenel, F., and Eilers, M. (2002). Negative regulation of the mammalian UV response by Myc through association with Miz-1. *Mol Cell* *10*, 509-521.

Herrera, R., and Sebolt-Leopold, J. S. (2002). Unraveling the complexities of the Raf/MAP kinase pathway for pharmacological intervention. *Trends Mol Med* *8*, S27-31.

Hickman, E. S., Moroni, M. C., and Helin, K. (2002). The role of p53 and pRB in apoptosis and cancer. *Curr Opin Genet Dev* *12*, 60-66.

Hoffmann, M. J., and Schulz, W. A. (2005). Causes and consequences of DNA hypomethylation in human cancer. *Biochem Cell Biol* *83*, 296-321.

Hopkins-Donaldson, S., Ziegler, A., Kurtz, S., Bigosch, C., Kandioler, D., Ludwig, C., Zangemeister-Witke, U., and Stahel, R. (2003). Silencing of death receptor and caspase-8 expression in small cell lung carcinoma cell lines and tumors by DNA methylation. *Cell Death Differ* *10*, 356-364.

Horak, P., Pils, D., Haller, G., Pribill, I., Roessler, M., Tomek, S., Horvat, R., Zeillinger, R., Zielinski, C., and Krainer, M. (2005). Contribution of epigenetic silencing of tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand receptor 1 (DR4) to TRAIL resistance and ovarian cancer. *Mol Cancer Res* *3*, 335-343.

- Hsu, H., Xiong, J., and Goeddel, D. V. (1995).** The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation. *Cell* 81, 495-504.
- Hu, S., Vincenz, C., Ni, J., Gentz, R., and Dixit, V. M. (1997).** I-FLICE, a novel inhibitor of tumor necrosis factor receptor-1- and CD-95-induced apoptosis. *J Biol Chem* 272, 17255-17257.
- Hu, W. H., Johnson, H., and Shu, H. B. (1999).** Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptors signal NF-kappaB and JNK activation and apoptosis through distinct pathways. *J Biol Chem* 274, 30603-30610.
- Huang, C., Ma, W. Y., Dawson, M. I., Rincon, M., Flavell, R. A., and Dong, Z. (1997).** Blocking activator protein-1 activity, but not activating retinoic acid response element, is required for the antitumor promotion effect of retinoic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 5826-5830.
- Hunter, T. (1991).** Cooperation between oncogenes. *Cell* 64, 249-270.
- Hymowitz, S. G., O'Connell, M. P., Ultsch, M. H., Hurst, A., Totpal, K., Ashkenazi, A., de Vos, A. M., and Kelley, R. F. (2000).** A unique zinc-binding site revealed by a high-resolution X-ray structure of homotrimeric Apo2L/TRAIL. *Biochemistry* 39, 633-640.
- I**
- Ichii, S., Horii, A., Nakatsuru, S., Furuyama, J., Utsunomiya, J., and Nakamura, Y. (1992).** Inactivation of both APC alleles in an early stage of colon adenomas in a patient with familial adenomatous polyposis (FAP). *Hum Mol Genet* 1, 387-390.
- Ichikawa, K., Liu, W., Zhao, L., Wang, Z., Liu, D., Ohtsuka, T., Zhang, H., Mountz, J. D., Koopman, W. J., Kimberly, R. P., and Zhou, T. (2001).** Tumoricidal activity of a novel anti-human DR5 monoclonal antibody without hepatocyte cytotoxicity. *Nat Med* 7, 954-960.
- Inohara, N., Koseki, T., Hu, Y., Chen, S., and Nunez, G. (1997).** CLARP, a death effector domain-containing protein interacts with caspase-8 and regulates apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 10717-10722.
- Insinga, A., Monestiroli, S., Ronzoni, S., Gelmetti, V., Marchesi, F., Viale, A., Altucci, L., Nervi, C., Minucci, S., and Pelicci, P. G. (2005).** Inhibitors of histone deacetylases induce tumor-selective apoptosis through activation of the death receptor pathway. *Nat Med* 11, 71-76.
- Irmeler, M., Thome, M., Hahne, M., Schneider, P., Hofmann, K., Steiner, V., Bodmer, J. L., Schroter, M., Burns, K., Mattmann, C., *et al.* (1997).** Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature* 388, 190-195.
- Iyer, N. G., Ozdag, H., and Caldas, C. (2004).** p300/CBP and cancer. *Oncogene* 23, 4225-4231.

J

- Janz, A., Seignani, C., Kenyon, K., Ngo, C. V., and Thomas-Tikhonenko, A. (2000).** Activation of the myc oncoprotein leads to increased turnover of thrombospondin-1 mRNA. *Nucleic Acids Res* 28, 2268-2275.
- Jeremias, I., Kupatt, C., Baumann, B., Herr, I., Wirth, T., and Debatin, K. M. (1998).** Inhibition of nuclear factor kappaB activation attenuates apoptosis resistance in lymphoid cells. *Blood* 91, 4624-4631.
- Jin, H., Yang, R., Fong, S., Totpal, K., Lawrence, D., Zheng, Z., Ross, J., Koeppen, H., Schwall, R., and Ashkenazi, A. (2004).** Apo2 ligand/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand cooperates with chemotherapy to inhibit orthotopic lung tumor growth and improve survival. *Cancer Res* 64, 4900-4905.
- 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.
- Johnstone, R. W. (2002).** Histone-deacetylase inhibitors: novel drugs for the treatment of cancer. *Nat Rev Drug Discov* 1, 287-299.
- Jones, P. A., and Baylin, S. B. (2002).** The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet* 3, 415-428.
- Jones, P. L., Veenstra, G. J., Wade, P. A., Vermaak, D., Kass, S. U., Landsberger, N., Strouboulis, J., and Wolffe, A. P. (1998).** Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nat Genet* 19, 187-191.

K

- Kandasamy, K., Srinivasula, S. M., Alnemri, E. S., Thompson, C. B., Korsmeyer, S. J., Bryant, J. L., and Srivastava, R. K. (2003).** Involvement of proapoptotic molecules Bax and Bak in tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced mitochondrial disruption and apoptosis: differential regulation of cytochrome c and Smac/DIABLO release. *Cancer Res* 63, 1712-1721.
- Kang, K. S., Sun, W., Nomata, K., Morita, I., Cruz, A., Liu, C. J., Trosko, J. E., and Chang, C. C. (1998).** Involvement of tyrosine phosphorylation of p185(c-erbB2/neu) in tumorigenicity induced by X-rays and the neu oncogene in human breast epithelial cells. *Mol Carcinog* 21, 225-233.

- Kauffmann-Zeh, A., Rodriguez-Viciana, P., Ulrich, E., Gilbert, C., Coffey, P., Downward, J., and Evan, G. (1997).** Suppression of c-Myc-induced apoptosis by Ras signalling through PI(3)K and PKB. *Nature* *385*, 544-548.
- Keane, M. M., Ettenberg, S. A., Nau, M. M., Russell, E. K., and Lipkowitz, S. (1999).** Chemotherapy augments TRAIL-induced apoptosis in breast cell lines. *Cancer Res* *59*, 734-741.
- Keino-Masu, K., Masu, M., Hinck, L., Leonardo, E. D., Chan, S. S., Culotti, J. G., and Tessier-Lavigne, M. (1996).** Deleted in Colorectal Cancer (DCC) encodes a netrin receptor. *Cell* *87*, 175-185.
- Kelley, S. K., and Ashkenazi, A. (2004).** Targeting death receptors in cancer with Apo2L/TRAIL. *Curr Opin Pharmacol* *4*, 333-339.
- 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.
- Kendall, S. D., Adam, S. J., and Counter, C. M. (2006).** Genetically engineered human cancer models utilizing mammalian transgene expression. *Cell Cycle* *5*, 1074-1079.
- Kendall, S. D., Linardic, C. M., Adam, S. J., and Counter, C. M. (2005).** A network of genetic events sufficient to convert normal human cells to a tumorigenic state. *Cancer Res* *65*, 9824-9828.
- Khwaja, A., Rodriguez-Viciana, P., Wennstrom, S., Warne, P. H., and Downward, J. (1997).** Matrix adhesion and Ras transformation both activate a phosphoinositide 3-OH kinase and protein kinase B/Akt cellular survival pathway. *Embo J* *16*, 2783-2793.
- Kim, C. F., Jackson, E. L., Woolfenden, A. E., Lawrence, S., Babar, I., Vogel, S., Crowley, D., Bronson, R. T., and Jacks, T. (2005).** Identification of bronchioalveolar stem cells in normal lung and lung cancer. *Cell* *121*, 823-835.
- Kim, K., Takimoto, R., Dicker, D. T., Chen, Y., Gazitt, Y., and El-Deiry, W. S. (2001).** Enhanced TRAIL sensitivity by p53 overexpression in human cancer but not normal cell lines. *Int J Oncol* *18*, 241-247.
- Kim, Y., Suh, N., Sporn, M., and Reed, J. C. (2002).** An inducible pathway for degradation of FLIP protein sensitizes tumor cells to TRAIL-induced apoptosis. *J Biol Chem* *277*, 22320-22329.
- Kimberley, F. C., and Screaton, G. R. (2004).** Following a TRAIL: update on a ligand and its five receptors. *Cell Res* *14*, 359-372.
- Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. (1997).** Cancer-susceptibility genes. Gatekeepers and caretakers. *Nature* *386*, 761, 763.

- 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.
- Kischkel, F. C., Lawrence, D. A., Tinel, A., LeBlanc, H., Virmani, A., Schow, P., Gazdar, A., Blenis, J., Arnott, D., and Ashkenazi, A. (2001).** Death receptor recruitment of endogenous caspase-10 and apoptosis initiation in the absence of caspase-8. *J Biol Chem* *276*, 46639-46646.
- Kiyono, T., Foster, S. A., Koop, J. I., McDougall, J. K., Galloway, D. A., and Klingelutz, A. J. (1998).** Both Rb/p16INK4a inactivation and telomerase activity are required to immortalize human epithelial cells. *Nature* *396*, 84-88.
- Klose, R. J., Kallin, E. M., and Zhang, Y. (2006).** JmjC-domain-containing proteins and histone demethylation. *Nat Rev Genet* *7*, 715-727.
- Knight, M. J., Riffkin, C. D., Ekert, P. G., Ashley, D. M., and Hawkins, C. J. (2004).** Caspase-8 levels affect necessity for mitochondrial amplification in death ligand-induced glioma cell apoptosis. *Mol Carcinog* *39*, 173-182.
- Knudson, A. G. (2001).** Two genetic hits (more or less) to cancer. *Nat Rev Cancer* *1*, 157-162.
- Knudson, A. G., Jr. (1971).** Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* *68*, 820-823.
- Knudson, A. G., Jr. (1991).** Overview: genes that predispose to cancer. *Mutat Res* *247*, 185-190.
- Knudson, A. G., Jr., Meadows, A. T., Nichols, W. W., and Hill, R. (1976).** Chromosomal deletion and retinoblastoma. *N Engl J Med* *295*, 1120-1123.
- Kopf, E., Plassat, J. L., Vivat, V., de The, H., Chambon, P., and Rochette-Egly, C. (2000).** Dimerization with retinoid X receptors and phosphorylation modulate the retinoic acid-induced degradation of retinoic acid receptors alpha and gamma through the ubiquitin-proteasome pathway. *J Biol Chem* *275*, 33280-33288.
- Krammer, P. H. (2000).** CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* *407*, 789-795.
- Kroemer, G. (1998).** The mitochondrion as an integrator/coordinator of cell death pathways. *Cell Death Differ* *5*, 547.
- Krueger, A., Schmitz, I., Baumann, S., Krammer, P. H., and Kirchhoff, S. (2001).** Cellular FLICE-inhibitory protein splice variants inhibit different steps of caspase-8 activation at the CD95 death-inducing signaling complex. *J Biol Chem* *276*, 20633-20640.

L

- Lacoste, N., Utley, R. T., Hunter, J. M., Poirier, G. G., and Cote, J. (2002).** Disruptor of telomeric silencing-1 is a chromatin-specific histone H3 methyltransferase. *J Biol Chem* 277, 30421-30424.
- Lacour, S., Micheau, O., Hammann, A., Drouineaud, V., Tschopp, J., Solary, E., and Dimanche-Boitrel, M. T. (2003).** Chemotherapy enhances TNF-related apoptosis-inducing ligand DISC assembly in HT29 human colon cancer cells. *Oncogene* 22, 1807-1816.
- Laird, P. W., Jackson-Grusby, L., Fazeli, A., Dickinson, S. L., Jung, W. E., Li, E., Weinberg, R. A., and Jaenisch, R. (1995).** Suppression of intestinal neoplasia by DNA hypomethylation. *Cell* 81, 197-205.
- Lallemand-Breitenbach, V., Guillemin, M. C., Janin, A., Daniel, M. T., Degos, L., Kogan, S. C., Bishop, J. M., and de The, H. (1999).** Retinoic acid and arsenic synergize to eradicate leukemic cells in a mouse model of acute promyelocytic leukemia. *J Exp Med* 189, 1043-1052.
- Lamhamedi-Cherradi, S. E., Zheng, S. J., Maguschak, K. A., Peschon, J., and Chen, Y. H. (2003).** Defective thymocyte apoptosis and accelerated autoimmune diseases in TRAIL^{-/-} mice. *Nat Immunol* 4, 255-260.
- Land, H., Chen, A. C., Morgenstern, J. P., Parada, L. F., and Weinberg, R. A. (1986).** Behavior of myc and ras oncogenes in transformation of rat embryo fibroblasts. *Mol Cell Biol* 6, 1917-1925.
- Land, H., Parada, L. F., and Weinberg, R. A. (1983).** Tumorigenic conversion of primary embryo fibroblasts requires at least two cooperating oncogenes. *Nature* 304, 596-602.
- 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.
- Lazarov, M., Kubo, Y., Cai, T., Dajee, M., Tarutani, M., Lin, Q., Fang, M., Tao, S., Green, C. L., and Khavari, P. A. (2002).** CDK4 coexpression with Ras generates malignant human epidermal tumorigenesis. *Nat Med* 8, 1105-1114.
- LeBlanc, H., Lawrence, D., Varfolomeev, E., Totpal, K., Morlan, J., Schow, P., Fong, S., Schwall, R., Sinicropi, D., and Ashkenazi, A. (2002).** Tumor-cell resistance to death receptor-induced apoptosis through mutational inactivation of the proapoptotic Bcl-2 homolog Bax. *Nat Med* 8, 274-281.
- LeBlanc, H. N., and Ashkenazi, A. (2003).** Apo2L/TRAIL and its death and decoy receptors. *Cell Death Differ* 10, 66-75.
- Lee, H. O., Herndon, J. M., Barreiro, R., Griffith, T. S., and Ferguson, T. A. (2002).** TRAIL: a mechanism of tumor surveillance in an immune privileged site. *J Immunol* 169, 4739-4744.

- Lengauer, C., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. (1998).** Genetic instabilities in human cancers. *Nature* 396, 643-649.
- Lessard, J., and Sauvageau, G. (2003).** Bmi-1 determines the proliferative capacity of normal and leukaemic stem cells. *Nature* 423, 255-260.
- Leverkus, M., Sprick, M. R., Wachter, T., Denk, A., Brocker, E. B., Walczak, H., and Neumann, M. (2003).** TRAIL-induced apoptosis and gene induction in HaCaT keratinocytes: differential contribution of TRAIL receptors 1 and 2. *J Invest Dermatol* 121, 149-155.
- Levine, A. J. (1997).** p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 88, 323-331.
- Li, H., Zhu, H., Xu, C. J., and Yuan, J. (1998).** Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 94, 491-501.
- Liang, J., Prouty, L., Williams, B. J., Dayton, M. A., and Blanchard, K. L. (1998).** Acute mixed lineage leukemia with an inv(8)(p11q13) resulting in fusion of the genes for MOZ and TIF2. *Blood* 92, 2118-2122.
- Lin, R. J., and Evans, R. M. (2000).** Acquisition of oncogenic potential by RAR chimeras in acute promyelocytic leukemia through formation of homodimers. *Mol Cell* 5, 821-830.
- Linardic, C. M., Downie, D. L., Qualman, S., Bentley, R. C., and Counter, C. M. (2005).** Genetic modeling of human rhabdomyosarcoma. *Cancer Res* 65, 4490-4495.
- Lipinski, M. M., and Jacks, T. (1999).** The retinoblastoma gene family in differentiation and development. *Oncogene* 18, 7873-7882.
- Lippman, S. M., Glisson, B. S., Kavanagh, J. J., Lotan, R., Hong, W. K., Paredes-Espinoza, M., Hittelman, W. N., Holdener, E. E., and Krakoff, I. H. (1993).** Retinoic acid and interferon combination studies in human cancer. *Eur J Cancer* 294, S9-13.
- Lippman, S. M., Kalvakolanu, D. V., and Lotan, R. (1996).** Retinoids and interferons in non-melanoma skin cancer. *J Invest Dermatol Symp Proc* 1, 219-222.
- Lippman, S. M., and Lotan, R. (2000).** Advances in the development of retinoids as chemopreventive agents. *J Nutr* 130, 479S-482S.
- Liu, X., Yue, P., Khuri, F. R., and Sun, S. Y. (2005).** Decoy receptor 2 (DcR2) is a p53 target gene and regulates chemosensitivity. *Cancer Res* 65, 9169-9175.
- Llambi, F., Lourenco, F. C., Gozuacik, D., Guix, C., Pays, L., Del Rio, G., Kimchi, A., and Mehlen, P. (2005).** The dependence receptor UNC5H2 mediates apoptosis through DAP-kinase. *Embo J* 24, 1192-1201.
- Lotan, R. (1996).** Retinoids in cancer chemoprevention. *FASEB J* 10, 1031-1039.
- Lowy, D. R., and Willumsen, B. M. (1993).** Function and regulation of ras. *Annu Rev Biochem* 62, 851-891.

Lundberg, A. S., Randell, S. H., Stewart, S. A., Elenbaas, B., Hartwell, K. A., Brooks, M. W., Fleming, M. D., Olsen, J. C., Miller, S. W., Weinberg, R. A., and Hahn, W. C. (2002). Immortalization and transformation of primary human airway epithelial cells by gene transfer. *Oncogene* *21*, 4577-4586.

M

MacFarlane, M. (2003). TRAIL-induced signalling and apoptosis. *Toxicol Lett* *139*, 89-97.

MacFarlane M, A. M., Srinivasula SM, Fernandes-Alnemri T, Cohen GM, Alnemri ES. (1997). Identification and molecular cloning of two novel receptors for the cytotoxic ligand TRAIL. *J Biol Chem* *272*, 25417-25420.

MacKenzie, K. L., Franco, S., Naiyer, A. J., May, C., Sadelain, M., Rafii, S., and Moore, M. A. (2002). Multiple stages of malignant transformation of human endothelial cells modelled by co-expression of telomerase reverse transcriptase, SV40 T antigen and oncogenic N-ras. *Oncogene* *21*, 4200-4211.

Magnusson, C., and Vaux, D. L. (1999). Signalling by CD95 and TNF receptors: not only life and death. *Immunol Cell Biol* *77*, 41-46.

Malhi, H., and Gores, G. J. (2006). TRAIL resistance results in cancer progression: a TRAIL to perdition? *Oncogene*.

Marcu, K. B., Bossone, S. A., and Patel, A. J. (1992). myc function and regulation. *Annu Rev Biochem* *61*, 809-860.

Marks, P., Rifkind, R., Richon, V., Breslow, R., Miller, T., and Kelly, W. (2001). Histone deacetylases and cancer: causes and therapies. *Nat Rev Cancer* *1*, 194-202.

Marsters, S. A., Sheridan, J. P., Pitti, R. M., Huang, A., Skubatch, M., Baldwin, D., Yuan, J., Gurney, A., Goddard, A. D., Godowski, P., and Ashkenazi, A. (1997). A novel receptor for Apo2L/TRAIL contains a truncated death domain. *Curr Biol* *7*, 1003-1006.

Marx, J. (2003). Cancer research. Mutant stem cells may seed cancer. *Science* *301*, 1308-1310.

Masutomi, K., Yu, E. Y., Khurts, S., Ben-Porath, I., Currier, J. L., Metz, G. B., Brooks, M. W., Kaneko, S., Murakami, S., DeCaprio, J. A., et al. (2003). Telomerase maintains telomere structure in normal human cells. *Cell* *114*, 241-253.

Matikainen, S., Ronni, T., Hurme, M., Pine, R., and Julkunen, I. (1996). Retinoic acid activates interferon regulatory factor-1 gene expression in myeloid cells. *Blood* *88*, 114-123.

Mazelin, L., Bernet, A., Bonod-Bidaud, C., Pays, L., Arnaud, S., Gespach, C., Bredesen, D. E., Scoazec, J. Y., and Mehlen, P. (2004). Netrin-1 controls colorectal tumorigenesis by regulating apoptosis. *Nature* *431*, 80-84.

- McCormick, F. (1999).** Signalling networks that cause cancer. *Trends Cell Biol* *9*, M53-56.
- McCormick, F. (2001).** Cancer gene therapy: fringe or cutting edge? *Nat Rev Cancer* *1*, 130-141.
- McCormick, J. J., Fry, D. G., Hurlin, P. J., Morgan, T. L., Wilson, D. M., and Maher, V. M. (1990).** Malignant transformation of human fibroblasts by oncogene transfection or carcinogen treatment. *Prog Clin Biol Res* *340D*, 195-205.
- McDonnell, M. A., Wang, D., Khan, S. M., Vander Heiden, M. G., and Kelekar, A. (2003).** Caspase-9 is activated in a cytochrome c-independent manner early during TNF α -induced apoptosis in murine cells. *Cell Death Differ* *10*, 1005-1015.
- McMahon, S. B., Wood, M. A., and Cole, M. D. (2000).** The essential cofactor TRRAP recruits the histone acetyltransferase hGCN5 to c-Myc. *Mol Cell Biol* *20*, 556-562.
- Mehlen, P., and Llambi, F. (2005).** Role of netrin-1 and netrin-1 dependence receptors in colorectal cancers. *Br J Cancer* *93*, 1-6.
- Mehlen, P., and Puisieux, A. (2006).** Metastasis: a question of life or death. *Nat Rev Cancer* *6*, 449-458.
- Mendelsohn, J., and Baselga, J. (2000).** The EGF receptor family as targets for cancer therapy. *Oncogene* *19*, 6550-6565.
- Merino, 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. *Mol Cell Biol* *26*, 7046-7055.
- Merlo, A., Herman, J. G., Mao, L., Lee, D. J., Gabrielson, E., Burger, P. C., Baylin, S. B., and Sidransky, D. (1995).** 5' CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumour suppressor p16/CDKN2/MTS1 in human cancers. *Nat Med* *1*, 686-692.
- Metzger, D., Clifford, J., Chiba, H., and Chambon, P. (1995).** Conditional site-specific recombination in mammalian cells using a ligand-dependent chimeric Cre recombinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* *92*, 6991-6995.
- Micheau, O., Lens, S., Gaide, O., Alevizopoulos, K., and Tschopp, J. (2001).** NF-kappaB 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 Grutter, 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., and Tschopp, J. (2003).** Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell* *114*, 181-190.

- Miki, Y., Swensen, J., Shattuck-Eidens, D., Futreal, P. A., Harshman, K., Tavtigian, S., Liu, Q., Cochran, C., Bennett, L. M., Ding, W., and et al. (1994).** A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science* 266, 66-71.
- Minucci, S., Maccarana, M., Ciocce, M., De Luca, P., Gelmetti, V., Segalla, S., Di Croce, L., Giavara, S., Matteucci, C., Gobbi, A., et al. (2000).** Oligomerization of RAR and AML1 transcription factors as a novel mechanism of oncogenic activation. *Mol Cell* 5, 811-820.
- Minucci, S., and Pelicci, P. G. (2006).** Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatments for cancer. *Nat Rev Cancer* 6, 38-51.
- Mitsiades, C. S., Treon, S. P., Mitsiades, N., Shima, Y., Richardson, P., Schlossman, R., Hideshima, T., and Anderson, K. C. (2001).** TRAIL/Apo2L ligand selectively induces apoptosis and overcomes drug resistance in multiple myeloma: therapeutic applications. *Blood* 98, 795-804.
- Miyashita, T., Krajewski, S., Krajewska, M., Wang, H. G., Lin, H. K., Liebermann, D. A., Hoffman, B., and Reed, J. C. (1994).** Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene* 9, 1799-1805.
- Molofsky, A. V., He, S., Bydon, M., Morrison, S. J., and Pardal, R. (2005).** Bmi-1 promotes neural stem cell self-renewal and neural development but not mouse growth and survival by repressing the p16Ink4a and p19Arf senescence pathways. *Genes Dev* 19, 1432-1437.
- Moore, D. M., Kalvakolanu, D. V., Lippman, S. M., Kavanagh, J. J., Hong, W. K., Borden, E. C., Paredes-Espinoza, M., and Krakoff, I. H. (1994).** Retinoic acid and interferon in human cancer: mechanistic and clinical studies. *Semin Hematol* 31, 31-37.
- Morales, C. P., Holt, S. E., Ouellette, M., Kaur, K. J., Yan, Y., Wilson, K. S., White, M. A., Wright, W. E., and Shay, J. W. (1999).** Absence of cancer-associated changes in human fibroblasts immortalized with telomerase. *Nat Genet* 21, 115-118.
- Moreno, C. S., Ramachandran, S., Ashby, D. G., Laycock, N., Plattner, C. A., Chen, W., Hahn, W. C., and Pallas, D. C. (2004).** Signaling and transcriptional changes critical for transformation of human cells by simian virus 40 small tumor antigen or protein phosphatase 2A B56gamma knockdown. *Cancer Res* 64, 6978-6988.
- Mori, E., Thomas, M., Motoki, K., Nakazawa, K., Tahara, T., Tomizuka, K., Ishida, I., and Kataoka, S. (2004).** Human normal hepatocytes are susceptible to apoptosis signal mediated by both TRAIL-R1 and TRAIL-R2. *Cell Death Differ* 11, 203-207.
- Motoki, K., Mori, E., Matsumoto, A., Thomas, M., Tomura, T., Humphreys, R., Albert, V., Muto, M., Yoshida, H., Aoki, M., et al. (2005).** Enhanced apoptosis and tumor regression induced by a direct agonist antibody to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor 2. *Clin Cancer Res* 11, 3126-3135.
- Munshi, A., Pappas, G., Honda, T., McDonnell, T. J., Younes, A., Li, Y., and Meyn, R. E. (2001).** TRAIL (APO-2L) induces apoptosis in human prostate cancer cells that is inhibitable by Bcl-2. *Oncogene* 20, 3757-3765.

Muppidi, J. R., Tschopp, J., and Siegel, R. M. (2004). Life and death decisions: secondary complexes and lipid rafts in TNF receptor family signal transduction. *Immunity* *21*, 461-465.

Muzio, M., Stockwell, B. R., Stennicke, H. R., Salvesen, G. S., and Dixit, V. M. (1998). An induced proximity model for caspase-8 activation. *J Biol Chem* *273*, 2926-2930.

N

Naka, T., Sugamura, K., Hylander, B. L., Widmer, M. B., Rustum, Y. M., and Repasky, E. A. (2002). Effects of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand alone and in combination with chemotherapeutic agents on patients' colon tumors grown in SCID mice. *Cancer Res* *62*, 5800-5806.

Nakamura, T. M., and Cech, T. R. (1998). Reversing time: origin of telomerase. *Cell* *92*, 587-590.

Nam, S. Y., Jung, G. A., Hur, G. C., Chung, H. Y., Kim, W. H., Seol, D. W., and Lee, B. L. (2003). Upregulation of FLIP(S) by Akt, a possible inhibition mechanism of TRAIL-induced apoptosis in human gastric cancers. *Cancer Sci* *94*, 1066-1073.

Nan, X., Ng, H. H., Johnson, C. A., Laherty, C. D., Turner, B. M., Eisenman, R. N., and Bird, A. (1998). Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature* *393*, 386-389.

Nebbio, A., Clarke, N., Voltz, E., Germain, E., Ambrosino, C., Bontempo, P., Alvarez, R., Schiavone, E. M., Ferrara, F., Bresciani, F., *et al.* (2005). Tumor-selective action of HDAC inhibitors involves TRAIL induction in acute myeloid leukemia cells. *Nat Med* *11*, 77-84.

Nelson, C. J., Santos-Rosa, H., and Kouzarides, T. (2006). Proline isomerization of histone H3 regulates lysine methylation and gene expression. *Cell* *126*, 905-916.

Nervi, C., Ferrara, F. F., Fanelli, M., Rippo, M. R., Tomassini, B., Ferrucci, P. F., Ruthardt, M., Gelmetti, V., Gambacorti-Passerini, C., Diverio, D., *et al.* (1998). Caspases mediate retinoic acid-induced degradation of the acute promyelocytic leukemia PML/RARalpha fusion protein. *Blood* *92*, 2244-2251.

Nesterov, A., Ivashchenko, Y., and Kraft, A. S. (2002). Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) triggers apoptosis in normal prostate epithelial cells. *Oncogene* *21*, 1135-1140.

Nesterov, A., Nikrad, M., Johnson, T., and Kraft, A. S. (2004). Oncogenic Ras sensitizes normal human cells to tumor necrosis factor-alpha-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis. *Cancer Res* *64*, 3922-3927.

Nieda, M., Nicol, A., Koezuka, Y., Kikuchi, A., Lapteva, N., Tanaka, Y., Tokunaga, K., Suzuki, K., Kayagaki, N., Yagita, H., *et al.* (2001). TRAIL expression by activated human

CD4(+)Valpha24NKT cells induces in vitro and in vivo apoptosis of human acute myeloid leukemia cells. *Blood* 97, 2067-2074.

Nimmanapalli, R., Perkins, C. L., Orlando, M., O'Bryan, E., Nguyen, D., and Bhalla, K. N. (2001). Pretreatment with paclitaxel enhances apo-2 ligand/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis of prostate cancer cells by inducing death receptors 4 and 5 protein levels. *Cancer Res* 61, 759-763.

Nitsch, R., Bechmann, I., Deisz, R. A., Haas, D., Lehmann, T. N., Wendling, U., and Zipp, F. (2000). Human brain-cell death induced by tumour-necrosis-factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). *Lancet* 356, 827-828.

Nowell, P. C. (1976). The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 194, 23-28.

Nowell, P. C. (1989). The clonal nature of neoplasia. *Cancer Cells* 1, 29-30.

O

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.

Okuno, M., Kojima, S., Matsushima-Nishiwaki, R., Tsurumi, H., Muto, Y., Friedman, S., and Moriwaki, H. (2004). Retinoids in cancer chemoprevention. *Curr Cancer Drug Targets* 4, 285-298.

Orlowski, R. Z., and Baldwin, A. S., Jr. (2002). NF-kappaB as a therapeutic target in cancer. *Trends Mol Med* 8, 385-389.

Oya, M., Ohtsubo, M., Takayanagi, A., Tachibana, M., Shimizu, N., and Murai, M. (2001). Constitutive activation of nuclear factor-kappaB prevents TRAIL-induced apoptosis in renal cancer cells. *Oncogene* 20, 3888-3896.

Ozoren, N., and El-Deiry, W. S. (2002). Defining characteristics of Types I and II apoptotic cells in response to TRAIL. *Neoplasia* 4, 551-557.

P

Pan, G., Ni, J., Yu, G., Wei, Y. F., and Dixit, V. M. (1998). TRUNDD, a new member of the TRAIL receptor family that antagonizes TRAIL signalling. *FEBS Lett* 424, 41-45.

Pan, G., O'Rourke, K., Chinnaian, A. M., Gentz, R., Ebner, R., Ni, J., and Dixit, V. M. (1997). The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *Science* 276, 111-113.

Panner, A., James, C. D., Berger, M. S., and Pieper, R. O. (2005). mTOR controls FLIPS translation and TRAIL sensitivity in glioblastoma multiforme cells. *Mol Cell Biol* 25, 8809-8823.

- Pardal, R., Clarke, M. F., and Morrison, S. J. (2003).** Applying the principles of stem-cell biology to cancer. *Nat Rev Cancer* 3, 895-902.
- Park, S. M., Schickel, R., and Peter, M. E. (2005).** Nonapoptotic functions of FADD-binding death receptors and their signaling molecules. *Curr Opin Cell Biol* 17, 610-616.
- Pelengaris, S., Khan, M., and Evan, G. (2002).** c-MYC: more than just a matter of life and death. *Nat Rev Cancer* 2, 764-776.
- Pelicano, L., Li, F., Schindler, C., and Chelbi-Alix, M. K. (1997).** Retinoic acid enhances the expression of interferon-induced proteins: evidence for multiple mechanisms of action. *Oncogene* 15, 2349-2359.
- Petak, I., Douglas, L., Tillman, D. M., Vernes, R., and Houghton, J. A. (2000).** Pediatric rhabdomyosarcoma cell lines are resistant to Fas-induced apoptosis and highly sensitive to TRAIL-induced apoptosis. *Clin Cancer Res* 6, 4119-4127.
- Peter, M. E., and Krammer, P. H. (2003).** The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond. *Cell Death Differ* 10, 26-35.
- Peukert, K., Staller, P., Schneider, A., Carmichael, G., Hanel, F., and Eilers, M. (1997).** An alternative pathway for gene regulation by Myc. *Embo J* 16, 5672-5686.
- 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.
- Pollack, I. F., Erff, M., and Ashkenazi, A. (2001).** Direct stimulation of apoptotic signaling by soluble Apo21/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand leads to selective killing of glioma cells. *Clin Cancer Res* 7, 1362-1369.
- Prendergast, G. C. (1999).** Mechanisms of apoptosis by c-Myc. *Oncogene* 18, 2967-2987.
- Prendergast, G. C., and Ziff, E. B. (1991).** Methylation-sensitive sequence-specific DNA binding by the c-Myc basic region. *Science* 251, 186-189.
- Press, M. F., Jones, L. A., Godolphin, W., Edwards, C. L., and Slamon, D. J. (1990).** HER-2/neu oncogene amplification and expression in breast and ovarian cancers. *Prog Clin Biol Res* 354A, 209-221.
- Pukac, L., Kanakaraj, P., Humphreys, R., Alderson, R., Bloom, M., Sung, C., Riccobene, T., Johnson, R., Fiscella, M., Mahoney, A., et al. (2005).** HGS-ETR1, a fully human TRAIL-receptor 1 monoclonal antibody, induces cell death in multiple tumour types in vitro and in vivo. *Br J Cancer* 92, 1430-1441.

R

- Rasper, D. M., Vaillancourt, J. P., Hadano, S., Houtzager, V. M., Seiden, I., Keen, S. L., Tawa, P., Xanthoudakis, S., Nasir, J., Martindale, D., et al. (1998).** Cell death attenuation by 'Usurpin', a mammalian DED-caspase homologue that precludes caspase-8 recruitment and activation by the CD-95 (Fas, APO-1) receptor complex. *Cell Death Differ* 5, 271-288.
- Ravi, R., Bedi, G. C., Engstrom, L. W., Zeng, Q., Mookerjee, B., Gelinas, C., Fuchs, E. J., and Bedi, A. (2001).** Regulation of death receptor expression and TRAIL/Apo2L-induced apoptosis by NF-kappaB. *Nat Cell Biol* 3, 409-416.
- Ray, S., and Almasan, A. (2003).** Apoptosis induction in prostate cancer cells and xenografts by combined treatment with Apo2 ligand/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand and CPT-11. *Cancer Res* 63, 4713-4723.
- Reya, T., Morrison, S. J., Clarke, M. F., and Weissman, I. L. (2001).** Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 414, 105-111.
- Ricci, M. S., Jin, Z., Dews, M., Yu, D., Thomas-Tikhonenko, A., Dicker, D. T., and El-Deiry, W. S. (2004).** Direct repression of FLIP expression by c-myc is a major determinant of TRAIL sensitivity. *Mol Cell Biol* 24, 8541-8555.
- Rich, J. N., Guo, C., McLendon, R. E., Bigner, D. D., Wang, X. F., and Counter, C. M. (2001).** A genetically tractable model of human glioma formation. *Cancer Res* 61, 3556-3560.
- Richon, V. M., Sandhoff, T. W., Rifkind, R. A., and Marks, P. A. (2000).** Histone deacetylase inhibitor selectively induces p21WAF1 expression and gene-associated histone acetylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 10014-10019.
- Riedl, S. J., and Shi, Y. (2004).** Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 897-907.
- Rieger, P. T. (2004).** The biology of cancer genetics. *Semin Oncol Nurs* 20, 145-154.
- Rimondi, E., Secchiero, P., Quaroni, A., Zerbinati, C., Capitani, S., and Zauli, G. (2006).** Involvement of TRAIL/TRAIL-receptors in human intestinal cell differentiation. *J Cell Physiol* 206, 647-654.
- Ross, J. S., and Fletcher, J. A. (1999).** HER-2/neu (c-erb-B2) gene and protein in breast cancer. *Am J Clin Pathol* 112, S53-67.
- Ross, J. S., Fletcher, J. A., Linette, G. P., Stec, J., Clark, E., Ayers, M., Symmans, W. F., Puztai, L., and Bloom, K. J. (2003).** The Her-2/neu gene and protein in breast cancer 2003: biomarker and target of therapy. *Oncologist* 8, 307-325.
- Rottmann, S., Wang, Y., Nasoff, M., Deveraux, Q. L., and Quon, K. C. (2005).** A TRAIL receptor-dependent synthetic lethal relationship between MYC activation and GSK3beta/FBW7 loss of function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 15195-15200.

Ruediger, R., Pham, H. T., and Walter, G. (2001). Alterations in protein phosphatase 2A subunit interaction in human carcinomas of the lung and colon with mutations in the A beta subunit gene. *Oncogene* *20*, 1892-1899.

Ruley, H. E. (1983). Adenovirus early region 1A enables viral and cellular transforming genes to transform primary cells in culture. *Nature* *304*, 602-606.

S

Sager, R. (1991). Senescence as a mode of tumor suppression. *Environ Health Perspect* *93*, 59-62.

Sarkar, S., Julicher, K. P., Burger, M. S., Della Valle, V., Larsen, C. J., Yeager, T. R., Grossman, T. B., Nickells, R. W., Protzel, C., Jarrard, D. F., and Reznikoff, C. A. (2000). Different combinations of genetic/epigenetic alterations inactivate the p53 and pRb pathways in invasive human bladder cancers. *Cancer Res* *60*, 3862-3871.

Sato, K., Hida, S., Takayanagi, H., Yokochi, T., Kayagaki, N., Takeda, K., Yagita, H., Okumura, K., Tanaka, N., Taniguchi, T., and Ogasawara, K. (2001). Antiviral response by natural killer cells through TRAIL gene induction by IFN-alpha/beta. *Eur J Immunol* *31*, 3138-3146.

Scaffidi, C., Fulda, S., Srinivasan, A., Friesen, C., Li, F., Tomaselli, K. J., Debatin, K. M., Krammer, P. H., and Peter, M. E. (1998). Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J* *17*, 1675-1687.

Scaffidi, C., Schmitz, I., Krammer, P. H., and Peter, M. E. (1999). The role of c-FLIP in modulation of CD95-induced apoptosis. *J Biol Chem* *274*, 1541-1548.

Schneider, P. (2000). Production of recombinant TRAIL and TRAIL receptor: Fc chimeric proteins. *Methods Enzymol* *322*, 325-345.

Schneider, P., Olson, D., Tardivel, A., Browning, B., Lugovskoy, A., Gong, D., Dobles, M., Hertig, S., Hofmann, K., Van Vlijmen, H., *et al.* (2003). Identification of a new murine tumor necrosis factor receptor locus that contains two novel murine receptors for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). *J Biol Chem* *278*, 5444-5454.

Sears, R., Nuckolls, F., Haura, E., Taya, Y., Tamai, K., and Nevins, J. R. (2000). Multiple Ras-dependent phosphorylation pathways regulate Myc protein stability. *Genes Dev* *14*, 2501-2514.

Secchiero, P., Melloni, E., Heikinheimo, M., Mannisto, S., Di Pietro, R., Iacone, A., and Zauli, G. (2004). TRAIL regulates normal erythroid maturation through an ERK-dependent pathway. *Blood* *103*, 517-522.

Sedger, L. M., Glaccum, M. B., Schuh, J. C., Kanaly, S. T., Williamson, E., Kayagaki, N., Yun, T., Smolak, P., Le, T., Goodwin, R., and Gliniak, B. (2002). Characterization of

the in vivo function of TNF-alpha-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL/Apo2L, using TRAIL/Apo2L gene-deficient mice. *Eur J Immunol* 32, 2246-2254.

Seigneurin-Venin, S., Bernard, V., Moisset, P. A., Ouellette, M. M., Mouly, V., Di Donna, S., Wright, W. E., and Tremblay, J. P. (2000). Transplantation of normal and DMD myoblasts expressing the telomerase gene in SCID mice. *Biochem Biophys Res Commun* 272, 362-369.

Senderowicz, A. M. (2003). Novel small molecule cyclin-dependent kinases modulators in human clinical trials. *Cancer Biol Ther* 2, S84-95.

Serrano, M., Lin, A. W., McCurrach, M. E., Beach, D., and Lowe, S. W. (1997). Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* 88, 593-602.

Sharp, D. A., Lawrence, D. A., and Ashkenazi, A. (2005). Selective knockdown of the long variant of cellular FLICE inhibitory protein augments death receptor-mediated caspase-8 activation and apoptosis. *J Biol Chem* 280, 19401-19409.

Sheridan, J. P., Marsters, S. A., Pitti, R. M., Gurney, A., Skubatch, M., Baldwin, D., Ramakrishnan, L., Gray, C. L., Baker, K., Wood, W. I., et al. (1997). Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors *Science* 277, 818-821.

Sherr, C. J. (2004). Principles of tumor suppression. *Cell* 116, 235-246.

Shetty, S., Gladden, J. B., Henson, E. S., Hu, X., Villanueva, J., Haney, N., and Gibson, S. B. (2002). Tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) up-regulates death receptor 5 (DR5) mediated by NFkappaB activation in epithelial derived cell lines. *Apoptosis* 7, 413-420.

Shi, Y., Lan, F., Matson, C., Mulligan, P., Whetstine, J. R., Cole, P. A., and Casero, R. A. (2004). Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell* 119, 941-953.

Shu, H. B., Halpin, D. R., and Goeddel, D. V. (1997). Casper is a FADD- and caspase-related inducer of apoptosis. *Immunity* 6, 751-763.

Simpson, L., and Parsons, R. (2001). PTEN: life as a tumor suppressor. *Exp Cell Res* 264, 29-41.

Singh, S. K., Hawkins, C., Clarke, I. D., Squire, J. A., Bayani, J., Hide, T., Henkelman, R. M., Cusimano, M. D., and Dirks, P. B. (2004). Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* 432, 396-401.

Sirchia, S. M., Ferguson, A. T., Sironi, E., Subramanyan, S., Orlandi, R., Sukumar, S., and Sacchi, N. (2000). Evidence of epigenetic changes affecting the chromatin state of the retinoic acid receptor beta2 promoter in breast cancer cells. *Oncogene* 19, 1556-1563.

Slamon, D. J., Leyland-Jones, B., Shak, S., Fuchs, H., Paton, V., Bajamonde, A., Fleming, T., Eiermann, W., Wolter, J., Pegram, M., et al. (2001). Use of chemotherapy

plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med* 344, 783-792.

Smakman, N., Borel Rinkes, I. H., Voest, E. E., and Kranenburg, O. (2005). Control of colorectal metastasis formation by K-Ras. *Biochim Biophys Acta* 1756, 103-114.

Smyth, M. J., Cretney, E., Takeda, K., Wiltrout, R. H., Sedger, L. M., Kayagaki, N., Yagita, H., and Okumura, K. (2001). Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) contributes to interferon gamma-dependent natural killer cell protection from tumor metastasis. *J Exp Med* 193, 661-670.

Smyth, M. J., Takeda, K., Hayakawa, Y., Peschon, J. J., van den Brink, M. R., and Yagita, H. (2003). Nature's TRAIL--on a path to cancer immunotherapy. *Immunity* 18, 1-6.

Soprano, D. R., Qin, P., and Soprano, K. J. (2004). Retinoic acid receptors and cancers. *Annu Rev Nutr* 24, 201-221.

Spalding, A. C., Jotte, R. M., Scheinman, R. I., Geraci, M. W., Clarke, P., Tyler, K. L., and Johnson, G. L. (2002). TRAIL and inhibitors of apoptosis are opposing determinants for NF-kappaB-dependent, genotoxin-induced apoptosis of cancer cells. *Oncogene* 21, 260-271.

Spencer, C. A., and Groudine, M. (1991). Control of c-myc regulation in normal and neoplastic cells. *Adv Cancer Res* 56, 1-48.

Sprick, M. R., Rieser, E., Stahl, H., Grosse-Wilde, A., Weigand, M. A., and Walczak, H. (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. *EMBO J* 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.

Srinivasula, S. M., Ahmad, M., Otilie, S., Bullrich, F., Banks, S., Wang, Y., Fernandes-Alnemri, T., Croce, C. M., Litwack, G., Tomaselli, K. J., *et al.* (1997). FLAME-1, a novel FADD-like anti-apoptotic molecule that regulates Fas/TNFR1-induced apoptosis. *J Biol Chem* 272, 18542-18545.

Srinivasula, S. M., Datta, P., Fan, X. J., Fernandes-Alnemri, T., Huang, Z., and Alnemri, E. S. (2000). Molecular determinants of the caspase-promoting activity of Smac/DIABLO and its role in the death receptor pathway. *J Biol Chem* 275, 36152-36157.

Staller, P., Peukert, K., Kiermaier, A., Seoane, J., Lukas, J., Karsunky, H., Moroy, T., Bartek, J., Massague, J., Hanel, F., and Eilers, M. (2001). Repression of p15INK4b expression by Myc through association with Miz-1. *Nat Cell Biol* 3, 392-399.

Stark, G. R., Kerr, I. M., Williams, B. R., Silverman, R. H., and Schreiber, R. D. (1998). How cells respond to interferons. *Annu Rev Biochem* 67, 227-264.

Stehlik, C., de Martin, R., Kumabashiri, I., Schmid, J. A., Binder, B. R., and Lipp, J. (1998). Nuclear factor (NF)-kappaB-regulated X-chromosome-linked iap gene expression protects endothelial cells from tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis. *J Exp Med* *188*, 211-216.

Steichen-Gersdorf, E., Gallion, H. H., Ford, D., Girodet, C., Easton, D. F., DiCioccio, R. A., Evans, G., Ponder, M. A., Pye, C., Mazoyer, S., and et al. (1994). Familial site-specific ovarian cancer is linked to BRCA1 on 17q12-21. *Am J Hum Genet* *55*, 870-875.

Stewart, S. A., and Weinberg, R. A. (2006). Telomeres: Cancer to Human Aging. *Annu Rev Cell Dev Biol*.

Stone, J., de Lange, T., Ramsay, G., Jakobovits, E., Bishop, J. M., Varmus, H., and Lee, W. (1987). Definition of regions in human c-myc that are involved in transformation and nuclear localization. *Mol Cell Biol* *7*, 1697-1709.

Suliman, A., Lam, A., Datta, R., and Srivastava, R. K. (2001). Intracellular mechanisms of TRAIL: apoptosis through mitochondrial- dependent and -independent pathways. *Oncogene* *20*, 2122-2133.

Sun, S. Y., and Lotan, R. (2002). Retinoids and their receptors in cancer development and chemoprevention. *Crit Rev Oncol Hematol* *41*, 41-55.

T

Takeda, K., Cretney, E., Hayakawa, Y., Ota, T., Akiba, H., Ogasawara, K., Yagita, H., Kinoshita, K., Okumura, K., and Smyth, M. J. (2005). TRAIL identifies immature natural killer cells in newborn mice and adult mouse liver. *Blood* *105*, 2082-2089.

Takeda, K., Hayakawa, Y., Smyth, M. J., Kayagaki, N., Yamaguchi, N., Kakuta, S., Iwakura, Y., Yagita, H., and Okumura, K. (2001). Involvement of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in surveillance of tumor metastasis by liver natural killer cells. *Nat Med* *7*, 94-100.

Takeda, K., Smyth, M. J., Cretney, E., Hayakawa, Y., Kayagaki, N., Yagita, H., and Okumura, K. (2002). Critical role for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in immune surveillance against tumor development. *J Exp Med* *195*, 161-169.

Takeda, K., Yamaguchi, N., Akiba, H., Kojima, Y., Hayakawa, Y., Tanner, J. E., Sayers, T. J., Seki, N., Okumura, K., Yagita, H., and Smyth, M. J. (2004). Induction of Tumor-specific T Cell Immunity by Anti-DR5 Antibody Therapy. *J Exp Med*.

Tamura, K., Utsunomiya, J., Iwama, T., Furuyama, J., Takagawa, T., Takeda, N., Fukuda, Y., Matsumoto, T., Nishigami, T., Kusuhara, K., et al. (2004). Mechanism of carcinogenesis in familial tumors. *Int J Clin Oncol* *9*, 232-245.

Tanaka, M., Suda, T., Takahashi, T., and Nagata, S. (1995). Expression of the functional soluble form of human fas ligand in activated lymphocytes. *Embo J* *14*, 1129-1135.

- Tanaka, N., and Taniguchi, T. (2000).** The interferon regulatory factors and oncogenesis. *Semin Cancer Biol* *10*, 73-81.
- Tenen, D. G. (2003).** Disruption of differentiation in human cancer: AML shows the way. *Nat Rev Cancer* *3*, 89-101.
- Thiery-Vuillemin, A., Nguyen, T., Pivot, X., Spano, J. P., Dufresne, A., and Soria, J. C. (2005).** Molecularly targeted agents: their promise as cancer chemopreventive interventions. *Eur J Cancer* *41*, 2003-2015.
- Thorburn, A. (2004).** Death receptor-induced cell killing. *Cell Signal* *16*, 139-144.
- Trauzold, A., Wermann, H., Arlt, A., Schutze, S., Schafer, H., Oestern, S., Roder, C., Ungefroren, H., Lampe, E., Heinrich, M., et al. (2001).** CD95 and TRAIL receptor-mediated activation of protein kinase C and NF-kappaB contributes to apoptosis resistance in ductal pancreatic adenocarcinoma cells. *Oncogene* *20*, 4258-4269.
- Truneh, A., Sharma, S., Silverman, C., Khandekar, S., Reddy, M. P., Deen, K. C., McLaughlin, M. M., Srinivasula, S. M., Livi, G. P., Marshall, L. A., et al. (2000).** Temperature-sensitive differential affinity of TRAIL for its receptors. DR5 is the highest affinity receptor. *J Biol Chem* *275*, 23319-23325.
- V**
- van Noesel, M. M., van Bezouw, S., Salomons, G. S., Voute, P. A., Pieters, R., Baylin, S. B., Herman, J. G., and Versteeg, R. (2002).** Tumor-specific down-regulation of the tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand decoy receptors DcR1 and DcR2 is associated with dense promoter hypermethylation. *Cancer Res* *62*, 2157-2161.
- Vaque, J. P., Navascues, J., Shiio, Y., Laiho, M., Ajenjo, N., Mauleon, I., Matallanas, D., Crespo, P., and Leon, J. (2005).** Myc antagonizes Ras-mediated growth arrest in leukemia cells through the inhibition of the Ras-ERK-p21Cip1 pathway. *J Biol Chem* *280*, 1112-1122.
- Varfolomeev, E., Maecker, H., Sharp, D., Lawrence, D., Renz, M., Vucic, D., and Ashkenazi, A. (2005).** Molecular determinants of kinase pathway activation by Apo2 ligand/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *J Biol Chem* *280*, 40599-40608.
- Vassalli, P. (1992).** The pathophysiology of tumor necrosis factors. *Annu Rev Immunol* *10*, 411-452.
- Verma, I. M., and Weitzman, M. D. (2005).** Gene therapy: twenty-first century medicine. *Annu Rev Biochem* *74*, 711-738.
- Vogelstein, B., and Kinzler, K. W. (1998).** *The Genetic Basis of Human Cancer*, 2nd edition.

Vogelstein, B., and Kinzler, K. W. (2004). Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med* *10*, 789-799.

Voorhoeve, P. M., and Agami, R. (2003). The tumor-suppressive functions of the human INK4A locus. *Cancer Cell* *4*, 311-319.

Vousden, K. H., and Lu, X. (2002). Live or let die: the cell's response to p53. *Nat Rev Cancer* *2*, 594-604.

W

Wajant, H. (2003). Death receptors. *Essays Biochem* *39*, 53-71.

Wajant, H. (2004). TRAIL and NFkappaB signaling--a complex relationship. *Vitam Horm* *67*, 101-132.

Wajant, H. (2006). CD95L/FasL and TRAIL in tumour surveillance and cancer therapy. *Cancer Treat Res* *130*, 141-165.

Wajant, H., Gerspach, J., and Pfizenmaier, K. (2005). Tumor therapeutics by design: targeting and activation of death receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* *16*, 55-76.

Wajant, H., Pfizenmaier, K., and Scheurich, P. (2002). TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) and its receptors in tumor surveillance and cancer therapy. *Apoptosis* *7*, 449-459.

Walczak, H., Bouchon, A., Stahl, H., and Krammer, P. H. (2000). Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand retains its apoptosis-inducing capacity on Bcl-2- or Bcl-xL-overexpressing chemotherapy-resistant tumor cells. *Cancer Res* *60*, 3051-3057.

Walczak, H., Degli-Esposti, M. A., Johnson, R. S., Smolak, P. J., Waugh, J. Y., Boiani, N., Timour, M. S., Gerhart, M. J., Schooley, K. A., Smith, C. A., et al. (1997). TRAIL-R2: a novel apoptosis-mediating receptor for TRAIL. *EMBO J* *16*, 5386-5397.

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, J., Chun, H. J., Wong, W., Spencer, D. M., and Lenardo, M. J. (2001). Caspase-10 is an initiator caspase in death receptor signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* *98*, 13884-13888.

Wang, S., and El-Deiry, W. S. (2003). Requirement of p53 targets in chemosensitization of colonic carcinoma to death ligand therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 15095-15100.

Wang, X. (2001). The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* *15*, 2922-2933.

- Wang, Y., Engels, I. H., Knee, D. A., Nasoff, M., Deveraux, Q. L., and Quon, K. C. (2004).** Synthetic lethal targeting of MYC by activation of the DR5 death receptor pathway. *Cancer Cell* 5, 501-512.
- Wang, Y., Quon, K. C., Knee, D. A., Nesterov, A., and Kraft, A. S. (2005).** RAS, MYC, and sensitivity to tumor necrosis factor- α -related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis. *Cancer Res* 65, 1615-1616; author reply 1616-1617.
- Wanzel, M., Kleine-Kohlbrecher, D., Herold, S., Hock, A., Berns, K., Park, J., Hemmings, B., and Eilers, M. (2005).** Akt and 14-3-3 β regulate Miz1 to control cell-cycle arrest after DNA damage. *Nat Cell Biol* 7, 30-41.
- Weinberg, R. A. (1995).** The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* 81, 323-330.
- Welcker, M., Orian, A., Jin, J., Grim, J. E., Harper, J. W., Eisenman, R. N., and Clurman, B. E. (2004).** The Fbw7 tumor suppressor regulates glycogen synthase kinase 3 phosphorylation-dependent c-Myc protein degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 9085-9090.
- 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., and et al. (1995).** Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity* 3, 673-682.
- Wolbach, S., and Howe, P. (1925).** Tissue changes following deprivation of fat-soluble A vitamin. *Nutrition Classics The Journal of Experimental Medicine* 42, 753-777.
- Wooster, R., Bignell, G., Lancaster, J., Swift, S., Seal, S., Mangion, J., Collins, N., Gregory, S., Gumbs, C., and Micklem, G. (1995).** Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. *Nature* 378, 789-792.
- Wright, W. E., and Shay, J. W. (1992).** Telomere positional effects and the regulation of cellular senescence. *Trends Genet* 8, 193-197.
- Wu, G. S., Burns, T. F., McDonald, E. R., 3rd, Jiang, W., Meng, R., Krantz, I. D., Kao, G., Gan, D. D., Zhou, J. Y., Muschel, R., et al. (1997).** KILLER/DR5 is a DNA damage-inducible p53-regulated death receptor gene. *Nat Genet* 17, 141-143.
- X
- Xin, L., Lawson, D. A., and Witte, O. N. (2005).** The Sca-1 cell surface marker enriches for a prostate-regenerating cell subpopulation that can initiate prostate tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 6942-6947.
- Xu, D., Popov, N., Hou, M., Wang, Q., Bjorkholm, M., Gruber, A., Menkel, A. R., and Henriksson, M. (2001).** Switch from Myc/Max to Mad1/Max binding and decrease in histone acetylation at the telomerase reverse transcriptase promoter during differentiation of HL60 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 3826-3831.

Y

- Yagita, H., Takeda, K., Hayakawa, Y., Smyth, M. J., and Okumura, K. (2004).** TRAIL and its receptors as targets for cancer therapy. *Cancer Sci* *95*, 777-783.
- Yang, J., Chang, E., Cherry, A. M., Bangs, C. D., Oei, Y., Bodnar, A., Bronstein, A., Chiu, C. P., and Herron, G. S. (1999).** Human endothelial cell life extension by telomerase expression. *J Biol Chem* *274*, 26141-26148.
- Yeh, E., Cunningham, M., Arnold, H., Chasse, D., Monteith, T., Ivaldi, G., Hahn, W. C., Stukenberg, P. T., Shenolikar, S., Uchida, T., et al. (2004).** A signalling pathway controlling c-Myc degradation that impacts oncogenic transformation of human cells. *Nat Cell Biol* *6*, 308-318.
- Yeh, W. C., Itie, A., Elia, A. J., Ng, M., Shu, H. B., Wakeham, A., Mirtsos, C., Suzuki, N., Bonnard, M., Goeddel, D. V., and Mak, T. W. (2000).** Requirement for Casper (c-FLIP) in regulation of death receptor-induced apoptosis and embryonic development. *Immunity* *12*, 633-642.
- Yokota, S., Geppert, T. D., and Lipsky, P. E. (1988).** Enhancement of antigen- and mitogen-induced human T lymphocyte proliferation by tumor necrosis factor-alpha. *J Immunol* *140*, 531-536.
- Yoo, C. B., Cheng, J. C., and Jones, P. A. (2004).** Zebularine: a new drug for epigenetic therapy. *Biochem Soc Trans* *32*, 910-912.
- Yoo, C. B., and Jones, P. A. (2006).** Epigenetic therapy of cancer: past, present and future. *Nat Rev Drug Discov* *5*, 37-50.
- Yu, X., Guo, Z. S., Marcu, M. G., Neckers, L., Nguyen, D. M., Chen, G. A., and Schrupp, D. S. (2002).** Modulation of p53, ErbB1, ErbB2, and Raf-1 expression in lung cancer cells by depsipeptide FR901228. *J Natl Cancer Inst* *94*, 504-513.

Z

- Zauli, G., Milani, D., Rimondi, E., Baldini, G., Nicolin, V., Grill, V., and Secchiero, P. (2003).** TRAIL activates a caspase 9/7-dependent pathway in caspase 8/10-defective SK-N-SH neuroblastoma cells with two functional end points: induction of apoptosis and PGE2 release. *Neoplasia* *5*, 457-466.
- Zauli, G., and Secchiero, P. (2006).** The role of the TRAIL/TRAIL receptors system in hematopoiesis and endothelial cell biology. *Cytokine Growth Factor Rev* *17*, 245-257.
- 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, J., Lahti, J. M., Bruce, A., He, L., Parihar, K., Fan, C., Grenet, J., Liu, L., Kidd, V. J., Cormier, S., and Tang, D. (2006).** Identification of an ataxia telangiectasia-mutated protein mediated surveillance system to regulate Bcl-2 overexpression. *Oncogene* *25*, 5601-5611.
- Zhang, L., and Fang, B. (2005).** Mechanisms of resistance to TRAIL-induced apoptosis in cancer. *Cancer Gene Ther* *12*, 228-237.
- Zhang, W. W., Fujiwara, T., Grimm, E. A., and Roth, J. A. (1995).** Advances in cancer gene therapy. *Adv Pharmacol* *32*, 289-341.
- Zhang, X., Jin, T. G., Yang, H., DeWolf, W. C., Khosravi-Far, R., and Olumi, A. F. (2004).** Persistent c-FLIP(L) expression is necessary and sufficient to maintain resistance to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-mediated apoptosis in prostate cancer. *Cancer Res* *64*, 7086-7091.
- Zhang, X. D., Franco, A. V., Nguyen, T., Gray, C. P., and Hersey, P. (2000).** Differential localization and regulation of death and decoy receptors for TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) in human melanoma cells. *J Immunol* *164*, 3961-3970.
- Zhang, X. D., Zhang, X. Y., Gray, C. P., Nguyen, T., and Hersey, P. (2001).** Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis of human melanoma is regulated by smac/DIABLO release from mitochondria. *Cancer Res* *61*, 7339-7348.
- Zhang, Y., and Reinberg, D. (2001).** Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes Dev* *15*, 2343-2360.
- Zhang, Y., Riesterer, C., Ayrall, A. M., Sablitzky, F., Littlewood, T. D., and Reth, M. (1996).** Inducible site-directed recombination in mouse embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res* *24*, 543-548.
- Zhao, J. J., Gjoerup, O. V., Subramanian, R. R., Cheng, Y., Chen, W., Roberts, T. M., and Hahn, W. C. (2003).** Human mammary epithelial cell transformation through the activation of phosphatidylinositol 3-kinase. *Cancer Cell* *3*, 483-495.
- Zhu, Q., Zhang, J. W., Zhu, H. Q., Shen, Y. L., Flexor, M., Jia, P. M., Yu, Y., Cai, X., Waxman, S., Lanotte, M., et al. (2002).** Synergic effects of arsenic trioxide and cAMP during acute promyelocytic leukemia cell maturation subtends a novel signaling cross-talk. *Blood* *99*, 1014-1022.

Résumé

Les rétinoïdes exercent leurs effets via leur liaison à deux familles de récepteurs nucléaires, les RAR (α , β , γ) et les RXR (α , β , γ), qui sous forme d'hétérodimères, activent la transcription de leurs gènes cibles. Ainsi, les rétinoïdes ont la capacité de moduler la prolifération, différenciation et apoptose de nombreux types cellulaires, ceci étant à la base de leur utilisation en prévention et en thérapie de certains cancers. Le succès de la thérapie différenciative induite par l'acide rétinoïque (AR) est surtout démontré dans le cas de la leucémie promyélocytaire aiguë (APL), pour laquelle il représente un traitement standard. Des données obtenues au laboratoire indiquaient que l'apoptose induite par les rétinoïdes était liée à l'induction du ligand de mort TRAIL.

Nous avons pu élucider les mécanismes moléculaires qui sous-tendent l'induction d'apoptose de cellules leucémiques par les rétinoïdes et l'interféron γ d'une part, et par les inhibiteurs de HDACs d'autre part. Ainsi, nous avons pu montrer que TRAIL est non seulement l'élément clé de l'action apoptogénique des rétinoïdes mais également que TRAIL est à la base de l'action anti-tumorale des HDACis.

Parallèlement à ces études, l'utilisation d'un modèle cellulaire permettant de mimer in vitro les différentes étapes de tumorigenèse nous a permis de montrer que l'introduction d'un nombre limité d'éléments génétiques permet la transformation de cellules normales et leur sensibilisation à l'apoptose induite par TRAIL. Nos données montrent qu'il ne semble pas exister de mécanisme universel de sensibilisation des cellules à TRAIL mais qu'il s'agit plutôt d'un réseau complexe d'informations variant selon le type cellulaire et les oncogènes impliqués dans la transformation cellulaire.

Abstract

Retinoids act by binding to two classes of nuclear receptors, RAR and RXR, which form heterodimers and activate the transcription of target genes. As a consequence, retinoids have the ability to modulate proliferation, differentiation and apoptosis of various cell types, which is at the basis of their use as chemopreventive and therapeutic drugs in several cancers. Indeed, the success of retinoic acid (RA)-mediated differentiation therapy is particularly impressive in the case of acute promyelocytic leukaemia (APL), where it represents standard treatment. Previous data of our laboratory indicated that one of the factor involved in retinoid-induced apoptosis in APL cells is the death ligand TRAIL.

We were able to elucidate the molecular mechanisms underlying the apoptosis induction of leukemic cells by co-treatment of retinoids and interferon γ on one hand, and by HDACs inhibitors (HDACis) on the other hand. Thus, we could show that TRAIL is not only the key factor of the apoptogenic action of retinoids, but also that TRAIL is responsible for the anti-tumor action of HDACis.

In parallel, using a cellular model mimicking in vitro the tumorigenesis process we showed that the introduction of a limited number of genetic events leads to the transformation of normal cells into cancer cells and their concomitant sensitization to TRAIL-induced apoptosis. Our data indicate that there is no common principle for sensitization of the cells to TRAIL but that it is more likely a complex information network which cell type specific and depends on the oncogenes involved in transformation.

