

Centre Armand-Frappier Santé Biotechnologie

**MECANISMES MOLECULAIRES IMPLIQUES DANS LA RESISTANCE
DES CELLULES DEFICIENTES EN DFF40 LORS DE L'APOPTOSE
INDUITE PAR LA CYCLOHEXIMIDE**

Par
Adeline Paimboeuf

Mémoire présenté pour l'obtention du grade de
Maître ès Sciences (M.Sc.)
en sciences expérimentales de la santé

Jury d'évaluation

Président du jury et
Examineur interne

Cathy Vaillancourt
Centre Armand-Frappier Santé
Biotechnologie

Examineur externe

Laurence Terrisse-Rulleau
Axelys

Directeur de recherche

Jacques Bernier
Centre Armand-Frappier Santé
biotechnologie

REMERCIEMENTS

En premier lieu, j'aimerais remercier mon directeur de recherche Dr Jacques Bernier, qui m'a permis de savoir que je voulais faire de la recherche, grâce au premier stage réalisé dans son laboratoire. Je voudrais le remercier d'autant plus de m'avoir par la suite pris pour cette maîtrise et de m'avoir fait confiance. Il a toujours été présent et m'a guidé tout au long de ce projet, tout en me permettant de développer mon autonomie et d'aiguiser mon esprit d'initiative.

Je souhaiterais aussi remercier mes collègues de laboratoire, Guillaume qui m'a aidé malgré le fait qu'il avait fini son doctorat et Merve qui m'a beaucoup aidé avec mes expériences et la vision de mon projet. Je voudrais aussi remercier nos voisins de paillasse, le laboratoire de Isabelle Plante, qui nous ont aidés quand il nous manquait de petites choses et surtout qui ont insufflé une superbe ambiance dans le laboratoire, dont Alec, Bélinda, Melany, Cameron, Jysiane et leurs stagiaires.

De plus, je tiens à remercier les étudiants qui ont été un soutien moral et de très belle rencontre durant cette aventure tel que Mathilde, Clément, Anaïs, Wesley, Claudia, Aïcha, Hélène, Josianne, Juliette, Zoé, Laurie, Léna, Mustapha, Richard, Vincent, Aurélie, Eve, Gaëlle, Hermine, Mustapha, Charlotte et d'autres que je pourrais oublier.

Enfin, je veux dire un grand merci à ma famille qui m'a soutenue pour ce grand projet, un merci pour mes parents qui sont un exemple de persévérance et d'ambition, un merci à mon frère pour l'exemple qu'il a toujours été pour moi scientifiquement ou humainement.

RÉSUMÉ

La voie de l'apoptose est un mécanisme de mort cellulaire programmée qui est crucial pour l'homéostasie cellulaire et tissulaire, mais aussi dans le développement des organes. Elle implique trois grandes voies dépendantes des caspases, qui conduisent finalement à la fragmentation de l'ADN. On sait que les cellules cancéreuses régulent fortement la voie apoptotique et son rôle dans l'acquisition des caractéristiques du cancer a été discuté au cours des dernières décennies. De nombreuses mutations dans les types de cellules cancéreuses ont été rapportées comme étant impliquées dans la chimiorésistance et les résultats des traitements. Dont la sous expression du facteur de fragmentation de l'ADN (DFF40) qui serait lié à la chimiorésistance. Ainsi, nous avons voulu connaître les mécanismes intervenant dans cette résistance face à l'induction de l'apoptose par la cycloheximide (CHX). Notre hypothèse est que les cellules cancéreuses seraient résistantes à l'apoptose induite par la CHX due à une déficience en DFF40.

Sachant cela, nous voulons mieux comprendre la résistance induite par une déficience en DFF40 par la voie dépendante de la caspase 8 et donc la voie extrinsèque. Pour cela, nous avons réalisé des traitements avec des temps de 4, 8, 12, 16, 24, 48 H et des concentrations de 1, 10, 25, 50 μM à la cycloheximide sur deux lignées cellulaires Jurkats et HeLa : DFF40 KO et DFF40 WT. Puis nous avons utilisé le cytomètre en flux afin d'analyser la viabilité cellulaire, le cycle cellulaire, le taux d'apoptose (Annexine V/Pi), et l'activité de Caspase 3/7. De plus, nous avons confirmé l'absence ou non de fragmentation par gel d'agarose. Nos résultats ont montré de plus faible mortalité avec les traitements à la cycloheximide dans la lignée DFF40 KO, tout comme un taux d'apoptose plus faible dans cette lignée. De plus, nous avons confirmé l'absence de fragmentation dans la lignée DFF40 avec des gels d'agarose et avec de faibles taux de cellules en phase SubG0/G1. Cependant, nous observons plus d'activité de la Caspase 3/7 dans la lignée DFF40. Nos travaux semblent donc confirmer que l'absence de DFF40 dans les cellules Jurkat entraînerait une résistance à l'induction de l'apoptose par la cycloheximide.

Mots-clés : Apoptose ; DFF40 ; Cycloheximide ; Résistance.

ABSTRACT

The apoptosis pathway is a programmed cell death mechanism that is crucial for cell and tissue homeostasis but also in organ development. It involves three major caspase-dependent pathways, which ultimately lead to DNA fragmentation. It is known that cancer cells strongly regulate the apoptotic pathway and its role in the acquisition of cancer characteristics has been discussed over the last decades. Many mutations in cancer cell types have been reported to be involved in chemoresistance and treatment outcomes. One of them is the under expression of DNA fragmentation factor (DFF40) which is thought to be related to chemoresistance. Thus, we wanted to know the mechanisms involved in this resistance to the induction of apoptosis by cycloheximide. Our hypothesis is that cancer cells would be resistant to CHX-induced apoptosis due to a deficiency in DFF40.

Knowing this, we want to better understand the resistance induced by DFF40 deficiency through the caspase 8 dependent pathway and thus the extrinsic pathway. For this purpose, we performed treatments with 4, 8, 12, 16, 24, 48 H and 1, 10, 25, 50 μ M concentrations of cycloheximide on two Jurkats and HeLa cell lines: DFF40 KO and DFF40 WT. Then we used flow cytometer to analyze cell viability, cell cycle, apoptosis rate (Annexin V/Pi), and Caspase 3/7 activity. In addition, we confirmed the absence or presence of fragmentation by agarose gel. Our results showed lower mortality with cycloheximide treatments in the DFF40 KO line, as well as a lower rate of apoptosis in this line. Furthermore, we confirmed the absence of fragmentation in the DFF40 line with agarose gels and with low rates of SubG0/G1 phase cells. However, we observe more Caspase 3/7 activity in the DFF40 line. Our work thus seems to confirm that the absence of DFF40 in Jurkat cells would lead to resistance to cycloheximide induction of apoptosis.

Keywords : Apoptosis ; DFF40 ; Cycloheximide ; Resistance.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS.....	III
RÉSUMÉ.....	V
ABSTRACT.....	VII
TABLE DES MATIÈRES	IX
LISTE DES FIGURES.....	XI
LISTE DES TABLEAUX	XIII
LISTE DES ABRÉVIATIONS	XV
1 INTRODUCTION	1
2 REVUE DE LITTÉRATURE	3
2.1 LA VOIE DE L'APOPTOSE.....	3
2.1.1 <i>Les voies apoptotiques dépendantes des caspases</i>	4
2.1.2 <i>Activation de la voie extrinsèque à ligand spécifique</i>	5
2.1.3 <i>Signalisation par la voie extrinsèque</i>	8
2.1.4 <i>Régulation de la voie extrinsèque</i>	10
2.1.5 <i>Les autres voies de l'apoptose</i>	12
2.1.6 <i>Traitements actuels pour contrer la résistance à l'apoptose</i>	14
2.1.7 <i>Mutations dans la voie extrinsèque qui conduisent à la tumorigenèse</i>	15
2.2 STRUCTURE ET ACTIVATION DU DFF.....	20
2.2.1 <i>Structure et voie de signalisation</i>	20
2.2.2 <i>Fonctions du DFF40</i>	23
2.2.3 <i>Anomalie liée à l'expression du DFF</i>	24
2.2.4 <i>Le DFF40 permet la régulation de la stabilité génomique</i>	25
2.2.5 <i>Importance de l'apoptose chez les cellules cancéreuses</i>	27
2.3 LA CYCLOHEXIMIDE (CHX).....	29
2.3.1 <i>Structure</i>	29
2.3.2 <i>Voie apoptotique induite par la cycloheximide</i>	30
3 MATÉRIEL ET MÉTHODES	31
3.1 MATÉRIELS	31
3.2 GÉNÉRATION D'UNE LIGNEE CRISPR-Cas9 DFF40KO, KNOCKOUT DE DFF40 INDUIT PAR LA MÉTHODE CRISPR-CAS9 DE JURKAT ET TRANSFECTION DE GENES	31
3.3 TRAITEMENTS CELLULAIRES	33
3.4 LE CYTOMETRE EN FLUX	33
3.4.1 <i>Viabilité cellulaire</i>	34
3.5 ÉVALUATION DE L'APOPTOSE.....	36
3.6 TEST DE DÉTECTION DE L'ACTIVITÉ CASPASE 3/7	37

3.7	TEST DES COMETES.....	37
3.8	ANALYSE DES DONNEES.....	39
3.9	ANALYSES STATISTIQUES.....	39
4	RÉSULTATS	41
4.1.1	<i>Les cellules déficientes en DFF40 sont moins sensibles à la mortalité induite par le cycloheximide</i>	<i>41</i>
4.1.2	<i>Les cellules T Jurkats déficientes en DFF40 sont résistantes à l'apoptose induite par le cycloheximide.</i>	<i>44</i>
4.1.3	<i>Les cellules HeLa déficientes en DFF40 sont plus résistantes à l'apoptose induite par la cycloheximide que les cellules Jurkats.....</i>	<i>47</i>
4.1.4	<i>Les cellules T jukat déficientes en DFF40 retardent l'apoptose induite par la cycloheximide.</i>	<i>49</i>
4.1.5	<i>Etude de cinétiques avec des temps plus court et fragmentation ADN.....</i>	<i>52</i>
4.1.6	<i>L'activité de la Caspase 3/7 reflète un retard de l'apoptose induite par la cylcoheximide dans les cellules Jurkat déficientes en DFF40</i>	<i>54</i>
4.1.7	<i>Test de comètes permettant de visualiser la fragmentation d'ADN dans les cellules Jurkat DFF40 WT et absente dans les cellules DFF40 KO</i>	<i>56</i>
5	DISCUSSION ET CONCLUSION	59
5.1	L'IMPORTANCE DU DFF40 DANS LA RÉSISTANCE À L'INDUCTION DE L'APOPTOSE PAR LA CYCLOHEXIMIDE DANS LES CELLULES CANCÉREUSES.....	59
5.2	L'IMPORTANCE DE LA CONNAISSANCE AUTOUR DU RÔLE DU DFF40 DANS LA RÉSISTANCE DES CELLULES CANCÉREUSES.....	62
5.3	PERSPECTIVES.....	64
5.4	CONCLUSION GENERALE	65
6	BIBLIOGRAPHIE	67
7	ANNEXE I.....	83

LISTE DES FIGURES

FIGURE 2.1	ILLUSTRATION DES PRINCIPALES VOIES APOPTOTIQUES DEPENDANTES DES CASPASES ET DE LEURS REGULATEURS.	9
FIGURE 2.2	ILLUSTRATION DU COMPLEXE DFF (DFF40 ET DFF45) ET SON ACTIVATION PAR LA CASPASE 3.	22
FIGURE 3.1	COMMENT REALISER L'ANALYSE SUR FLOWJOW AVEC DES DONNEES DE CYTOMETRIE EN FLUX..	35
FIGURE 3.3	ECHELLE DE REFERENCE UTILISEE POUR MIEUX CARACTERISER LES STADES DE FRAGMENTATION DE L'ADN.	38
FIGURE 4.1	LES CELLULES DEFICIENTES EN DFF40 SONT MOINS SENSIBLES A LA MORTALITE INDUITE PAR LE CYCLOHEXIMIDE.	43
FIGURE 4.2	LA DEFICIENCE EN DFF40 DANS LES CELLULES JURKAT INHIBE L'APOPTOSE PAR FRAGMENTATION DE L'ADN INDUITE PAR LA CYCLOHEXIMIDE.	46
FIGURE 4.3	LA DEFICIENCE EN DFF40 DANS LES CELLULES HELA INHIBE L'APOPTOSE PAR FRAGMENTATION DE L'ADN INDUITE PAR LA CYCLOHEXIMIDE.	48
FIGURE 4.4	LA DEFICIENCE EN DFF40 ENTRAINE UN RETARD DANS L'APOPTOSE INDUITE PAR LA CYCLOHEXIMIDE.	51
FIGURE 4.5	LA DEFICIENCE EN DFF40 ENTRAINE UN RETARD DANS L'APOPTOSE INDUITE PAR LA CYCLOHEXIMIDE.	53
FIGURE 4.6	LA DEFICIENCE EN DFF40 ENTRAINE UN RETARD DANS L'APOPTOSE INDUITE PAR LA CYCLOHEXIMIDE.	55
FIGURE 4.7	LA DEFICIENCE EN DFF40 ENTRAINE UNE ABSENCE DE VISUALISATION CELLULAIRE DE FRAGMENTATION CELLULAIRE AVEC UN TRAITEMENT A LA CYCLOHEXIMIDE.	57

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 2.1	RECEPTEURS DE MORT COMMUNS INDUISANT L'APOPTOSE ET LEURS LIGANDS.....	7
TABLEAU 2.2	MUTATIONS CONNUES DES VOIES APOPTOTIQUES DEPENDANTES DES CASPASES CONDUISANT A LA RESISTANCE DES CELLULES CANCEREUSES.....	16

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
AIF	Facteur inducteur de l'apoptose
APAF-1	Facteur 1 d'activation de la peptidase apoptotique
ARN	Acide ribonucléique
ATF6	Activating transcription factor 6
Bcl	Lymphome des cellules B
BiP	Protéine d'immunoglobuline de liaison
CAD	Désoxyribonucléase activée par caspase
Caspase	Protéases cystéiniques spécifiques à l'aspartates
CHX	Cycloheximide
DcR	Récepteurs leurres
DD	Domaine de mort
DED	Domaine effecteur de mort
DFF35	Facteur de fragmentation de l'ADN de 35 kDa
DFF40	Facteur de fragmentation de l'ADN de 40 kDa
DFF45	Facteur de fragmentation de l'ADN de 45 kDa
DIABLO	Protéine liant l'IAP et ayant un point isoélectrique faible
DISC	Complexe de signalisation induisant la mort
DNase	Désoxyribonucléase
DR	Récepteurs de morts
FADD	Protéine associée a Fas avec un domaine de mort
FLIP	Protéine inhibitrice de FLICE
H2AX	Membre X de la famille des histones H2A
Hela	Lignée cellulaire de carcinomes d'épithélium humain

IAP	Protéines inhibitrices de l'apoptose
ICAD	Inhibiteur de CAD
IRE1	L'enzyme 1 nécessitant l'inositol
Jurkat	Lignée cellulaire immortalisée de lymphocyte T CD4 humain
JNK	Kinase c-Jun N-terminale
KO	Knock out
MAPK	Protéine kinase activée par des mitogènes
NF-kB	Facteur nucléaire-kB
PARP	Poly (ADP-ribose) polymérase
PERK	Protéine kinase R (PKR)-like endoplasmic reticulum kinase
p53	Protéine tumorale 53
RE	Réticulum endoplasmique
ST	Staurosporine
TBT	Tributylétain
TNFR	Récepteur du facteur tumoral de nécrose
TRAIL	Tumor-necrosis-factor related apoptosis inducing ligand
UV	Rayonnement ultraviolet
XIAP	L'inhibiteur lié à l'X de la protéine d'apoptose

1 INTRODUCTION

L'apoptose est un processus de mort cellulaire, impliquée dans l'élimination des cellules sénescentes ou endommagées, et contribue à l'homéostasie. Ainsi, une dérégulation de l'apoptose peut conduire à différents types de maladies comme les maladies auto-immunes, les maladies neurodégénératives, les maladies bactériennes et virales, les maladies cardiaques ou le cancer. Chez les cellules cancéreuses, il y a une modulation de la voie apoptotique, attribuée à de nombreuses mutations résultant en une chimiorésistance. ([Krzyszczyk et al.](#)).

L'apoptose possède deux voies d'activations, la voie intrinsèque et la voie extrinsèque. Cette dernière est déclenchée par des signaux externes à la cellule cible, qui peuvent être médiés par des lymphocytes tueurs naturels (NK) ou des cellules T cytotoxiques CD8 positives (CTL/CD8+) ([Sordo-Bahamonde et al.](#); [Yanumula et al.](#)). Dans cette voie, l'apoptose peut être initiée par des récepteurs de mort pro-apoptotiques (Fas, TNFR1, TNFR2, TRAIL DR4, TRAIL DR5) recevant leur ligand spécifique. Ces liaisons ligand-récepteurs entraînent le recrutement de protéines adaptatrices (FADD) et de caspases initiatrices (Caspase 8 ou 10). Les caspases initiatrices vont permettre l'activation des caspases effectrices (Caspase 3,6 et 7). La caspase 3 active permet de cliver le complexe DFF et ainsi libérer le DFF40 ([Carneiro et al.](#)). Cependant, l'absence de DFF40 a été associée avec de mauvais pronostiques de survie à certains lymphomes. Il est donc intéressant de travailler sur la caractérisation des étapes de l'apoptose et les mécanismes responsables de la résistance des cellules cancéreuses.

Normalement, l'apoptose nucléaire médiée par cette endonucléase se caractérise par la coupure de l'ADN en fragments réguliers de 200 pb. Le complexe DFF est formé de deux sous-unités, l'unité DNase ayant un poids moléculaire de 40 kDa (DFF40) et une seconde unité à activité inhibitrice le DFF45 ([Inohara et al., 1998](#)). Le DFF40 et DFF45 interagissent par un domaine conservé, le domaine CIDE N qui permet la formation d'hétérodimère ([Liu et al., 1997](#)). Le DFF40 est responsable de la fragmentation de l'ADN, de la condensation de la chromatine et donc de l'apoptose cellulaire. La sous-expression du DFF40 est liée à une mauvaise survie dans certains types de tumeurs malignes, ainsi le DFF40 pourrait être utilisé comme cible thérapeutique. Cette sous-expression entraîne par conséquent une meilleure survie des cellules malignes, et malheureusement une augmentation de la survie tumorale. On pourrait induire une sur-expression par thérapie génique afin de favoriser l'apoptose du cancer et inhiber la prolifération des cellules tumorales ([Minaiyan et al.](#)). La dissociation du DFF40 et du DFF45, permet l'homodimérisation du DFF40 par le domaine CIDE N. Outre le rôle du DFF dans

l'apoptose, cette endonucléase semble jouer d'autres rôles physiologiques importants. Par exemple, l'absence d'expression du DFF40 favorise la résistance des cellules au toxique, comme le tributylétain ([Kulbay et al., 2019](#)). Plusieurs articles montrent que l'administration de l'inhibiteur de la synthèse des protéines (Cycloheximide (CHX)) entraîne l'apparition de l'apoptose ([Tsuchida et al., 2002](#)). L'apoptose induite par la CHX a été démontrée comme étant caspase 8 dépendante, donc ne passerait pas directement par la voie mitochondriale ([Zhang et al.](#)). Notre laboratoire a déjà démontré par le passé qu'un déficit en DFF40 dans les lymphocytes T cancéreux était impliqué dans la résistance aux médicaments de chimiothérapies ([Kulbay et al.](#)).

La problématique de ce projet était donc de mieux comprendre les mécanismes de résistances des cellules cancéreuses déficientes en DFF40 par le biais de l'induction de l'apoptose extrinsèque. **Notre hypothèse** était que les cellules cancéreuses seraient résistantes à l'apoptose induite par la CHX due à une déficience en DFF40. Notre étude a permis de déterminer la relation entre le DFF40 et la voie caspase 8 dépendante. Pour cela, **notre premier objectif** a été de déterminer s'il y avait une résistance à l'apoptose induite par la cycloheximide (CHX) en absence d'expression de DFF40. Puis **dans le second objectif**, nous avons voulu déterminer s'il y avait une induction de la fragmentation d'ADN en présence de cycloheximide (CHX) et en absence de DFF40. Enfin, **le dernier objectif** a été de caractériser l'expression des différents marqueurs de l'apoptose en fonction du traitement à la cycloheximide et de l'expression du DFF40. Cette étude pavera la voie à des études subséquentes sur la voie Fas dépendante, voie impliquée dans plusieurs thérapies contre les cellules cancéreuses.

La première section fait un état de la revue de la littérature, séparé en trois chapitres traitant de l'apoptose, du DFF40 et de la cycloheximide. Puis, la seconde section permet d'expliquer le matériel et les méthodes utilisées pour les expérimentations qui ont conduit à obtenir les résultats présentés dans la troisième section. Pour finir, la dernière section fait état de conclusion et de discussion du projet mené pendant ces 2 années.

2 REVUE DE LITTÉRATURE

2.1 La voie de l'apoptose

De nombreuses voies de mort cellulaire ont été décrites. Les deux formes de mort cellulaire les plus répandues sont la nécrose qui est une mort cellulaire incontrôlée alors que l'apoptose est une forme contrôlée ([D'Arcy, 2019](#)). Cependant, la signalisation cellulaire de l'apoptose est la voie la mieux décrite à ce jour, en grande partie, car elle est impliquée dans un grand nombre de pathologies. Ce processus a été découvert par John KER et Willy CURRIE en 1972 ([Elmore](#)). L'apoptose est un mécanisme de mort cellulaire programmée connu sous le nom de suicide cellulaire. Cette forme de mort cellulaire décrit un processus par lequel les cellules déclenchent leur autodestruction en réponse à un signal (intrinsèque ou extrinsèque). Il existe aussi la voie effectrice perforine-granzyme qui permet l'activation de l'apoptose. Le lymphocyte cytotoxique en reconnaissant une cellule cible va former une synapse immunologique et les granules sécrétoires vont circuler vers la membrane présynaptique et libérer la perforine et les granzymes. Et les granzymes vont pouvoir initier l'apoptose de la cellule cible ([Voskoboinik et al., 2015](#)). L'apoptose est un processus biologique important : elle permet d'éliminer les cellules infectées du corps humain, elle contribue au fonctionnement du système immunitaire et également au maintien de l'homéostasie. Il y a deux voies apoptotiques principales qui ont été décrites dans la littérature : la voie extrinsèque ou du récepteur de mort et la voie intrinsèque ou mitochondriale. D'une part, la voie intrinsèque est déclenchée par des signaux internes à la cellule, tels que des lésions de l'ADN ou l'infection de la cellule par des agents viraux. D'autre part, la voie extrinsèque est déclenchée par des signaux externes à la cellule cible. Tel que des cytokines comme le TNF alpha. La voie apoptotique n'entraîne pas de réponse inflammatoire ([Elmore, 2007](#)). Contrairement à la nécrose, les signaux pro-apoptotiques (par exemple, lésion de l'ADN, stress, infection virale, statut P53, produits chimiques) incitent la cellule à prendre la décision de déclencher un processus de mort voir d'apoptose ([Sordo-Bahamonde et al.](#); [Yanumula et al.](#)).

2.1.1 Les voies apoptotiques dépendantes des caspases

La nature (par exemple extracellulaire ou intracellulaire) du signal induisant l'apoptose détermine les voies qui sont activées. En général, ces signaux induisent l'activation des caspases effectrices qui assurent la médiation de la signalisation intracellulaire, conduisant finalement à la fragmentation de l'ADN. Il est important de noter que certains signaux ne conduisent pas à l'activation des caspases (la voie de l'apoptose indépendante des caspases) ([Solano-Gálvez et al., 2018](#)). Les dommages mitochondriaux directs peuvent induire la libération d'AIF et d'EndoG ou HtrA2 ([Solano-Gálvez et al., 2018](#)), qui sont des protéines qui induisent directement l'apoptose par le biais de dommages directs à l'ADN ou de la dégradation protéolytique du cytosquelette respectivement ([Chai et al., 2014](#)). La voie dépendante des caspases tient son origine de trois sources principales pour les signaux d'activation : les signaux extracellulaires qui sont détectés et acheminés par des récepteurs transmembranaires spécifiques des ligands afin d'activer la voie extrinsèque ([Yanumula et al., 2020](#)), les stimuli intracellulaires qui induisent l'apoptose par le biais des mitochondries et ([Sordo-Bahamonde et al., 2020](#)) les stimuli intracellulaires qui induisent l'apoptose par le biais du stress causé dans le réticulum endoplasmique (RE) ([Solano-Gálvez et al., 2018](#)). Les deux derniers signaux conduisent à l'activation de la voie intrinsèque.

Globalement, tout au long de la voie apoptotique extrinsèque, deux groupes de caspases participent à la signalisation cellulaire : (1) les caspases initiatrices de l'apoptose, connues sous le nom de caspases du groupe II (par exemple, les caspases-2 (Nedd2/ICH-1), -8 (FLICE/MACH/Mch5), -9 (ICE-LAP6/Mch6) et -10 (Mch4)) ou (2) les caspases effectrices de l'apoptose, connues sous le nom de caspases du groupe III (par ex. par exemple, les caspases -3 (Yama/ CPP32/apopaine), -6 (Mch2) et -7 (ICE-LAP3/Mch3/CMH-1)) ([Nuñez et al., 1998](#)). Les caspases du groupe III ne possèdent ni de domaine effecteur de mort (DED) ni domaines de recrutement des caspases (CARD). Au contraire, les caspases du groupe II possèdent l'un des deux domaines en fonction de leurs rôles précis ([Vigneswara et al., 2020](#)).

2.1.2 Activation de la voie extrinsèque à ligand spécifique

La liaison d'un ligand à un récepteur de mort est la première étape de la cascade de signalisation extrinsèque de l'apoptose. Les récepteurs de mort les plus étudiés sont les récepteurs appartenant à la superfamille des récepteurs du TNF (TNFRSF), notamment le récepteur du facteur de nécrose tumorale 1 (TNFR1), le récepteur CD95 (CD95R/FasR/APO-1/APT) et les deux récepteurs de mort du TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) : TRAIL-R1 (DR4) et TRAIL-R2 (DR5) ([Locksley et al., 2001](#)). Le tableau 1 présente un résumé des principaux récepteurs transmembranaires et de leurs ligands induisant l'apoptose. Chacun de ces récepteurs de mort a une importance dans le processus d'apoptose et peut même présenter des similitudes entre eux. Nous abordons ici les caractéristiques des récepteurs de la mort les plus étudiés.

Le TNFR1 est exprimé dans tous les types de cellules. Il contient un domaine de mort (DD) de 70-80 acides aminés ([Kulbay et al.](#)) et est impliqué dans l'apoptose et l'inflammation chronique par l'interaction avec le TNF- α ([Morton et al.](#)). Il est produit en tant que molécule transmembranaire (tmTNF) et est ensuite libéré des cellules en tant que cytokine soluble (sTNF) ([Milatovich et al.](#)) via le clivage régulé du tmTNF par l'enzyme de conversion du TNF- α (TACE) ([Brambilla et al., 2011](#)). Le sTNF a plus grande affinité pour le TNFR1 ([Kemanetzoglou et al., 2017](#)). Les antagonistes pharmacologiques du TNF α tels que les récepteurs solubles (par exemple l'éta nercept) ou les anticorps monoclonaux (par exemple l'adalimumab) permettent de neutraliser le TNF ([Chadwick et al., 2018](#); [Liu et al., 2016](#)). D'autre part, il a été démontré que des toxiques comme le bisphénol A (BPA) et les nanoparticules (NPs) induisent la libération de TNF et donc l'apoptose ([Urriola-Muñoz et al., 2018](#)). L'étude de Crisafulli et de ses collègues démontre que l'inhibition pharmacologique, ainsi que génétique, de la liaison du TNF à TNFR1 conduit à une réduction du degré d'inflammation des macrophages provoquée par la stimulation du LPS et de l'IFN- γ ([Crisafulli et al., 2009](#)). Le CD95L et TRAIL sont exprimés comme des protéines membranaires trimériques de type II ([Siegmond et al., 2017](#)). La fonction principale de CD95 est l'induction de l'apoptose ([Suda et al., 1993](#)). Il appartient à la superfamille des récepteurs du TNF. Une étude menée par XM et ses collègues chez le rat a montré que dans le processus de reperfusion de l'ischémie myocardique que le FasL induit l'apoptose des cellules myocardiques ([Liu et al., 2017](#)). Les récepteurs CD95 sont des homotrimères pré-associés exprimés à la surface des cellules ([Peter et al., 2003](#)). La liaison de FasL à son récepteur (FasR) induit un changement de conformation permettant la formation du DISC ([Qadir et al., 2020](#); [Sharma et al., 2019](#)). Le resvératrol un polyphénol présent dans certains fruits module l'apoptose médiée par Fas/Fas-

ligand ([Diaz-Gerevini et al., 2016](#)). L'ONL1204 est un petit peptide inhibiteur du récepteur Fas ([Krishnan et al., 2019](#)). FAIM1, FAIM2 et FAIM3 inhibent la mort cellulaire induite par Fas ([Planells-Ferrer et al., 2016](#)). D'autre part, TRAIL, qui appartient également à la superfamille du TNF, se compose de 282 acides aminés ([Almasan et al., 2003](#)) et est exprimé dans les cellules NK, les cellules B, les monocytes et les cellules dendritiques ([Gandini et al., 2013](#)). Il a été démontré que TRAIL n'active que l'apoptose extrinsèque dans les cellules cancéreuses ([Woo et al., 2019](#)). L'étude de Staniek et de ses collègues fournit une analyse de la capacité de signalisation et de l'induction de l'apoptose de TRAIL-R dans les cellules B humaines primaires ([Staniek et al., 2019](#)). Cinq récepteurs cellulaires différents peuvent induire une liaison avec TRAIL. Ceux qui contiennent un DD, comme TRAIL-R1 (DR4) ([Schneider et al., 1997](#)) et TRAIL-R2 (DR5) peuvent induire l'apoptose des cellules cancéreuses ([Vunnam et al., 2017](#)). En revanche, ceux qui ne contiennent pas de DD, comme TRAIL-R3, TRAIL-R4 et l'ostéoprotégérine (OPG), n'induisent pas d'apoptose ([von Karstedt et al., 2020](#); [Yoshimura et al., 2019](#)). DR4 et DR5 possèdent dans leur partie extracellulaire 2 à 4 domaines similaires riches en cystéine et sont des protéines membranaires de type I ([Wang et al., 2003](#)). Les DD de DR4 et DR5 sont composés d'environ 70 acides aminés dans la partie cytoplasmique ([Yuan et al., 2018](#)). La liaison trimérique va permettre de modifier la structure intracellulaire du DD des DR et ainsi de former la liaison FADD ([Zhong et al., 2019](#)). La dulanermine est un agent inducteur d'apoptose. Elle est une forme optimisée du ligand endogène de l'Apo2 et peut donc se lier aux récepteurs DR4 et DR5 ([Pan et al., 2011](#)). Le nabt et le nelfinavir des agents antirétroviraux entraînent une expression plus élevée des récepteurs de mort membranaire (DR4/5) ([Koltai, 2015](#); [Pajak et al., 2007](#)).

TNFRSF	Ligands	References
TNFR1	<p><i>Activators</i></p> <p>TNF-α</p> <p><i>Inhibitors</i></p> <p>Soluble receptors (<i>e.g.</i> etanercept)</p> <p>Monoclonal antibodies (<i>e.g.</i> adalimumab)</p>	<p>(Weinelt et al.)</p> <p>(Morton et al., 2019)</p> <p>(Kemanetzoglou et al., 2017)</p> <p>(Liu et al., 2016)</p> <p>(Chadwick et al., 2018)</p>
FasR	<p>Activators</p> <p>FasL/CD95L</p> <p>Inhibitors</p> <p>Flavonoid resveratrol</p> <p>ONL1204</p> <p>FAIM1, FAIM2 and FAIM3</p>	<p>(Suda et al., 1993)</p> <p>(Qadir et al., 2020)</p> <p>(Siegmund et al., 2017)</p> <p>(Peter et al., 2003)</p> <p>(Diaz-Gerevini et al., 2016)</p> <p>(Krishnan et al., 2019)</p> <p>(Planells-Ferrer et al., 2016)</p>
TRAIL-R1/DR4	<p><i>Activators</i></p> <p>TRAIL/Apo2L</p> <p><i>Inhibitors</i></p> <p>Sodium butyrate (NaBt)</p>	<p>(Schneider et al., 1997)</p> <p>(Staniek et al., 2019)</p> <p>(Wang et al., 2003)</p> <p>(Pajak et al., 2007)</p>
TRAIL-R2/DR5	<p><i>Activators</i></p> <p>TRAIL/Apo2L</p> <p><i>Inhibitors</i></p> <p>Sodium butyrate (NaBt)</p> <p>Nelfinavir</p>	<p>(Walczak et al., 1997)</p> <p>(Yamamoto et al., 2020)</p> <p>(Dubuisson et al., 2017)</p> <p>(Vunnam et al., 2017)</p> <p>(Pajak et al., 2007)</p> <p>(Koltai, 2015)</p>

Tableau 2.1 Récepteurs de morts communs induisant l'apoptose et leurs ligands.

2.1.3 Signalisation par la voie extrinsèque

La voie extrinsèque est initiée par la liaison des DR (death receptor) à leurs ligands respectifs. La liaison du récepteur au ligand entraîne l'oligomérisation du récepteur, et la fixation de la protéine adaptatrice DD. Les protéines impliquées dans la signalisation cellulaire dans la voie apoptotique extrinsèque sont spécifiques aux récepteurs mis en jeu. Ainsi, les protéines DD associées à Fas (FADD) ou les protéines DD associées à TNFR (TRADD) sont recrutées à la membrane cellulaire ([Cavalcante et al., 2019](#)). Après la liaison de FasL avec FasR et l'oligomérisation du récepteur, FADD est recruté à la membrane cellulaire au niveau de la séquence DD du récepteur ([Kulbay et al.](#)). FADD recrute la procaspase-8 (également connue sous le nom de FLICE) par sa dimérisation, ce qui conduit à la formation du complexe de signalisation induisant la mort (DISC) ([Seo et al., 2018](#)). Une fois le DISC entièrement formé, la procaspase-8 est activée par son clivage autolytique et forme la caspase-8, qui initie la voie de signalisation apoptotique en clivant directement la procaspase-3 en sa forme active ([Masuda et al., 2020](#)). La caspase-8 contient le domaine effecteur de mort (DED) ([Shen et al., 2018](#)). L'activation de la caspase-8 nécessite la formation de structures oligomériques spécifiques, appelées filaments DED ([Ivanisenko et al., 2019](#)). La formation des filaments DED est obtenue par l'interaction des DED de FADD avec les DED de la procaspase-8, de la procaspase-10 et de la protéine cellulaire inhibitrice de FLICE (c-FLIP) ([Hillert et al., 2020](#)). L'induction de la cascade de caspases est le résultat de la dimérisation et de l'activation de la procaspase-8 au niveau du filament DED ([Seyrek et al., 2020](#)). Cependant, l'activation de la procaspase-8 ne serait pas possible sans les DEDs tandem (tDEDs), qui permettent de réunir plusieurs monomères de la procaspase-8 ([Mandal et al., 2020](#)). L'activation directe de la caspase-3 et de la caspase-7 par la caspase-8 est l'étape clé pour la destruction ultime du génome ([Kulbay et al.](#)). La caspase-3 est responsable du clivage du facteur de fragmentation de l'ADN 45/inhibiteur de la DNase activée par la caspase (DFF45/ICAD), qui active l'activité endonucléase du facteur de fragmentation de l'ADN 40/ DNase activée par la caspase (DFF40/CAD) ([Bagheri et al., 2015](#)). Cette étape finale conduit à la fragmentation internucléosomale de l'ADN.

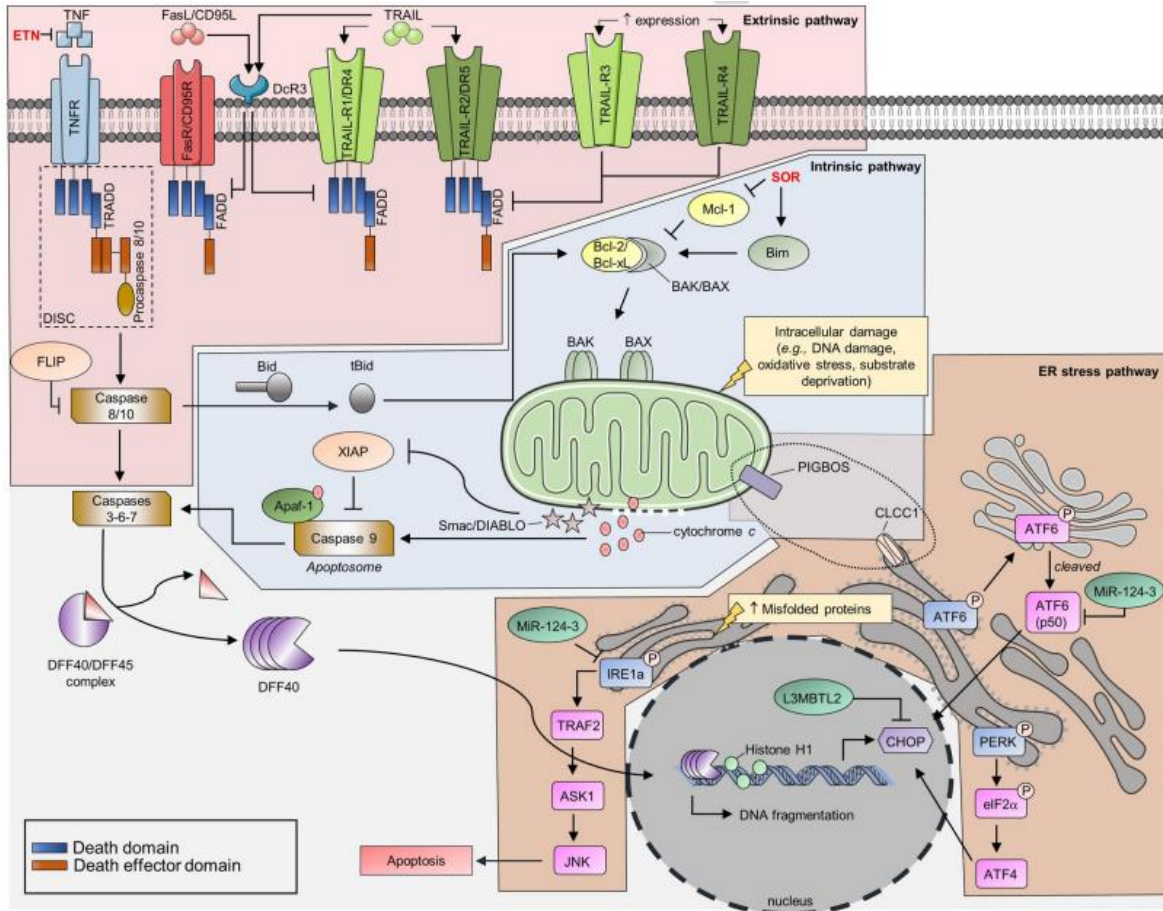


Figure 2.1 Illustration des principales voies apoptotiques dépendantes des caspases et de leurs régulateurs.

La voie extrinsèque (boîte rose), intrinsèque (boîte bleue) et de stress du réticulum endoplasmique (ER) (boîte orange) sont représentées. Les mécanismes d'action des médicaments sont représentés en rouge. ETN, étanercept ; SOR, sorafenib. (Kulbay et al., 2021c)

2.1.4 Régulation de la voie extrinsèque

- Régulation des récepteurs de la mort cellulaire

L'apoptose peut être régulée de plusieurs façons (voir tableau 2.1). Le premier niveau de régulation repose sur l'expression des DRs spécifique aux tissus et aux cellules. Une variation de l'expression des DR au sein d'une même cellule a également été constatée ([Spierings et al.](#)). Deuxièmement, les récepteurs leurres (DcR) jouent un rôle important dans la régulation de l'apoptose. TRAIL-R3 et -4 sont considérés comme des récepteurs leurres et inhibent ainsi l'apoptose ([Neumann et al., 2014](#); [Pan et al., 1997](#)). La surexpression de TRAILR3 ou de TRAILR4 inhibe efficacement l'apoptose médiée par TRAILR1 ou TRAILR2 ([Pan et al., 1997](#)). Comme TRAIL3 et TRAIL4 sont incorporés dans des complexes de signalisation, ils peuvent interférer en réduisant ou en empêchant la signalisation ([Neumann et al., 2014](#)). De nombreux exemples de DcRs existent dans la littérature. Par exemple, l'un des DcR les plus étudiés est le DcR3. Le DcR3, un membre de la superfamille des sTNFR, est un facteur anti-apoptose et pro-métastases ([Takahashi et al., 2011](#)). Il peut se lier de manière compétitive à FasL, TL1A et LIGHT, en raison de sa séquence similaire à celle de l'OPG, du TNF2 et de Fas, et inhiber l'apoptose et induire l'angiogenèse ([Liang et al., 2017](#)). Le DcR IL-1RII est une glycoprotéine de 60 kDa et est exprimé sur les monocytes, les neutrophiles et les lymphocytes B ([Vasilyev et al., 2013](#)). Son rôle est d'inhiber le transfert du signal dans le compartiment intracellulaire ([Vasilyev et al., 2013](#)). De plus, les glycoprotéines jouent un rôle important dans la modulation de l'apoptose. En effet, la sensibilité à l'induction de l'apoptose de CD95 et de TRAIL-R est liée à leurs structures glycosylées, qui modulent leur sensibilité à l'induction de l'apoptose ([Shatnyeva et al., 2011](#)). Les galectines, en interagissant avec les DR et les glycoprotéines de surface cellulaire, peuvent réguler l'apoptose. La N-glycosylation est requise pour l'ajustement des interactions CD95/CD95L, mais n'est pas requise pour la liaison de CD95L à CD95 ([Seyrek et al., 2019](#)).

- Régulation des partenaires de signalisation moléculaire

L'un des principaux points de régulation de la voie extrinsèque passe par les caspases. Tout d'abord, les inhibiteurs de caspases tels que p35, le modificateur de réponse aux cytokines A (CrmA) et les IAPs jouent un rôle important dans l'activation des caspases ([Ekert et al.](#)). La protéine p35 empêche l'activité des caspases en se liant aux enzymes cibles des protéases ([Zhou et al., 1998](#)). En présence de caspases actives, un clivage intramoléculaire est effectué sur des sites spécifiques des caspases par p35, ce qui empêche sa dissociation des caspases ([Wu et al.,](#)

[2016](#)). CrmA est le seul membre de la famille des sérines qui peut inhiber l'action des cystéines protéases, comme les caspases, et des sérines protéases ([Degterev et al., 2003](#)). Huit PAI humaines sont connues pour contrôler les caspases : X-linked IAPs (XIAP), cIAP1, cIAP2, ML-IAP, NAIP, ILP2, survivin et Bruce ([Wang et al., 2013](#)). Cependant, seul XIAP peut inhiber directement les caspases, alors que cIAP empêche seulement la formation de complexes de signalisation pro-apoptotiques dans la voie apoptotique extrinsèque ([Feltham et al., 2012](#)). XIAP contient trois répétitions IAP baculovirales (BIR) et comporte un domaine ubiquitine associé ([Chen et al., 2019](#)). Le domaine BIR sert de domaine d'interaction protéine-protéine pour la liaison directe et l'inhibition des caspases-3, -7 et -9 ([Takahashi et al., 1998](#)). Le domaine BIR3 inhibe la caspase-9 et la région de liaison entre les domaines BIR1 et BIR2 est responsable de l'inhibition des caspases-3 et -7 ([Allègre et al., 2018](#)). Le domaine associé à l'ubiquitine (UBA) permet la liaison de conjugués de poly-ubiquitine et le domaine annulaire est nécessaire à l'activité E3-ligase qui favorise la dégradation des protéines pro-apoptotiques (SMAC et ARTS), dont dépend essentiellement la régulation de l'apoptose ([Abbas et al., 2020](#); [Mamriev et al., 2020](#)). Un autre régulateur majeur de l'activation des caspases est c-FLIP. Les protéines c-FLIP régulent l'activation de la procaspase-8a/b ([Meng et al., 2020](#)). Cette régulation est localisée sur les filaments de la DED. Il existe 3 isoformes de c-FLIP : c-FLIP L (Long), c-FLIP S (Court) et c-FLIP R (Raji) ([Meng et al., 2020](#)). c-FLIP L a une fonction pro-apoptotique à une concentration intermédiaire en formant des hétérodimères procaspase-8/c-FLIP L catalytiquement actifs et en stabilisant le centre actif de la procaspase-8 ([Schleich et al., 2016](#)). Ainsi, la caspase-8 sera active après une formation suffisante d'hétérodimères. Cependant, le c-FLIP L a une fonction anti-apoptotique à des concentrations élevées, tout comme les isoformes courtes c-FLIP, c-FLIP S et c-FLIP R ([Hillert et al., 2020](#)).

2.1.5 Les autres voies de l'apoptose

- La voie apoptotique intrinsèque

La voie apoptotique intrinsèque peut être activée par des signaux qui induisent directement la libération du cytochrome C via la régulation des protéines de la famille bcl-2 ou par une diaphonie avec la voie apoptotique extrinsèque ([Kulbay et al., 2021a](#)). La protéine clé impliquée dans la diaphonie entre ces deux voies est Bid, une protéine d'interaction bcl-2 ([Li et al., 1998b](#); [Luo et al., 1998](#)). Après l'activation de la voie apoptotique FasL/FasR, la caspase-8 induit le clivage de Bid en t-Bid, ce qui permet sa translocation du cytoplasme vers les compartiments membranaires ([Li et al., 1998a](#)). Ceci est dû à sa plus grande affinité avec BclxL, un membre de la protéine de la famille Bcl-2 ([Li et al., 1998a](#)). L'activation de t-Bid conduit à la perméabilisation de la membrane mitochondriale par Bax ou Bak par la formation de pores ([Kulbay et al., 2021a](#)). La liaison de la protéine BH-3 uniquement, telle que tBid, à Bax induit des changements conformationnels et sa translocation ultérieure vers la mitochondrie et son oligomérisation ([Uren et al., 2017](#)). Les protéines Bak et Bax actives forment des pores dans la membrane mitochondriale permettant la fuite de son contenu. Il a été démontré dans les cellules Cos-7 que la perte de m précède l'association de Bax avec la mitochondrie après une apoptose induite par la staurosporine (STS) ([Smaili et al., 2001](#)). L'activation de la voie intrinsèque par la régulation des protéines de la famille bcl-2 est discutée plus loin. Les deux voies conduisent à la libération du cytochrome C et du second activateur des caspases dérivé des mitochondries (Smac/DIABLO) à partir des mitochondries. Le cytochrome C cytosolique se lie à la protéine Apaf-1, qui recrute ensuite la procaspase-9 pour former l'apoptosome ([Kulbay et al., 2021a](#)). L'apoptosome est une structure heptamérique où l'Apaf-1 interagit directement avec trois ou quatre molécules de procaspase-9 via des interactions CARD-CARD ([Dorstyn et al., 2018](#)). Les molécules de procaspase-9 forment des homodimères ou des hétérodimères dans l'apoptosome ([Dorstyn et al., 2018](#)). Cette conformation tridimensionnelle spécifique induit le clivage de la procaspase-9 en sa forme active, la caspase-9, qui à son tour active la caspase-3 ([Kulbay et al., 2021a](#)). D'autre part, il a été démontré que Smac inhibe les protéines inhibitrices de l'apoptose (IAP), principalement XIAP, permettant une nouvelle activation de la caspase ([Adrain et al.](#)). Les étapes suivantes sont similaires à celles de la voie apoptotique extrinsèque : les deux voies convergent.

- La voie du stress du réticulum endoplasmique

Lorsque le RE est soumis à un stress, l'organite ne peut pas exécuter sa fonction correcte, ce qui conduit à l'accumulation de protéines non repliées dans son compartiment intracellulaire.

L'augmentation de la concentration de protéines non repliées est détectée par des capteurs spécifiques associés à la membrane qui activent l'UPR. Comme mentionné ci-dessus, trois capteurs principaux sont impliqués dans cette voie : PERK, IRE1 et ATF6. Nous allons ici avoir un bref aperçu de ces 3 voies. Dans des conditions physiologiques, PERK, IRE1 et ATF6 sont dans un complexe dimérique avec la protéine de liaison à l'immunoglobuline (BiP/GRP78) ([Kadowaki et al., 2013](#)). Suite à l'accumulation de protéines mal repliées, BiP, la molécule chaperonne, se dissocie des molécules conduisant à l'activation de la voie. PERK, une protéine transmembranaire de type I, possède une activité sérine/thréonine kinase dans son domaine cytosolique C-terminal ([Kadowaki et al., 2013](#)). Elle détecte l'accumulation de protéines non repliées grâce à son domaine N-terminal ([Kadowaki et al., 2013](#)). Suite au stress du RE, la transcription de facteurs proapoptotiques (par exemple la protéine homologue C/EBP (CHOP)) est activée par la voie PERK-eIF2-ATF4 ([Kadowaki et al., 2013](#)). Un grand nombre de protéines proapoptotiques sont sous la régulation de CHOP, comme DR5, la liaison aux microtubules (Bim) et le modulateur d'apoptose régulé par p53 (PUMA) ([Kadowaki et al., 2013](#)). Les fonctions de ces molécules sont discutées ci-dessous. L'activation de ces facteurs conduit à l'apoptose. La voie de signalisation d'IRE1 est assez similaire à celle de PERK. Le stress ER prolongé active la voie IRE1-TRAF2-ASK1 ([Kadowaki et al., 2013](#)). Cette voie conduit à l'activation de la voie JNK/p38 qui déclenche l'apoptose par une transcription renforcée de Bak/Bax ([Kadowaki et al., 2013](#)). Enfin, l'interaction d'ATF6 avec des protéines mal repliées induit sa translocation du RE vers le Golgi, où il est traité et libère un domaine cytosolique N-terminal ([Kadowaki et al., 2013](#)). Le domaine N-terminal est ensuite transloqué vers le noyau pour induire les gènes cibles de l'UPR (par exemple les chaperons, la protéine de liaison X-box 1 (XBP1)) ([Kadowaki et al., 2013](#)). Globalement, l'activation des voies UPR dans le RE augmente le repliement des protéines, régule la protéolyse des protéines non repliées et régule à la baisse l'expression des protéines ([Chu et al., 2019](#)). La suractivation de ces voies sans retour à l'homéostasie cellulaire conduira finalement à l'apoptose cellulaire par un déséquilibre entre les protéines pro- et anti-apoptotiques de la famille bcl-2 ([Chu et al.](#) ; [Yadav et al.](#)).

2.1.6 Traitements actuels pour contrer la résistance à l'apoptose

Les modalités de traitement impliquant la voie extrinsèque de l'apoptose dépendante des caspases sont constituées des agonistes et des activateurs des récepteurs de la mort, des thérapies liées à la voie p53 et d'autres mécanismes de mort cellulaire, tels que l'activation de l'ATF4 et les mécanismes épigénétiques qui favorisent l'apoptose intrinsèque ([Carneiro et al.](#)). Le traitement par les récepteurs de mort s'est concentré sur les agonistes DR4 et DR5, car ils ont montré une apoptose sélective des cellules malignes sans effets sur les cellules non malignes environnantes, contrairement à d'autres agonistes, tels que CD95R/FasR, qui était associé à une toxicité hépatique sévère, et TNFR, qui était associé à une inflammation ([Falschlehner et al.](#)). Des études antérieures ont examiné en détail la dulanermine, un anticorps monoclonal recombinant ayant une activité anti-DR4 et DR5, en monothérapie et en thérapie combinée, mais aucune efficacité clinique n'a été constatée, très probablement en raison de sa courte demi-vie (30 minutes) et de sa capacité limitée à induire un regroupement des récepteurs ([Berg et al.](#); [Herbst et al.](#)). Pour combattre la courte demi-vie et la capacité réduite de regroupement des récepteurs des agonistes solubles, des anticorps monoclonaux activateurs de DR4 et DR5 (par exemple, mapatumumab, lexatumumab, conatumumab, tigatuzumab et drozitumab) ont été étudiés. Le mapatumumab, en monothérapie et en association, a été bien toléré mais n'a pas montré d'efficacité clinique dans les essais de phase I et de phase II chez des patients atteints de carcinome pulmonaire non à petites cellules (NSCLC), de cancer colorectal et d'autres tumeurs solides, et a été associé à une lymphopénie de grade 3-4 par rapport aux autres bras de l'étude ([Mom et al.](#); [von Pawel et al.](#)). Le lexatumumab, étudié en monothérapie et en association, a montré des résultats de stabilisation de la maladie chez des enfants atteints d'ostéosarcome et des adultes atteints de sarcome, mais aucun résultat statistiquement significatif n'a été noté et une transaminite limitée par la dose a limité l'étude ([Plummer et al.](#)). Fréquemment inactivée dans les cancers humains, la fonction de p53 a été la cible des inhibiteurs de MDM2 et MDM4, qui bloquent la dégradation de p53 sans induire de dommages à l'ADN ([Wang et al.](#)). L'activation de l'ATF4, par l'intermédiaire de l'ONC201, conduisant à une régulation ascendante de DR5 dépendante de CHOP et à la mort cellulaire, s'est avérée provoquer la mort des cellules tumorales dans des essais précliniques et cliniques et reste à l'étude en tant que stratégie thérapeutique ([Stein et al.](#); [Wagner et al.](#)). Les inhibiteurs de la protéine histone désacétylase (HDAC) ou bromodomaines et domaine extra-terminal (BET) sont des modulateurs épigénétiques qui ont montré une activité anticancéreuse via plusieurs mécanismes conduisant à la mort cellulaire ([Carneiro et al.](#)). Les inhibiteurs BET ont montré une activité positive sur les lignées cellulaires de LAM et les cellules de lymphome cutané à cellules T dérivées de patients, par le biais d'une

synergie lorsqu'ils sont utilisés en association avec des inhibiteurs de Bcl-2, tels que l'ABT-199 ([Kim et al.](#)). Les inhibiteurs d'HDAC, qui modifient le remodelage de la chromatine et induisent l'apoptose par l'activation en aval de la voie intrinsèque et la mort cellulaire subséquente, ont donné des résultats positifs dans les lignées cellulaires de rhabdomyosarcome lorsqu'ils étaient associés à l'ABT-199 ([Heinicke et al.](#) ; [Zhao et al.](#)). Des résultats positifs ont également été observés lorsque des inhibiteurs d'HDAC ont été utilisés en association avec le panobinostat et le fimépinostat dans le lymphome diffus à grandes cellules B, les lignées cellulaires de myélome multiple et le lymphome réfractaire, respectivement ([Liu et al.](#) ; [Ramakrishnan et al.](#)).

De nombreux traitements sont donc à l'étude et montre de grandes avancées, cependant plusieurs facteurs tels que le types de cancers sont à prendre en compte et la voie de l'apoptose à utiliser, il n'y a donc pas de possibilités d'avoir un traitement universel pour tous les types de cancers via la voie de l'apoptose.

2.1.7 Mutations dans la voie extrinsèque qui conduisent à la tumorigenèse

Une dérégulation de l'apoptose peut conduire à différents types de maladies comme les maladies auto-immunes, les maladies neurodégénératives, les maladies bactériennes et virales, les maladies cardiaques ou le cancer ([Pistritto et al., 2016](#)). De nombreuses revues de la littérature ont fait état dans le passé de mutations dans la voie de l'apoptose qui conduisent au cancer et favorisent la résistance des cellules à l'apoptose ([Fernald et al., 2013](#); [Ghavami et al., 2009](#)). Cependant, les mécanismes qui sous-tendent la résistance des cellules cancéreuses à l'apoptose font l'objet de recherches continues et de nouvelles données sont découvertes. Il est important de connaître les principales mutations et adaptations des cellules cancéreuses afin de fournir une meilleure prise en charge clinique et un plan de traitement personnalisé aux patients. Nous passons ici en revue les principales mutations trouvées dans les cancers et un large résumé est présenté dans le tableau. (Pour plus d'information, voir annexe I de la revue de littérature « Review of cancer cell resistance mechanisms to apoptosis and actual targeted therapies »).

Tableau 2.2 Mutations connues des voies apoptotiques dépendantes des caspases conduisant à la résistance des cellules cancéreuses.

Gene	Mutations	Outcome	Cancers	References
THE EXTRINSIC PATHWAY				
FasR/TNFRSF6	Deletion	Disruption of the Fas signaling death receptor pathway	Autoimmune lymphoproliferative syndrome	(Nabhani et al., 2015) (Justiz Vaillant et al., 2020) (Lambotte et al., 2013)
FADD	11q13.3 amplification	Inhibition of intracellular signal transmission	Lymphoepithelioma-like hepatocellular carcinoma	(Zhang et al., 2018) (Chan et al.)
Procaspase-8	Q482H mutation	Inhibition of dimerization leading to diminished caspase-8 activation	Gastric cancers	(Li et al., 2019 ; Li et al., 2018)
	Deletion	Impaired activation of the extrinsic apoptotic pathways	Small cell lung carcinomas	(Hopkins-Donaldson et al., 2003)
Procaspase-9	Silent mutations in splice sites	Impaired activity	Gastric cancers	(Soung et al., 2006)
	-21263 GG Genotype	Enhances cancer cell sensitivity to apoptosis	Lung cancer	(Park et al., 2015)
Procaspase-3	Silent and missense mutations	Impaired activity	Stomach adenocarcinoma, lung cancer, colon cancer, hepatocellular carcinoma, and multiple myeloma	(Soung et al., 2004)

	rs4647601:TT genotype	Decreases cancer cell sensitivity to apoptosis	Squamous cell carcinoma of the head and neck	(Chen et al.)
Procaspase-7	Nonsense mutation	Diminished caspase activity	Colon adenocarcinoma, esophageal squamous cell carcinoma, and laryngeal squamous cell carcinoma	(Soung et al., 2003)
DFF40	Hemizygous deletions of 1p36	Impaired DNA fragmentation	Human HCC cell lines	(Hsieh et al., 2003)
	Downregulation of protein expression	Impaired DNA fragmentation	Uterine leiomyosarcomas	(Banas et al., 2017a)
c-FLIP	Deregulated protein expression	Enhanced inhibition of procaspase-8 activation	CCRF-HSB-2 leukemia cell line and the MCF-7 breast cancer cell line	(Safa et al., 2008)
XIAP	Deletion	Continuous activation of caspase-9	X-linked lymphoproliferative disease	(Rigaud et al., 2006)

Des mutations impliquant les DR ont été rapportées dans des cancers. Dans les lignées cellulaires de carcinome pulmonaire à petites cellules (SCLC), aucun DR de surface n'est détecté ([Hopkins-Donaldson et al., 2003](#)). Une mutation dans le gène qui code pour une protéine Fas située dans le bras long du chromosome 10 peut conduire au syndrome lymphoprolifératif auto-immune (ALPS), qui est un type de troubles lymphoprolifératifs ([Justiz Vaillant et al., 2020](#)). L'ALPS résulte souvent de mutations germinales dominantes hétérozygotes de FAS ou de mutations somatiques hétérozygotes de FAS (10-15 % des cas d'ALPS-FAS) ([Lambotte et al., 2013](#)). Les mutations germinales homozygotes sont plus rares ([Lambotte et al., 2013](#)). L'ALPS causé par un déficit en FAS/TNFRSF6 (ALPS-FAS) entraîne une perturbation de la signalisation apoptotique via la voie Fas DR, ce qui compromet principalement l'homéostasie des lymphocytes ([Nabhani et al., 2015](#)). Des mutations sur le chromosome humain 11q13.3, qui est le locus contenant le gène FADD, sont fréquemment observées dans les tumeurs malignes humaines ([Tourneur et al., 2005](#)). Cette mutation empêche la transmission des signaux apoptotiques via FADD avec DR ([Gómez-Angelats et al., 2003](#)). Par exemple, le carcinome hépatocellulaire de type lymphoépithéliome (LEL-HCC) est caractérisé par une amplification focale marquée du chromosome 11q13.3 ([Chan et al.](#)). Des études *in vivo* et *in vitro* menées par Weimin et al ont démontré que l'amplification du miR-548k situé dans l'amplicon 11q13.3 favorisait la lymphangiogenèse et les métastases lymphatiques ([Zhang et al., 2018](#)).

Les mutations impliquant les caspases dans la chimiorésistance aux traitements anticancéreux ont été largement rapportées dans le passé ([Ghavami et al., 2009](#)). Les mutations de la caspase-8 sont principalement détectées dans les cancers gastriques ([Soung et al., 2005](#)). La mutation Q482H de la procaspase-8 abolit l'apoptose en provoquant une atténuation de la dimérisation des monomères protéiques de la procaspase-8, ce qui entraîne une résistance à la chimiothérapie ([Li et al., 2019](#)). Les mutations du gène de la caspase-8 impliquent principalement des délétions dans le cadre, des substitutions et des insertions d'acides aminés ([Ghavami et al., 2009](#)). Une délétion de la protéine procaspase-8 a également été notée dans le SCLC ([Hopkins-Donaldson et al., 2003](#)). Initialement étudié dans des tissus de neuroblastomes sans preuve de mutations somatiques, l'isolement de l'ADN génomique par Soung et ses collègues à partir de tissus normaux et tumoraux a révélé des mutations silencieuses des sites d'épissage de la caspase-9 dans deux carcinomes colorectaux et un carcinome gastrique ([Abel et al.](#); [Soung et al., 2006](#)). Park et ses collègues ont ensuite étudié les mutations de la caspase-9 dans le cadre d'une étude cas-témoins chez des patients atteints de cancer du poumon et ont constaté que certains génotypes (-21263 GG) présentaient un risque significativement réduit de cancer du poumon ([Park et al.](#)). Soung et ses collègues ont également étudié la mutation somatique de la

caspase-3 dans plusieurs cancers ([Soung et al., 2004](#)). Des mutations silencieuses et antisens ont été trouvées dans l'adénocarcinome de l'estomac, le cancer du poumon, le cancer du côlon, le carcinome hépatocellulaire et le myélome multiple. Chen et ses collègues ont examiné les mutations de la caspase-3 dans le carcinome épidermoïde de la tête et du cou (SCCHN), l'un des cancers les plus courants dans le monde, dans une étude cas-témoins portant sur 1863 patients ([Chen et al.](#)). Ils ont découvert que le génotype caspase-3 rs4647601:TT était associé à un risque accru de SCCHN ([Chen et al.](#)). Des polymorphismes de la caspase-7 ont été observés dans l'adénocarcinome du côlon, le carcinome spinocellulaire de l'œsophage et le carcinome spinocellulaire du larynx ([Soung et al., 2003](#)). Les auteurs ont conclu que l'altération de l'Arg-43 diminue la fonction protéase de la caspase-7 et que la mutation conduit à une incapacité à induire l'apoptose.

XAF1 joue un rôle important dans l'angiogenèse du cancer. Des niveaux élevés d'expression de XIAP à XAF1 dans les cellules cancéreuses peuvent fournir un avantage de survie ([Fong et al., 2000](#)). De plus, l'expression anormalement élevée des protéines IAP représente un événement oncogénique fréquent dans les cancers humains ([Majorini et al., 2018](#)). En effet, Jaiswal et al soulignent que la survivine est fortement exprimée dans la plupart des cancers et est associée à un mauvais résultat clinique ([Jaiswal et al., 2015](#)). Une dérégulation de l'expression de c-FLIP L a été observée dans les tumeurs ([Bagnoli et al., 2010](#)). L'expression accrue de c-FLIP est impliquée dans la résistance à l'apoptose induite par CD95/Fas et TRAILR dans divers cancers ([Safa et al., 2008](#)). Une étude réalisée sur 12 patients atteints de la maladie lymphoproliférative liée à l'X (XLP) a révélé une mutation du gène codant pour le BIRC4/XIAP et entraînant un déficit de ce dernier ([Rigaud et al., 2006](#)). De plus, des immunodéficiences primaires peuvent être causées par un déficit en XIAP dû à la délétion du gène BIRC4 ([Parackova et al., 2020](#)).

2.2 Structure et activation du DFF

2.2.1 Structure et voie de signalisation

La fragmentation de l'ADN est due à l'activation du DFF40 ou de la DNase activée par la caspase (CAD) qui est impliquée dans la dernière étape de l'apoptose ([Banas et al., 2018](#)). Le DFF40 (facteur de fragmentation de l'ADN, sous-unité de 40 kDa) ou nucléase activée par la caspase (CPAN) est le nom de l'homologue humain, le nom de l'orthologue de la souris est DNase activée par la caspase (CAD) ([Iglesias-Guimaraes et al.](#)). Le DFF40 a un poids moléculaire de 40 kDa et une séquence moléculaire de 345 acides aminés divisée en 3 domaines. On retrouve le domaine CIDE-N qui est important dans les interactions du complexe DFF40/DFF45, il est composé de 80 acides aminés très conservés entre les deux composants du complexe DFF ([Kerr et al., 1972](#)). Le second domaine est le plus petit et se situe entre la position 86 et 131 des acides aminés et contient 3 hélices alpha. Pour finir, le troisième domaine est positionné entre les acides aminés 132 et 345, ce dernier est formé d'hélices alpha ainsi que de 4 feuillets bêtas, et une boucle sur l'extrémité C-terminale ([Kerr et al., 1972](#)). Son activité catalytique pour la fragmentation de l'ADN réside dans son dernier domaine, son extrémité C-terminale ([Widlak, 2000](#)). Son activité endonucléasique maximale se trouve à pH 7.5 et nécessite du Mg²⁺ et son activité catalytique est inhibée par une forte concentration en Zn²⁺ ([Widlak et al.](#)). Une étude chez la souris a montré que 4 résidus d'histidine seraient vitaux pour l'induction de la fragmentation de l'ADN par DF40 : résidus 242, 263, 313, 308 ([Meiss et al., 2001](#)). Le complexe DFF est constitué d'un dimère : DFF40 (DNase activée par la caspase ; CAD) et DFF45 (inhibiteur de la DNase activée par la caspase ; ICAD). Le DFF45 bloque l'homo-oligomérisation nécessaire à l'activation de la nucléase DFF40 en s'associant au DFF45 ([Bagheri et al., 2015](#)). La forme active de DFF40 est libérée par le clivage de DFF45 par la caspase 3 pendant l'apoptose extrinsèque. Cela permet au domaine actif de DFF40 d'entraîner la fragmentation de l'ADN. Le DFF45 a un rôle chaperonne impliquée dans le repliement correct du DFF40 ([Fukushima et al., 2002](#)). L'activité chaperonne de DFF45 montre l'absence de fragmentation de l'ADN ou de condensation de la chromatine chez les souris déficientes en DFF45. DFF45 est donc irremplaçable dans la production de DFF40 fonctionnel ([Zhang et al., 1998](#)). L'activité catalytique de la DFF40 génère des fragments d'ADN de 50 à 300 pb lors des étapes initiales de la fragmentation apoptotique de l'ADN chromosomique, conduisant à la production de fragments d'ADN internucléosomique de 180 à 200 pb à la terminaison ([Oberhammer et al., 1993](#)). Il a été démontré que l'expression de DFF40 est régulée à la baisse dans les lignées cellulaires cancéreuses telles que les léiomyosarcomes utérins, les

cancers de l'endomètre non endométrioïdes et endométrioïdes de haut grade et les lignées de cellules T leucémiques ([Abbas et al., 2020](#); [Banas et al., 2018](#)).

Enfin, des régulations de l'étape finale de l'apoptose peuvent également se produire. L'activité nucléasique de DFF40/CAD peut être activée par des protéines chromosomiques spécifiques, telles que l'histone H1, les protéines chromatides contenant des boîtes HMG (HMGB) 1 et 2 et la topoisomérase II (TOP2). L'histone H1, HMG-1/2 et la TOP2 permettent d'activer le DFF en piégeant les super-bobines et les croisements d'ADN, ce qui induit des conformations d'ADN qui imitent partiellement l'enveloppement de l'ADN nucléosomal ([Widlak et al., 2000](#)). Une étude sur des cellules somatiques H1 a montré que l'histone H1 stimule le clivage de l'ADN et que son domaine C-terminal (CTD) est responsable de l'activation du DFF40/CAD ([Widlak et al., 2005b](#)). La liaison des protéines HMGB 1/2 rend le substrat plus accessible au clivage par la nucléase DFF40/CAD selon les données d'une étude ([Kalinowska-Herok et al., 2008](#)). Enfin, TOP2 permet la condensation et la ségrégation des chromosomes ([Durrieu et al., 2000](#)). DFF45/ICAD et DFF35/ICAD-S ont également la capacité d'inhiber les homo-oligomères activés de DFF40/CAD.

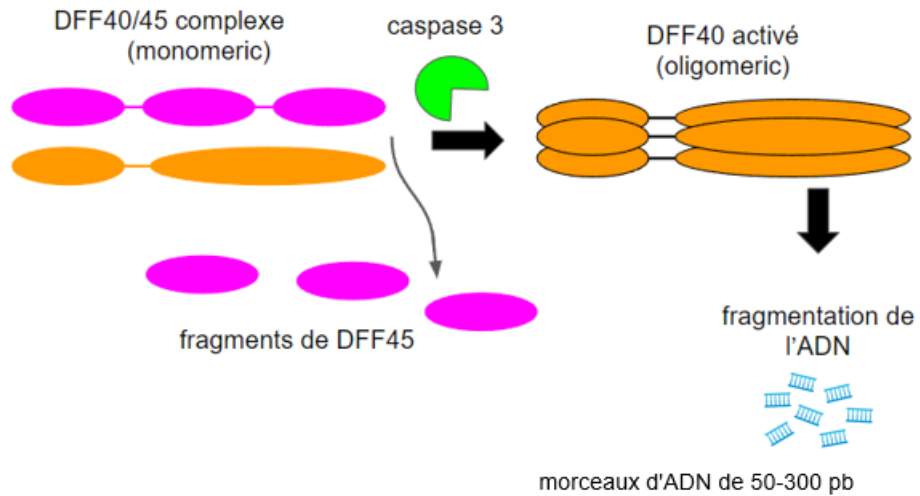


Figure 2.2 Illustration du complexe DFF (DFF40 et DFF45) et son activation par la caspase 3. Le DFF45 (en rose), le DFF40 (en orange) et la caspase 3 sous forme active (en vert) sont représentées. Ce schéma simplifié représente l'activation du DFF40 entraînant la fragmentation de l'ADN.

2.2.2 Fonctions du DFF40

Tel que mentionné plus haut, la dernière étape de l'apoptose qui consiste à dégrader l'ADN permet de maintenir l'homéostasie, empêchant le transfert de gène et en inhibant la réponse immunitaire innée stimulée fortement par l'ADN ([Mukae et al.](#)). La fragmentation de l'ADN se produit en deux étapes au minimum avec un clivage de gros fragments dans un premier temps puis la fragmentation en plus petits fragments ([Kitazumi et al.](#)). Le DFF40 est l'acteur principal pour la fragmentation en 200 pb ([Sakahira et al.](#)). Le DFF40 permet le clivage des régions d'espacement nucléosomiques et de la condensation subséquente de la chromatine dans la dernière étape de l'apoptose ([Enari et al.](#) ; [Sakahira et al.](#)). La régulation du DFF40 est dépendante de son association avec le DFF45 (ICAD) ([Ha et al., 2018](#)). Le DFF45 existe en deux variantes d'épissage alternatives : la forme longue, ICAD-L ou DFF45, et la forme courte, ICAD-S ou DFF35 ([Lechardeur et al., 2000](#)). Le DFF35 est dépourvu de la partie C-terminale composée de 63 résidus d'ICAD et est localisé au niveau du cytoplasme ([Gu et al.](#)).

L'interaction entre le complexe DFF40/DFF45 est médiée par le domaine CIDE-N, comme expliqué précédemment. Cette interaction implique d'une part les domaines fonctionnels (D1, D2, D3) de DFF45 et d'autre part les domaines activateur et catalytique de DFF40 ([McCarty et al., 1999](#)) Une région impliquant les acides aminés Lys9, Lys18, Lys32 et Arg36 qui est une région formée de résidus basiques entoure un patch convexe hydrophobe central composé Phe19, Val21 et Ala22. Tout cela permet une interaction avec un noyau acide du DFF45 composé de Asp66, Asp71, Asp72 et Asp74 qui lui-même entoure un noyau hydrophobe concave composé de Ile69, Val70 et Tyr72 ([Zhou et al.](#)). Ensuite, une interaction plus puissante avec le domaine CIDE-N du DFF40 et la région qui entoure le site du clivage par la caspase-3 du DFF45 solidifie le lien du complexe DFF. Ce lien permet d'inhiber l'activité catalytique du DFF40 ([Kutscher et al.](#)). Il a été démontré que les acides aminés 101 à 180 du DFF45 permettent de médier la liaison du complexe DFF, d'un autre côté les résidus compris de 23 à 100 sont responsables de l'activité inhibitrice du DFF45 ([Gu et al.](#)). Comme décrit précédemment, deux isoformes de DF45 existent, la forme courte, elle, semble présenter une plus grande affinité que la forme longue pour le DFF40 ([Gu et al.](#)). Sur le point de la localisation du complexe DFF sous sa forme inactive, un débat persiste. Cependant, certaines études suggèrent que le complexe inactif DFF40/DFF45 était transféré dans le noyau en attendant des déclencheurs de l'apoptose après sa traduction dans le cytoplasme ([Widlak, 2000](#)).

L'histone H1, HMG-1/2 et la TOP2 permettent d'activer le DFF en piégeant les super-bobines et les croisements d'ADN, ce qui induit des conformations d'ADN qui imitent partiellement

l'enveloppement de l'ADN nucléosomal ([Widlak et al., 2000](#)). Une étude sur des cellules somatiques H1 a montré que l'histone H1 stimule le clivage de l'ADN et que son domaine C-terminal (CTD) est responsable de l'activation du DFF40/CAD ([Widlak et al., 2005b](#)). La liaison des protéines HMGB 1/2 rend le substrat plus accessible au clivage par la nucléase DFF40/CAD selon les données d'une étude ([Kalinowska-Herok et al., 2008](#)). Enfin, TOP2 permet la condensation et la ségrégation des chromosomes ([Durrieu et al., 2000](#)). DFF45/ICAD et DFF35/ICAD-S ont également la capacité d'inhiber les homo-oligomères activés de DFF40/CAD. La DFF45 a également un rôle de molécule chaperon où elle permet le repliement correct de la DFF40 nouvellement synthétisée ([Widlak et al., 2005a](#)).

2.2.3 Anomalie liée à l'expression du DFF

Un dérèglement du fonctionnement du complexe DFF peut entraîner des malignités et autres désordres. De nombreuses études montrent des changements morphologiques nucléaires apoptotiques ou des activations de l'apoptose sans avoir la présence de fragmentation de l'ADN. Dans un premier temps, on peut citer une étude qui a démontré qu'une mutation dans l'expression de l'ICAD dans les cellules Jurkat remplaçant les résidus Asp117 et Asp224 par l'acide glutamique, induit une condensation de la chromatine près de la périphérie nucléaire, cependant aucune fragmentation nette est observée avec une exposition à la staurosporine ([Sakahira et al., 1999](#)). Ce phénomène est aussi observable dans les cellules Jurkat et TF-1 exprimant la forme mutée du DFF45 au site de reconnaissance de la caspase 3, empêchant son clivage protéolytique ([McIlroy et al., 1999](#)). Dans un modèle murin, un déficit de DFF45 entraîne une résistance à la fragmentation de l'ADN dans les splénocytes et les thymocytes, ainsi qu'une résistance à la condensation de la chromatine ([Zhang et al., 1998](#)). Notre laboratoire a prouvé que les cellules Jurkat T déficientes en DFF40 à la suite de l'induction de l'apoptose par tributylétain (TBT) ne présentent pas de fragmentation de l'ADN, pourtant l'action de la caspase 3 est bien présente dans les cellules ([Kulbay et al., 2019](#)). Il est possible d'observer le même schéma dans les glioblastomes. En effet, le déficit en DFF40 dans les glioblastomes humains altère la fragmentation de l'ADN dans les cellules qui possèdent une activation normale de la cascade d'apoptose ([Sánchez-Osuna et al., 2016a](#)). Des anomalies de la fragmentation de l'ADN dans la mort cellulaire peuvent aussi être dues à des mutations dans la voie apoptotique en amont de la caspase-3. La molécule transmembranaire, le CD45, impliqué dans la modulation du TCR et des cytokines, régule l'apoptose des cellules T ([Liu et al., 2006](#)). Ainsi, un déficit intrinsèque en CD45

dans des lymphocytes T altère la fragmentation de l'ADN tout en gardant l'activation de la caspase-3 et le clivage du DFF45 ([Desharnais et al., 2008](#)). Nous pouvons conclure que des altérations de la voie apoptotique qui altèrent aussi la fragmentation de l'ADN peuvent donc altérer le maintien de la stabilité génomique ([Kulbay et al., 2021a](#)). ([Soung et al., 2003](#)). Enfin, des défauts dans l'expression de DFF sont associés à plusieurs types de cancers ([Bagheri et al., 2015](#)). Les délétions hémizygotiques du chromosome 1p36 sont souvent associées à certains types de cancers ([Hsieh et al., 2003](#)). Il a été démontré que la déficience en DFF40 dans les cellules Jurkat réduit la sensibilité des cellules à l'apoptose induite par le tributylétain ([Kulbay et al., 2019](#)). Il a également été démontré que l'expression des protéines DFF40 et DFF45 était régulée à la baisse dans les léiomyosarcomes utérins et liée à un mauvais pronostic ([Banas et al., 2017a](#)).

2.2.4 Le DFF40 permet la régulation de la stabilité génomique

La stabilité génomique permet de conserver l'intégrité cellulaire et la protection contre la transformation tumorale, elle est donc essentielle pour les cellules humaines. L'intégrité du génome peut être altérée par : les ultraviolets (UV), le stress oxydatif, l'exposition à des réactifs chimiques mutagènes ou bien des radiations ([Wang et al., 2016](#)). De nombreux mécanismes permettent de faire barrage à ces lésions irréversibles comme les voies de réparations de l'ADN, les points de contrôle du cycle cellulaire et la fonction télomérique ([Kulbay et al., 2021a](#)).

La réponse aux dommages à l'ADN (DDR) peut être effectuée par la voie ATM spécifique des cassures double brins spécifiques (DSB) ou par voie ATR spécifique des cassures simple brins spécifiques (SSB). La DDR mène à une suractivation de la voie de réparation cellulaire par l'expression de la protéine kinase ADN-dépendante (DNA-PK) et la perte de TRF2 au niveau des télomères ([Hain et al., 2016](#)). Les dommages à l'ADN se produisent dans la phase tardive après un arrêt mitotique prolongé, impliquant donc l'ATM et l'ADN-PK mais aussi l'activation des caspases ([Hain et al., 2016](#)). Dans l'étude de Hain et al., il a été démontré que les protéines de la famille Bcl-2, caspase-9, caspase-3/7 et DFF40 régulent la voie de réparation des dommages à l'ADN. Selon notre laboratoire, l'hypothèse serait que le déficit en DFF40 présent dans les tumeurs malignes, serait également impliqué dans l'altération des systèmes DDR via une inhibition de l'activité DNA-PK et ATM, une perte de formation de γ H2AX et par le maintien de TRF2 au niveau des télomères ([Kulbay et al., 2021a](#)). Ainsi cela pourrait altérer la stabilité génomique des cellules cancéreuses et elles pourraient progresser en intégrant des mutations, dues à la régulation de leur télomère et à l'altération des systèmes de réparation de l'ADN. Une

autre hypothèse de notre laboratoire, était que TOPBP1 pourrait interagir avec un facteur inconnu sur l'ADN endommagé et si ce facteur implique un partenaire de DFF40, un déficit de DFF40 pourrait également compromettre la voie ATR ([Flynn et al., 2011](#); [Kulbay et al., 2021a](#)).

Il existe deux principaux points de contrôle importants dans la tumorigenèse qui ont été fréquemment identifiés comme des sites potentiels de mutation dans le développement du cancer : les points de contrôle G1/S et G2/M ([Malumbres et al., 2009](#)). Ces deux points de contrôle sont cruciaux pour la détection des dommages à la chromatine qui peuvent potentiellement conduire à l'instabilité génomique et au développement du cancer ([Vermeulen et al., 2003](#)). Le point de contrôle G1/S dépend de l'activité de p53 et de l'expression du produit du gène suppresseur de tumeur du rétinoblastome (Rb). Après la détection d'une lésion de l'ADN, les cellules stimulent l'expression de p53 qui médiatise l'apoptose cellulaire, en fonction de l'irréversibilité de la lésion ([Vermeulen et al., 2003](#)).

Le point de contrôle G2/M est responsable de la réparation des dommages à l'ADN avant l'entrée en mitose et permet de préserver la stabilité génomique des cellules somatiques ([Tyagi et al., 2002](#)). Le rôle du point de contrôle G2/M semble être plus important, car il peut réparer les dommages à l'ADN qui ont pu contourner le point de contrôle G1/S ([Tyagi et al., 2002](#)). Ainsi, tout dysfonctionnement des protéines dans les régulateurs directs du point de contrôle G2/M pourrait potentiellement conduire à la tumorigenèse.

Le DFF40 est important dans la condensation de la chromatine et l'effondrement nucléaire durant la mort cellulaire ([Sánchez-Osuna et al., 2016b](#)). Ainsi les protéines modulant l'ADN sont parmi les régulateurs les plus prédominants des points de contrôle du cycle cellulaire. Il est donc intéressant de s'interroger sur l'impact de la déficience de DFF40 dans la régulation de la transition G1/S. Ces observations ont permis à notre laboratoire de supposer qu'un manque d'expression de DFF40 peut altérer l'efficacité des points de contrôle du cycle cellulaire, permettant ainsi aux cellules de subir la mitose à un rythme plus rapide ([Kulbay et al., 2021a](#)). Cette hypothèse est soutenue par des études qui ont montré que la diminution de l'expression de DFF40 est responsable de taux de prolifération et de survie élevés dans les cellules cancéreuses, malgré de nombreuses anomalies chromosomiques ([Banas et al., 2017a](#)).

2.2.5 Importance de l'apoptose chez les cellules cancéreuses

Cliniquement, de nombreuses malignités ont montré une dérégulation de l'expression de DFF40 et DFF45 : dans une première étude, l'expression de DFF40 a été retrouvée diminuée dans les cancers de l'endomètre non endométrioïdes et endométrioïdes de haut grade ([Banas et al.](#)), dans une autre étude le DFF40 est sous-exprimé dans des cellules de myomètre utérin de léiomyosarcomes (uLMS-M) ([Banas et al., 2017b](#)) et des faibles niveaux de DFF40 ont été retrouvés dans des glioblastomes ([Sánchez-Osuna et al., 2016b](#)). De plus, notre laboratoire a montré que dans des cellules traitées au TBT avec une déficience en DFF40 : un retard dans l'activation de la caspase-3, le clivage de la poly (ADP-ribose) polymérase (PARP) et une absence totale de phosphorylation de l'histone H2AX ([Kulbay et al.](#)). Les tumeurs malignes ont de nombreuses mutations et des altérations d'expressions de protéines qui contribuent à leur tumorigénèse. Plusieurs profils tumoraux malins sont liés à l'expression du DFF40 et de son inhibiteur le DFF45.

Il a été observé qu'une diminution des niveaux d'ARNm de DFF45 est associée à un mauvais pronostic chez des patients atteints d'un carcinome épidermoïde de l'œsophage ([Konishi et al., 2002](#)). Ces niveaux d'ARNm de DFF45 diminués sont retrouvés chez les patients avec un stade pathologique et statut plus élevé que la normale, avec des métastases ganglionnaires et chez des patients avec des invasions lymphatiques étendues ([Konishi et al., 2002](#)). L'expression du DFF45 est aussi compromise dans les cellules épithéliales du cancer du côlon humain. Les études *in vivo* et *in vitro* utilisant ces cellules épithéliales du côlon de souris montrent un déficit en DFF45/ICAD entraînant une résistance à la mort des cellules au carcinogène du côlon diméthylhydrazine ([Errami et al., 2013](#)). Une autre étude a montré que l'expression de DFF45/ICAD est significativement diminuée dans des tissus de carcinomes à cellules rénales humaines par rapport aux cellules rénales normales ([Rajandram et al., 2016](#)). De plus, une régulation à la baisse de DFF40/DFF45 a été trouvée dans léiomyosarcomes utérins est associé aussi à un mauvais pronostic ([Banas et al., 2017a](#)). Comme vue précédemment, plusieurs études s'accordent sur le fait qu'une régulation à la baisse de l'expression de DFF45/ICAD peut être lié à la résistance dans le cancer, cependant peu d'études rapportent l'observation opposée. Par exemple, il a été observé dans le cancer séreux de l'ovaire, une régulation à la hausse de DFF45/ICAD lié à un mauvais pronostic ([Brustmann, 2006](#)). De plus, dans les hyperplasies endométriales non atypiques et atypiques, il a été trouvé une augmentation de l'expression du DFF45, ce qui pourrait être lié à la résistance à l'apoptose ([Brustmann, 2007](#)). Il faut rappeler qu'une altération de la structure du DFF45 est liée à une absence d'activité du DFF40

Pour ce qui est de l'expression du DFF40, il est sous-exprimé dans les cancers de l'endomètre non endométrioïdes et endométrioïdes de haut grade, mais aussi dans léiomyosarcomes utérins et dans les glioblastomes, et cette sous expression est liée à un mauvais pronostic ([Banas et al., 2017a](#); [Banas et al., 2018](#); [Sánchez-Osuna et al., 2016a](#)). Cependant, la surexpression du DFF40 dans des lignées cellulaires de cancer du sein T47-D entraîne une sensibilisation à l'apoptose induite par des médicaments ([Bagheri et al., 2014](#); [Bagheri et al., 2015](#)). Ces études prises ensemble semblent suggérer que le DFF40 a un rôle crucial dans le développement de la tumorigenèse tout comme son inhibiteur le DFF45 ([Kulbay et al., 2021a](#)). De plus, une étude de notre laboratoire a montré que la ré-expression du DFF40 dans des cellules Jurkat est liée à une augmentation de la sensibilité des cellules cancéreuses ([Kulbay et al., 2019](#)). Un autre article de notre laboratoire a montré que la sensibilité des cellules cancéreuses déficientes en DFF40 avait une sensibilité différente selon le type de chimiothérapies. En effet, les cellules cancéreuses déficientes en DFF40 étaient décrites comme moins sensibles aux antimétabolites, alors que l'utilisation d'inhibiteurs de TOP2 semblait améliorer la chimiosensibilité de ces cellules ([Kulbay et al., 2021b](#)).

2.3 La cycloheximide (CHX)

2.3.1 Structure

La cycloheximide (CHX) est un composé semi-synthétique soluble dans l'eau possédant un poids moléculaire de 281,35 g/mol, elle contient une fonction glutarimide. La CHX induit des effets toxiques tels que : des lésions de l'ADN, la tératogénèse et des effets sur la reproduction. La CHX a été utilisée comme fongicide en agriculture ([Lawana et al., 2014](#)). La cycloheximide est un inducteur d'apoptose tout comme le Fas-ligand par exemple. La CHX est un antibiotique produit par *Streptomyces griseus*, elle est un inhibiteur de l'élongation de la traduction de la biosynthèse des protéines dans les cellules eucaryotes et augmente la cytotoxicité du facteur de nécrose tumorale- α (TNF- α) ([Alessenko et al., 1997](#)). La cycloheximide a été utilisée pendant des décennies pour inhiber rapidement et de façon réversible les ribosomes allongés afin d'étudier la synthèse des protéines et permettre de mesurer les demi-vies des protéines ([Baliqa et al., 1969](#)).

La translocation de l'ARNt médiée par eEF2 est bloquée par la liaison de la CHX au site E de la grande sous-unité ribosomale, ce qui bloque le processus de traduction de l'ARNm en protéine ([Schneider-Poetsch et al., 2010](#)). Les inhibiteurs de la synthèse protéique peuvent avoir deux effets contradictoires : d'une part, ils peuvent limiter la production de molécules protectrices, induisant ainsi l'apoptose, et d'autre part, ils peuvent inhiber l'expression des gènes de mort, inhibant ainsi l'apoptose ([Lemaire et al., 1999](#)).

Cet article « Liu X, Yang JM, Zhang SS, Liu XY, Liu DX. Induction of cell cycle arrest at G1 and S phases and cAMP-dependent differentiation in C6 glioma by low concentration of cycloheximide » a montré qu'une faible concentration de CHX inhibait la prolifération des cellules de gliome C6 et que les cellules aux phases G2 et M seraient épuisées, ce qui pourrait être dû à un blocage aux phases G1 et S lors de l'accumulation massive de protéines ([Liu et al., 2010](#)).

2.3.2 Voie apoptotique induite par la cycloheximide

Comme expliqué précédemment, la cycloheximide est un inhibiteur de l'élongation de la traduction de la biosynthèse des protéines dans les cellules eucaryotes et augmente la cytotoxicité du TNF- α ([Alessenko et al., 1997](#)). La cycloheximide peut induire la mort des cellules T par un mécanisme lié à FADD (FAS-associated death domains) ([Lawana et al., 2014](#)). Il a été démontré que la cycloheximide induit l'apoptose dans des lignées de cellules sanguines telles que HL-60, Molt-4 et U937 in vitro ([Gong et al., 1993](#); [Martin et al., 1990](#)). Malgré ces études antérieures décrivant l'induction de l'apoptose par la cycloheximide, le mécanisme impliqué est encore mal compris ([Tsuchida et al., 2002](#)). De plus, certains papiers montrent que la cycloheximide peut aussi induire l'apoptose à travers la voie intrinsèque. En effet, d'après une étude, la cycloheximide a été utilisée pour induire une apoptose intrinsèque dans RAW264.7 infectée par Leishmania, et que cette apoptose a été retardée grâce à la cycloheximide ([Zeng et al., 2016](#)). Cependant ce papier se base sur un autre papier qui lui montre que l'infection à Leishmania inhibe l'apoptose des macrophages induite par la cycloheximide sans vraiment déterminer la voie apoptotique utilisée ([Donovan et al., 2009](#)).

3 MATÉRIEL ET MÉTHODES

3.1 Matériels

RPMI 1640 (11875-093), pénicilline/streptomycine (15140-122), HEPES (15630-080) et iodure de propidium (PI, P3566) ont été achetés auprès de Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA). Cycloheximide (C15H23NO4, 66819), peroxyde d'hydrogène (H₂O₂; 516813) et le sérum bovin fœtal (FBS, F1051) provenaient de Sigma-Aldrich Corporation (Milwaukee, WI, USA). L'anti-caspase-3 (9668S) provenait de Cell Signaling Technology Inc. (Danvers, MA, USA). Les sondes H2DCFDA (D399) et caspase 3/7 (R37111) ont été obtenues auprès d'Invitrogen Corporation (Carlsbad, CA, USA) provenait de CaymanChemical Company (Ann Arbor, MI, États-Unis). Le kit de détection d'apoptose annexine V-FITC (B32115) a été acheté auprès de Cedarlane Laboratories (Burlington, ON, Canada). Le substrat Clarity Western ECL (170–5060) a été obtenu auprès de Bio-Rad Laboratories, Ltd. (Mississauga, ON, Canada). Les cellules XL10-Gold® Ultracompetent ont été achetées chez Stratagene (San Diego, CA, USA). Le kit QIAGEN Plasmid midi a été acheté auprès de Qiagen (Toronto, ON, Canada). Les plasmides d'expression sgRNA/cas9-all-in-one ont été obtenus auprès de GeneCopoeia (Rockville, MD, USA). Un FACScan® de Becton Dickinson (Oakville, ON, Canada) a été utilisé pour l'analyse par cytomètre en flux. EtBr a été visualisé à l'aide d'un Fluor S-Multimager par transillumination UV de Bio-Rad Laboratories, Ltd. (Mississauga, ON, Canada).

3.2 Génération d'une lignée CRISPR-Cas9 DFF40KO, knock-out de DFF40 induit par la méthode CRISPR-cas9 de Jurkat et transfection de gènes.

Cette partie a été réalisée antérieurement au projet par le laboratoire ([Kulbay et al., 2019](#)). Des délétions génétiques ont été réalisées avec la méthode CRISPR-cas9. Tout d'abord, les cellules Jurkat ont été transfectées avec 3x plasmides d'expression sgRNA/cas9-all-in-one ciblant le gène DFF40 par électroporation. 10⁷ cellules ont été lavées dans une solution saline tamponnée au phosphate (PBS) et mises en suspension dans 1 ml de milieu RPMI complété par 10% de FBS. Les cellules ont été électroporées 3 fois à 250 V (longueur d'impulsion : 10 ms) et immédiatement transférées dans un milieu de culture complet complété par 10% de FBS. Les cellules positives ont été sélectionnées avec de la généticine (G418) pendant 7 jours après la transfection. Le 8^{ème} jour post-transfection, les cellules ont été suspendues dans un milieu RPMI complet sans G418, et les populations ont été sélectionnées par deux séries de dilutions sérielles pour la perte de

DFF40 (KO Jurkat, Jurkat-BG11). L'expression de DFF40 a été évaluée par Western Blot. Après les premières dilutions en série, les cellules Jurkat qui ont une expression conservée de DFF40 ont été utilisées comme contrôle négatif (WT Jurkat, Jurkat-AD10). Aucune différence entre les cellules Jurkat AD10 et les cellules Jurkat parentales n'a été observée dans les différents tests. Pour confirmer le rôle de DFF40, la réexpression de DFF40 a été effectuée dans les cellules KO avec la Lipofectamine LTX en utilisant les plasmides pcDNA3.4-TOPO contenant l'ORF de DFF40 complet. 107 cellules ont été lavées dans du RPMI froid sans sérum et placées dans des plaques à 6 puits dans du milieu de culture OPTI-MEM. Pour la transfection, 250 µl de complexes composés de 2,5 µg d'ADN plasmidique, 2,5 µl de réactif PLUS et 7 µl de Lipofectamine LTX, dans Opti-MEM, ont été ajoutés aux cellules et incubés pendant la nuit. La sélection des cellules a été effectuée comme décrit précédemment.

Pour les cellules HeLa, des cellules DFF40 KO ont été générées par transfection Lipofectamine LTX (Thermo Fisher Scientific Cat # 15 338 100) en utilisant 3 × sgRNA / cas9-all-in-one plasmides d'expression ciblant le gène DFF40 (GeneCopoeia Cat # HCP256543-CG01-3). Brièvement, des cellules HeLa ont étéensemencées dans des plaques 6 puits (Sarstedt) dans du milieu DMEM/F12 complet additionné de 10% de FBS afin d'atteindre un état de confluence à 80% pendant la nuit. Le lendemain matin, le milieu de culture a été remplacé par du milieu Opti-MEM (Gibco) et 250 µl de complexe Lipofectamine LTX (2,5 µg d'ADN plasmidique, 2,5 µl de réactif PLUS et 7 µl de Lipofectamine LTX) ont été ajoutés aux cellules et laissés toute la nuit. Les milieux de transfection ont été remplacés par du milieu DMEM/F12 complet additionné de 10 % de FBS le jour suivant et 48 h après la transfection, de la généticine (G418) à 1 µg/ml a été ajoutée pour une sélection de 5 jours. Les cellules ont été passées dans du milieu DMEM/F12 complet sans G418 le 8ème jour, et des colonies individuelles ont été développées deux fois pour obtenir des populations monoclonales. Après la première expansion d'une seule colonie, les cellules HeLa, qui ont conservé une expression positive de DFF40, ont été utilisées comme contrôle négatif pour d'autres essais (HeLa DFF40 WT).

3.3 Traitements cellulaires

Les cellules Jurkat ont été lavées avec du PBS avant d'être ensemencées dans des plaques à 24 puits, la concentration cellulaire utilisée était de 1×10^6 cellules/ml dans un milieu complet RPMI 1640 avec 10% de FBS. Des doses croissantes de cycloheximide (1-50 μ M) ont été injectées dans les cellules, le cycloheximide a été dilué dans de l'éthanol (EtOH). Les traitements ont été effectués sur différents temps d'exposition, de 4 à 24 h pour les Jurkats. Le RPMI avec 0,1% de FBS a été utilisé pour les temps courts (0-6h) sur les cellules Jurkats.

Le maintien des lignées cellulaires Jurkat a été réalisé à l'aide de milieu RPMI 1640 avec 10 % FBS.

Les cellules HeLa ont été décollées à l'aide de trypsine puis ont été lavées avec du PBS avant d'être ensemencées dans des plaques de 24 puits, la concentration cellulaire utilisée était de 1×10^6 cellules/ml dans un milieu complet DMEM/F12 avec 10% de FBS. Des doses croissantes de cycloheximide (1-25 μ M) ont été injectées dans les cellules, le cycloheximide a été dilué dans de l'éthanol (EtOH). Les traitements ont été effectués sur différents temps d'exposition, de 24 et 48 h pour les Hela.

Le maintien des lignées cellulaire HeLa a été réalisé à l'aide de milieu DMEM/F12 avec 10% de FBS.

3.4 Le cytomètre en flux

Nous avons utilisé la cytométrie en flux afin d'obtenir des données de viabilités cellulaires. Le cytomètre en flux permet de pouvoir travailler sur un grand nombre de cellules et il est donc bien adapté pour ce type d'analyses, de plus il permet d'analyser plusieurs milliers de cellules en quelques secondes. Le cytomètre en flux ou plus communément appelé FACS® (*fluorescent activated cell sorter*) permet de s'intéresser à divers paramètres tels que : la taille (FSC), la granularité (SSC), le contenu en ADN, le contenu en protéine, le pH intracellulaire et la concentration en calcium. Ces quelques paramètres sont les plus étudiés à l'aide du cytomètre en flux. Cependant, il est aussi possible de mesurer la viabilité cellulaire, le taux d'apoptose, l'activation des caspases 3/7 et étudier le cycle cellulaire ; ce sont les paramètres étudiés dans notre projet qu'on décrira par la suite.

Le cytomètre en flux est composé d'une organisation de divers lasers optiques et de détecteurs électroniques et fluidiques. Ces outils permettent de mesurer la dispersion de la lumière et la

fluorescence en même temps ou pas sur une suspension cellulaire en flux concentrée dans une colonne de flux laminaire de la largeur d'une cellule. Lorsque qu'une cellule passe à travers un laser convergent de rayon de diamètre de quelques cellules de larges, cela entraîne une émission de lumière dispersée dans plusieurs directions. Cette dispersion de lumière est mesurée à 90° de l'incidence (SSC – *Slide Scattered*) pour déterminer la quantité de structures granulaires dans la cellule, une autre mesure est réalisée à 180° (FSC-*Forward Scattered*) pour déterminer approximativement la taille de la cellule. A l'aide de ces deux paramètres, il est possible de distinguer un grand nombre de types cellulaires, mais aussi de distinguer les cellules mortes, des agrégats, des débris cellulaires dans la suspension cellulaire analysée.

Il est possible d'utiliser des colorants ou des fluorochromes qui lient des protéines ou des acides nucléiques, ou des colorants fluorescents avec des spectres d'émission dépendant des concentrations en ions, hydrogène ou calcium. A l'aide du cytomètre, il est possible d'identifier des protéines spécifiques, grâce à des colorants comme la fluorescéine (FITC) ou la phycoérythrine (PE) sont attachées avec des liens covalents à des anticorps monoclonaux qui se lieront spécifiquement aux cellules exprimant la protéine voulue. Le cytomètre à l'aide de filtres capte la lumière des différentes longueurs d'onde émanant des colorants utilisés et elle est redirigée vers les photodétecteurs. Il est possible de détecter 5 longueurs d'ondes maximums simultanément avec les paramètres FSC et SCC en plus.

3.4.1 Viabilité cellulaire

L'iodure de propidium ou le propidium iodide (PI) est un agent intercalant des acides nucléiques qui ne sont pas spécifiques. Grâce à sa lipophobes très élevée, cet agent ne peut traverser que les membranes plasmiques endommagées, ce qui lui permet d'être un très bon marqué de viabilité cellulaire. Il y aura donc une augmentation de la fluorescence quand le taux de mortalité augmentera par conséquent. Le PI est dilué dans une solution physiologique (PBS) avant que les échantillons soient analysés.

Les cellules ont donc été lavées avec du PBS après les traitements, puis elles ont été suspendues dans une solution d'iodure de propidium (PI ; 0,1 µg/mL). Les échantillons ont ensuite été conservés sur glace pour être analysés par cytométrie en flux sur un FACScan® à 488 (canal FL-2). L'analyse des échantillons a été effectuée sur un total de 10 000 événements.

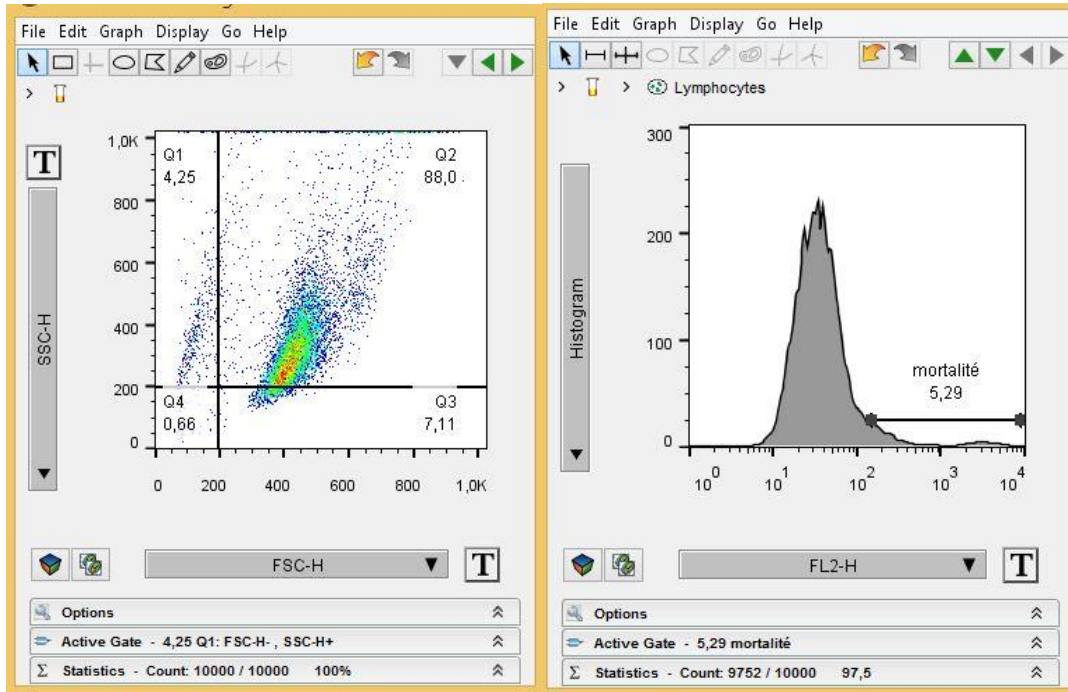


Figure 3.1 Comment réaliser l'analyse sur FlowJo avec des données de cytométrie en flux.

Dans la première image la population cellulaire est présentée selon sa taille et sa granulosité. Dans la seconde image la population cellulaire est représentée selon la fluorescence de l'iodure de propidium.

Paramètre du cytomètre

FSC - » indique la taille de la cellule

SSC - » indique la granularité de la cellule

FL2-H - » indique la gamme de longueur d'ondes de fluorescence de la sonde

3.5 Évaluation de l'apoptose

Afin d'évaluer l'apoptose, plusieurs expériences ont été réalisées. Tout d'abord, nous avons analysé le cycle cellulaire en utilisant un tampon Krishan. Dans un premier temps, les cellules ont été lavées avec du PBS après les traitements, puis mises en suspension dans le tampon Krishan (0,1% de citrate de sodium, 0,3% de NP-40, 20 µg/ml de RNase et 50 µg/ml de PI). Et avant d'effectuer l'analyse par cytométrie en flux sur un FACScan® (canal FL-2), les échantillons ont été incubés pendant 30 minutes à 37°C dans un incubateur. L'analyse avec le cytomètre a été réalisée sur 10 000 événements en discriminant les doublets par gating (définir une population d'étude en excluant les débris cellulaires) et nous avons analysé le pic diploïde de la phase SubG1/G0 montrant les cellules à contenu réduit en ADN, donc les cellules apoptotiques.

Puis l'absence ou la présence de fragmentation de l'ADN a été analysée grâce à des électrophorèses sur gel d'agarose, permettant de visualiser la fragmentation internucléosomale. Dans un premier temps, nous avons re-suspendue les cellules traitées dans 20µL de 10 mM de Tris-HCl pH 7.4, 0.5% de SDS, 10 mM de EDTA, 0.1 mg/mL de protéinase K. Puis les suspensions cellulaires ont été incubées à 50 °C dans des bains marie pendant la nuit. Une concentration de 0,5 mg/ml de RNase a ensuite été ajoutée aux échantillons et incubée pendant encore 30 minutes à 50 °C. Ensuite, les échantillons ont été dilués dans un tampon de chargement à 20 % (v/v) (EDTA 10 mM, pH 8,0, agarose T0 à faible gélification 1,0 % (p/v), bleu de bromophénol 0,25 % (p/v) et saccharose 40 % (p/v)) et incubés à 70 °C pendant 10 minutes. Les échantillons ont été chargés sur un gel d'agarose à 2% (p/v) et soumis à une électrophorèse à 100 V pendant 1 h dans du TBE 0,5 X (10% (v/v) 5X TBE (0,45 M Tris base, 0,45 M acide borique, 2% (v/v) 0,5 M EDTA pH 8,0) à pH 8,3). La révélation du gel a été effectuée par transillumination UV après coloration avec du bromure d'éthidium (EtBr) 0,5 M à température ambiante pendant 30 minutes.

Enfin, grâce au cytomètre en flux nous avons analysé le pourcentage de cellules subissant une apoptose, cela a été quantifié par analyse de la translocation de la phosphatidylsérine (PS) vers la membrane extracellulaire avec le kit de détection de l'apoptose Annexin V-FITC. En premier lieu, les cellules ont été incubées avec de l'annexin-V (5% (v/v)) et du PI (5% (v/v)) à température ambiante pendant 15 min après lavage avec du PBS, suivant le traitement souhaité. L'analyse a été réalisée par cytomètre en flux sur un FACScan® et la compensation a été faite avec le canal FL-2 sur 10 000 événements.

3.6 Test de détection de l'activité Caspase 3/7

Le réactif de détection vert CellEvent Caspase 3/7 est intrinsèquement non fluorescent car le peptide DEVD inhibe la capacité du colorant à se lier à l'ADN. Cependant, après l'activation de la caspase 3/7 dans les cellules apoptotiques, le peptide DEVD est clivé, ce qui permet au colorant de se lier à l'ADN et de produire une réponse fluorogène brillante. L'émission fluorescente du colorant lorsqu'il est lié à l'ADN est d'environ 530 nm et peut être observée à l'aide d'un ensemble de filtres FITC standard.

Une sonde Caspase 3/7 Green a été utilisée selon les instructions du fabricant pour évaluer l'activité de la Caspase 3/7. Des suspensions cellulaires de 1×10^6 cellules/mL dans un milieu RPMI avec 10% de FBS ont été traitées avec 10 μ M de CHX pendant 24 h et 16 h, puis lavées avec du PBS et transférées dans des tubes stériles à fond rond en polypropylène. Le vert de la caspase 3/7 (2 gouttes/mL) a été ajouté aux échantillons et ceux-ci ont été incubés pendant 30 minutes à 37°C. Les échantillons ont ensuite été analysés par cytométrie en flux sur un FACScan® à 488 (canal FL-2). L'analyse des échantillons a été effectuée sur un total de 10 000 événements.

3.7 Test des comètes

Dans un premier temps, il faut faire fondre 1% d'agarose et tremper des lames de microscope dedans afin de préparer la surface de la lame pour l'expérience en avance. Puis, il faut les essuyer du côté qu'il ne sera pas utilisé et les laisser sécher overnight.

Les cellules Jurkat ont été lavées avec du PBS avant d'être ensemencées dans des plaques à 24 puits, la concentration cellulaire utilisée était de 1×10^6 cellules/ml dans un milieu complet RPMI 1640 avec 10% de FBS. Deux doses de cycloheximide de 10 et 25 μ M ont été injectées dans les cellules, la cycloheximide a été diluée dans de l'éthanol (EtOH). Les traitements ont été effectués sur un temps d'exposition de 24 h. Les cellules ont été recueillies à la fin du traitement et centrifugées et resuspendus dans du PANS pour avoir 1×10^6 cellules/ml. Il est important tout au long de l'expérience d'éviter de trop exposer les échantillons à la lumière pour éviter que la lumière n'endommage l'ADN.

Par la suite, la suspension cellulaire des différents traitements a été mélangée avec 1% d'agarose à bas point de fusion obtenue en le maintenant à 37°C. Un rapport de 1 volume de suspension cellulaire dans 10 volumes de 1% d'agarose a été utilisé en effectuant de pipetage de haut en

bas (up and down) doucement. Puis 30 µL ont été déposés sur une lame préalablement préparée comme expliquer précédemment.

La lame a été placée à 4 ° C dans l'obscurité pendant 10 min. Il faut ensuite plonger la lame dans la solution de lyse (2,5 M NaCl, 100 mM disodium EDTA, 10 mM Tris base et 200 mM NaOH ; pH 10) placée à 4°C dans l'obscurité pendant 1 h à une nuit.

Le lendemain, les lames ont été égouttées puis placées dans une solution d'électrophorèse neutre (100 mM de base Tris et 300 mM d'acétate de sodium ; pH 9) pendant 30 minutes à 4°C à l'obscurité. Puis les lames vont être placées dans une cuve d'électrophorèse remplie avec le tampon et mettre à migrer à 20 V pendant 45 minutes à 4°C. Les lames doivent être ensuite égouttées puis immergées dans une solution de précipitation de l'ADN pendant 30 min à température ambiante. Les lames ont été placées dans un dernier bain d'éthanol de 70% pendant 30 minutes à température ambiante et les laissés sécher pendant 15 minutes avant de pouvoir les colorés à l'aide de DAPI en en ajoutant 100 µL sur les lames et les laissés 15 minutes dans l'obscurité. Enfin, les lames ont été passées brièvement dans de l'eau et séchées à 37°C avant d'être placées dans un microscope à fluorescence pour pouvoir prendre en photo les comètes.

Nous avons utilisé une échelle de référence afin de mieux identifier les stades de fragmentations de l'ADN.



Figure 3.2 Echelle de référence utilisée pour mieux caractériser les stades de fragmentation de l'ADN.

Classification visuelle des comètes colorées au DAPI dans cinq niveaux (0-4) de cellules de *B. atratus* d'un échantillon de vaisseau dorsal dans le contrôle (niveau 0) et les groupes exposés à une solution de 0,2 ppb Hg. Niveau 0 : aucun dommage (<5%) ; niveau 1 : faible niveau de dommage (5-20%) ; niveau 2 : dommage moyen (20-40%) ; niveau 3 : niveau élevé de dommage (40-95%) ; niveau 4 : dommage total (>95%)([Ceschi-Bertoli et al., 2020](#)).

3.8 Analyse des données

Le cytomètre en flux a permis d'analyser les cellules, les mesures ont été réalisées 10 000 évènements. Grâce à des tubes témoins, il a été possible d'exclure les débris cellulaires et ainsi déterminer une région déterminant les lymphocytes T. Le logiciel (CellQuest Pro Software) de notre cytomètre en flux a permis de récolter les données. Puis les données ont été converties afin de pouvoir les analyser sur ordinateur à l'aide FlowJo™ v10. L'ensemble des résultats ont été mis en forme à l'aide GraphPad Prism 8.0.1.

3.9 Analyses statistiques

Toutes les expériences ont été réalisées 3 fois ou plus indépendamment. Les données sont présentées en tant que moyenne \pm SEM de trois expériences indépendantes en triplicate. Les différences entre les deux lignées cellulaires, traitées ou non traitées, ont été testées par une ANOVA à deux voies suivies d'une correction post-hoc de Tukey. Des comparaisons par tests t multiples ont été effectuées pour comparer les différences statistiques au sein d'une même lignée cellulaire, traitée ou non traitée, ou entre deux groupes. Une valeur $p < 0,05$ a été considérée comme significative.

4 RÉSULTATS

4.1 Les cellules déficientes en DFF40 sont moins sensibles à la mortalité induite par le cycloheximide

Pour identifier le rôle de DFF40 dans l'apoptose induite par la CHX, l'expression de DFF40 a été supprimée dans les cellules T Jurkat (DFF40 WT) en utilisant l'édition de gènes mémoire CRISPR/Cas9. Le même processus a été réalisé sur les cellules HeLa. Les cellules Jurkat DFF40 KO et DFF40 WT ont été exposées à des doses croissantes de CHX (1,10,25 μ M) pendant 24 heures. L'exposition des cellules au cycloheximide a causé un taux de mortalité dans les cellules DFF40 WT de (78,10 \pm 5,00%) et un taux significativement plus faible dans les cellules DFF40 KO (49,91 \pm 2,14%) à 10 μ M. Nous observons aussi des résultats significatifs pour une dose de 25 μ M. Cependant, pour la suite des expériences la première dose significative a été utilisée, donc de 10 μ M. Ces résultats montrent que les cellules DFF40 KO sont moins sensibles à la cytotoxicité de la CHX que les cellules DFF40 WT, un effet de seuil est atteint à partir de 10 μ M pour les cellules DFF40 WT car la mortalité obtenue à 10 μ M et 25 μ M n'est pas significativement différentes (fig 1 A). La cinétique de l'exposition à 10 μ M de CHX pendant 24 h n'a montré aucun changement significatif à 4, 8,12 et 16 h d'exposition (figure 1 B). La différence a été significativement différente dans la mortalité entre les deux lignées à 24h. En effet, 78 \pm 10% de mortalité dans les cellules DFF40 WT a été noté alors que le taux a été nettement plus bas dans les cellules DFF40 KO (49%). Les paramètres utilisés pour la suite de nos expériences seront donc des expositions de 24h avec 10 μ M.

Une courbe dose-réponse a aussi été réalisée sur les lignées HeLa DFF40 WT et DFF40 KO. Néanmoins, des taux de mortalité très faibles ont été obtenus avec le traitement à la cycloheximide en comparaison avec les lignées de Jurkat DFF40 WT et DFF40 KO. En effet, dans les lignées HeLa, la mortalité maximum obtenue est atteinte à 27 \pm 1.9% (fig 1 C), alors que dans les lignées Jurkats le maximum de mortalité peut atteindre 78 \pm 10% (fig 1 A). Cependant, le même phénomène de mortalité significativement plus basse dans les cellules DFF40 KO a été observé en comparaison avec les cellules DFF40 WT pour les trois doses utilisées (1, 10, 25 μ M).

De plus, il a été noté qu'un plateau de taux de mortalité se forme dans la lignée DFF40 KO, un seuil compris entre 10 et 14 % de taux de mortalité. Alors que, une augmentation de la mortalité a été remarquée dans la lignée DFF40 WT passant de 19% pour 1 μ M de CHX à 27% pour 25 μ M de CHX. Les expériences avec un temps plus long de 48h ont été répétées afin de savoir si ce plateau était dû au temps d'exposition au traitement ou était caractéristique de la lignée

cellulaire HeLa utilisée. Le même schéma de mortalité a été observé dans la lignée DFF40 KO avec un temps d'exposition de 48h, un seuil de mortalité d'un taux compris entre 22 et 25%. A la différence, qu'un seuil de mortalité a été aussi visible dans la lignée DFF40 WT compris entre 30 et 34% (fig 1 D).

Nous pouvons conclure à partir de ces premiers résultats, que dans les deux types cellulaires Jurkat et HeLa, la mortalité est significativement plus basse dans les lignées cellulaires DFF40 KO par rapport à la lignée cellulaire DFF40 WT en réponse au traitement à la cycloheximide. De plus, il a été noté qu'avec les mêmes traitements effectués sur HeLa des taux de mortalité nettement plus bas sont observés. Des effets seuils persistent avec des temps d'exposition différents dans les HeLa DFF40 KO. Nous pouvons supposer que nos traitements ont induit la mortalité maximale dans les HeLa à 48h car l'effet seuil a été observé dans les HeLa DFF40 KO et WT. Ensemble, ces résultats montrent que les cellules déficientes en DFF40 semblent être moins sensibles à la mortalité induite par le CHX. Contrairement aux cellules Jurkat, les HeLa semblent être plus résistantes au traitement à la CHX.

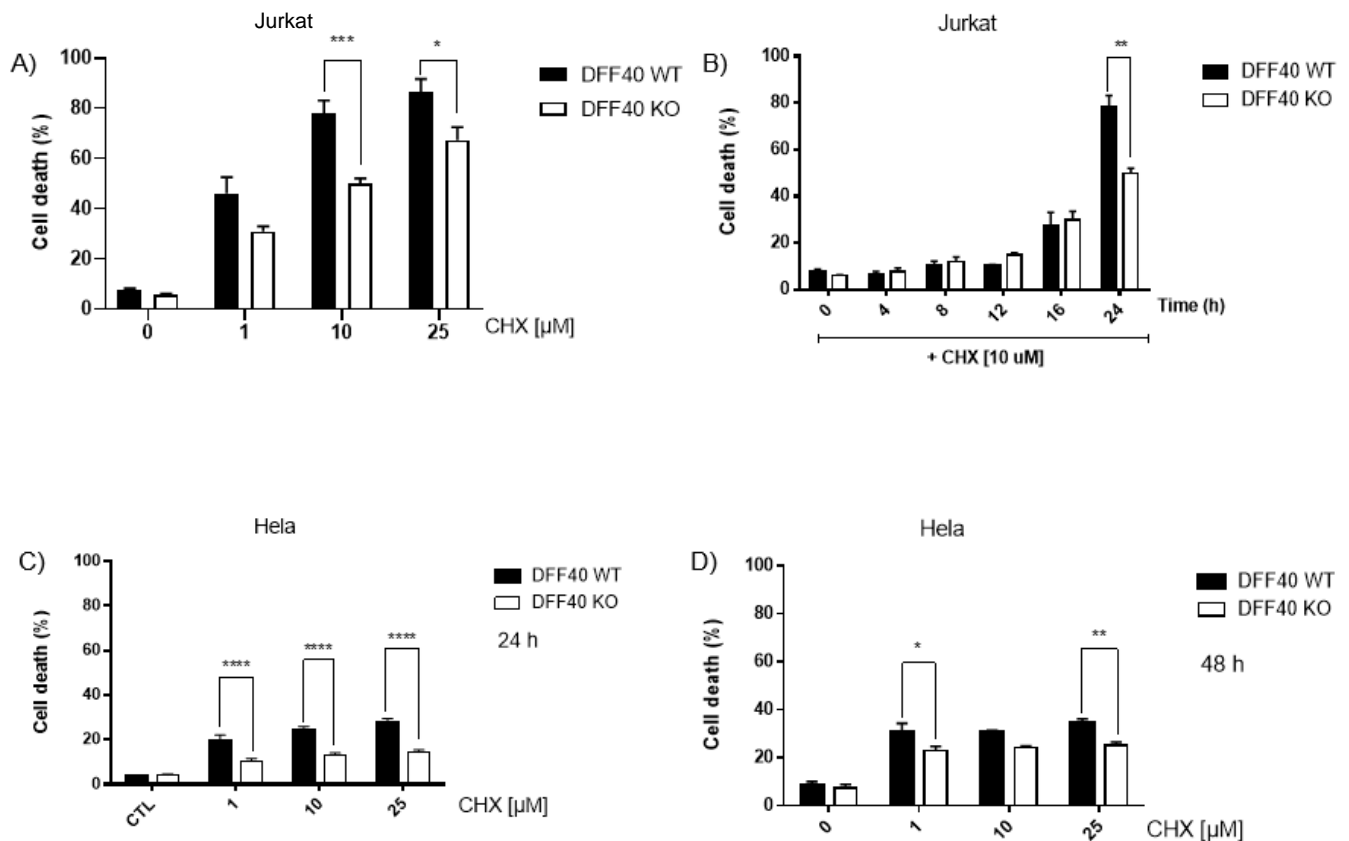


Figure 4.1 Les cellules déficientes en DFF40 sont moins sensibles à la mortalité induite par le cycloheximide.

A : Les cellules Jurkat DFF40 WT et DFF40 KO ont été traitées pendant 24 h avec du CHX (1-25 μ M) dans du RPMI 1640 avec 10 % de FBS et une condition était non traitée. **B :** Les cellules ont été traitées avec CHX [10 μ M] pendant 4 à 24 h et une condition n'a pas été traitée. **C :** CRISPR cas-9 a été utilisé pour obtenir des cellules HeLa DFF40 KO. Les cellules HeLa DFF40 WT et DFF40 KO ont été traitées pendant 24 h avec du CHX (1-25 μ M) dans du RPMI 1640 avec 10 % de FBS et une condition n'a pas été traitée. **D :** Les cellules HeLa DFF40 WT et DFF40 KO ont été traitées pendant 48 h avec CHX (1-25 μ M) dans RPMI 1640 avec 10% FBS et une condition n'a pas été traitée. Les cellules ont été analysées par cytomètre en flux avec de l'iodure de propidium (1 μ g/ml). Toutes les données sont représentatives d'au moins 3 expériences indépendantes. Les données sont présentées sous forme de (moyenne \pm SEM). Une ANOVA à deux voies avec test posthoc de Tukey a été réalisée, suivie de comparaisons par test t multiple (*p < 0,05, **p < 0,001).

4.2 Les cellules T Jurkats déficientes en DFF40 sont résistantes à l'apoptose induite par le cycloheximide.

Par la suite, une analyse du cycle cellulaire a été effectuée pour évaluer la mort cellulaire apoptotique induite par la CHX sur les cellules Jurkat. Comme expliqué précédemment, nous avons utilisé une exposition de 24h avec 10 μ M de cycloheximide, car ce sont les paramètres les mieux adaptés pour observer le début de différence entre les deux lignées DFF40 WT et DFF40 KO. La quantification du pic subdiploïde G1/G0 indique la fragmentation de l'ADN (figure 2 A), correspondant à la fragmentation de l'ADN. Les résultats montrent qu'après une exposition de 24h au CHX [10 μ M], les cellules DFF40 WT présentent des niveaux significativement plus élevés de fragmentation de l'ADN ($70,55\pm 1,48\%$), par rapport aux cellules Jurkat DFF40 KO, qui ne présentent quasiment aucune fragmentation de l'ADN ($1,82\pm 0,955\%$) (Fig. 2A). Aucune différence n'a été observable entre les DFF40 WT et DFF40 KO non traitées dans les quatre phases cellulaires, les changements étaient donc bien dû aux traitements réalisés avec la cycloheximide. De plus, on peut confirmer l'induction de fragmentation de l'ADN dans la lignée DFF40 WT avec le traitement à la cycloheximide car dans le contrôle, on obtient $3,58\pm 0,66\%$ de cellules en phase SubG0/G1 alors qu'on en obtient $70,55\pm 1,48\%$ avec le traitement à la cycloheximide. On peut donc supposer que cela est bien dû à l'induction de l'apoptose.

Les autres phases du cycle cellulaire ont aussi été analysées, car il y a un point de contrôle en G1/S et aussi en G2/M. Le point de contrôle G1/S dépend de l'activité de p53 et de l'expression du produit du gène suppresseur de tumeur du rétinoblastome (Rb) et elle permet la transcription des protéines nécessaires à la réplication de l'ADN. Nous avons pu observer une augmentation significative ($15,89\pm 0,776\%$) de la population de cellules DFF40 KO avec traitements en comparaison avec les cellules DFF40 WT avec traitements ($7,10\pm 0,571\%$) dans la phase S. D'autre part, le point de contrôle G2/M est responsable de la réparation des dommages à l'ADN avant d'entrer en mitose, afin de préserver la stabilité génomique dans les cellules somatiques. Tout dysfonctionnement protéique dans les régulateurs directs de ce point de contrôle pourrait potentiellement conduire à une tumorigenèse. Ainsi dans nos résultats, nous avons pu observer une augmentation très significative ($9,00\pm 1,594\%$) du pourcentage de cellules dans la lignée DFF40 KO traité en comparaison des cellules DFF40 WT avec traitements ($2,90\pm 0,125\%$). On a donc une accumulation de population cellulaire dans les points de contrôles dans la lignée DFF40 KO avec traitements contrairement à ce qu'on a pu observer dans la lignée WT avec traitements.

Par la suite, l'absence de fragmentation de l'ADN a été confirmée sur un gel d'agarose (Fig. 2B). Comme le montre la figure 2B, les cellules DFF40 WT exposées au CHX présentent une

fragmentation identique de l'ADN pendant 16h et 24h, alors que les cellules DFF40 KO et le contrôle DFF40 WT présentent, elles, une absence totale de bandes d'ADN.

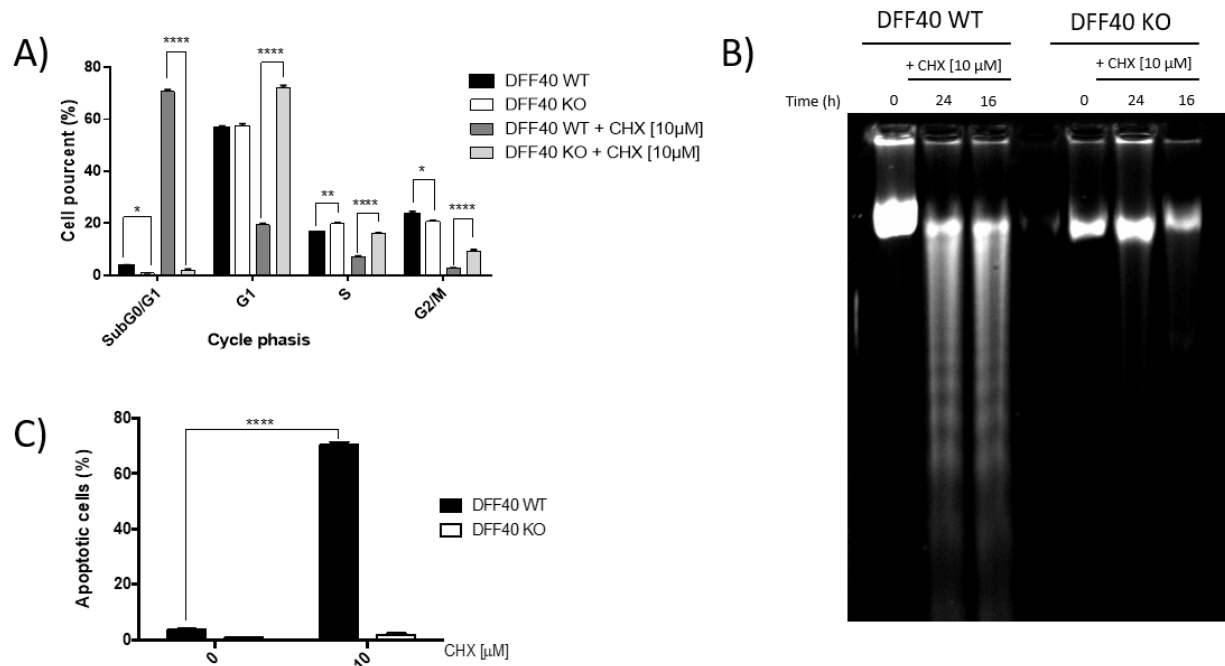


Figure 4.2 La déficience en DFF40 dans les cellules Jurkat inhibe l'apoptose par fragmentation de l'ADN induite par la cycloheximide.

Les cellules Jurkat DFF40 WT et DFF40 KO ont été traitées ou non avec CHX [10 µM] pendant 24h dans un milieu complet. A : L'apoptose a été déterminée par une analyse du cycle cellulaire sub-G0 après coloration avec le tampon Krishan. B : la fragmentation de l'ADN a été visualisée par un gel d'agarose à 2% coloré au bromure d'éthidium. C : l'apoptose déterminée par cycle cellulaire est présentée dans un graphique simplifié. Toutes les données sont représentatives d'un triplicat biologique. Les données sont présentées sous forme de (moyenne ± SEM). Une ANOVA à deux voies avec test posthoc de Tukey a été réalisée, suivie de comparaisons par tests t multiples (*p < 0,05, ***p < 0,0001).

4.3 Les cellules HeLa déficientes en DFF40 sont plus résistantes à l'apoptose induite par la cycloheximide que les cellules Jurkats.

La même analyse du cycle cellulaire a été effectuée pour évaluer la mort cellulaire apoptotique induite par la CHX mais cette fois-ci avec les cellules HeLa. Comme expliqué précédemment, la quantification du pic subdiploïde G1/G0 indique la fragmentation de l'ADN (figure 3 A). Les résultats montrent qu'après une exposition de 24h au CHX [10 μ M], les cellules DFF40 WT présentent des niveaux significativement plus élevés de fragmentation de l'ADN (18,235 \pm 3,05%), par rapport aux cellules Jurkat DFF40 KO, qui ne présentent aucune fragmentation de l'ADN (2.037 \pm 0.19%) (Fig. 3B).

Comme pour les cellules Jurkat, des différences très faibles sont observables entre les DFF40 WT et DFF40 KO non traitées dans les trois phases cellulaires présentées, sauf dans les cellules en phase G2/M. Les changements sont donc bien encore une fois dus aux traitements réalisés avec la cycloheximide. De plus, on peut confirmer l'induction de fragmentation de l'ADN dans la lignée DFF40 WT avec le traitement à la cycloheximide car dans le contrôle, on obtient 2.56 \pm 0.14% de cellules en phase SubG0/G1 alors qu'on en obtient 18,235 \pm 3,05% avec le traitement à la cycloheximide. On peut donc supposer que cela est bien dû à l'induction de l'apoptose.

Il faut cependant prendre en compte le fait qu'il y a une large différence entre les résultats obtenus avec le type cellulaire HeLa et le type cellulaire Jurkat. En effet, avec le traitement à la cycloheximide le taux de cellules DFF40 WT en phase SubG0/G1 peut atteindre 70,55 \pm 1,48% avec les cellules Jurkat alors que le taux est seulement de 18,235 \pm 3,05% avec les cellules HeLa (fig 3 A et C). On peut donc supposer que les cellules HeLa sont plus résistantes à l'induction de la fragmentation de l'ADN que les Jurkat par la cycloheximide.

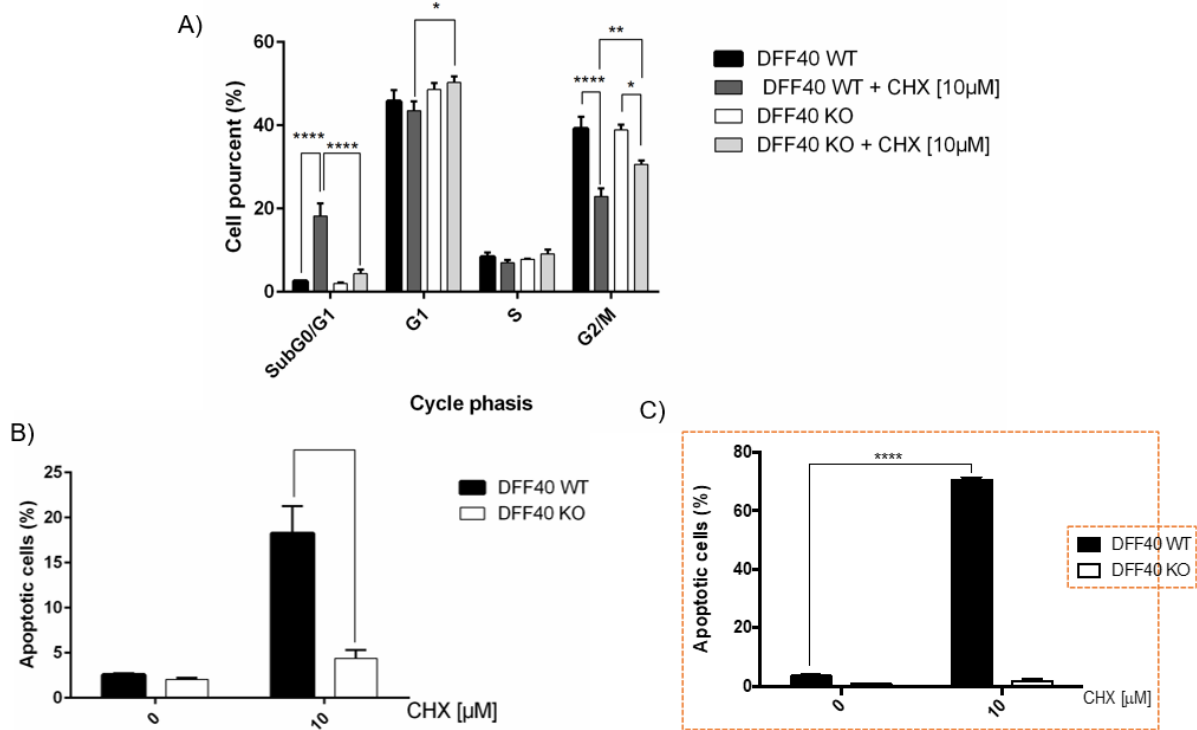


Figure 4.3 La déficience en DFF40 dans les cellules HeLa inhibe l'apoptose par fragmentation de l'ADN induite par la cycloheximide.

Les cellules HeLa DFF40 WT et DFF40 KO ont été traitées ou non avec CHX [10 μM] pendant 24h dans un milieu complet. A : L'apoptose a été déterminée par une analyse du cycle cellulaire sub-G0 après coloration avec le tampon Krishan. B : l'apoptose déterminée par cycle cellulaire est présentée dans un graphique simplifié pour les HeLa. C : l'apoptose déterminée par cycle cellulaire est présentée dans un graphique simplifié pour les Jurkat. Les données sont présentées sous forme de (moyenne ± SEM). Une ANOVA à deux voies avec test posthoc de Tukey a été réalisée, suivie de comparaisons par tests t multiples (*p < 0,05, ***p < 0,0001).

4.4 Les cellules T jukat déficientes en DFF40 retardent l'apoptose induite par la cycloheximide.

Puisque l'apoptose peut se produire en l'absence de fragmentation de l'ADN, nous avons utilisé une seconde approche expérimentale pour confirmer l'absence de fragmentation dans les cellules KO. L'apoptose se caractérise par l'expression de la phosphatidylsérine (PS) à la membrane cellulaire extracellulaire, la détection de l'apoptose a été faite avec Annexin V-FITC. Dans la figure 4 A, on peut voir les graphiques bruts qui donnent plusieurs informations tels :

Q4 : AnV- / PI- → cellule vivante ;

Q1 : AnV- / PI+ → débris nucléaires ;

Q3 : AnV+ / PI- → phase précoce d'apoptose ;

Q2 : AnV+ / PI+ → phase tardive d'apoptose et ou nécrose.

Les résultats qui ont été obtenus sur la différence de la répartition des populations cellulaires entre les différentes conditions ont été présentés à la figure 4 A. Dans les conditions de contrôles sans traitements, on observe une absence de cellules dans les quadrants Q2 et Q3, et donc une absence de cellules en phase précoce d'apoptose ou en phase tardive d'apoptose/nécrose, confirmant ainsi nos contrôles. De plus, il a été noté un déplacement de la population cellulaire dans la phase tardive d'apoptose et/ou nécrose dans la condition de traitements de 10 μ M dans la lignée WT, confirmant donc l'induction de l'apoptose par le traitement de la cycloheximide dans la lignée WT.

L'expression de nos résultats sous forme d'histogramme, afin d'isoler un paramètre spécifique, nous a démontré qu'il y a un très faible pourcentage de cellules Annexin V/Pi positives donc en phase tardive d'apoptose et ou nécrose dans les conditions de la lignée DFF40 KO ($0.188 \pm 0.111\%$ à $1.98 \pm 1.56\%$) (figure 4 B). Au contraire, une induction de l'apoptose tardive ou nécrose dans notre lignée WT traitée avec 10 μ M après 24h, a été observée ($11.4 \pm 1.865\%$ de cellules Annexine V/Pi positivement). Donc l'apoptose a été induite avec le traitement à la cycloheximide et l'absence de cette induction a été notée dans la lignée DFF40 KO.

L'analyse sur l'ensemble des cellules apoptotiques précoces (annexine V + PI -) et les cellules apoptotiques/nécrotiques tardives (annexine V + PI+) dans la figure 4 C, nous a permis de pouvoir confirmer ou infirmer nos résultats précédents. En effet, nous avons obtenu $0.295 \pm 0.173\%$ à $3.725 \pm 2.16\%$ des cellules qui sont Annexin V positives dans la lignée DFF40 KO sans et avec traitement alors que dans la lignée DFF40 WT avec traitement le pourcentage de cellules peut atteindre $24.838 \pm 7.051\%$, ce qui a montré qu'il y a très nombreuses cellules apoptotiques

précoces dans la lignée DFF40KO. Nous avons aussi obtenu 11.4 ± 1.865 % de cellules DFF40 WT traitées Annexine V/Pi +, alors que les cellules DFF40 KO traitées ne sont que 1.98 ± 1.156 %. Nous avons donc encore une fois, une résistance à l'induction de l'apoptose dans la lignée DFF40 KO par le traitement à la cycloheximide, qui pourtant induit bien l'apoptose dans notre lignée WT contrôle.

De plus, nous pouvons confirmer ces résultats car il n'y a pas d'induction d'apoptose dans les contrôles.

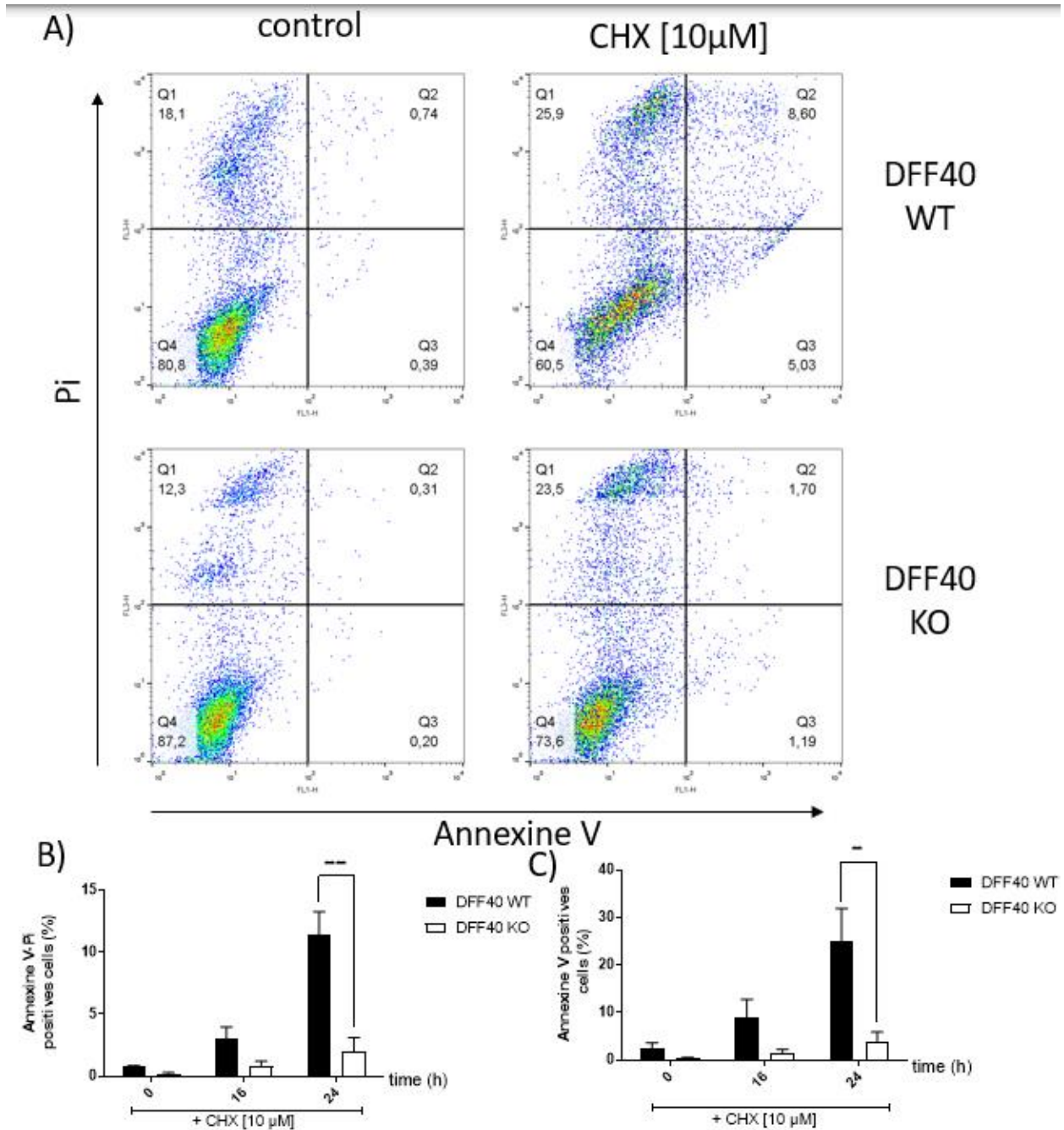


Figure 4.4 La déficience en DFF40 entraîne un retard dans l'apoptose induite par la cycloheximide. A - C : l'apoptose a été déterminée par un test à base de phosphatidylsérine/annexine V après 16 h et 24 h d'exposition au CHX [10 μ M] dans du RPMI avec 10 % de FBS. A : cellules Annexin V + -PI -, B : Annexin V + -PI +, et C : analyse représentative par cytométrie en flux. Les cellules témoins ont été incubées avec 0,1% (v/v) d'EtOH. Toutes les données sont représentatives d'un duplicata biologique. Les données sont présentées sous forme de (moyenne \pm SEM). Une ANOVA à deux voies avec test posthoc de Tukey a été réalisée, suivie de plusieurs comparaisons par test t (*p < 0,05, ***p < 0,0001).

4.5 Etude de cinétiques avec des temps plus courts et fragmentation ADN

Afin de confirmer de ne pas être passé à côté d'une induction de l'apoptose plus précoce dans le temps, nous avons réalisé des cinétiques à temps court avec 0%FBS pour mettre nos cellules en état de stress. Nous avons réutilisé un seul temps déjà préalablement étudié, notre temps le plus court de 4h pour comparer la mortalité qui a été induite par le stress. Nous avons pu déjà identifier que lors du traitement avec 10 μ M à 4h avec 10 %FBS, nous avons 6,744 \pm 2,154% dans la lignée WT et 7,668 \pm 3,635% dans la lignée KO de mortalité, alors qu'avec un stress induit en absence de FBS, nous avons 6,086 \pm 0,935% dans la lignée WT et 8,741 \pm 1,373% dans la lignée KO. Ainsi, dans un premier temps, la mortalité a été augmentée dans la lignée DFF40 KO avec l'absence de FBS, et a creusé l'écart entre les deux lignées. Dans un second temps, il a été noté une très faible différence avec une absence de FBS avec la lignée WT. Donc, nous avons supposé que le stress provoqué pourrait permettre de mieux induire la mortalité dans la lignée DFF40 KO (figure 5C).

Nous avons donc réalisé les mêmes cinétiques avec 2 autres doses plus fortes afin de confirmer cet effet. Non seulement le même effet a été observé mais dans les trois doses nous avons une différence significative à 6h (figure 5 A-C).

Par la suite la visualisation de la fragmentation de l'ADN a été observée sur gel d'agarose. Tout d'abord, nous avons bien une absence de fragmentation de l'ADN dans notre contrôle WT, mais aussi dans l'ensemble des traitements et du contrôle dans la lignée KO (figure 5D). On a même vu une évolution de la fragmentation de l'ADN en fonction de la concentration en Cycloheximide dans les traitements réalisés dans les WT.

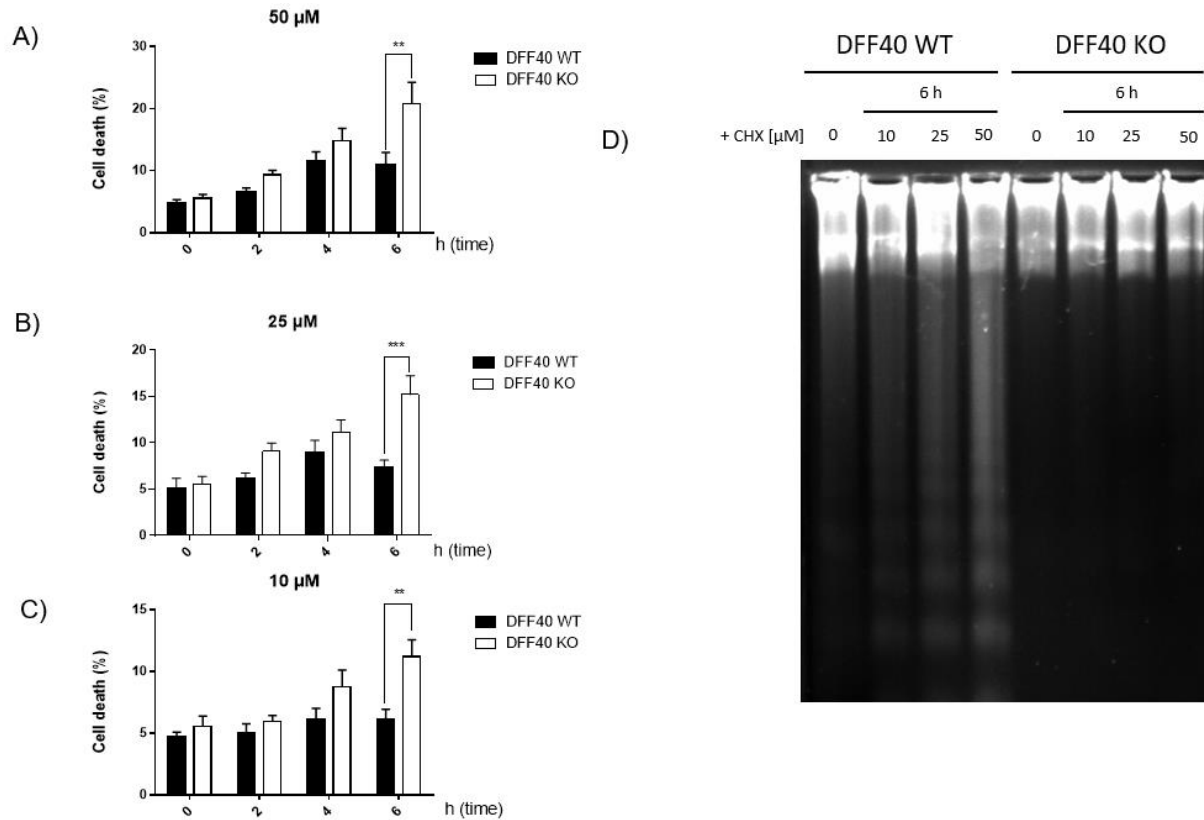


Figure 4.5 La déficience en DFF40 entraîne un retard dans l'apoptose induite par la cycloheximide.

A - C : mortalité cellulaire avec de court temps d'exposition avec la CHX [10 μ M] dans du RPMI avec 0 % de FBS. : Les cellules Jurkat DFF40 WT et DFF40 KO ont été traitées pendant 2,4,6 h avec du CHX (1-25-50 μ M) dans du RPMI 1640 avec 0 % de FBS et une condition était non traitée **D :** la fragmentation de l'ADN a été visualisée par un gel d'agarose à 2% coloré au bromure d'éthidium pour les doses de 10, 25 et 50 μ M de CHX à 6h. Toutes les données sont représentatives d'un triplicat biologique. Les données sont présentées sous forme de (moyenne \pm SEM). Une ANOVA à deux voies avec test posthoc de Tukey a été réalisée, suivie de comparaisons par tests t multiples (* $p < 0,05$, *** $p < 0,0001$).

4.6 L'activité de la Caspase 3/7 reflète un retard de l'apoptose induite par la cycloheximide dans les cellules Jurkat déficientes en DFF40

Par la suite, nous nous sommes intéressés à l'activité de la caspase 3/7, car c'est grâce à la forme active de la caspase 3, que le clivage du DFF45 et la libération du DFF40 peuvent être réalisés, permettant ainsi au DFF40 d'être actif et de fragmenter l'ADN. Le principe du test est basé sur la non-fluorescence intrinsèque car le peptide DEVD inhibe la capacité du colorant à se lier à l'ADN. Alors qu'après activation de la caspase 3/7 dans les cellules apoptotiques, le peptide DEVD est clivé, ce qui permet au colorant de se lier à l'ADN et de produire une réponse fluorogène brillante.

Nous avons traité nos deux lignées DFF40 KO et WT avec 10 μ M de CHX pendant 16 ou 24 h tout comme pour nos expériences précédentes, puis nous avons grâce à la sonde Caspase 3/7 et le cytomètre en flux pu analyser la mort cellulaire.

Ce qui est marquant, c'est que l'activité caspase 3/7 a été observée plus forte dans les 3 conditions dont la condition contrôle dans la lignée Jurkat DFF40 KO. Et que cette différence est significative pour un traitement avec 10 μ M à 16h et à 24h. De plus, on observe une faible activité de la caspase 3/7 dans toutes les conditions et le contrôle pour les WT. Donc la mort cellulaire a déjà eu lieu car l'activité avec traitements est similaire à celle du contrôle. Alors que dans la lignée KO, il y a une augmentation de l'activité avec le temps de traitement avec la cycloheximide. On peut donc supposer que la mort cellulaire est déplacée dans le temps dans la lignée cellulaire KO. Par ailleurs l'analyse au cytomètre en flux a été réalisée à l'aide d'une « gate » sur les cellules vivantes donc d'une définition d'une population cible qui a été réalisée afin d'analyser seulement les cellules vivantes. Il sera donc intéressant par la suite de mieux décrire ce phénomène avec des expériences plus approfondies.

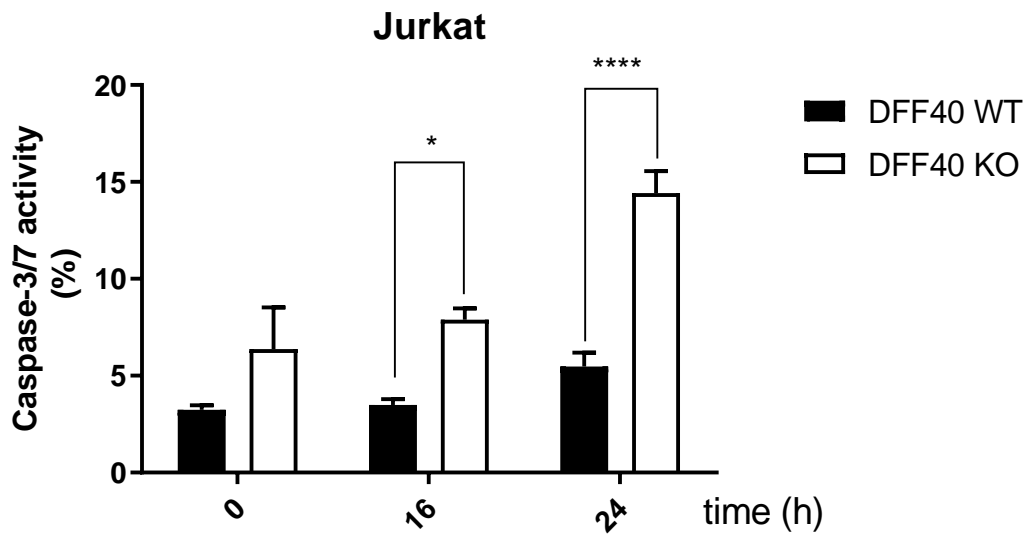


Figure 4.6 La déficience en DFF40 entraîne un retard dans l'apoptose induite par la cycloheximide. Les cellules Jurkat DFF40 WT et DFF40 ont été traitées 24h et 16h avec 10 μ M de CHX et le réactif de détection caspase-3/7 Green a été ajouté à chaque échantillon (2 gouttes/ml). L'activité caspase-3/7 a été évaluée par cytomètre en flux.

4.7 Test de comètes permettant de visualiser la fragmentation d'ADN dans les cellules Jurkat DFF40 WT et absente dans les cellules DFF40 KO

Enfin, nous avons réalisé des tests de comètes afin de visualiser une fragmentation ADN aléatoire dans les cellules Jurkat DFF40 WT et KO. Nous avons traité ou non les deux lignées avec 10 ou 25 μM de CHX pendant 24h. De plus, dans la figure 7 A nous présentons une échelle afin de pouvoir mieux identifier les différents stades de la fragmentation de l'ADN.

Dans la figure 7 B, on peut voir dans l'imagerie des cellules Jurkat WT qu'il y a une apparition de fragmentation de l'ADN (petits points bleus qui se forment autour du noyau) avec l'exposition à la cycloheximide et nous pouvons même voir une queue de comète (trace bleue se formant derrière le noyau et montrant la dégradation de l'ADN) dans la concentration de 25 μM .

Dans la figure 7 C, on observe le phénomène inverse, c'est-à-dire un maintien de la cellule même avec l'exposition avec la cycloheximide. En effet, il n'y a ni formation de queue ni de grande visualisation de dégradation de l'ADN autour du noyau de la cellule.

Nous pouvons donc confirmer la résistance des cellules Jurkat DFF40 KO à la fragmentation induite par la cycloheximide.

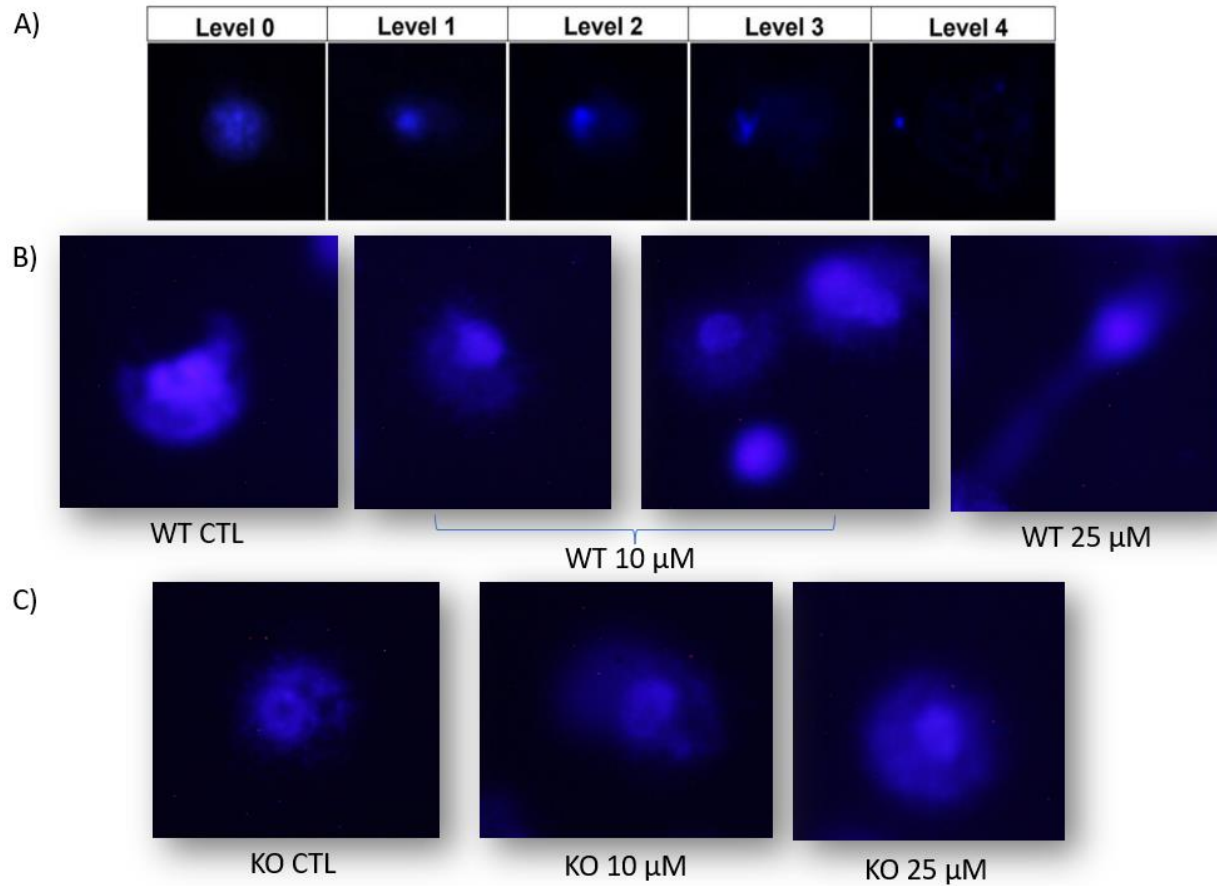


Figure 4.7 La déficience en DFF40 entraîne une absence de visualisation cellulaire de fragmentation cellulaire avec un traitement à la cycloheximide.

Imagerie de test de comète au DAPI. A : Echelle de référence pour comparer la visualisation de la fragmentation de l'ADN dans une cellule. B : Imagerie de cellules Jurkat DFF40 WT traitées avec 10 μ M ou 25 μ M pendant 24h avec de la cycloheximide ou non traitées. C : Imagerie de cellules Jurkat DFF40 KO traitées avec 10 μ M ou 25 μ M pendant 24h avec de la cycloheximide ou non traitées. Imagerie réalisée au microscope à fluorescence.

5 DISCUSSION et CONCLUSION

5.1 L'importance du DFF40 dans la résistance à l'induction de l'apoptose par la cycloheximide dans les cellules cancéreuses.

Le but de ce projet était de déterminer le rôle du DFF40 dans la résistance des cellules cancéreuses à l'induction de l'apoptose, dans le cas ici, une apoptose extrinsèque induite par la cycloheximide. Dans un premier temps, nous avons démontré une différence de mortalité induite par le traitement de la cycloheximide dans 2 types cellulaires, les HeLa et les Jurkats, dans les cellules avec une déficience en DFF40 et notre lignée contrôle WT. Mettant en relief que l'absence de DFF40 permettait une résistance à la mortalité face à la cycloheximide. Cependant, nos résultats ont aussi montré une différence d'induction de mortalité entre les 2 types cellulaires, soulignant une résistance plus grande à l'induction de la mortalité dans les cellules HeLa en général. Il faut tout de même prendre en compte que ces résultats ne considèrent que la mortalité, et donc peuvent refléter divers types de mort, tel que la nécrose, l'efferoctose ou bien l'apoptose ou autre ...

C'est pour cela que dans un premier temps, nous nous sommes intéressés au cycle cellulaire, car la phase SubG0/G1 est un indicateur de la fragmentation de l'ADN et donc de pouvoir vérifier ou non la présence de fragmentation de l'ADN dans un premier temps, mais aussi cette phase est représentative du taux de cellules en apoptose et donc permet de mieux identifier le taux de cellules en apoptose. Tout d'abord, nous avons confirmé l'absence de fragmentation dans la lignée DFF40 KO des cellules Jurkat en obtenant des taux très bas de cellules dans la SubG0/G1 mais aussi en le confirmant par gel d'agarose. Tout comme notre laboratoire l'avait confirmé dans l'article « DNA fragmentation factor 40 expression in T cells confers sensibility to tributyltin-induced apoptosis », il n'y a pas de fragmentation de l'ADN dans notre lignée KO ([Kulbay et al., 2019](#)).

Les mêmes expériences ont été réalisées sur les HeLa. Les mêmes résultats ont été observés qu'avec les cellules Jurkats, cependant avec des taux de fragmentation induite par le traitement à la CHX dans la lignée WT beaucoup plus bas. On peut donc supposer que les cellules HeLa sont plus résistantes à l'induction de la fragmentation de l'ADN que les Jurkat ($49,91 \pm 2,14\%$ pour jurkat DFF40 KO) par la cycloheximide mais les cellules HeLa DFF40 KO ($25,08 \pm 3,302\%$) sont bien plus résistantes que les cellules HeLa DFF40 WT ($34,53 \pm 4,151\%$). On peut supposer que cette résistance est liée au type cellulaire des Hela, en effet, les cellules Hela sont des cellules adhérentes contrairement aux cellules Jurkats qui sont en suspension. Ainsi, plusieurs

paramètres tel que la façon dont les cellules sont exposées dans le milieu de culture au traitement à la CHX ainsi que la façon dont les cellules adhérentes ont d'être plus proches les unes des autres dans la flasque doivent aussi être pris en compte pour expliquer cette différence entre les types cellulaires.

Dans un second temps, nous avons utilisé le double marquage Annexine V / Pi pour déterminer le taux de cellules en apoptose tardive ou précoce ou en nécrose. A l'aide de ces résultats, on a pu conclure que d'un côté il y a une très faible induction de l'apoptose dans la lignée DFF40 KO et mais pas d'absence totale et bien une induction d'apoptose dans la lignée WT avec le traitement à la cycloheximide. Le même résultat avait été obtenu avec un traitement au TBT dans un papier précédent de notre laboratoire ([Kulbay et al., 2019](#)). Nous avons confirmé une inhibition de l'induction de l'apoptose dans la lignée DFF40 KO avec la cycloheximide dû à la déficience en DFF40.

Pour être sûr de ne pas avoir manqué un phénomène différent tel qu'une induction de la mortalité plus précoce dans le temps, nous avons réalisé des cinétiques à temps court avec 0%FBS pour mettre nos cellules en état de stress. En effet, il a été montré que le stress oxydatif peut induire l'apoptose ([Guo et al., 2022](#)) c'est donc pour ça que nous avons utilisé un milieu sans FBS et ainsi voir si nos contrôles avaient de l'apoptose induite par le stress. De plus, le FBS contient des facteurs de croissance et leur ajout permet de sauver les cellules de la mort cellulaire. Par exemple, certains facteurs de croissance sont aussi des facteurs de survie comme le PDGF-B ([Tillie et al., 2021](#)). Cependant, même en absence de FBS, la mortalité induite n'est pas haute mais elle a permis d'observer un phénomène contraire à nos temps plus longs de traitement. En effet, avec les 3 doses utilisées à 6h, on observe plus de mortalité dans la lignée KO que dans la lignée WT dans les cellules Jurkat avec une absence de FBS. On peut supposer à partir de ces résultats, que le stress engendré par l'absence de FBS permet de mieux induire la mortalité dans les cellules DFF40 KO mais qu'il n'est pas le responsable principal car nos contrôles ont des mortalités très basses. De plus, ces résultats sont en accord avec les résultats obtenus précédemment montrant que les niveaux de ROS sont plus conséquents dans la lignée DFF40 KO ([Kulbay et al., 2019](#)).

Par la suite, il était évident de s'intéresser à l'étape précédente de la fragmentation de l'ADN, c'est-à-dire l'activation de la caspase 3/7 qui permet sous sa forme active de cliver le DFF45 et de libérer le DFF40 afin qu'il puisse agir. Nous avons observé une augmentation de l'activité de caspase 3/7 avec le temps et le traitement dans la lignée DFF40 KO, alors qu'un plateau d'activation se forme pour la lignée DFF40 WT. On peut donc supposer que la mort cellulaire est

déplacée dans le temps dans la lignée cellulaire KO. Cependant, il est nécessaire de réaliser des expériences complémentaires pour pouvoir confirmer cette hypothèse. Par ailleurs l'analyse au cytomètre en flux a été réalisée à l'aide d'un « gate » donc d'une définition d'une population cible qui a été réalisé afin d'analyser seulement les cellules vivantes, nous sommes donc bien convaincus de la véracité de ces données.

Pour finir, nous avons voulu visualiser la fragmentation dans les cellules. Nous avons pu observer une formation de fragmentation de l'ADN et même une queue de comète dans la lignée WT avec le traitement à la cycloheximide alors que nous avons confirmé une absence de fragmentation de l'ADN dans les cellules DFF40 KO. Nous avons donc bien pu conclure qu'il y a une absence de fragmentation dans la lignée DFF40 KO et cela même avec la cycloheximide qui est un inducteur d'apoptose qui a bien induit de la fragmentation de l'ADN dans la lignée DFF40 WT. Cependant, nous aurions pu aller plus loin en utilisant différents paramètres pour le protocole des tests de comètes afin d'analyser divers types de dommages à l'ADN ([Roy, 2007](#)). En effet, dans ce papier, les auteurs décrivent les paramètres à changer afin d'observer tel que : les cassures double brin, les cassures simples brin, les bases oxydées et les sites abasiques ([Roy, 2007](#)).

En résumé, nos résultats ont montré que les cellules Jurkat et HeLa DFF40 KO sont bien résistantes à l'induction de l'apoptose par la cycloheximide. Cependant, il est essentiel de mieux comprendre le mécanisme du déplacement de mort et l'augmentation de l'activité de la caspase 3/7.

5.2 L'importance de la connaissance autour du rôle du DFF40 dans la résistance des cellules cancéreuses.

Une meilleure compréhension du rôle du DFF40 dans la résistance est essentielle afin de mettre au cœur des recherches actuelles son expression pour induire la mortalité ciblée des cellules cancéreuses. En effet, mieux connaître le DFF40 pourrait permettre de l'utiliser comme thérapie pour traiter le cancer, afin de remplacer la chimiothérapie qui comporte de nombreux effets secondaires très lourds et néfastes pour le corps humain. C'est dans cette optique que plusieurs papiers sont sortis récemment dans la dernière année. Dans un premier papier, l'équipe du laboratoire Akbari a montré que l'expression du gène DFF40 pilotée par le promoteur de la survivine, un promoteur spécifique de la tumeur, a été utilisée pour induire sélectivement la cytotoxicité dans les cellules de mélanome ([Minaiyan et al., 2021](#)). Dans un second papier, une étude a permis de produire la protéine recombinante DFF40-iRGD en tant que nouvelle molécule pour induire sélectivement la cytotoxicité dans les cellules cancéreuses et évaluer ses effets biologiques ([Amrollahi-Nia et al., 2021](#)). Enfin, il a été démontré que le gossypol aldéhyde terpénoïde naturel provoque une fragmentation nucléaire dépendante de DFF40/CAD ([Martínez-Escardó et al., 2021](#)). Ces trois papiers publiés l'an dernier montrent bien le potentiel thérapeutique pour le cancer et l'engouement autour du DFF40.

Notre laboratoire, lui, se concentre sur la recherche fondamentale autour du DFF40 afin de mieux caractériser son action et son mécanisme lié à la résistance des cellules cancéreuses aux médicaments de chimiothérapies. En effet, notre laboratoire a pu montrer que le DFF40 jouerait un rôle dans la sensibilité des cellules au tributylétain et aussi dans la stabilité génomique ([Kulbay et al., 2019](#)). Un autre papier s'intéressant au déficit en DFF40 dans les lymphocytes T cancéreux montre que le DFF40 serait impliqué dans la sensibilité et la résistance aux médicaments de chimiothérapie par la régulation de la voie apoptotique, suggérant que le DFF40 est une nouvelle cible clé dans la résistance des cellules cancéreuses qui régule potentiellement la stabilité génomique ([Kulbay et al., 2021b](#)).

Pour finir, notre laboratoire a aussi remarqué un manque de littérature autour du DFF40. C'est dans cette optique que le laboratoire a rédigé une revue sur le rôle du DFF40 dans la stabilité génomique ([Kulbay et al., 2021a](#)). De plus, une autre revue de littérature sur les mutations de l'apoptose liée aux cancers et les thérapies ciblées comportant évidemment une partie sur le DFF40 a été rédigée par le laboratoire ([Kulbay et al., 2021c](#)). Ces deux revues de littérature permettent de montrer nos connaissances actuelles mais aussi et surtout les questionnements toujours constants sur le DFF40.

Un papier récent publié dans *Science* a proposé que la signalisation DFF soit un mécanisme adaptatif intrinsèque au cancer pour résister au stress génotoxique ([Larsen et al., 2022](#)). En effet, des défauts dans les voies p53 et pRB contrôlant la transition G1/S, une entrée prématurée en phase S induite par l'oncogène, un stress de réplication accru et une réparation défectueuse de l'ADN, ainsi que des mécanismes de signalisation des points de contrôle pourrait refléter une adaptation aux pressions sélectives qui déstabilisent le génome au cours de la tumorigenèse et contribuer à la résistance aux traitements. Ainsi, ils proposent que cette voie de contrôle prosurvivante puisse offrir une possibilité d'améliorer la radiosensibilité des cellules tumorales en ciblant ce point de contrôle du cycle cellulaire G2 ([Larsen et al., 2022](#)).

L'article le plus représentatif de l'intérêt actuel pour le DFF40 est sûrement celui sorti cette année sur les cellules cancéreuses qui utiliseraient des cassures d'ADN auto-infligées pour échapper aux limites de croissance imposées par le stress génotoxique. Dans cet article, il est décrit que la voie médiée par DFF pourrait refléter l'adaptation à des pressions sélectives du génome au cours de la tumorigenèse et contribuer à la résistance à des traitements de rayonnements ionisants. Cette voie de point de contrôle révèle aussi une vulnérabilité sélective au cancer, permettant ainsi une voie potentielle pour améliorer la radiosensibilité des cellules tumorales en ciblant ce point de contrôle du cycle cellulaire G2 ([Larsen et al., 2022](#)).

L'importance principale de développer de nouvelles connaissances sur le DFF40 est de pouvoir se baser sur ces études afin de mieux comprendre la chimiorésistance des cellules cancéreuses. En effet, on peut citer le papier de notre laboratoire «DFF40 deficiency in cancerous T cells is implicated in chemotherapy drug sensitivity and resistance through the regulation of the apoptotic pathway » , qui montre que les cellules cancéreuses déficientes en DFF40 sont moins sensibles aux antimétabolites comme le 6-mercaptopurine mais que l'utilisation d'inhibiteurs de Topoisomérase 2 améliore la chimiosensibilité de ces cellules cancéreuses ([Kulbay et al., 2021b](#)).

Cependant, il est aussi important de mieux comprendre les régulations que peut effectuer le DFF40. Notre laboratoire a suggéré un rôle du DFF40 dans la préservation de l'homéostasie et de la fonction des mitochondries. Ainsi, nous avons observé qu'une déficience en DFF40 confère aux cellules Jurkat une masse mitochondriale accrue, des taux d'ADNmt, des niveaux de potentiel de membrane mitochondriale et de glycolyse dans un environnement non apoptotique qui pourrait expliquer leur malignité ([Kulbay et al., 2022](#)).

5.3 Perspectives

Pour poursuivre nos travaux, il serait intéressant de se pencher sur le résultat le plus difficile à expliquer, c'est-à-dire l'activité augmentée de la caspase 3/7 avec le temps de traitement à la cycloheximide. Des westerns blot avec des anticorps avec la caspase 3 sous forme active et sous forme non active devraient être réalisés, de même que pour la caspase 7. Afin de mieux identifier les quantités initiales de caspases dans les deux lignées DFF40 KO et WT. Mais aussi, remonter plus haut dans la cascade de la signalisation, et donc de s'intéresser à la caspase 8 car c'est grâce à sa forme active que la caspase 3/7 peut être activée.

De plus, nous savons qu'il existe de nombreux récepteurs de morts associés à l'apoptose extrinsèque, il faudrait donc essayer de réaliser les mêmes expériences mais en induisant l'apoptose par le biais de différents récepteurs de mort de divers types afin de comparer les résultats obtenus. En effet, on pourrait tout comme avec la cycloheximide, induire de façon spécifique l'apoptose par le biais d'un récepteur de mort choisi et mieux comprendre la cascade d'activation des caspases par la suite et ainsi aussi observer la fragmentation ou non du DFF40.

Dans un ordre plus toxicologique autour du DFF40, il serait intéressant de développer une lignée Zebra Fish DFF40 à l'aide de la méthode CRISPR-Cas9 et d'effectuer des screening de drogues in vivo afin de peut-être identifier une molécule permettant de réinduire la fragmentation de l'ADN en absence de DFF40. Car le modèle Zebrafish est peu couteux et grandit assez vite, de plus, demande peu de place et est simple de mise en place. De plus, on pourrait aussi essayer de faire des screening avec des inducteurs naturels de l'apoptose.

Enfin, il serait intéressant de comparer nos résultats en annexes afin de déterminer un profil toxicologique de notre projet, en comparant les résultats de la cycloheximide qui est un inducteur « synthétique » de l'apoptose extrinsèque, avec ceux obtenus avec le Fas Ligand qui un inducteur naturel de l'apoptose extrinsèque et avec les résultats obtenus avec le 5-Fluorouracil qui est un médicament utilisé pour le traitement de certains cancers. Et d'effectuer des expériences complémentaires avec le Fas L et le 5-fluorourcail afin de pouvoir comparer l'ensemble des expériences de ce projet réalisé avec la cycloheximide.

5.4 Conclusion générale

En résumé, cette étude a permis de montrer que la cycloheximide induisait bien l'apoptose dans la lignée DFF40 WT, que cette apoptose induisait une mortalité plus faible avec la lignée Hela DFF40 WT. Mais aussi et avant tout, cette étude a permis de confirmer que notre lignée DFF40 KO ne présentait pas de fragmentation d'ADN. Cependant, il y a tout de même une très faible présence de taux d'apoptose dans la lignée DFF40 KO pour donner suite au traitement à la cycloheximide. Enfin, nous avons pu observer un délai de l'activation des caspases 3/7 dans la lignée DFF40 KO entraînant un retard de la mort cellulaire. Nous pouvons conclure que les cellules DFF40 KO sont résistantes à l'apoptose induite par la cycloheximide. Cette étude servira de base afin de mieux comprendre et décrire les mécanismes en jeu dans la résistance des cellules DFF40 KO à l'induction de l'apoptose par la cycloheximide.

6 BIBLIOGRAPHIE

References

- Abbas R, Larisch S (2020) Targeting XIAP for Promoting Cancer Cell Death-The Story of ARTS and SMAC. *Cells* 9(3).
- Abel F, Sjöberg Rm Fau - Ejeskär K, Ejeskär K Fau - Krona C, Krona C Fau - Martinsson T, Martinsson T (Analyses of apoptotic regulators CASP9 and DFFA at 1P36.2, reveal rare allele variants in human neuroblastoma tumours. (0007-0920 (Print)).
- Adrain C, Creagh Em Fau - Martin SJ, Martin SJ (Apoptosis-associated release of Smac/DIABLO from mitochondria requires active caspases and is blocked by Bcl-2. (0261-4189 (Print)).
- Alessenko AV, Boikov P, Filippova GN, Khrenov AV, Loginov AS, Makarieva ED (1997) Mechanisms of cycloheximide-induced apoptosis in liver cells. *FEBS Lett* 416(1):113-116.
- Allègre J, Cartier J, Glorian V, Droin N, Dumetier B, Kayaci C, Berthelet J, Gemble S, Vuillier C, Maillet L, Garrido C, Dubrez L (2018) E2F1 binds to the peptide-binding groove within the BIR3 domain of cIAP1 and requires cIAP1 for chromatin binding. *PLoS One* 13(10):e0206253.
- Almasan A, Ashkenazi A (2003) Apo2L/TRAIL: apoptosis signaling, biology, and potential for cancer therapy. *Cytokine Growth Factor Rev* 14(3-4):337-348.
- Amrollahi-Nia R, Akbari V, Shafiee F (2021) DFF40-iRGD, a novel chimeric protein with efficient cytotoxic and apoptotic effects against triple-negative breast cancer cells. *Biotechnol Lett* 43(10):1967-1976.
- Bagheri F, Safarian S, Eslaminejad MB, Sheibani N (2014) Stable overexpression of DNA fragmentation factor in T-47D cells: sensitization of breast cancer cells to apoptosis in response to acetazolamide and sulfabenzamide. *Mol Biol Rep* 41(11):7387-7394.
- Bagheri F, Safarian S, Eslaminejad MB, Sheibani N (2015) Sensitization of breast cancer cells to doxorubicin via stable cell line generation and overexpression of DFF40. *Biochem Cell Biol* 93(6):604-610.
- Bagnoli M, Canevari S, Mezzanzanica D (2010) Cellular FLICE-inhibitory protein (c-FLIP) signalling: a key regulator of receptor-mediated apoptosis in physiologic context and in cancer. *Int J Biochem Cell Biol* 42(2):210-213.
- Baliga BS, Pronczuk AW, Munro HN (1969) Mechanism of cycloheximide inhibition of protein synthesis in a cell-free system prepared from rat liver. *J Biol Chem* 244(16):4480-4489.
- Banas T, Pitynski K, Okon K, Czerw A (2017a) DNA fragmentation factors 40 and 45 (DFF40/DFF45) and B-cell lymphoma 2 (Bcl-2) protein are underexpressed in uterine leiomyosarcomas and may predict survival. *Onco Targets Ther* 10:4579-4589.
- Banas T, Pitynski K, Okon K, Czerw A (2017b) DNA fragmentation factors 40 and 45 (DFF40/DFF45) and B-cell lymphoma 2 (Bcl-2) protein are underexpressed in

- uterine leiomyosarcomas and may predict survival. *OncoTargets and therapy* 10:4579-4589.
- Banas T, Pitynski K, Okon K, Winiarska A (Non-endometrioid and high-grade endometrioid endometrial cancers show DNA fragmentation factor 40 (DFF40) and B-cell lymphoma 2 protein (BCL2) underexpression, which predicts disease-free and overall survival, but not DNA fragmentation factor 45 (DFF45) underexpression. (1471-2407 (Electronic)).
- Banas T, Pitynski K, Okon K, Winiarska A (2018) Non-endometrioid and high-grade endometrioid endometrial cancers show DNA fragmentation factor 40 (DFF40) and B-cell lymphoma 2 protein (BCL2) underexpression, which predicts disease-free and overall survival, but not DNA fragmentation factor 45 (DFF45) underexpression. *BMC Cancer* 18(1):418.
- Berg D, Lehne M Fau - Müller N, Müller N Fau - Siegmund D, Siegmund D Fau - Münkel S, Münkel S Fau - Sebald W, Sebald W Fau - Pfizenmaier K, Pfizenmaier K Fau - Wajant H, Wajant H (Enforced covalent trimerization increases the activity of the TNF ligand family members TRAIL and CD95L. (1350-9047 (Print)).
- Brambilla R, Ashbaugh JJ, Magliozzi R, Dellarole A, Karmally S, Szymkowski DE, Bethea JR (2011) Inhibition of soluble tumour necrosis factor is therapeutic in experimental autoimmune encephalomyelitis and promotes axon preservation and remyelination. *Brain* 134(Pt 9):2736-2754.
- Brustmann H (2006) DNA fragmentation factor (DFF45): expression and prognostic value in serous ovarian cancer. *Pathol Res Pract* 202(10):713-720.
- Brustmann H (2007) Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) and DNA-fragmentation factor (DFF45): expression and correlation in normal, hyperplastic and neoplastic endometrial tissues. *Pathol Res Pract* 203(2):65-72.
- Carneiro BA, El-Deiry WA-O (Targeting apoptosis in cancer therapy. (1759-4782 (Electronic)).
- Cavalcante GC, Schaan AP, Cabral GF, Santana-da-Silva MN, Pinto P, Vidal AF, Ribeiro-Dos-Santos A (2019) A Cell's Fate: An Overview of the Molecular Biology and Genetics of Apoptosis. *Int J Mol Sci* 20(17).
- Ceschi-Bertoli L, Vidal FAP, Balsamo PJ, Abdalla FC (2020) Comet assay protocol for *Bombus atratus* fat body and pericardial cells (Hymenoptera, bombini) at a safe concentration of mercury. *Chemosphere* 261:127752.
- Chadwick L, Zhao S, Mysler E, Moots RJ (2018) Review of Biosimilar Trials and Data on Etanercept in Rheumatoid Arthritis. *Curr Rheumatol Rep* 20(12):84.
- Chai J, Shi Y (2014) Apoptosome and inflammasome: conserved machineries for caspase activation. *National Science Review* 1(1):101-118.
- Chan AA-OX, Zhang Z, Chong CC, Tin EK, Chow C, Wong N (Genomic landscape of lymphoepithelioma-like hepatocellular carcinoma. (1096-9896 (Electronic)).
- Chen K, Zhao H Fau - Hu Z, Hu Z Fau - Wang L-E, Wang Le Fau - Zhang W, Zhang W Fau - Sturgis EM, Sturgis Em Fau - Wei Q, Wei Q (CASP3 polymorphisms and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck. (1078-0432 (Print)).
- Chen SN, Fang T, Kong JY, Pan BB, Su XC (2019) Third BIR domain of XIAP binds to both Cu(II) and Cu(I) in multiple sites and with diverse affinities characterized at atomic resolution. *Sci Rep* 9(1):7428.

- Chu Q, Martinez TA-O, Novak SW, Donaldson CJ, Tan D, Vaughan JM, Chang T, Diedrich JK, Andrade LA-O, Kim A, Zhang T, Manor UA-O, Saghatelian AA-OX (Regulation of the ER stress response by a mitochondrial microprotein. (2041-1723 (Electronic)).
- Chu Q, Martinez TF, Novak SW, Donaldson CJ, Tan D, Vaughan JM, Chang T, Diedrich JK, Andrade L, Kim A, Zhang T, Manor U, Saghatelian A (2019) Regulation of the ER stress response by a mitochondrial microprotein. *Nat Commun* 10(1):4883.
- Crisafulli C, Galuppo M, Cuzzocrea S (2009) Effects of genetic and pharmacological inhibition of TNF-alpha in the regulation of inflammation in macrophages. *Pharmacol Res* 60(4):332-340.
- D'Arcy MS (2019) Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biol Int* 43(6):582-592.
- Degterev A, Boyce M, Yuan J (2003) A decade of caspases. *Oncogene* 22(53):8543-8567.
- Desharnais P, Dupéré-Minier G, Hamelin C, Devine P, Bernier J (2008) Involvement of CD45 in DNA fragmentation in apoptosis induced by mitochondrial perturbing agents. *Apoptosis* 13(2):197-212.
- Diaz-Gerevini GT, Repossi G, Dain A, Tarres MC, Das UN, Eynard AR (2016) Beneficial action of resveratrol: How and why? *Nutrition* 32(2):174-178.
- Donovan MJ, Maciuba BZ, Mahan CE, McDowell MA (2009) Leishmania infection inhibits cycloheximide-induced macrophage apoptosis in a strain-dependent manner. *Exp Parasitol* 123(1):58-64.
- Dorstyn L, Akey CW, Kumar S (2018) New insights into apoptosome structure and function. *Cell Death & Differentiation* 25(7):1194-1208.
- Dubuisson A, Micheau O (2017) Antibodies and Derivatives Targeting DR4 and DR5 for Cancer Therapy. *Antibodies (Basel)* 6(4).
- Durrieu F, Samejima K, Fortune JM, Kandels-Lewis S, Osheroff N, Earnshaw WC (2000) DNA topoisomerase IIalpha interacts with CAD nuclease and is involved in chromatin condensation during apoptotic execution. *Curr Biol* 10(15):923-926.
- Ekert PG, Silke J Fau - Vaux DL, Vaux DL (Caspase inhibitors. (1350-9047 (Print))).
- Elmore S (Apoptosis: a review of programmed cell death. (0192-6233 (Print))).
- Elmore S (2007) Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 35(4):495-516.
- Enari M, Sakahira H Fau - Yokoyama H, Yokoyama H Fau - Okawa K, Okawa K Fau - Iwamatsu A, Iwamatsu A Fau - Nagata S, Nagata S (A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. (0028-0836 (Print))).
- Errami Y, Brim H, Oumouna-Benachour K, Oumouna M, Naura AS, Kim H, Ju J, Davis CJ, Kim JG, Ashktorab H, Fallon K, Xu M, Zhang J, Del Valle L, Boulares AH (2013) ICAD deficiency in human colon cancer and predisposition to colon tumorigenesis: linkage to apoptosis resistance and genomic instability. *PLoS One* 8(2):e57871.
- Falschlehner C, Ganten Tm Fau - Koschny R, Koschny R Fau - Schaefer U, Schaefer U Fau - Walczak H, Walczak H (TRAIL and other TRAIL receptor agonists as novel cancer therapeutics. (0065-2598 (Print))).
- Feltham R, Khan N, Silke J (2012) IAPS and ubiquitylation. *IUBMB Life* 64(5):411-418.

- Fernald K, Kurokawa M (2013) Evading apoptosis in cancer. *Trends Cell Biol* 23(12):620-633.
- Flynn RL, Zou L (2011) ATR: a master conductor of cellular responses to DNA replication stress. *Trends in Biochemical Sciences* 36(3):133-140.
- Fong WG, Liston P, Rajcan-Separovic E, St Jean M, Craig C, Korneluk RG (2000) Expression and genetic analysis of XIAP-associated factor 1 (XAF1) in cancer cell lines. *Genomics* 70(1):113-122.
- Fukushima K, Kikuchi J, Koshiba S, Kigawa T, Kuroda Y, Yokoyama S (2002) Solution structure of the DFF-C domain of DFF45/ICAD. A structural basis for the regulation of apoptotic DNA fragmentation. *J Mol Biol* 321(2):317-327.
- Gandini M, Gras C, Azeredo EL, Pinto LM, Smith N, Despres P, da Cunha RV, de Souza LJ, Kubelka CF, Herbeuval JP (2013) Dengue virus activates membrane TRAIL relocalization and IFN- α production by human plasmacytoid dendritic cells in vitro and in vivo. *PLoS Negl Trop Dis* 7(6):e2257.
- Ghavami S, Hashemi M, Ande SR, Yeganeh B, Xiao W, Eshraghi M, Bus CJ, Kadkhoda K, Wiechec E, Halayko AJ, Los M (2009) Apoptosis and cancer: mutations within caspase genes. *J Med Genet* 46(8):497-510.
- Gómez-Angelats M, Cidlowski JA (2003) Molecular evidence for the nuclear localization of FADD. *Cell Death Differ* 10(7):791-797.
- Gong J, Li X, Darzynkiewicz Z (1993) Different patterns of apoptosis of HL-60 cells induced by cycloheximide and camptothecin. *J Cell Physiol* 157(2):263-270.
- Gu J, Dong Rp Fau - Zhang C, Zhang C Fau - McLaughlin DF, McLaughlin Df Fau - Wu MX, Wu Mx Fau - Schlossman SF, Schlossman SF (Functional interaction of DFF35 and DFF45 with caspase-activated DNA fragmentation nuclease DFF40. (0021-9258 (Print))).
- Guo X, Kang J, Wang Z, Wang Y, Liu M, Zhu D, Yang F, Kang X (2022) Nrf2 Signaling in the Oxidative Stress Response After Spinal Cord Injury. *Neuroscience* <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2022.06.007>.
- Ha HJ, Park HH (2018) Crystal structure and mutation analysis revealed that DREP2 CIDE forms a filament-like structure with features differing from those of DREP4 CIDE. *Scientific Reports* 8(1):17810-17810.
- Hain KO, Colin DJ, Rastogi S, Allan LA, Clarke PR (2016) Prolonged mitotic arrest induces a caspase-dependent DNA damage response at telomeres that determines cell survival. *Scientific Reports* 6(1):26766.
- Heinicke U, Haydn T, Kehr S, Vogler M, Fulda S (BCL-2 selective inhibitor ABT-199 primes rhabdomyosarcoma cells to histone deacetylase inhibitor-induced apoptosis. (1476-5594 (Electronic))).
- Herbst RS, Eckhardt Sg Fau - Kurzrock R, Kurzrock R Fau - Ebbinghaus S, Ebbinghaus S Fau - O'Dwyer PJ, O'Dwyer Pj Fau - Gordon MS, Gordon Ms Fau - Novotny W, Novotny W Fau - Goldwasser MA, Goldwasser Ma Fau - Tohnya TM, Tohnya Tm Fau - Lum BL, Lum BI Fau - Ashkenazi A, Ashkenazi A Fau - Jubb AM, Jubb Am Fau - Mendelson DS, Mendelson DS (Phase I dose-escalation study of recombinant human Apo2L/TRAIL, a dual proapoptotic receptor agonist, in patients with advanced cancer. (1527-7755 (Electronic))).

- Hillert LK, Ivanisenko NV, Espe J, König C, Ivanisenko VA, Kähne T, Lavrik IN (2020) Long and short isoforms of c-FLIP act as control checkpoints of DED filament assembly. *Oncogene* 39(8):1756-1772.
- Hopkins-Donaldson S, Ziegler A, Kurtz S, Bigosch C, Kandioler D, Ludwig C, Zangemeister-Wittke U, 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 & Differentiation* 10(3):356-364.
- Hsieh SY, Liaw SF, Lee SN, Hsieh PS, Lin KH, Chu CM, Liaw YF (2003) Aberrant caspase-activated DNase (CAD) transcripts in human hepatoma cells. *Br J Cancer* 88(2):210-216.
- Iglesias-Guimaraes V, Gil-Guiñon E Fau - Gabernet G, Gabernet G Fau - García-Belinchón M, García-Belinchón M Fau - Sánchez-Osuna M, Sánchez-Osuna M Fau - Casanelles E, Casanelles E Fau - Comella JX, Comella Jx Fau - Yuste VJ, Yuste VJ (Apoptotic DNA degradation into oligonucleosomal fragments, but not apoptotic nuclear morphology, relies on a cytosolic pool of DFF40/CAD endonuclease. (1083-351X (Electronic))).
- Inohara N, Koseki T, Chen S, Wu X, Núñez G (1998) CIDE, a novel family of cell death activators with homology to the 45 kDa subunit of the DNA fragmentation factor. *EMBO J* 17(9):2526-2533.
- Ivanisenko NV, Lavrik IN (2019) [Mechanisms of Procaspase-8 Activation in the Extrinsic Programmed Cell Death Pathway]. *Mol Biol (Mosk)* 53(5):830-837.
- Jaiswal PK, Goel A, Mittal RD (2015) Survivin: A molecular biomarker in cancer. *Indian J Med Res* 141(4):389-397.
- Justiz Vaillant AA, Stang CM (2020) Lymphoproliferative Disorders. *StatPearls*, © 2020, StatPearls Publishing LLC., Treasure Island FL.
- Kadowaki H, Nishitoh H (2013) Signaling pathways from the endoplasmic reticulum and their roles in disease. *Genes (Basel)* 4(3):306-333.
- Kalinowska-Herok M, Widłak P (2008) High mobility group proteins stimulate DNA cleavage by apoptotic endonuclease DFF40/CAD due to HMG-box interactions with DNA. *Acta Biochim Pol* 55(1):21-26.
- Kemanetzoglou E, Andreadou E (2017) CNS Demyelination with TNF- α Blockers. *Curr Neurol Neurosci Rep* 17(4):36.
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer* 26(4):239-257.
- Kim SR, Lewis JM, Cyrenne BM, Monico PF, Mirza FN, Carlson KR, Foss FM, Girardi M (BET inhibition in advanced cutaneous T cell lymphoma is synergistically potentiated by BCL2 inhibition or HDAC inhibition. (1949-2553 (Electronic))).
- Kitazumi I, Tsukahara M (Regulation of DNA fragmentation: the role of caspases and phosphorylation. (1742-4658 (Electronic))).
- Koltai T (2015) Nelfinavir and other protease inhibitors in cancer: mechanisms involved in anticancer activity. *F1000Res* 4:9.
- Konishi S, Ishiguro H, Shibata Y, Kudo J, Terashita Y, Sugiura H, Koyama H, Kimura M, Sato A, Shinoda N, Kuwabara Y, Fujii Y (2002) Decreased expression of DFF45/ICAD is correlated with a poor prognosis in patients with esophageal carcinoma. *Cancer* 95(12):2473-2478.

- Krishnan A, Kocab AJ, Zacks DN, Marshak-Rothstein A, Gregory-Ksander M (2019) A small peptide antagonist of the Fas receptor inhibits neuroinflammation and prevents axon degeneration and retinal ganglion cell death in an inducible mouse model of glaucoma. *J Neuroinflammation* 16(1):184.
- Krzyszczczyk P, Acevedo A, Davidoff EJ, Timmins LM, Marrero-Berrios I, Patel M, White C, Lowe C, Sherba JJ, Hartmanshenn C, O'Neill KM, Balter ML, Fritz ZR, Androulakis IP, Schloss RS, Yarmush ML (The growing role of precision and personalized medicine for cancer treatment. (2339-5478 (Print))).
- Kulbay M, Bernier-Parker N, Bernier J (2021a) The role of the DFF40/CAD endonuclease in genomic stability. *Apoptosis* 26(1-2):9-23.
- Kulbay M, Bernier-Parker N, Bernier JA-O (The role of the DFF40/CAD endonuclease in genomic stability. (1573-675X (Electronic))).
- Kulbay M, Johnson B, Bernier J (DNA fragmentation factor 40 expression in T cells confers sensibility to tributyltin-induced apoptosis. (1879-3185 (Electronic))).
- Kulbay M, Johnson B, Bernier J (2019) DNA fragmentation factor 40 expression in T cells confers sensibility to tributyltin-induced apoptosis. *Toxicology* 426:152255.
- Kulbay M, Johnson B, Fiola S, Diaz RJ, Bernier J (DFF40 deficiency in cancerous T cells is implicated in chemotherapy drug sensitivity and resistance through the regulation of the apoptotic pathway. (1873-2968 (Electronic))).
- Kulbay M, Johnson B, Fiola S, Diaz RJ, Bernier J (2021b) DFF40 deficiency in cancerous T cells is implicated in chemotherapy drug sensitivity and resistance through the regulation of the apoptotic pathway. *Biochem Pharmacol* 194:114801.
- Kulbay M, Johnson B, Ricaud G, Séguin-Grignon M-N, Bernier J (2022) Energetic metabolic reprogramming in Jurkat DFF40-deficient cancer cells. *Molecular and Cellular Biochemistry* 10.1007/s11010-022-04433-0.
- Kulbay M, Paimboeuf A, Ozdemir D, Bernier J (2021c) Review of cancer cell resistance mechanisms to apoptosis and actual targeted therapies. *J Cell Biochem* 10.1002/jcb.30173.
- Kutscher D, Pingoud A Fau - Jeltsch A, Jeltsch A Fau - Meiss G, Meiss G (Identification of ICAD-derived peptides capable of inhibiting caspase-activated DNase. (1742-4658 (Electronic))).
- Lamotte O, Neven B, Galicier L, Magerus-Chatinet A, Schleinitz N, Hermine O, Meyts I, Picard C, Godeau B, Fischer A, Rieux-Laucat F (2013) Diagnosis of autoimmune lymphoproliferative syndrome caused by FAS deficiency in adults. *Haematologica* 98(3):389-392.
- Larsen BD, Benada J, Yung PYK, Bell RAV, Pappas G, Urban V, Ahlskog JK, Kuo TT, Janscak P, Megeney LA, Elsässer SJ, Bartek J, Sørensen CS (2022) Cancer cells use self-inflicted DNA breaks to evade growth limits imposed by genotoxic stress. *Science* 376(6592):476-483.
- Lawana V, Korrapati MC, Mehendale HM (2014) Cycloheximide. *Encyclopedia of Toxicology (Third Edition)*, Wexler P (Édit.) Academic Press, Oxford <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386454-3.00298-0>. p 1103-1105.
- Lechardeur D, Drzymala L, Sharma M, Zylka D, Kinach R, Pacia J, Hicks C, Usmani N, Rommens JM, Lukacs GL (2000) Determinants of the nuclear localization of the

- heterodimeric DNA fragmentation factor (ICAD/CAD). *The Journal of cell biology* 150(2):321-334.
- Lemaire C, Andréau K, Souvannavong V, Adam A (1999) Specific dual effect of cycloheximide on B lymphocyte apoptosis: involvement of CPP32/caspase-3. *Biochemical Pharmacology* 58(1):85-93.
- Li H, Zhu H, Xu C-j, Yuan J (1998a) Cleavage of BID by Caspase 8 Mediates the Mitochondrial Damage in the Fas Pathway of Apoptosis. *Cell* 94(4):491-501.
- Li H, Zhu H, Xu CJ, Yuan J (1998b) Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 94(4):491-501.
- Li M, Le W, Zhang XM, Zhang YJ, Jiang J, Liu PY (2019) The M476W/Q482H mutation of procaspase-8 restored caspase-8-mediated apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 514(3):653-658.
- Li M, Yao J, Zhang X, Chen X, Chen J, Guan Y, Yang X (2018) Q482H mutation of procaspase-8 in acute myeloid leukemia abolishes caspase-8-mediated apoptosis by impairing procaspase-8 dimerization. *Biochem Biophys Res Commun* 495(1):1376-1382.
- Liang C, Xu Y, Li G, Zhao T, Xia F, Li G, Zhang D, Wu J (2017) Downregulation of DcR3 sensitizes hepatocellular carcinoma cells to TRAIL-induced apoptosis. *Oncotargets Ther* 10:417-428.
- Liu J, Dong Z, Zhu Q, He D, Ma Y, Du A, He F, Zhao D, Xu X, Zhang H, Jin L, Wang J (2016) TNF- α Promoter Polymorphisms Predict the Response to Etanercept More Powerfully than that to Infliximab/Adalimumab in Spondyloarthritis. *Sci Rep* 6:32202.
- Liu X, Yang JM, Zhang SS, Liu XY, Liu DX (2010) Induction of cell cycle arrest at G1 and S phases and cAMP-dependent differentiation in C6 glioma by low concentration of cycloheximide. *BMC Cancer* 10:684.
- Liu X, Zou H, Slaughter C, Wang X (1997) DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell* 89(2):175-184.
- Liu XM, Yang ZM, Liu XK (2017) Fas/FasL induces myocardial cell apoptosis in myocardial ischemia-reperfusion rat model. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 21(12):2913-2918.
- Liu Y, Mondello PA-O, Erazo T, Tannan NB, Asgari Z, de Stanchina E, Nanjangud G, Seshan VE, Wang S, Wendel HG, Younes A (NOXA genetic amplification or pharmacologic induction primes lymphoma cells to BCL2 inhibitor-induced cell death. (1091-6490 (Electronic)).
- Liu Z, Dawes R, Petrova S, Beverley PC, Tchilian EZ (2006) CD45 regulates apoptosis in peripheral T lymphocytes. *Int Immunol* 18(6):959-966.
- Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ (2001) The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 104(4):487-501.
- Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C, Wang X (1998) Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* 94(4):481-490.
- Majorini MT, Manenti G, Mano M, De Cecco L, Conti A, Pinciroli P, Fontanella E, Tagliabue E, Chiodoni C, Colombo MP, Delia D, Lecis D (2018) cIAP1 regulates

- the EGFR/Snai2 axis in triple-negative breast cancer cells. *Cell Death Differ* 25(12):2147-2164.
- Malumbres M, Barbacid M (2009) Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nature Reviews Cancer* 9(3):153-166.
- Mamriev D, Abbas R, Klingler FM, Kagan J, Kfir N, Donald A, Weidenfeld K, Sheppard DW, Barkan D, Larisch S (2020) A small-molecule ARTS mimetic promotes apoptosis through degradation of both XIAP and Bcl-2. *Cell Death Dis* 11(6):483.
- Mandal R, Barrón JC, Kostova I, Becker S, Strebhardt K (2020) Caspase-8: The double-edged sword. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer* 1873(2):188357.
- Martin SJ, Lennon SV, Bonham AM, Cotter TG (1990) Induction of apoptosis (programmed cell death) in human leukemic HL-60 cells by inhibition of RNA or protein synthesis. *J Immunol* 145(6):1859-1867.
- Martínez-Escardó L, Alemany M, Sánchez-Osuna M, Sánchez-Chardi A, Roig-Martínez M, Suárez-García S, Ruiz-Molina D, Vidal N, Plans G, Majós C, Ribas J, Baltrons MA, Bayascas JR, Barcia C, Bruna J, Yuste VJ (2021) Gossypol Treatment Restores Insufficient Apoptotic Function of DFF40/CAD in Human Glioblastoma Cells. *Cancers (Basel)* 13(21).
- Masuda A, Isobe Y, Sugimoto K, Yoshimori M, Arai A, Komatsu N (2020) Efficient recruitment of c-FLIP(L) to the death-inducing signaling complex leads to Fas resistance in natural killer-cell lymphoma. *Cancer Sci* 111(3):807-816.
- McCarty JS, Toh SY, Li P (1999) Multiple Domains of DFF45 Bind Synergistically to DFF40: Roles of Caspase Cleavage and Sequestration of Activator Domain of DFF40. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 264(1):181-185.
- McIlroy D, Sakahira H, Talanian RV, Nagata S (1999) Involvement of caspase 3-activated DNase in internucleosomal DNA cleavage induced by diverse apoptotic stimuli. *Oncogene* 18(31):4401-4408.
- Meiss G, Scholz SR, Korn C, Gimadutdinow O, Pingoud A (2001) Identification of functionally relevant histidine residues in the apoptotic nuclease CAD. *Nucleic acids research* 29(19):3901-3909.
- Meng X, Chang Z, Che N, Wu J, Dang T, Chai J (2020) Acid/bile exposure triggers TRAIL-mediated apoptosis in esophageal cancer cells by suppressing the decoy receptors and c-FLIP(R). *Int J Biochem Cell Biol* 122:105736.
- Milatovich A, Song K Fau - Heller RA, Heller Ra Fau - Francke U, Francke U (Tumor necrosis factor receptor genes, TNFR1 and TNFR2, on human chromosomes 12 and 1. (0740-7750 (Print))).
- Minaiyan G, Shafiee F, Akbari V (2021) Survivin Promoter-Driven DFF40 Gene Expression Sensitizes Melanoma Cancer Cells to Chemotherapy. *Int J Toxicol* 40(4):380-387.
- Minaiyan G, Shafiee F, Akbari VA-O (Survivin Promoter-Driven DFF40 Gene Expression Sensitizes Melanoma Cancer Cells to Chemotherapy. (1092-874X (Electronic))).
- Mom CH, Verweij J Fau - Oldenhuis CNAM, Oldenhuis Cn Fau - Gietema JA, Gietema Ja Fau - Fox NL, Fox Ni Fau - Miceli R, Miceli R Fau - Eskens FALM, Eskens Fa Fau - Loos WJ, Loos Wj Fau - de Vries EGE, de Vries Eg Fau - Sleijfer S, Sleijfer S (Mapatumumab, a fully human agonistic monoclonal antibody that targets

- TRAIL-R1, in combination with gemcitabine and cisplatin: a phase I study. (1557-3265 (Electronic)).
- Morton PA-O, Perrin CA-O, Levitt J, Matthews DR, Marsh RJ, Pike RA-O, McMillan D, Maloney AA-O, Poland S, Ameer-Beg S, Parsons MA-O (TNFR1 membrane reorganization promotes distinct modes of TNF α signaling. LID - eaaw2418 [pii] LID - 10.1126/scisignal.aaw2418 [doi]. (1937-9145 (Electronic)).
- Morton PE, Perrin C, Levitt J, Matthews DR, Marsh RJ, Pike R, McMillan D, Maloney A, Poland S, Ameer-Beg S, Parsons M (2019) TNFR1 membrane reorganization promotes distinct modes of TNF α signaling. *Sci Signal* 12(592).
- Mukae N, Yokoyama H Fau - Yokokura T, Yokokura T Fau - Sakoyama Y, Sakoyama Y Fau - Nagata S, Nagata S (Activation of the innate immunity in Drosophila by endogenous chromosomal DNA that escaped apoptotic degradation. (0890-9369 (Print)).
- Nabhani S, Ginzl S, Miskin H, Revel-Vilk S, Harlev D, Fleckenstein B, Hönscheid A, Oommen PT, Kuhlen M, Thiele R, Laws HJ, Borkhardt A, Stepensky P, Fischer U (2015) Deregulation of Fas ligand expression as a novel cause of autoimmune lymphoproliferative syndrome-like disease. *Haematologica* 100(9):1189-1198.
- Neumann S, Hasenauer J, Pollak N, Scheurich P (2014) Dominant negative effects of tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) receptor 4 on TRAIL receptor 1 signaling by formation of heteromeric complexes. *J Biol Chem* 289(23):16576-16587.
- Nuñez G, Benedict MA, Hu Y, Inohara N (1998) Caspases: the proteases of the apoptotic pathway. *Oncogene* 17(25):3237-3245.
- Oberhammer F, Wilson JW, Dive C, Morris ID, Hickman JA, Wakeling AE, Walker PR, Sikorska M (1993) Apoptotic death in epithelial cells: cleavage of DNA to 300 and/or 50 kb fragments prior to or in the absence of internucleosomal fragmentation. *EMBO J* 12(9):3679-3684.
- Pajak B, Orzechowski A, Gajkowska B (2007) Molecular basis of sodium butyrate-dependent proapoptotic activity in cancer cells. *Adv Med Sci* 52:83-88.
- Pan G, Ni J, Wei YF, Yu G, Gentz R, Dixit VM (1997) An antagonist decoy receptor and a death domain-containing receptor for TRAIL. *Science* 277(5327):815-818.
- Pan Y, Xu R, Peach M, Huang CP, Branstetter D, Novotny W, Herbst RS, Eckhardt SG, Holland PM (2011) Evaluation of pharmacodynamic biomarkers in a Phase 1a trial of dulanermin (rhApo2L/TRAIL) in patients with advanced tumours. *Br J Cancer* 105(12):1830-1838.
- Parackova Z, Milota T, Vrabcova P, Smetanova J, Svaton M, Freiburger T, Kanderova V, Sediva A (2020) Novel XIAP mutation causing enhanced spontaneous apoptosis and disturbed NOD2 signalling in a patient with atypical adult-onset Crohn's disease. *Cell Death Dis* 11(6):430.
- Park EK, Lee JC, Park JW, Bang SY, Yi SA, Kim BK, Park JH, Kwon SH, You JS, Nam SW, Cho EJ, Han JW (2015) Transcriptional repression of cancer stem cell marker CD133 by tumor suppressor p53. *Cell Death Dis* 6(11):e1964.
- Park JY, Park Jm Fau - Jang JS, Jang Js Fau - Choi JE, Choi Je Fau - Kim KM, Kim Km Fau - Cha SI, Cha Si Fau - Kim CH, Kim Ch Fau - Kang YM, Kang Ym Fau - Lee WK, Lee Wk Fau - Kam S, Kam S Fau - Park RW, Park Rw Fau - Kim IS,

- Kim Is Fau - Lee J-T, Lee Jt Fau - Jung TH, Jung TH (Caspase 9 promoter polymorphisms and risk of primary lung cancer. (0964-6906 (Print)).
- Peter ME, Krammer PH (2003) The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond. *Cell Death Differ* 10(1):26-35.
- Pistritto G, Trisciuglio D, Ceci C, Garufi A, D'Orazi G (2016) Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies. *Aging (Albany NY)* 8(4):603-619.
- Planells-Ferrer L, Urresti J, Coccia E, Galenkamp KM, Calleja-Yagüe I, López-Soriano J, Carriba P, Barneda-Zahonero B, Segura MF, Comella JX (2016) Fas apoptosis inhibitory molecules: more than death-receptor antagonists in the nervous system. *J Neurochem* 139(1):11-21.
- Plummer R, Attard G Fau - Pacey S, Pacey S Fau - Li L, Li L Fau - Razak A, Razak A Fau - Perrett R, Perrett R Fau - Barrett M, Barrett M Fau - Judson I, Judson I Fau - Kaye S, Kaye S Fau - Fox NL, Fox NI Fau - Halpern W, Halpern W Fau - Corey A, Corey A Fau - Calvert H, Calvert H Fau - de Bono J, de Bono J (Phase 1 and pharmacokinetic study of lexatumumab in patients with advanced cancers. (1078-0432 (Print)).
- Qadir AS, Stults AM, Murmann AE, Peter ME (2020) The mechanism of how CD95/Fas activates the Type I IFN/STAT1 axis, driving cancer stemness in breast cancer. *Sci Rep* 10(1):1310.
- Rajandram R, Razack AH, Ng KL, Gobe GC (2016) Decreased Expression of Inhibitor of Caspase-Activated DNase (ICAD) in Renal Cell Carcinoma - Tissue Microarray of Human Samples. *J Kidney Cancer VHL* 3(1):1-11.
- Ramakrishnan VG, Miller KC, Macon EP, Kimlinger TK, Haug J, Kumar S, Gonsalves WI, Rajkumar SV, Kumar SK (Histone deacetylase inhibition in combination with MEK or BCL-2 inhibition in multiple myeloma. (1592-8721 (Electronic)).
- Rigaud S, Fondanèche MC, Lambert N, Pasquier B, Mateo V, Soulas P, Galicier L, Le Deist F, Rieux-Laucat F, Revy P, Fischer A, de Saint Basile G, Latour S (2006) XIAP deficiency in humans causes an X-linked lymphoproliferative syndrome. *Nature* 444(7115):110-114.
- Roy MD (2007) Approach for assessing total cellular DNA damage. *Biotechniques* 42(4):425, 427, 429 passim.
- Safa AR, Day TW, Wu CH (2008) Cellular FLICE-like inhibitory protein (C-FLIP): a novel target for cancer therapy. *Curr Cancer Drug Targets* 8(1):37-46.
- Sakahira H, Enari M Fau - Nagata S, Nagata S (Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. (0028-0836 (Print)).
- Sakahira H, Enari M, Ohsawa Y, Uchiyama Y, Nagata S (1999) Apoptotic nuclear morphological change without DNA fragmentation. *Curr Biol* 9(10):543-546.
- Sakahira H, Iwamatsu A Fau - Nagata S, Nagata S (Specific chaperone-like activity of inhibitor of caspase-activated DNase for caspase-activated DNase. (0021-9258 (Print)).
- Sánchez-Osuna M, Martínez-Escardó L, Granados-Colomina C, Martínez-Soler F, Pascual-Guiral S, Iglesias-Guimaraes V, Velasco R, Plans G, Vidal N, Tortosa A, Barcia C, Bruna J, Yuste VJ (2016a) An intrinsic DFF40/CAD endonuclease deficiency impairs oligonucleosomal DNA hydrolysis during caspase-dependent

- cell death: a common trait in human glioblastoma cells. *Neuro-oncology* 18(7):950-961.
- Sánchez-Osuna M, Martínez-Escardó L, Granados-Colomina C, Martínez-Soler F, Pascual-Guiral S, Iglesias-Guimarais V, Velasco R, Plans G, Vidal N, Tortosa A, Barcia C, Bruna J, Yuste VJ (2016b) An intrinsic DFF40/CAD endonuclease deficiency impairs oligonucleosomal DNA hydrolysis during caspase-dependent cell death: a common trait in human glioblastoma cells. *Neuro-oncology* 18(7):950-961.
- Schleich K, Buchbinder JH, Pietkiewicz S, Kähne T, Warnken U, Öztürk S, Schnölzer M, Naumann M, Krammer PH, Lavrik IN (2016) Molecular architecture of the DED chains at the DISC: regulation of procaspase-8 activation by short DED proteins c-FLIP and procaspase-8 prodomain. *Cell Death Differ* 23(4):681-694.
- Schneider-Poetsch T, Ju J, Eyler DE, Dang Y, Bhat S, Merrick WC, Green R, Shen B, Liu JO (2010) Inhibition of eukaryotic translation elongation by cycloheximide and lactimidomycin. *Nat Chem Biol* 6(3):209-217.
- Schneider P, Thome M, Burns K, Bodmer JL, Hofmann K, Kataoka T, Holler N, Tschopp J (1997) TRAIL receptors 1 (DR4) and 2 (DR5) signal FADD-dependent apoptosis and activate NF- κ B. *Immunity* 7(6):831-836.
- Seo J, Lee EW, Shin J, Seong D, Nam YW, Jeong M, Lee SH, Lee C, Song J (2018) K6 linked polyubiquitylation of FADD by CHIP prevents death inducing signaling complex formation suppressing cell death. *Oncogene* 37(36):4994-5006.
- Seyrek K, Ivanisenko NV, Richter M, Hillert LK, König C, Lavrik IN (2020) Controlling Cell Death through Post-translational Modifications of DED Proteins. *Trends Cell Biol* 30(5):354-369.
- Seyrek K, Richter M, Lavrik IN (2019) Decoding the sweet regulation of apoptosis: the role of glycosylation and galectins in apoptotic signaling pathways. *Cell Death Differ* 26(6):981-993.
- Sharma S, Carmona A, Skowronek A, Yu F, Collins MO, Naik S, Murzeau CM, Tseng PL, Erdmann KS (2019) Apoptotic signalling targets the post-endocytic sorting machinery of the death receptor Fas/CD95. *Nat Commun* 10(1):3105.
- Shatnyeva OM, Kubarenko AV, Weber CE, Pappa A, Schwartz-Albiez R, Weber AN, Krammer PH, Lavrik IN (2011) Modulation of the CD95-induced apoptosis: the role of CD95 N-glycosylation. *PLoS One* 6(5):e19927.
- Shen C, Pei J, Guo X, Zhou L, Li Q, Quan J (2018) Structural basis for dimerization of the death effector domain of the F122A mutant of Caspase-8. *Sci Rep* 8(1):16723.
- Siegmund D, Lang I, Wajant H (2017) Cell death-independent activities of the death receptors CD95, TRAILR1, and TRAILR2. *FEBS J* 284(8):1131-1159.
- Smaili SS, Hsu YT, Sanders KM, Russell JT, Youle RJ (2001) Bax translocation to mitochondria subsequent to a rapid loss of mitochondrial membrane potential. *Cell Death & Differentiation* 8(9):909-920.
- Solano-Gálvez SG, Abadi-Chiriti J, Gutiérrez-Velez L, Rodríguez-Puente E, Konstat-Korzenny E, Álvarez-Hernández DA, Franyuti-Kelly G, Gutiérrez-Kobeh L, Vázquez-López R (2018) Apoptosis: Activation and Inhibition in Health and Disease. *Med Sci (Basel)* 6(3).

- Sordo-Bahamonde C, Lorenzo-Herrero S, Payer Á R, Gonzalez S, López-Soto A (2020) Mechanisms of Apoptosis Resistance to NK Cell-Mediated Cytotoxicity in Cancer. *Int J Mol Sci* 21(10).
- Sordo-Bahamonde C, Lorenzo-Herrero S, Payer Á R, Gonzalez SA-O, López-Soto AA-O (Mechanisms of Apoptosis Resistance to NK Cell-Mediated Cytotoxicity in Cancer. LID - 10.3390/ijms21103726 [doi] LID - 3726. (1422-0067 (Electronic))).
- Soung YH, Lee JW, Kim HS, Park WS, Kim SY, Lee JH, Park JY, Cho YG, Kim CJ, Park YG, Nam SW, Jeong SW, Kim SH, Lee JY, Yoo NJ, Lee SH (2003) Inactivating mutations of CASPASE-7 gene in human cancers. *Oncogene* 22(39):8048-8052.
- Soung YH, Lee JW, Kim SY, Jang J, Park YG, Park WS, Nam SW, Lee JY, Yoo NJ, Lee SH (2005) CASPASE-8 gene is inactivated by somatic mutations in gastric carcinomas. *Cancer Res* 65(3):815-821.
- Soung YH, Lee JW, Kim SY, Park WS, Nam SW, Lee JY, Yoo NJ, Lee SH (2004) Somatic mutations of CASP3 gene in human cancers. *Hum Genet* 115(2):112-115.
- Soung YH, Lee JW, Kim SY, Park WS, Nam SW, Lee JY, Yoo NJ, Lee SH (2006) Mutational analysis of proapoptotic caspase-9 gene in common human carcinomas. *APMIS* 114(4):292-297.
- Spierings DC, de Vries Eg Fau - Vellenga E, Vellenga E Fau - van den Heuvel FA, van den Heuvel Fa Fau - Koornstra JJ, Koornstra Jj Fau - Wesseling J, Wesseling J Fau - Hollema H, Hollema H Fau - de Jong S, de Jong S (Tissue distribution of the death ligand TRAIL and its receptors. (0022-1554 (Print))).
- Staniek J, Lorenzetti R, Heller B, Janowska I, Schneider P, Unger S, Warnatz K, Seidl M, Venhoff N, Thiel J, Smulski CR, Rizzi M (2019) TRAIL-R1 and TRAIL-R2 Mediate TRAIL-Dependent Apoptosis in Activated Primary Human B Lymphocytes. *Front Immunol* 10:951.
- Stein MN, Malhotra J, Tarapore RS, Malhotra U, Silk AW, Chan N, Rodriguez L, Aisner J, Aiken RD, Mayer T, Haffty BG, Newman JH, Aspromonte SM, Bommareddy PK, Estupinian R, Chesson CB, Sadimin ET, Li S, Medina DJ, Saunders T, Frankel M, Kareddula A, Damare S, Wesolowsky E, Gabel C, El-Deiry WS, Prabhu VV, Allen JE, Stogniew M, Oster W, Bertino JR, Libutti SK, Mehnert JM, Zloza AA-O (Safety and enhanced immunostimulatory activity of the DRD2 antagonist ONC201 in advanced solid tumor patients with weekly oral administration. (2051-1426 (Electronic))).
- Suda T, Takahashi T, Golstein P, Nagata S (1993) Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell* 75(6):1169-1178.
- Takahashi M, Miura Y, Hayashi S, Tateishi K, Fukuda K, Kurosaka M (2011) DcR3-TL1A signalling inhibits cytokine-induced proliferation of rheumatoid synovial fibroblasts. *Int J Mol Med* 28(3):423-427.
- Takahashi R, Deveraux Q, Tamm I, Welsh K, Assa-Munt N, Salvesen GS, Reed JC (1998) A single BIR domain of XIAP sufficient for inhibiting caspases. *J Biol Chem* 273(14):7787-7790.
- Tillie R, Theelen TL, van Kuijk K, Temmerman L, de Bruijn J, Gijbels M, Betsholtz C, Biessen EAL, Sluimer JC (2021) A Switch from Cell-Associated to Soluble

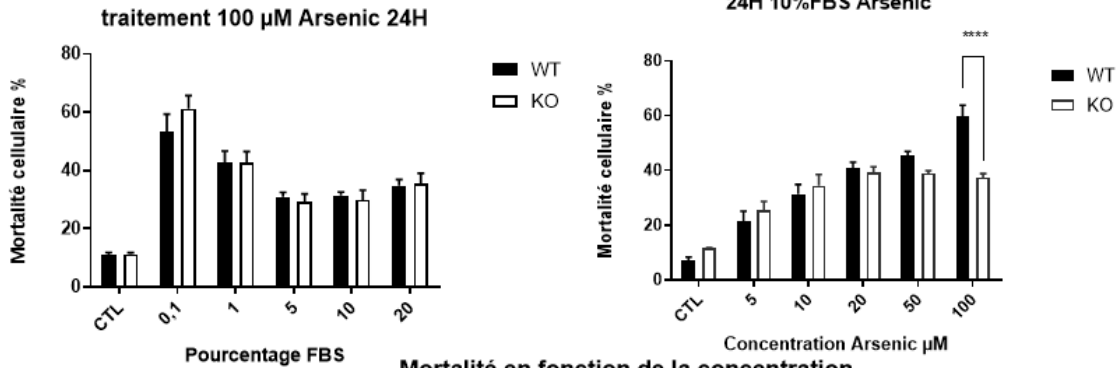
- PDGF-B Protects against Atherosclerosis, despite Driving Extramedullary Hematopoiesis. *Cells* 10(7).
- Tourneur L, Buzyn A, Chiocchia G (2005) FADD adaptor in cancer. *Med Immunol* 4(1):1.
- Tsuchida T, Kato T, Yamada A, Kawamoto K (2002) Cycloheximide induces apoptosis of astrocytes. *Pathol Int* 52(3):181-185.
- Tyagi AK, Singh RP, Agarwal C, Chan DC, Agarwal R (2002) Silibinin strongly synergizes human prostate carcinoma DU145 cells to doxorubicin-induced growth inhibition, G2-M arrest, and apoptosis. *Clin Cancer Res* 8(11):3512-3519.
- Uren RT, Iyer S, Kluck RM (2017) Pore formation by dimeric Bak and Bax: an unusual pore? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 372(1726).
- Urriola-Muñoz P, Lagos-Cabré R, Patiño-García D, Reyes JG, Moreno RD (2018) Bisphenol-A and Nonylphenol Induce Apoptosis in Reproductive Tract Cancer Cell Lines by the Activation of ADAM17. *Int J Mol Sci* 19(8).
- Vasilyev FF, Lopatnikova JA, Sennikov SV (2013) Optimized flow cytometry protocol for analysis of surface expression of interleukin-1 receptor types I and II. *Cytotechnology* 65(5):795-802.
- Vermeulen K, Van Bockstaele DR, Berneman ZN (2003) The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif* 36(3):131-149.
- Vigneswara V, Ahmed Z (2020) The Role of Caspase-2 in Regulating Cell Fate. *Cells* 9(5).
- von Karstedt S, Walczak H (2020) An unexpected turn of fortune: targeting TRAIL-Rs in KRAS-driven cancer. *Cell Death Discov* 6:14.
- von Pawel J, Harvey JH, Spigel DR, Dediu M, Reck M, Cebotaru CL, Humphreys RC, Gribbin MJ, Fox NL, Camidge DR (Phase II trial of mapatumumab, a fully human agonist monoclonal antibody to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor 1 (TRAIL-R1), in combination with paclitaxel and carboplatin in patients with advanced non-small-cell lung cancer. (1938-0690 (Electronic)).
- Voskoboinik I, Whisstock JC, Trapani JA (2015) Perforin and granzymes: function, dysfunction and human pathology. *Nat Rev Immunol* 15(6):388-400.
- Vunnam N, Lo CH, Grant BD, Thomas DD, Sachs JN (2017) Soluble Extracellular Domain of Death Receptor 5 Inhibits TRAIL-Induced Apoptosis by Disrupting Receptor-Receptor Interactions. *J Mol Biol* 429(19):2943-2953.
- Wagner J, Kline CL, Zhou L, Campbell KS, MacFarlane AW, Olszanski AJ, Cai KQ, Hensley HH, Ross EA, Ralff MD, Zloza A, Chesson CB, Newman JH, Kaufman H, Bertino J, Stein M, El-Deiry WS (Dose intensification of TRAIL-inducing ONC201 inhibits metastasis and promotes intratumoral NK cell recruitment. (1558-8238 (Electronic)).
- Walczak H, Degli-Esposti MA, Johnson RS, Smolak PJ, Waugh JY, Boiani N, Timour MS, Gerhart MJ, Schooley KA, Smith CA, Goodwin RG, Rauch CT (1997) TRAIL-R2: a novel apoptosis-mediating receptor for TRAIL. *EMBO J* 16(17):5386-5397.
- Wang J, Lindahl T (2016) Maintenance of Genome Stability. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics* 14(3):119-121.

- Wang K, Lin B (2013) Inhibitor of apoptosis proteins (IAPs) as regulatory factors of hepatic apoptosis. *Cell Signal* 25(10):1970-1980.
- Wang S, El-Deiry WS (2003) TRAIL and apoptosis induction by TNF-family death receptors. *Oncogene* 22(53):8628-8633.
- Wang S, Zhao Y, Aguilar A, Bernard D, Yang CY (Targeting the MDM2-p53 Protein-Protein Interaction for New Cancer Therapy: Progress and Challenges. LID - 10.1101/cshperspect.a026245 [doi] LID - a026245. (2157-1422 (Electronic)).
- Weinelt NA-O, Karathanasis CA-O, Smith SA-O, Medler JA-O, Malkusch SA-OX, Fulda SA-O, Wajant HA-O, Heilemann MA-O, van Wijk SA-O (Quantitative single-molecule imaging of TNFR1 reveals zafirlukast as antagonist of TNFR1 clustering and TNF α -induced NF- κ B signaling. (1938-3673 (Electronic)).
- Widłak P (2000) The DFF40/CAD endonuclease and its role in apoptosis. *Acta Biochim Pol* 47(4):1037-1044.
- Widlak P, Garrard WT (2005a) Discovery, regulation, and action of the major apoptotic nucleases DFF40/CAD and endonuclease G. *J Cell Biochem* 94(6):1078-1087.
- Widlak P, Kalinowska M, Parseghian MH, Lu X, Hansen JC, Garrard WT (2005b) The histone H1 C-terminal domain binds to the apoptotic nuclease, DNA fragmentation factor (DFF40/CAD) and stimulates DNA cleavage. *Biochemistry* 44(21):7871-7878.
- Widlak P, Li P, Fau - Wang X, Wang X, Fau - Garrard WT, Garrard WT (Cleavage preferences of the apoptotic endonuclease DFF40 (caspase-activated DNase or nuclease) on naked DNA and chromatin substrates. (0021-9258 (Print)).
- Widlak P, Li P, Wang X, Garrard WT (2000) Cleavage preferences of the apoptotic endonuclease DFF40 (caspase-activated DNase or nuclease) on naked DNA and chromatin substrates. *J Biol Chem* 275(11):8226-8232.
- Woo SM, Kwon TK (2019) E3 ubiquitin ligases and deubiquitinases as modulators of TRAIL-mediated extrinsic apoptotic signaling pathway. *BMB Rep* 52(2):119-126.
- Wu CC, Lee S, Malladi S, Chen MD, Mastrandrea NJ, Zhang Z, Bratton SB (2016) The Apaf-1 apoptosome induces formation of caspase-9 homo- and heterodimers with distinct activities. *Nat Commun* 7:13565.
- Yadav RK, Chae SW, Kim HR, Chae HJ (Endoplasmic reticulum stress and cancer. (2288-3649 (Print)).
- Yamamoto J, Miyake K, Han Q, Tan Y, Inubushi S, Sugisawa N, Higuchi T, Tashiro Y, Nishino H, Homma Y, Matsuyama R, Chawla SP, Bouvet M, Singh SR, Endo I, Hoffman RM (2020) Oral recombinant methioninase increases TRAIL receptor-2 expression to regress pancreatic cancer in combination with agonist tigatuzumab in an orthotopic mouse model. *Cancer Lett* 492:174-184.
- Yanumula A, Cusick JK (Biochemistry, Extrinsic Pathway of Apoptosis. BTI - StatPearls.
- Yanumula A, Cusick JK (2020) Biochemistry, Extrinsic Pathway of Apoptosis. *StatPearls*, © 2020, StatPearls Publishing LLC., Treasure Island FL.
- Yoshimura S, Sano E, Hanashima Y, Yamamuro S, Sumi K, Ueda T, Nakayama T, Hara H, Yoshino A, Katayama Y (2019) IFN- β sensitizes TRAIL-induced apoptosis by upregulation of death receptor 5 in malignant glioma cells. *Oncol Rep* 42(6):2635-2643.
- Yuan X, Gajan A, Chu Q, Xiong H, Wu K, Wu GS (2018) Developing TRAIL/TRAIL death receptor-based cancer therapies. *Cancer Metastasis Rev* 37(4):733-748.

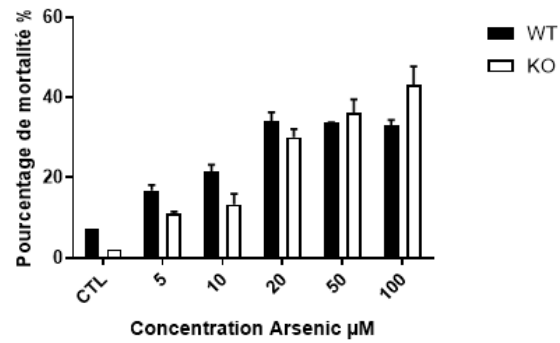
- Zeng J, Chen Q-W, Yu Z-Y, Zhang J-R, Chen D-L, Song C, Luo J, Zhang C, Wang S-L, Chen J-P (2016) Regulation of intrinsic apoptosis in cycloheximide-treated macrophages by the Sichuan human strain of Chinese Leishmania isolates. *Acta Tropica* 153:101-110.
- Zhang J, Liu X, Scherer DC, van Kaer L, Wang X, Xu M (1998) Resistance to DNA fragmentation and chromatin condensation in mice lacking the DNA fragmentation factor 45. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(21):12480-12485.
- Zhang J, Niu H, Zhao ZJ, Fu X, Wang Y, Zhang X, Zhang F, Zeng LA-O (CRISPR/Cas9 Knockout of Bak Mediates Bax Translocation to Mitochondria in response to TNF α /CHX-induced Apoptosis. (2314-6141 (Electronic))).
- Zhang W, Hong R, Li L, Wang Y, Du P, Ou Y, Zhao Z, Liu X, Xiao W, Dong D, Wu Q, Chen J, Song Y, Zhan Q (2018) The chromosome 11q13.3 amplification associated lymph node metastasis is driven by miR-548k through modulating tumor microenvironment. *Mol Cancer* 17(1):125.
- Zhao Y, Tan J Fau - Zhuang L, Zhuang L Fau - Jiang X, Jiang X Fau - Liu ET, Liu Et Fau - Yu Q, Yu Q (Inhibitors of histone deacetylases target the Rb-E2F1 pathway for apoptosis induction through activation of proapoptotic protein Bim. (0027-8424 (Print))).
- Zhong HH, Wang HY, Li J, Huang YZ (2019) TRAIL-based gene delivery and therapeutic strategies. *Acta Pharmacol Sin* 40(11):1373-1385.
- Zhou P, Lugovskoy Aa Fau - McCarty JS, McCarty Js Fau - Li P, Li P Fau - Wagner G, Wagner G (Solution structure of DFF40 and DFF45 N-terminal domain complex and mutual chaperone activity of DFF40 and DFF45. (0027-8424 (Print))).
- Zhou Q, Krebs JF, Snipas SJ, Price A, Alnemri ES, Tomaselli KJ, Salvesen GS (1998) Interaction of the baculovirus anti-apoptotic protein p35 with caspases. Specificity, kinetics, and characterization of the caspase/p35 complex. *Biochemistry* 37(30):10757-10765.

7 ANNEXE I

Données sur Arsenic

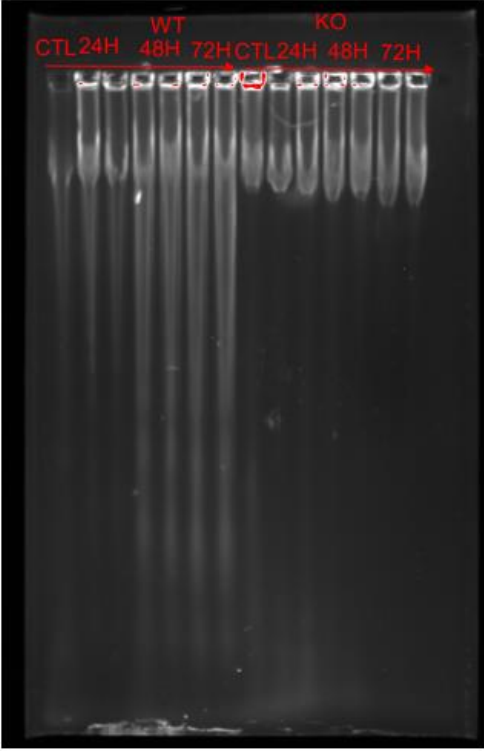
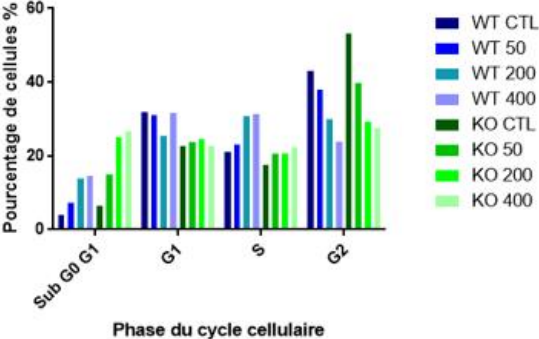


Mortalité en fonction de la concentration d'arsenic sur des cellules Hela 24 H N2



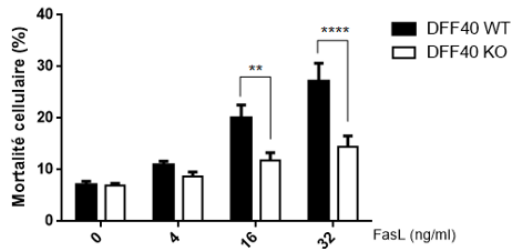
Données sur 5-Fluouracile

cycle cellulaire 72H 50-200-400 µM 5FU N3

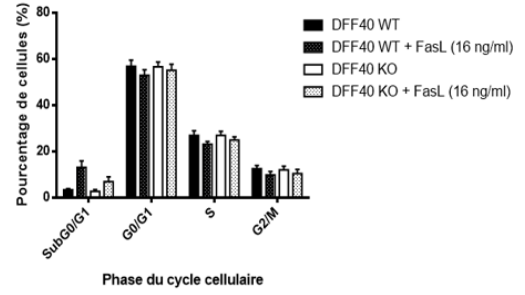


Données sur Fas L

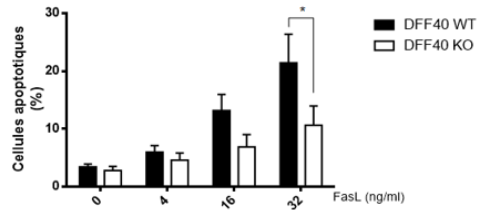
Pourcentage de cellules mortes en fonction de la concentration



Pourcentage de cellules dans chaque phase du cycle cellulaire



Pourcentage de cellules mortes en fonction de la concentration



Review of cancer cell resistance mechanisms to apoptosis and actual targeted therapies

Merve Kulbay^{1,2}  | Adeline Paimboeuf¹ | Derman Ozdemir³ | Jacques Bernier¹ 

¹INRS – Centre Armand-Frappier Santé Biotechnologie, Laval, Quebec, Canada

²Department of Medicine, Université de Montréal, Montréal, Quebec, Canada

³Department of Medicine, One Brooklyn Health-Brookdale Hospital Medical Center, Brooklyn, New York, USA

Correspondence

Jacques Bernier, INRS – Centre Armand-Frappier Santé Biotechnologie, 531 Boul des Prairies, Laval, QC H7V 1B7, Canada.
Email: Jacques.bernier@inrs.ca

Funding information

Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada, Grant/Award Number: operating grant 1257509

Abstract

The apoptosis pathway is a programmed cell death mechanism that is crucial for cellular and tissue homeostasis and organ development. There are three major caspase-dependent pathways of apoptosis that ultimately lead to DNA fragmentation. Cancerous cells are known to highly regulate the apoptotic pathway and its role in cancer hallmark acquisition has been discussed over the past decades. Numerous mutations in cancer cell types have been reported to be implicated in chemoresistance and treatment outcome. In this review, we summarize the mutations of the caspase-dependant apoptotic pathways that are the source of cancer development and the targeted therapies currently available or in trial.

KEYWORDS

apoptosis, cell mutations, resistance, targeted therapy

1 | INTRODUCTION

Numerous cell death pathways have been identified throughout the literature. Cell signalization in apoptosis is the best described pathway until today, due to its implication in a large number of pathologies. This process was discovered by John KER, Wyllie and Currie in 1972.¹ Apoptosis is a programmed cell death mechanism known as a cellular suicide signal. This form of cell death describes a process by which cells trigger their self-destruction in response to a signal. Apoptosis plays several roles; it eliminates infected cells from the human body, contributes to the functioning of the immune system, and also the maintenance of homeostasis. There are two main apoptotic pathways that have been thoroughly described in the literature: the extrinsic or death receptor

pathway and the intrinsic or mitochondrial pathway. On one hand, the intrinsic pathway is triggered by signals internal to the cell, such as damage to the DNA or infection of the cell by viral agents. On the other hand, the extrinsic pathway is triggered by signals that are external to the target cell that can be mediated by either natural killer (NK) lymphocytes or CD8 positive cytotoxic T cells (CTL/CD8⁺ T cells). Overall, the apoptotic pathway lacks an inflammatory response, but some apoptotic signals were shown to induce one. Activation of CD95, a death receptor further discussed below, was shown to induce cell death and promote inflammation through pro-inflammatory cytokine production.² A pro-inflammatory role of human caspases related to caspase-1 was also reported in sepsis, through cleavage and activation of cytokines.³ Although, it is fair to say that apoptosis does

Merve Kulbay and Adeline Paimboeuf are co-first authors and contributed equally to this study.

not lead to cell lysis unlike necrosis. Proapoptotic signals (e.g., DNA lesion, stress, viral infection, p53 status, chemicals) prompts the cell to make the decision to trigger a process of apoptosis.^{4,5}

Cancerous cells are known to highly regulate the apoptotic pathway and its role in cancer hallmark acquisition has been discussed over the past decades.⁶ Numerous mutations in cancer cell types have been reported to be implicated in chemoresistance and treatment outcome. In fact, cancer is among the leading death causes in the United States.⁷ Current first-line therapies in oncology mainly involve chemotherapeutic drugs in combination with surgery and/or radiotherapy. Although, over the past years, the interest toward personalized therapies has increased to overcome deaths associated with cancer. Personalized medicine comes with a handful of challenges, mainly due to the highly diverse genetic background of each cancer cell type. Malignant cells can be highly diverse according to the type of cancer, but also within the same tumor.⁸ Not only genetic heterogeneity is important in personalized medicine, but we also have to take into account the microenvironment in which the cancer cells divide and proliferate. These emerging discoveries in cancer genetic and patient management outcomes have led to clearly affirm that no patients have the same cancer cells within a subtype and thus, patient response to traditional first-line treatments may vary;^{7,9} there's an increasing need for personalized medicine to alleviate cancer burden on society. It is clear that a better understanding of the mutations involved in cancer cell resistance to apoptosis will allow a better clinical management. Thus, in this review, we discuss the main pathways of apoptosis and their regulation in normal cells to better understand the adaptations in cancerous cells. The main mutations in malignancy acquisition are reviewed and the targeted therapies are presented.

2 | THE CASPASE-DEPENDANT APOPTOTIC PATHWAYS

2.1 | Apoptosis activating signals

The nature (e.g., extracellular or intracellular) of the apoptosis-inducing signal determines the pathways that are activated. In general, those signals induce the activation of effector caspases that mediate intracellular signaling, ultimately leading to DNA fragmentation. It is important to note that some signals do not lead to the activation of caspases (the caspase-independent apoptosis pathway).¹⁰ Direct mitochondrial damage can induce the release of AIF and EndoG or HtrA2,¹⁰ which are proteins that directly induce apoptosis through direct

DNA damage or proteolytic breakdown of cytoskeleton.¹¹ In addition, non-caspase proteases, such as calpains, serine proteases, or lysosomal proteases, also mediate cell death by enhancing apoptosis signaling or inducing necrosis.¹² Caspase-independent PARP cleavage was also shown to regulate cell death.¹³ Other non-apoptotic pathways involved in cancer cell clearance following DNA damage induction include autophagy,¹⁴ mitophagy,¹⁵ necrosis, and mitotic catastrophe (MC).¹⁶ DNA damage-mediated autophagy is known to induce the DNA damage response pathway, which leads to subsequent cell cycle arrest and DNA repair pathway regulation.¹⁷ In the case of extensive DNA damage that cannot be repaired, cell death is initiated. As for DNA damage-induced MC, cancer cells undergo cell cycle arrest which leads to different death-associated outcomes depending on the cell cycle phase arrest and the presence or not of DNA repair.¹⁶ Although these non-apoptotic pathways are not covered in this review, it is important to acknowledge their existence and importance in cancer cell death. The caspase dependant pathway has three main sources for the activating signals: (1) extracellular signals that are detected and routed through ligand-specific transmembrane receptors to activate the extrinsic pathway, (2) intracellular stimuli that induce apoptosis through the mitochondria, and (3) intracellular stimuli that induce apoptosis through stress caused in the endoplasmic reticulum (ER).¹⁰ The last two signals lead to the activation of the intrinsic pathway. In this section, we will thoroughly review the sources of these apoptosis-activating signals.

2.1.1 | Activation of the extrinsic pathway through ligand-specific transmembrane receptors

The binding of a ligand to a death receptor is the first step in the extrinsic apoptosis signaling cascade. The most studied death receptors are the receptors belonging to the tumor necrosis factor (TNF) receptor (TNFR) superfamily (TNFRSF) including the TNFR1, the CD95 receptor (CD95/Fas/APO-1/APT), and the two TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) death receptors: TRAIL-R1 (DR4) and TRAIL-R2 (DR5).¹⁸ Table 1 presents a summary of the major transmembrane receptors and their apoptosis-inducing ligands discussed in this review. Each of these death receptors has an importance within the apoptosis process and may even present similarities between them. Here, we discuss the characteristics of the most studied death receptors.

Amongst the TNFRSF, TNFR1 and TNFR2 are the most studied transmembrane receptors. TNFR1 is

TABLE 1 Common apoptosis-inducing death receptors and their ligands

TNFRSF	Ligands	References
TNFR1	<i>Activators</i>	22,23
	TNF- α	
	<i>Inhibitors</i>	24,25,26
	Soluble receptors (e.g., etanercept)	
	Monoclonal antibodies (e.g., adalimumab)	
FasR	<i>Activators</i>	29–33,37
	FasL/CD95L	
	<i>Inhibitors</i>	44–48
	Flavonoid resveratrol	
	ONL1204	
	FAIM1, FAIM2, and FAIM3	
TRAIL-R1/DR4	<i>Activators</i>	49,50,54
	TRAIL/Apo2L	
	<i>Inhibitors</i>	61
	Sodium butyrate (NaBt)	
TRAIL-R2/DR5	<i>Activators</i>	61,62
	TRAIL/Apo2L	
	<i>Inhibitors</i>	61,62
	Sodium butyrate (NaBt)	
	Nelfinavir	

expressed in all cell types, whereas the expression of TNFR2 is limited to immune cells, mesenchymal stem cells, and neural cells (e.g., glial cells).¹⁹ Both receptors contain multiple cysteine-rich domains (CRDs) in their extracellular domain.²⁰ TNFR1 contains a death domain (DD) of 70–80 amino acids²¹ and is involved in apoptosis and chronic inflammation through the interaction with TNF- α .²² On the other end, TNFR2 does not contain a DD, but has a short amino acid motif near its C-terminal domain that allows the recruitment of the adapter protein TRAF2 and its associated proteins as well.²⁰ Due to the lack of a DD, TNFR2 thus lacks an inducible intrinsic cell death activity. It mediates its activity through the NF κ B signaling pathway and through the activation of other multiple kinases.²³ TNF- α is the ligand of both receptors and is expressed in two distinct forms (e.g., transmembrane protein or soluble variant (sTNF) issued from the proteolytic processing of the transmembrane form).²⁰ It was shown that sTNF has more affinity for TNFR1.²⁴ TNFR cell death signaling is thus activated by the binding of sTNF or membrane-bound TNF to the receptor. Antagonists of TNF- α such as soluble receptors (e.g., etanercept) or monoclonal antibodies (e.g., adalimumab) make it possible to neutralize TNF.^{25,26} Bisphenol A (BPA) and nanoparticles (NPs) have been shown to induce the release of TNF and thus induce

apoptosis.²⁷ The study by Crisafulli et al.²⁸ demonstrates that pharmacological, as well as genetic, inhibition of TNF binding to TNFR1 leads to a reduction in the degree of macrophage inflammation caused by LPS and IFN- γ stimulation.

CD95/Fas, DR4, and DR5 are also involved in the induction of apoptosis.²⁹ Their respective ligands, CD95L and TRAIL, are expressed as single-span type II trimeric membrane proteins, but can be cleaved in certain circumstances.³⁰ First, the CD95 receptors are pre-associated homotrimers expressed on the cell surface and contain three extracellular CRD.^{31,32} It was shown that these domains are located on the NH₂-terminal domain and are involved in the oligomerization of CD95.^{32,33} The CRD1 contains the self-association domain (pre-ligand assembly domain [PLAD]), which is shared by the TNFRSF.³² Cell surface CD95 proximity is linked to PLAD.³² Furthermore, it was shown that CD95L is not necessary for apoptosis induction in cells overexpressing the cytoplasmic domain of CD95 or lacking the NH₂-terminal domain (42 amino acids).³³ The binding of its ligand (FasL/CD95L) induces a conformational change allowing the formation of the DISC (further described below).^{34,35} A study conducted by Liu et al.³⁶ using rats showed that in the reperfusion process of myocardial ischemia, FasL induces apoptosis of myocardial cells. Multiple studies have reported the importance of the anti-CD95 antibody (Jo2) in hepatocyte cell death.^{37,38} Hepatocytes are type 2 cells that constitutively express CD95, rendering them sensitive to CD95L-mediated apoptosis. The injection of the agonistic Jo2 anti-CD95 antibody in mice was shown to significantly enhance hepatocyte cell death (e.g., liver toxicity), which is mediated by the activation of NK cells.^{39,40} It is important to note that the injection of physiological soluble CD95L does not induce toxicity, due to posttranslational modifications of the ligand.^{41–43} Many inhibitory molecules or modulators of CD95/Fas have also been reported in the literature. It was shown that resveratrol modulates FasL/Fas-mediated apoptosis.⁴⁴ ONL1204, a new derivative of Met12, was shown to be a small peptide inhibitor of Fas.⁴⁵ It was shown that Met12 inhibits caspase-8 activation following Fas-induced apoptosis in 661W cells.⁴⁶ Similarly, ONL1204 blocks membrane FasL-induced apoptosis and its subsequent signaling pathway.⁴⁵ Both molecules are actual derivatives of Met, a receptor tyrosine kinase whose ligand is hepatocyte growth factor (HGF). Met was shown to directly bind to Fas in hepatocytes and induce its sequestration, therefore inhibiting FasL-induced apoptosis.⁴⁷ Derivates of Met are thus of interest due to their ability to inhibit Fas-induced apoptosis. The Fas inhibitor molecule (FAIM)1, FAIM2, and FAIM3 have also shown to inhibit Fas-induced cell death.⁴⁸ On

the other hand, TRAIL-R's are also expressed on cell surface, but they consist of five different receptor subtypes. The study by Staniek et al.⁴⁹ provided an analysis of the signaling capacity and induction of TRAIL-R-induced apoptosis in primary human B cells. TRAIL-R's that contain a DD, such as TRAIL-R1 (DR4)⁵⁰ and TRAIL-R2 (DR5) can induce apoptosis in cancer cells.⁵¹ TRAIL-R's without a DD, such as TRAIL-R3, TRAIL-R4, and osteoprotegerin (OPG), do not induce apoptosis.^{52,53} DR4 and DR5 have in their extracellular parts 2–4 similar CRDs and are type I membrane proteins.⁵⁴ Their DDs are composed of about 70 amino acids in the cytoplasmic part.⁵⁵ The trimeric bond will allow the intracellular DD structure of the DRs to be modified and thus the FADD bond will be formed.⁵⁶ The ligand of TRAIL-R (TRAIL) also belongs to the TNFSF and consists of 282 amino acids.⁵⁷ TRAIL is expressed in NK cells, B cells, monocytes, and dendritic cells,⁵⁸ and was shown to only activate extrinsic apoptosis in cancer cells.⁵⁹ Modulators of TRAIL-R include dulanermin, an apoptosis-inducing agent. It is an optimized form of the endogenous Apo2 ligand and can therefore bind to the DR4 and DR5 receptors.⁶⁰ Other modulators are Nabt and nelfinavir, which result in higher expression of membrane death receptors (DR4/5).^{61,62}

2.1.2 | Activation of the intrinsic apoptosis pathway through the mitochondria

The intrinsic apoptosis pathway through mitochondrial damage is activated by a large number of endogenous or exogenous stimuli that can induce multiple bicellular damages such as DNA damage, oxidative stress, and a rise in intracellular Ca^{2+} concentrations.^{1,10,63} The activation of this pathway involves the activation or inhibition of proteins from the B-cell lymphoma 2 (Bcl-2) family. This step will be discussed below. In oncology, multiple drugs are known to induce apoptosis of cancerous cells through this mechanism. Sorafenib, a small molecule *Raf* kinase inhibitor used in the treatment of solid tumors, induces the apoptosis of acute myeloid leukemias (AMLs) through the upregulation of BIM, an activator of the intrinsic pathway, and the downregulation of Mcl-1, an anti-apoptotic protein,⁶⁴ both members of the Bcl-2 protein superfamily. Synthetic silicon dioxide nanoparticles (SiNPs), used mainly in drug delivery and gene therapy, have shown to induce oxidative stress and mitochondrial damage.⁶⁵ Essential oils of *Cymbopogon citratus* induce the activation of the intrinsic pathway through the loss of the mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$).⁶⁶ In fact, an increase in reactive oxygen species (ROS) leads to the loss of $\Delta\psi_m$.⁶⁷

Every synthetic or natural molecule that can alter the redox balance of cells can thus induce the intrinsic apoptotic pathway through mitochondrial activation.

2.1.3 | Activation of the intrinsic apoptosis pathway through the endoplasmic reticulum stress

ER stress is mainly caused by misfolded proteins that accumulate in the ER compartment of normal cells.¹⁰ The ER is the site for protein folding, lipid, and sterol synthesis as well as storage for free calcium. The highest levels of intracellular calcium are in fact found in the ER. Upon a pathological stress on the ER, the level of mutated proteins rises in the compartment, which results in an imbalance between the capacity of the ER to fold proteins and the demand for protein folding.⁶⁸ This phenomenon induces an ER stress that is sensed and transduced by the unfolded protein response (UPR). The protein kinase RNA-like ER kinase (PERK), inositol-requiring protein 1 (IRE1a), and the activating transcription factor 6 (ATF6) are activated when the levels of misfolded proteins reach a critical concentration.¹⁰ Apoptosis is induced through the activation of Bax and Bak, two main proapoptotic proteins, by their association with IRE1.¹⁰ These steps involved in the pathway activation will be discussed down below. In clinical oncology, many natural compounds are known to modulate cancer cell apoptosis through the ER stress pathway.⁶⁹ Thapsigargin (TG), extracted from plants and known as an ER stress inducer, has shown to induce apoptosis through caspase-3 activation in the myeloma cell line 12-PE.⁷⁰ DOT1L inhibition significantly suppresses ER stress pathway genes in sensitive multiple myeloma (MM) cells that undergo cell death.⁷¹ The regulation of the UPR pathway could thus be a novel approach for cancer management by favoring the accumulation of unfolded proteins in cancer cells.^{72,73}

2.2 | Cell signaling pathways

There are two main death signaling channels: the extrinsic and the intrinsic apoptotic pathways. The choice of the apoptotic pathway activated upon cell death-triggering signals depends on cell types and the nature of the stimuli. For example, type I cells are more likely to undergo the extrinsic apoptotic pathway, whereas type II cells require amplification to perform the intrinsic apoptotic pathway.⁷⁴ These specificities are due to biomolecular differences in both cell types. There is a high level of DISC and caspase-8 activation with Fas

stimulation in type I cells, which causes the activation of effector caspases-3 and -7 of the extrinsic pathway.⁷⁴ On the other hand, type II cells show low levels of DISC formation and their apoptotic signals are amplified by the release of cytochrome C from mitochondria through the intrinsic pathway.⁷⁴ The release of cytochrome C from the mitochondria leads to the formation of the apoptosome, resulting in the activation of the caspase-9.⁷⁵ In this section, we review the caspase-dependant apoptosis signaling pathways (Figure 1) in detail.

2.2.1 | The extrinsic apoptotic pathway

The extrinsic pathway is initiated by the binding of the DR's to their respective ligands. The binding of the receptor to the ligand leads to the oligomerization of the receptor and then attracts the adapter DD protein. Cell

signaling in the extrinsic apoptotic pathway is ligand-specific. In fact, the recruited adapter DD proteins are specific to the ligand: each ligand induces the recruitment of an adapter DD protein associated with him. Thus, either the Fas-associated DD (FADD) or TNFR-associated DD (TRADD) proteins are recruited to the cell membrane.⁷⁶ Following the binding of FasL with Fas and the oligomerization of the receptor, FADD is recruited to the cell membrane at the DD sequence of the receptor.²¹ FADD recruits the procaspase-8 (also known as FLICE) through its dimerization, leading to the formation of the death-inducing signaling complex (DISC).⁷⁷ Once the DISC is fully formed, the procaspase-8 is activated by its autolytic cleavage and forms the caspase-8, which initiates the apoptotic signaling pathway by directly cleaving the procaspase-3 into its active form.⁷⁸ Caspase-8 contains the death effector domain (DED).⁷⁹ The activation of caspase-8 requires the formation of specific

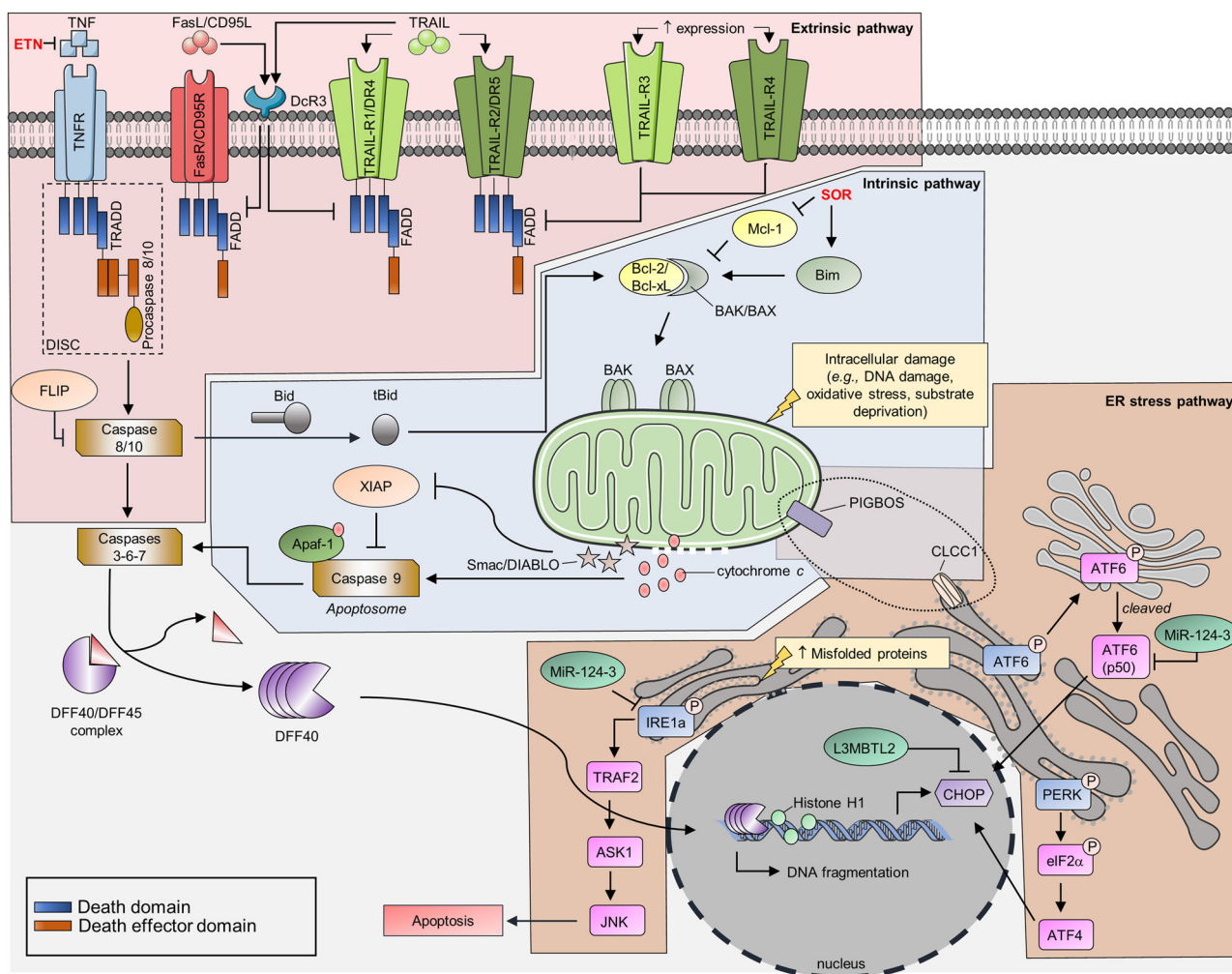


FIGURE 1 Illustration of the main caspase-dependent apoptotic pathways and their regulators. The extrinsic (pink box), intrinsic (blue box), and endoplasmic reticulum (ER) stress (orange box) pathways are represented. Mechanisms of actions of drugs are represented in red. ETN, etanercept; SOR, sorafenib

oligomeric structures, called DED filaments.⁸⁰ The formation of DED filaments is achieved through the interaction of FADD's DEDs with the DEDs of procaspase-8, procaspase-10, and cellular FLICE-inhibitory protein (c-FLIP).⁸¹ The induction of the cascade of caspases is the result of the dimerization and activation of the procaspase-8 at the DED filament.⁸² However, the activation of procaspase-8 would not be possible without the tandem DEDs (tDEDs), which allow several monomers of procaspase-8 to be brought together.⁸³ The direct activation of caspase-3 and caspase-7 by caspase-8 is the key step for the ultimate destruction of the genome.²¹ Caspase-3 is responsible for the cleavage of the DNA fragmentation factor 45/inhibitor of caspase-activated DNase (DFF45/ICAD), which switches on the endonuclease activity of the DNA fragmentation factor 40/caspase-activated DNase (DFF40/CAD).⁸⁴ This final step leads to the internucleosomal fragmentation of the DNA. Overall, throughout the extrinsic apoptotic pathway, two groups of caspases participate in cell signaling: (1) apoptosis-initiating caspases, known as group II caspases (e.g., caspases-2 [Nedd2/ICH-1], -8 [FLICE/MACH/Mch5], -9 [ICE-LAP6/Mch6], and -10 [Mch4]) or (2) effector caspases of apoptosis, known as group III caspases (e.g., caspases-3 [Yama/ CPP32/apopain], -6 [Mch2], and -7 [ICE-LAP3/Mch3/CMH-1]).⁸⁵ Group III caspases do not have DED or caspase recruitment domains (CARDs). On the contrary, group II caspases have one of the two domains according to their precise roles.⁸⁶

2.2.2 | The intrinsic apoptotic pathway

The intrinsic apoptotic pathway can be activated by signals that directly regulate the Bcl-2 family proteins or through a crosstalk with the extrinsic apoptotic pathway.^{21,87} The key member of the Bcl-2 family involved in the crosstalk between those two pathways is Bid, a BH3-only interacting protein.^{88,89} Following the activation of the FasL/Fas apoptotic pathway, caspase-8 induces the cleavage of Bid into t-Bid, which allows its translocation from the cytoplasm to the membrane compartments of mitochondria.⁸⁸ This is due to its higher affinity to Bcl-xL, a member of the Bcl-2 family protein.⁸⁸ The activation of t-Bid leads to the mitochondrial membrane permeabilization by Bax or Bak through pore formation.²¹ The binding of the BH3-only protein to Bax induces conformational changes and its subsequent translocation to the mitochondria and oligomerization.⁹⁰ Active Bak and Bax proteins form pores in the mitochondrial membrane allowing the leak of its content. It was shown in Cos-7 cells that $\Delta\psi_m$ loss precedes Bax association with the mitochondria

following staurosporine (STS)-induced apoptosis.⁹¹ The activation of the intrinsic pathway through the regulation of Bcl-2 family proteins is discussed further below. Both pathways lead to the release of cytochrome C and second mitochondria-derived activator of caspases (Smac/DIABLO) from the mitochondria. Cytosolic cytochrome C binds to the Apaf-1 protein, which further recruits procaspase-9 to form the apoptosome.²¹ The apoptosome is a heptameric structure where Apaf-1 directly interacts with three or four procaspase-9 molecules via CARD-CARD interactions.⁹² Procaspase-9 molecules form homodimers or heterodimers in the apoptosome.⁹² This specific tridimensional conformation induces the cleavage of procaspase-9 to its active form, the caspase-9, which in its turn activates caspase-3/7 by procaspase-3/7 cleavage.²¹ On the other hand, Smac was shown to inhibit inhibitor of apoptosis proteins (IAPs), mainly XIAP, allowing further caspase activation.⁹³ Overall, caspase-9 and t-Bid are the two main molecules that allow a link between the extrinsic and intrinsic apoptotic pathways. The subsequent steps following caspase-9 activation are similar to those in the extrinsic apoptotic pathway: both pathways have converged.

2.2.3 | The endoplasmic reticulum stress pathway

When the ER is subject to stress, the organelle cannot execute its proper function, leading to the accumulation of unfolded proteins in its intracellular compartment. The rise in the concentration of unfolded proteins is detected by specific membrane-associated sensors that activate the UPR. As mentioned above, three main sensors are involved in this pathway: PERK, IRE1, and ATF6. Here we will briefly have an overview of the three pathways, that were thoroughly reviewed by Kadowaki and Nishitoh.⁹⁴ Under physiological conditions, PERK, IRE1, and ATF6 are in a dimeric complex with the immunoglobulin-binding protein (BiP/GRP78).⁹⁴ Following the accumulation of misfolded proteins, BiP, the chaperone molecule, dissociates from the molecules leading to pathway activation. PERK, a type I transmembrane protein, possesses a serine/threonine kinase activity in its C-terminal cytosolic domain.⁹⁴ It senses the accumulation of unfolded proteins through its N-terminal domain.⁹⁴ Following the ER stress, the transcription of proapoptotic factors (e.g., C/EBP homologous protein [CHOP]) is activated by the PERK-eIF2 α -ATF4 pathway.⁹⁴ A large number of proapoptotic proteins are under the regulation of CHOP, such as DR5, and two BH3-only proteins of Bcl-2 family, namely Bim

(binding to microtubule) and PUMA (p53 upregulated modulator of apoptosis).⁹⁴ The functions of these molecules are discussed below. The activation of these factors leads to apoptosis. The signaling pathway of IRE1 is pretty similar to that of PERK. The prolonged ER stress activates the IRE1-TRAF2-ASK1 pathway.⁹⁴ This pathway leads to the activation of the JNK/p38 pathway that triggers apoptosis through Bak/Bax enhanced transcription.⁹⁴ Finally, the interaction of ATF6 with misfolded proteins induces its translocation from the ER to the Golgi, where it's processed and releases an N-terminal cytosolic domain.⁹⁴ The N-terminal domain is then translocated to the nucleus to induce UPR target genes (e.g., chaperones, X-box binding protein 1 [XBP1]).⁹⁴ Overall, the activation of the UPR pathways in the ER increases protein folding, upregulates proteolysis of unfolded proteins, and downregulates protein expression.⁹⁵ Overactivation of these pathways without a return to cell homeostasis will ultimately lead to cell apoptosis through an imbalance between pro- and anti-apoptotic Bcl-2 family proteins.^{95,96}

3 | MECHANISMS OF REGULATION OF APOPTOSIS

3.1 | The extrinsic pathway is regulated upon many levels

3.1.1 | Cell death receptor regulations

Apoptosis can be regulated in several ways (see Table 2). The first level of regulation relies on tissue- and cell-specific expression of DRs. A variation in DR expression within the same cell has also been noted.^{21,97} Second, decoy receptors (DcRs) have a huge role in apoptosis regulation. TRAIL-R3 and -4 are considered as decoy receptors and thus inhibit apoptosis.^{98,99} The overexpression of TRAIL-R3 or TRAIL-R4 effectively inhibits apoptosis mediated by TRAIL-R1 or TRAIL-R2.⁹⁹ Since TRAIL3 and TRAIL4 are incorporated into signaling complexes, they can interfere by reducing or preventing signaling.⁹⁸ Many examples of DcRs exist in the literature. For example, one of the most studied DcR is the DcR3. DcR3, a member of the TNFRSF, is an antiapoptotic and pro-metastases factor.¹⁰⁰ It can competitively bind to FasL, TL1A (TNF-like cytokine 1A), and LIGHT, due to its similar sequence with OPG, TNF2, and Fas, and inhibit apoptosis and induce angiogenesis.¹⁰¹ The DcR IL-1RII is a glycoprotein of 60 kDa and is expressed on monocytes, neutrophils, and B lymphocytes.¹⁰² Its role is to inhibit signal transfer into the intracellular compartment.¹⁰² Furthermore, glycoproteins play an important role in apoptosis modulation. In fact,

the sensitivity to apoptosis induction of CD95 and TRAIL-R is due to their glycosylated structures, which modulates their sensitivity to apoptosis induction.¹⁰³ Galectins, by interacting with DRs and cell surface glycoproteins, can regulate apoptosis. N-glycosylation is required for the adjustment of CD95L/CD95L interactions, but is not required for the linkage from CD95L to CD95.¹⁰⁴

3.1.2 | Regulation of the molecular signaling partners

The main regulation point of the extrinsic pathway is through caspases. First, caspase inhibitors such as p35, cytokine response modifier A (CrmA), and the IAPs play an important role in caspase activation.¹⁰⁵ The p35 protein prevents caspase activity by binding to protease target enzymes.¹⁰⁶ In the presence of active caspases, an intramolecular cleavage is performed at specific caspase sites by p35, which prevents its dissociation from caspases.¹⁰⁷ CrmA is the only member of the serine family that can inhibit the action of cysteine proteases, such as caspases, and serine proteases.¹⁰⁸ CrmA is the first identified caspase inhibitor and works by inhibiting caspase-1.¹⁰⁹ The inhibition of caspase-1 prevents the secretion of interleukin (IL)-1 β and IL-18.¹⁰⁹ CrmA also inhibits caspase-8 and caspase-10.¹⁰⁹ The inhibition of caspases occurs by the binding of CrmA directly to the catalytic site of the protease.¹⁰⁹ Eight human IAPs are known to control caspases: X-linked IAPs (XIAP), cIAP1, cIAP2, ML-IAP, NAIP, ILP2, survivin, and Bruce.¹¹⁰ However, only XIAP can directly inhibit caspases, whereas cIAP only prevents the formation of proapoptotic signaling complexes in the extrinsic apoptotic pathway.¹¹¹ XIAP contains three baculoviral IAP repeats (BIR) and contains an associated ubiquitin domain.¹¹² The BIR domain serves as a protein-protein interaction domain for the direct binding and inhibition of caspases-3, -7, and -9.¹¹³ The BIR3 domain inhibits caspase-9 and the binding region between the BIR1 and BIR2 domains is responsible for the inhibition of caspase-3 and -7.¹¹⁴ The ubiquitin-associated domain (UBA) allows the binding of poly-ubiquitin conjugates and the ring domain is necessary for the E3-ligase activity which promotes the degradation of proapoptotic proteins (SMAC and ARTS), on which the regulation of apoptosis essentially depends.^{115,116} As mentioned above, there are two main cell types in Fas-induced apoptosis, which are type 1 (e.g., lymphocytes) and type 2 (e.g. hepatocytes, pancreatic β -cells) cells. It was shown that XIAP can discriminate between type I and type II Fas-induced apoptosis.¹¹⁷ In thymocytes, Fas stimulation by its ligand rapidly abolishes XIAP levels, whereas in hepatocytes, treatment

TABLE 2 Regulators of the caspase-dependent apoptotic pathways

Regulators	Function(s)	References
<i>The extrinsic pathway</i>		
Soluble TNF- α receptors (e.g., etanercept)	Binds and neutralizes TNF- α , inhibiting the activation of TNFR.	25,26
Anti-TNF- α monoclonal antibodies (e.g., adalimumab)	Binds and neutralizes TNF- α , inhibiting the activation of TNFR.	25
TNF- α enhancing agents (e.g., Bisphenol A, nanoparticles)	Enhances the release of TNF- α induces apoptosis through TNFR signaling.	27
TRAIL-R3	Inhibits apoptosis mediated by TRAIL-R1/DR4.	99
TRAIL-R4	Inhibits apoptosis mediated by TRAIL-R2/DR5 by reducing or preventing signaling.	98,99
Decoy receptor 3	Competitively binds to FasL and TRAIL and inhibits apoptosis.	100,101
Decoy receptor IL-1RII	Inhibits apoptosis by impairing intracellular cell signaling.	102
p35 protein	Prevents caspase activity by binding to protease target enzymes.	105,106
CrmA	Inhibits the action of cysteine proteases (caspases) and serine proteases.	105,108
XIAP	Directly inhibits caspases-3, -7, and -9.	113,114
c-IAP	Prevents the formation of proapoptotic signaling complexes.	110,111
c-FLIP L	Antiapoptotic function at high concentrations. Inhibits procaspase-8 activation.	118,119
c-FLIP S	Inhibits procaspase-8 activation.	81,118
DFF45/ICAD	Inhibits DFF40/CAD activation, which is responsible for DNA fragmentation.	124
Histone H1	Stimulates DNA cleavage and activates DFF40/CAD through its C-terminal domain.	124
<i>The intrinsic pathway</i>		
Bcl-2	Inhibits the activation and oligomerization of Bax/Bak.	127
Bcl-xL	Directly interacts and inhibits Bax/Bak. Continuously retranslocates Bax from the mitochondria to the cytosol.	127 130
Bfl-1/A1	Binds and inhibits Bax/Bak, with a preferential binding for Bax. Binds BH-3-only proteins and inhibits Bax/Bak activation. Continuously retranslocates Bax from the mitochondria to the cytosol. Binds and inhibits cBid and Bax.	132,133 131
Mcl-1	Binds BH-3-only proteins and inhibits Bax/Bak activation.	134
Bim	Induces direct activation of Bax/Bak.	128,134
Noxa	Neutralizes Mcl-1, facilitating Bax/Bak activation.	128,134
PUMA	Induces direct activation of Bax/Bak.	128,134
Smac	Neutralizes IAPs (mainly XIAP), allowing caspase activation.	93
<i>The ER stress pathway</i>		
PIGBOS	Regulates the activation of the UPR pathways by interacting with the CLCC1 channel in the ER.	95
L3MBTL2	Directly suppresses CHOP transcription.	139
MiR-124-3	Suppresses CHOP transcription by neutralizing IRE1 α , XBP1s, and active ATF6.	139

increases XIAP levels.¹¹⁷ In BID/XIAP double-deficient hepatocytes of mice, FasL treatment induces cell death, which can be prevented by pretreatment with a caspase inhibitor.¹¹⁷ Another major regulator of caspase activation is c-FLIP. The c-FLIP proteins regulate the activation of procaspase-8a/b.¹¹⁸ This regulation is located on the DED filaments. There are 3 c-FLIP isoforms: c-FLIP L (Long), c-FLIP S (Short), and c-FLIP R (Raji).¹¹⁸ c-FLIP L has a proapoptotic function at an intermediate concentration by forming catalytically active procaspase-8/c-FLIP L heterodimers and stabilizing the active center of procaspase-8.¹¹⁹ Thus, caspase-8 will be active after sufficient heterodimer formation. However, c-FLIP L has an antiapoptotic function in high concentrations as do the short isoforms c-FLIP, c-FLIP S, and c-FLIP R.⁸¹ Finally, regulations in the final step of apoptosis can also occur. The nuclease activity of DFF40/CAD can be activated by specific chromosomal proteins, such as the histone H1, the HMG-box-containing chromatin proteins (HMGB) 1 and 2, and topoisomerase II (TOP2). Histone H1, HMGB-1/2, and the TOP2 enable the DFF to be activated by trapping DNA supercoils and cross-breeds, which induces DNA conformations that partially mimic nucleosomal DNA wrapping.¹²⁰ A study on histone H1 somatic cells showed that histone H1 stimulates DNA cleavage and that its C-terminal domain (CTD) is responsible for the activation of DFF40/CAD.¹²¹ The binding of the HMGB 1/2 proteins makes the substrate more accessible to cleavage by the DFF40/CAD nuclease according to data shown in one study.¹²² Finally, TOP2 allows the condensation and segregation of chromosomes.¹²³ DFF45/ICAD and DFF35/ICAD-S also have the ability to inhibit activated DFF40/CAD homo-oligomers. DFF45 also has a role of chaperone molecule where it allows the proper folding of newly synthesized DFF40.¹²⁴

3.2 | Regulation of the intrinsic pathway through the Bcl-2 superfamily proteins

The intrinsic apoptosis pathway is regulated through the Bcl-2 superfamily proteins that mainly control mitochondrial outer membrane permeabilization (MOMP). The Bcl-2 family proteins can be divided into three groups: (1) the antiapoptotic proteins (e.g., Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-W, Mcl-1, and Bfl-1/A1), (2) the proapoptotic pore-forming proteins (e.g., Bak, Bax, and Bok), and finally the (3) proapoptotic BH3-only proteins, that can be divided into activator proteins (e.g., Bid, Bim, NOXA, and PUMA) or sensitizer proteins (e.g., Bad, NOXA).^{125,126}

First, the interaction between the Bcl-2 family proteins is regulated through their BH3 domains. The

antiapoptotic proteins perform their function through the mitochondrial membrane, the nuclear envelope, and the ER to prevent the activation of the proapoptotic proteins.¹²⁷ All members of the antiapoptotic subfamily (e.g., Bcl-2, Mcl-1, Bcl-xL, and Bcl-W) contain four BH domains and a C-terminal hydrophobic domain.¹²⁷ The BH1 to BH3 domains form the hydrophobic groove, known to interact with BH3-only proteins, whereas the BH4 domain is involved in structure stabilization.¹²⁷ BH3-only proteins consist of Bcl-2 family proteins that possess only the BH3 motif of 100–200 amino acids.¹²⁸ Their role is to either promote the direct activation of Bax and Bak (e.g., Bid, BIM, and PUMA) or inhibit the role of the antiapoptotic Bcl-2 proteins through their BH3-containing helix and the hydrophobic groove of the substrate.¹²⁸ Under nonapoptotic conditions, the Bcl-2 antiapoptotic subfamily is linked to BH3-only proteins through their BH1–BH3 groove, inhibiting the activation of proapoptotic proteins. The Bcl-2 protein inhibits the activation and oligomerization of Bax/Bak and is also known to directly bind and inhibit Bax.¹²⁷ It also directly stops the release of the cytochrome c in the cytoplasm, therefore inhibiting the formation of the apoptosome.¹²⁷ Like the Bcl-2 protein, Bcl-xL also directly interacts with Bax and Bak to prevent MOMP.¹²⁷ It is important to note that Bcl-xL is the antiapoptotic long isoform of Bcl-x.¹²⁹ It was shown that alternative splicing of Bcl-x also produces a short isoform, known as Bcl-xS, which has a proapoptotic function.¹²⁹ To prevent Bax activation, it was recently shown that Bcl-xL¹³⁰ and Bfl-1/A1¹³¹ continuously retranslocates Bax from the mitochondria to the cytosol. Bfl-1/A1 has also the ability to form stable complexes with cBid and Bax, with a stronger binding affinity with cBid, and inhibit apoptosis.¹³¹ On the other hand, Bcl-W binds with Bak and Bax, with a preferential binding for Bax.¹³² It can also bind with numerous BH3-only proteins, like Mcl-1 and Bcl-2, to inhibit apoptosis.^{133,134} Alternative splicing of Mcl-1 produces 3 distinct isoforms (Mcl-1L, Mcl-1S, Mcl-1ES), where the long isoform (Mcl-1L) is known for its antiapoptotic function and is commonly referred to as Mcl-1.¹³⁵ Mcl-1 can localize to cell membranes, especially to the mitochondrial outer membrane.¹³⁴ As for the two other isoforms, they mainly display proapoptotic functions. Mcl-1S can dimerize with Mcl-1L, thus inhibiting its antiapoptotic function, whereas Mcl-1ES is known to induce mitochondrial cell death, independently of Bak or Bax.¹³⁴ Bak and Bax are the proapoptotic proteins that also consist of four BH domains.¹³⁶ The main difference between Bak and Bax is their localization in normal cells. Prior to its activation, Bax is mainly located in the cytoplasm, whereas Bak is located in the mitochondrial membrane.¹²⁷ Phosphorylation of Bad inactivates its

tumor suppressor function.¹³⁷ Under apoptotic conditions (e.g., DNA damage, Bcl-2 inhibitors), the BH3-only proteins are released, subsequently activating the proapoptotic proteins through the hydrophobic groove interaction.¹³⁶ The molecular mechanisms involved in the activation of Bax and Bak have thoroughly been described by Westphal et al.¹³⁶ The hallmark of proapoptotic activation is the translocation of Bax to the MOM and its subsequent conformation change to allow homo-oligomerization. The relation between the different Bcl-2 family proteins under apoptotic and normal conditions is presented in Figure 2.

3.3 | Regulation of the endoplasmic reticulum stress pathway

As the other two caspase-dependent pathways, the ER stress pathway has its own regulatory mechanisms. First, levels of BiP are highly regulated by oligomer

formation, Posttranslational modifications, and the induction of the UPR in the ER.¹³⁸ The PIGB opposite strand 1 (PIGBOS) microprotein, a mitochondrial outer membrane protein, was shown to interact with the chloride channel CLIC-like 1 (CLCC1) protein in the ER.⁹⁵ An abolition in the expression of PIGBOS leads to increase sensitivity to UPR activators such as TG and Brefeldin A (BFA).⁹⁵ In fact, there is an increase in the levels of target UPR genes, that lead to apoptosis through caspase-3 activation and PARP cleavage.⁹⁵ On the other hand, overexpression of PIGBOS in HEK293 cells lowers UPR activation levels.⁹⁵ A recent study, using the CRISPR-based loss of function genetic screening tool, discovered numerous suppressors of the ER stress pathway, such as a polycomb protein complex (lethal(3)malignant brain tumor-like 2 (L3MBTL2)) and a microRNA targeted toward IRE1 (MiR-124-3).¹³⁹ L3MBTL2 eases ER stress-induced apoptosis in HEK293T cells by suppressing CHOP expression.¹³⁹ MiR-124-3 also suppresses CHOP expression by directly

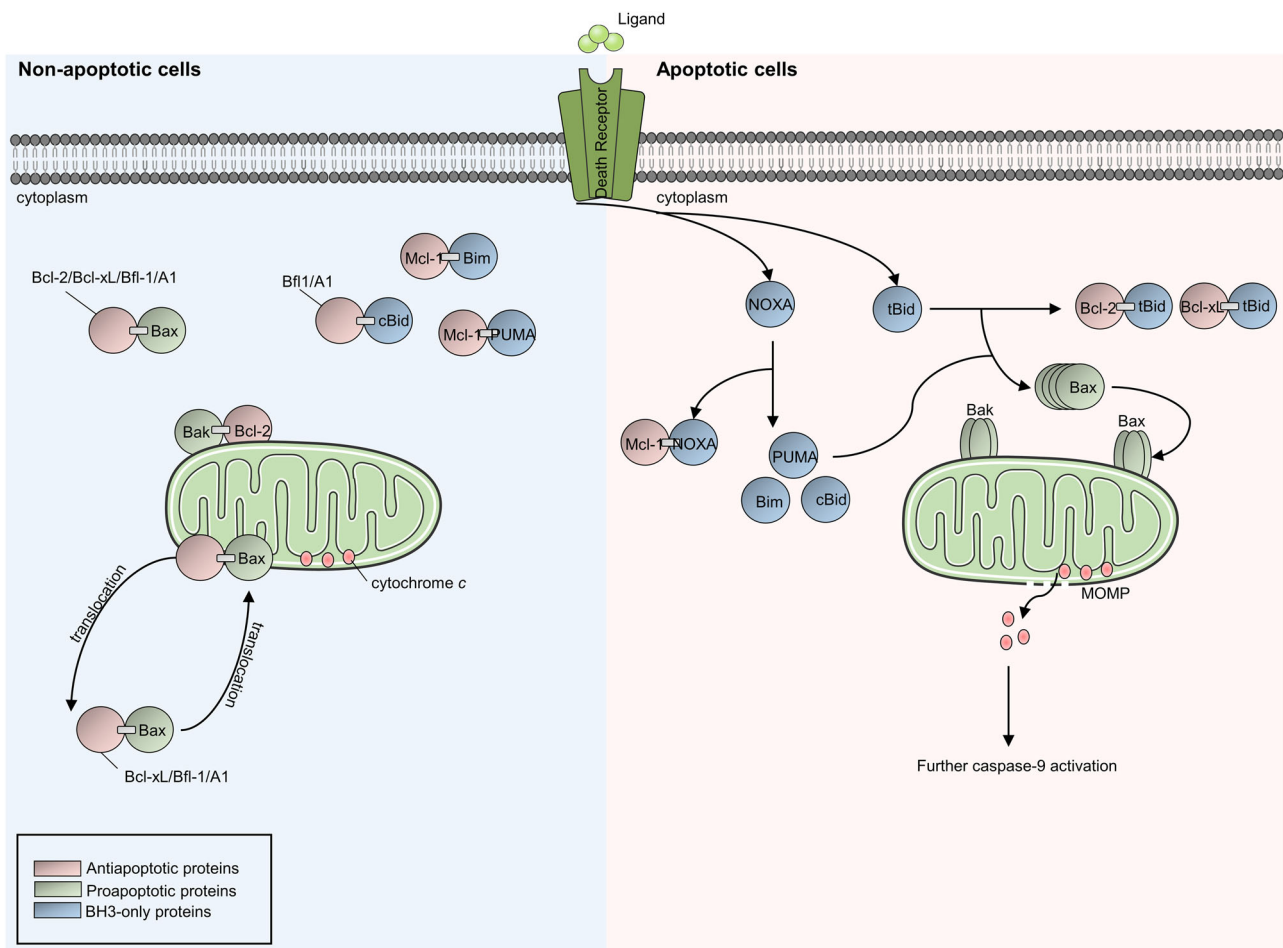


FIGURE 2 Representation of the cell signaling network between BH3-only proteins during apoptosis. Molecular interactions of Bcl-2 family proteins in non-apoptotic and apoptotic cells. Antiapoptotic proteins are represented in pink, proapoptotic proteins in green, and BH3-only proteins in blue

targeting IRE1, by diminishing the protein expression levels of IRE1 α , spliced XBP1 (XBP1s), and active ATF6.¹³⁹

4 | MUTATIONS IN THE CASPASE-DEPENDANT APOPTOSIS PATHWAYS THAT LEAD TO TUMORIGENESIS

Deregulation of apoptosis can lead to different types of diseases such as autoimmune diseases, neurodegenerative diseases, bacterial and viral diseases, heart disease, or cancer.¹⁴⁰ Many literature reviews have reported in the past mutations in the apoptosis pathway that lead to cancer and favors cell resistance to apoptosis.^{141–143} Although, the mechanisms underlying cancer cell resistance to apoptosis are continuously investigated and new data found. It is important to know the main mutations and adaptations in cancer cells to provide a better clinical management and personalized treatment plan to patients. Here, we review the main mutations found in cancers and a large summary is reported in Table 3.

4.1 | Mutations in the extrinsic apoptotic pathway

4.1.1 | Mutations involved upstream caspase activation that lead to cancer

Mutations involving the DRs have been reported in cancers. In small cell lung carcinoma (SCLC) cell lines no surface DRs are detected.¹⁴⁴ Mutations and post-translational modulations in CD95-mediated cell death in cancer cells have been thoroughly described in the literature.¹⁴⁵ Numerous germinal and somatic mutations in the APT-1 gene, encoding for CD95, have been reported,¹⁴⁵ leading to the autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS). ALPS often results from heterozygous dominant germline FAS or heterozygous somatic FAS mutations (10%–15% of ALPS-FAS cases).¹⁴⁶ Homozygous germline mutations are more rare.¹⁴⁶ ALPS caused by FAS/TNFRSF6 deficiency (ALPS-FAS) leads to a disruption of apoptotic signaling via the Fas DR pathway, which mainly compromises lymphocyte homeostasis.¹⁴⁷ Posttranslational modifications in the cytoplasmic portion of CD95, such as oxidations or covalent binding of palmitic acid, have also been linked to malignancy.¹⁴⁵ Furthermore, mutations on the human chromosome 11q13.3, which is the locus containing the FADD gene, are frequently observed in human malignancies.¹⁴⁸ This mutation prevents the transmission of

apoptotic signals via FADD with DR.¹⁴⁹ For example, lymphoepithelioma-like hepatocellular carcinoma (LEL-HCC) is characterized by marked focal amplification of chromosome 11q13.3.¹⁵⁰ In vivo and in vitro studies conducted by Zhang et al. demonstrated that the amplification of miR-548k located in amplicon 11q13.3 promoted lymphangiogenesis and lymphatic metastasis.¹⁵¹

4.1.2 | Mutations in caspases and nucleases are largely involved in cancer therapy chemoresistance

Mutations involving caspases in cancer therapy chemoresistance have been widely reported in the past.¹⁴³ Caspase-8 mutations are mainly detected in gastric cancers.¹⁵² The Q482H mutation of procaspase-8 abolishes apoptosis by causing dimerization attenuation of the protein monomers of procaspase-8, leading to resistance to chemotherapy.¹⁵³ Mutations in the caspase-8 gene mainly involve in-frame deletions, substitutions, and insertions of amino acids.¹⁴³ A deletion of the procaspase-8 protein was also noted in SCLC.¹⁴⁴ Although the majority of studies report a downregulation of caspase-8 in cancer cells, a few studies have reported the link between caspase-8 overexpression and oncogenesis. Caspase-8 overexpression was reported in glioblastomas.¹⁵⁴ It was shown that caspase-8 promotes tumor growth and angiogenesis through cytokine and growth factor secretion in glioblastomas.¹⁵⁵ Its overexpression was also shown to favor neoplastic transformation and upregulate cell proliferation.¹⁵⁶ Initially studied in neuroblastoma tissues with no evidence of somatic mutations, genomic DNA isolation by Soung et al. from normal and tumor tissues revealed silent mutations of caspase-9 splice sites in two colorectal carcinomas and one gastric carcinoma.^{157,158} Park et al.¹⁵⁹ further looked into caspase-9 mutations in a case-control study in lung cancer patients and found that certain genotypes (–21263 GG) had significantly decreased risk of lung cancer. Soung et al.¹⁶⁰ also studied the caspase-3 somatic mutation in several cancers. Silent and missense mutations were found in stomach adenocarcinoma, lung cancer, colon cancer, hepatocellular carcinoma, and multiple myeloma. Chen et al. looked at caspase-3 mutations in squamous cell carcinoma of the head and neck (SCCHN), one of the most common cancers in the world, in a case-control study with 1863 patients (Chen et al.¹⁶¹). They found that the caspase-3 rs4647601:TT genotype was associated with an increased risk of SCCHN (Chen et al.¹⁶¹). Caspase-7 polymorphisms were seen in colon adenocarcinoma, oesophageal squamous cell carcinoma, and laryngeal squamous cell carcinoma.¹⁶² The authors concluded that the alteration

TABLE 3 Known mutations of the caspase-dependent apoptotic pathways leading to cancer cell resistance

Gene	Mutations	Outcome	Cancers	References
<i>The extrinsic pathway</i>				
FasR/TNFRSF6	Deletion	Disruption of the Fas signaling death receptor pathway	Autoimmune lymphoproliferative syndrome	146,147
CD95	Somatic and germinal mutations; Posttranslational modifications			145
FADD	11q13.3 amplification	Inhibition of intracellular signal transmission	Lymphoepithelioma-like hepatocellular carcinoma	150,151
Procaspase-8	Q482H mutation	Inhibition of dimerization leading to diminished caspase-8 activation	Gastric cancers	144,152,153
	Deletion	Impaired activation of the extrinsic apoptotic pathways	Small cell lung carcinomas	
Caspase-8	Overexpression	Enhanced cell proliferation	Glioblastomas	154–156
		Angiogenesis		
Procaspase-9	Silent mutations in splice sites	Impaired activity	Gastric cancers	157,158
	–21263 GG Genotype	Enhances cancer cell sensitivity to apoptosis	Lung cancer	159
Procaspase-3	Silent and missense mutations	Impaired activity	Stomach adenocarcinoma, lung cancer, colon cancer, hepatocellular carcinoma, and multiple myeloma	162
	rs4647601:TT genotype	Decreases cancer cell sensitivity to apoptosis	Squamous cell carcinoma of the head and neck	161
Procaspase-7	Nonsense mutation	Diminished caspase activity	Colon adenocarcinoma, esophageal squamous cell carcinoma, and laryngeal squamous cell carcinoma	162
DFP40	Hemizygous deletions of 1p36	Impaired DNA fragmentation	Human HCC cell lines	163
	Downregulation of protein expression	Impaired DNA fragmentation	Uterine leiomyosarcomas	165
c-FLIP	Deregulated protein expression	Enhanced inhibition of procaspase-8 activation	CCRF-HSB-2 leukemia cell line and the MCF-7 breast cancer cell line	170
XIAP	Deletion	Continuous activation of caspase-9	X-linked lymphoproliferative disease	171
<i>The intrinsic pathway</i>				
Bcl-2	Overexpression	Increased cell survival	Glioma, neuroblastoma, lung, colorectal, melanoma, and squamous carcinoma cancer cells	177–183
	Downregulation	Enhanced apoptosis	Uterine leiomyosarcomas	165,185
Bad	Active protein downregulation	Decreased activation of apoptosis	Grade II breast cancers	196

TABLE 3 (Continued)

Gene	Mutations	Outcome	Cancers	References
Bid	Overexpression of inactive protein	Decreased activation of apoptosis	Triple-negative breast cancer, ovarian cancers	197,198
Bim	Frameshift and missense mutations	Inhibition of Bid activation	Gastric carcinomas	199,200
Bax	Deletions	Decreased activation of apoptosis	Non-small-cell lung cancer	201
Bok	Downregulation	Decreased activation of apoptosis	Breast cancer cells, aggressive non-Hodgkin lymphoma, ovarian cancer, metastatic colorectal cancer, and pancreatic cancer	203–210
	Downregulation	Decreased activation of apoptosis	Stage II and III colorectal cancers	211
<i>The ER stress pathway</i>				
GRP78/BiP	Overexpression	Adaptation to the ER pathway. Cancer cell survival.	Breast cancers, human pancreatic neuroendocrine tumors (PanNETs)	221,222
IRE1 α	Somatic		Glioblastomas, lung carcinomas, and ovarian cancers	220,224
XBP1	Overexpression	Favors cell survival.	Human myelomas	228

of Arg-43 decreases the protease function of caspase-7 and the mutation leads to a failure to induce apoptosis.¹⁶² Finally, defects in the expression of DFF are associated with several types of cancers.⁸⁴ Hemizygous deletions of chromosome 1p36 are often associated with some types of cancers.¹⁶³ DFF40 deficiency in Jurkat cells was shown to reduce cell sensibility to tributyltin-induced apoptosis.¹⁶⁴ DFF40 and DFF45 protein expressions were also shown to be downregulated in uterine leiomyosarcomas and linked with a poor prognosis.¹⁶⁵

4.1.3 | Function deregulation of extrinsic apoptotic pathway regulators and cancer development

XAF1 plays an important role in cancer angiogenesis. High levels of XIAP to XAF1 expression in cancer cells may provide a survival advantage.¹⁶⁶ In addition, abnormally high expression of IAP proteins represents a frequent oncogenic event in human cancers.¹⁶⁷ Indeed, Jaiswal et al.¹⁶⁸ point out that survivin is strongly expressed in most cancers and is associated with poor clinical outcome. Deregulation of c-FLIP L expression was observed in tumors.¹⁶⁹ Increased expression of c-FLIP is implicated in resistance to CD95/Fas and TRAILR-induced apoptosis in various cancers.¹⁷⁰ A study was performed on 12 patients with the X-linked lymphoproliferative disease (XLP) a gene mutation encoding and leading to a BIRC4/XIAP deficiency.¹⁷¹ Moreover, primary immunodeficiencies can be caused by XIAP deficiency due to the deletion of the BIRC4 gene.¹⁷²

4.2 | Mutations in the intrinsic apoptotic pathway

Mutations in the Bcl-2 family proteins have been widely identified in numerous cancers. Amongst those proteins, the Bcl-2 protein is the most mutated protein in cancers. Bcl-2 is highly expressed in the majority of breast cancers as well as in other common tumors.¹⁷³ In vitro and in vivo studies have shown that overexpression of Bcl-2 in breast cancer cell lines increases metastasis to the lung in mice through the epithelial-to-mesenchymal transition,¹⁷⁴ promotes cancer cell growth by downregulating cell autophagy,¹⁷³ confers resistance to chemotherapy¹⁷⁵ and accelerates c-myc-induced tumorigenesis in transgenic mice.¹⁷⁶ Bcl-2 overexpression in other cancer cell types, such as glioma,^{177,178} neuroblastoma,¹⁷⁹ lung,¹⁸⁰ colorectal,¹⁸¹ melanoma,¹⁸² and squamous carcinoma¹⁸³ cancer cells, has also been linked to cell migration, invasion, and metastasis.¹⁸⁴ Overexpression of Bcl-2 in

cancer cell types allows their survival, thus increases their malignancy. Surprisingly, Bcl-2 was shown to be downregulated in uterine leiomyosarcomas^{165,185} and negatively correlate with survival rates. Polymorphisms in the BCL2 gene may be associated with an increased risk for endometrial cancer.¹⁸⁶ Overexpression of the other antiapoptotic proteins (Mcl-1, BclxL, and Bcl-W) in cancer cell types, such as glioma, gastric, lung, and colorectal cancer cells, have also been shown to promote tumorigenesis and favor the cancer hallmarks.^{181,187–194}

BH3-only proteins from the Bcl-2 family, primarily known as tumor suppressors, contribute to carcinogenesis through the regulation of their expression. First, in benign thyroid nodules, the gene expression level of Bad was significantly decreased, with a positive correlation according to nodule size.¹⁹⁵ Bad was shown to be underexpressed in the cytoplasm and nucleus of Grade II breast cancers.¹⁹⁶ Inactive phosphorylated Bad levels were shown to be increased in triple-negative breast cancer (TNBC) tumours¹⁹⁷ and in ovarian cancers,¹⁹⁸ which confers chemoresistance. Somatic mutations of Bad in colorectal cancers have also been reported and linked to cancer development.¹⁹⁹ On the other hand, a study performed on biopsies of cervix carcinoma from patients who received radiotherapy reveals that strong expression of Bid is associated with a poor outcome following treatment.²⁰⁰ Moreover, analyses of 67 gastric carcinomas revealed a Bid mutation in 6% of cases, that consists of a frameshift and missense mutations.¹⁹⁹ Expression of the tumor-derived Bid mutants in HEK293T cells reveals a diminution in apoptosis frequency for the frameshift mutation.¹⁹⁹ Bim deletions have been detected in non-small-cell lung cancer positive for epidermal growth factor receptor (EGFR) and linked with shorter progression-free survival.²⁰¹

Very few mutations in the mitochondrial proapoptotic proteins have been reported in the literature. A study performed by Kim et al.,²⁰² analyzing mutations in gastric ($n = 47$), colorectal ($n = 47$), breast ($n = 47$), lung ($n = 47$), and prostate ($n = 47$) carcinomas concluded that somatic mutations of BAX and BAK genes are rare in human cancers (besides those displaying a high microsatellite instability) and they would not be implicated in cancer tumorigenesis. Although, Bax has been shown to be underexpressed in breast cancer cells,^{203–206} high-grade non-Hodgkin lymphoma,²⁰⁷ ovarian cancer,²⁰⁸ pancreatic cancer,²⁰⁹ and metastatic colorectal cancer.²¹⁰ Bok protein levels have also been shown to be downregulated in stage II and III colorectal cancers.²¹¹ As its fellow proapoptotic proteins, a downregulation in the expression of Bak in breast cancer tissues has been noted in the literature, and is linked with a reduced overall survival rate.²¹²

4.3 | Expression modulation or mutations in DFF

The DFF has been linked multiple times to cancer malignancy throughout the past years. Here, we summarize the main mutations involved in cancer cell resistance to apoptosis. The decrease in expression of both subunits of DFF was shown to be associated with poor prognosis in patients. A decrease of DFF45 expression was associated with higher pathologic stage and metastasis.²¹³ Deletion of the 1p36.2-p36.3 locus in neuroblastoma causes a DFF45 mutation and correlates with unfavorable outcome.^{214,215} NB-C201 cells bearing the 1p36.2 mutation are more resistant to cisplatin and DFF45 re-expression confers sensitivity to drug.²¹⁶ In melanoma cells resistant to etoposide and cisplatin, an absence of DNA fragmentation and PARP cleavage were associated with apoptosis deficiency.²¹⁷ Underexpression of DFF in uterine leiomyosarcomas (uLMS) influences disease-free survival.¹⁶⁵ Only the decrease of DFF40 and not DFF45 expression predicts disease-free and overall survival in non-endometrioid and high-grade endometrioid endometrial cancers.²¹⁸ Later studies showed the role of DFF40 in tumor sensitivity to chemotherapeutic drugs. Interestingly, in uLMS, a decrease of DFF40 was associated with a lower expression of the antiapoptotic gene BCL-2. By targeting sequencing of chemoresistance genes, Hlavac identified DFFB genes modulation in neoadjuvant cytotoxic therapy.²¹⁹ Overall, direct modulation of DFF40 or indirect deregulation of functional DFF40 by DFF45 modulation affects cells' response in the presence of apoptosis-inducing drugs. Interestingly, results suggest a relation between the BCL-2 gene and the DFFB gene. In the study submitted, our lab has shown a direct connection between DFF40 expression and mitochondria, particularly some Bcl-2 members. Moreover, the loss of DFF40 correlated with particular sensitivity to some chemotherapeutic drugs.

4.4 | Mutations in the endoplasmic reticulum stress pathway

Cancer cells use intrinsic adaptive mechanisms such as the UPR pathway to adapt to an environment deprived of oxygen and nutrients, but also to meet increasing demands for the production of proteins and lipids necessary for rapid proliferation.²²⁰ Their highly deprived microenvironment, and the presence of genomic instability, including multiple somatic mutations in protein secretion pathways, are sources of ER stress in cancer cells.²²⁰ Several mutations of the ER stress pathway have been reported in the literature in cancer cells. Overexpression

of the glucose-regulated stress gene GRP78/BiP has been identified in solid tumor microenvironments in breast tissue cancers²²¹ and in human pancreatic neuroendocrine tumors (PanNETs).²²² These specific mutations could explain a more stable adaptation to the ER stress pathway, and allow the recurrence and survival of the cancer cells.²²³ It should be noted that somatic mutations have rarely been found in IRE1 α or PERK in cancers.²²⁴ Mutations in the IRE1 α gene have been reported in less than 1% of glioblastomas, lung carcinomas, and ovarian cancers.^{224,225} However, Chen et al.²²⁶ have shown that the homeostatic target XBP1 from IRE1 α promotes tumor progression by controlling the HIF1 α pathway in TNBC. Higher levels of cyclin A protein were observed by Thorpe and Schwarze²²⁷ in cells with active IRE1 α and were dependent on XBP1, enabling maintenance of cell division in cancer cells. Elevated levels of XBP1 were also found in 50% of human myelomas, suggesting a role of XBP1 in cell survival.²²⁸ Ferrer et al. have demonstrated on breast cancer cells that O-GlcNAcylation regulates the metabolic reprogramming of cells as well as the signaling of survival stress via the regulation of HIF-1 α .²²⁹ Wang et al. revealed that XBP1s is an activator of the hexosamine biosynthesis pathway (BPH) and thus protects cells under stress.²³⁰ Throughout these results, many have been wondering if the ER stress pathway promotes cancer cell survival. Oakes has addressed this matter in his review.²²⁵ *In vitro*^{231–234} and/or *in vivo*^{235,236} studies have shown that all three pathways of the UPR are necessary for tumor growth and thus, cancer cell survival.

5 | ACTUAL TREATMENTS TO COUNTER APOPTOSIS RESISTANCE

In clinical oncology, the first-line treatments employ the use of chemotherapeutic drugs, often in combination with surgery and/or radiotherapy. As noted above, cancer cells are really well equipped with multiple mutations for chemoresistance. Morgan et al. have demonstrated in 2004 that the contribution of chemotherapy to 5-year survival rates was less than 5% in the United States.^{7,237} There are a lot of factors to take into account when assessing the efficacy of a chemotherapeutic drug, such as factors related to the patient (e.g., age, medical history, and life habits) or to the cancer cell type (e.g., stage, grade, and location). These are among the reasons why there is an increasing interest in oncologists toward personalized medicine in patient management. In this section, we will review the main therapies that target the caspase-dependant apoptosis pathway. Although, it is important to note that there are many more targeted

therapies involving different mutations that are not discussed in this review, such as cell cycle checkpoint²³⁸ and immune system²³⁹ regulators.

5.1 | Targeting the intrinsic apoptosis pathway

The treatment modalities involving the intrinsic caspase-dependant apoptosis pathway are made up of (i) dual Bcl-2 and Bcl-xL inhibitors, (ii) selective Bcl-2 inhibitors, (iii) Bcl-xL inhibitors, and (iv) Mcl-1 inhibitors, collectively referred to as BH3 mimetics, and (v) BAX agonists, some of which will be discussed in this review.²⁴⁰ We will review major drugs approved by the FDA and their overall outcome on patients with chemoresistant tumors.

5.1.1 | Bcl-2 inhibitors

Bcl-2 inhibitors are one of the most effective treatments in cancer management. Having shown above that many tumors have a deregulation in the expression of Bcl-2, these inhibitors come in handy to treat those cancer cells, who will potentially be resistant to conventional chemotherapy. In 2016, the FDA approved the first-ever Bcl-2 inhibitor known as Venetoclax (ABT-199). ABT-199 is a BH3-mimetic and thus antagonizes the Bcl-2 anti-apoptotic protein.²⁴¹ It binds to the BH3 binding groove of the Bcl-2 protein, dislodging BH3-only proapoptotic proteins that are normally inactivated through the Bcl-2-BH3-groove interaction.²⁴¹ The released BH3-only proteins subsequently bind Bax and Bak and induce their activation/oligomerization which leads to MOMP. Although ABT-199 is known as a Bcl-2 inhibitor, it is important to mention that it also has an inhibitory action on Bcl-W.²⁴¹ In the preclinical trials, ABT-199 was shown to produce positive results when used to treat mouse xenografts injected with chronic lymphocytic leukemia (CLL) or non-Hodgkin lymphoma (NHL) cells.²⁴² A study conducted amongst patients with refractory CLL, treatment with ABT-199 induced a tumor response in 79% of patients and a complete response to treatment in 20% of patients.²⁴³ These results brought scientists to recognize the importance of Bcl-2 inhibitors in the treatment of chemoresistant tumors. What if Bcl-2 inhibitors could be used as first-line treatments instead of treating only relapsed patients? Some tumors are known to be resistant to chemotherapy and have a higher relapse incidence rate (see Table 3 for tumors over-expressing Bcl-2). To respond to this major issue, recently, ABT-199, combined with an anti-CD20 antibody (Obinutuzumab), was approved for the frontline

treatment of patients with CLL, after it showed superior results compared to chemotherapy alternatives.²⁴⁴ Bcl-2 inhibitors have also been effective in the treatment of myeloid malignancies, especially AML in elderly patients over 75 years old.²⁴⁰ The FDA approved the treatment regimen, ABT-199, and 5-azacytidine or decitabine, for elderly patients with AML after Dinardo et al.²⁵⁵ showed in a phase I trial that a noteworthy complete response (CR) rate of 67.0% and a median overall survival (OS) of 17.5 months was achieved with this regiment.²⁴⁵ Clinical oncology is evolving at a fast rate. Specialized treatments are becoming a lot more interesting, due to highly genetically diverse tumors and the ability to screen them.

5.1.2 | Dual Bcl-2 and Bcl-xL inhibitors

The ability to integrate the use of Bcl-2 inhibitors to treat hematological malignancies has led to further research and development of Bcl-2 selective and dual Bcl-2 and Bcl-xL inhibitors. Currently, there are experimental studies being conducted on dual inhibitors, but none have yet been approved by the FDA. One of the most studied dual inhibitors is Navitoclax (ABT-263). Its mechanism of action is similar to ABT-199, where it acts as a BH3-mimetic, allowing the release of BH3-only proteins and further MOMP through Bax/Bak activation.²⁴¹ In clinical trials, Robert and his colleagues examined the effect of ABT-263 in 118 patients with refractory CLL and recorded partial responses in 34.6% of patients in phase I trials.²⁴⁶ Furthermore, Kipps et al.²⁴⁷ combined ABT-263 with rituximab, a monoclonal antibody toward the protein CD-20 and a statistically significant overall response rate (ORR) of 70% were recorded in untreated patients with CLL compared to rituximab alone ($p = .003$).²⁴⁷ Overall, these results are promising for the treatment of malignant tumors. Although, a major concern with this dual inhibitor is its side effect, where it induces thrombocytopenia in a dose-dependent manner, due to the role of Bcl-xL in platelet survival. There is also an additional concern regarding the development of cancer cell resistance to ABT-263, through the upregulation of Mcl-1 phosphorylation and further sequestration of Bim, a proapoptotic protein.²⁴¹ The clinical use of ABT-263 is thus limited and further studies are required before its approval.

5.1.3 | Bcl-xL, Mcl-1 inhibitors, and Bax agonists

Selective Bcl-xL inhibitors have shown antitumor activity in preclinical studies and are currently being assessed for

their clinical use in phase I trials as monotherapy and combined therapy with taxanes in patients with refractory solid tumors and for patients with prostate cancer.²⁴⁸ In vitro and in vivo studies have shown that selective Bcl-xL inhibitors, such as WEHI-539, mediate their proapoptotic actions by directly binding the hydrophobic groove of Bcl-xL,²⁴⁹ thus allowing the release of BH3-only domain proapoptotic proteins and subsequent cancer cell death. Other studies have reported the importance of Bcl-xL regulators. Among those, there is tozasertib (VX-680), a selective small-molecular inhibitor of the Aurora kinases,²⁵⁰ that has been undergoing clinical trials. VX-680 increases Bcl-xS fraction through Bcl-x splicing regulation by SRSF1 down-regulation, an antiapoptotic splice factor.^{129,251} This regulation increases the sensitivity of cervical cancer cells to VX-680 induced apoptosis.

Another treatment modality that targets the intrinsic apoptosis pathway is Mcl-1 inhibitors, recently been approved for human trials, which could have clinical significance as Mcl-1 plays a role in the progression of several malignancies that have shown resistance to chemotherapy and dual Bcl-2/Bcl-xL inhibitors.²⁵² Mcl-1 inhibitors can briefly be classified into two distinct categories: (I) direct or (II) indirect Mcl-1 inhibitors. Some known indirect inhibitors of Mcl-1 are for example the cyclin-dependant kinase (CDK) inhibitors, mTOR inhibitors, and deubiquitinase inhibitors, which either block transcription, translation, or enhance degradation of Mcl-1 respectively.¹³⁵ Like other Bcl-2 protein inhibitors, direct and selective Mcl-1 inhibitors also mediate their action by binding the hydrophobic groove, thus allowing the BH3-only proteins to activate apoptosis.¹³⁵ Mcl-1 inhibitors are currently being tested in phase 1 or 2 clinical trials, and can either be used as a monotherapy or in combination with ABT-199.¹³⁵ A recent review from Wang et al.¹³⁵ lists the currently studied Mcl-1 inhibitors in clinical trials and the specific clinical application for each of them.

Finally, Bax agonist-induced apoptosis is another method of treatment via the intrinsic apoptosis pathway. Early studies looked at lung cancer in mice and observed apoptosis using BAX agonists, such as small molecule BAX agonist (SMBA)1-SMBA3.²⁵³ SMBA's act by binding with high affinity the S184 pocket, where its phosphorylation enhances cell death by apoptosis.²⁵³ Positive results with BAX agonists have led to further research and development of optimized compounds such as CYD-4-61 and GL0385, effective against breast cancer cell lines, and BAM-7 and BTSA1, effective in glioblastoma and AML cell lines.²⁴⁰ Furthermore, Pirocanac et al.²⁵⁴ used human telomerase reverse transcriptase (hTERT), an active enzyme in 85% of human cancers, to construct a

BAX gene expression inducer which led to apoptosis in human pancreatic cancer cells. Overall, currently, there are many ongoing experimental studies on specific inhibitors of the intrinsic apoptotic pathway. Developing such drugs can take several years. The major concern on developing specific inhibitors are the adverse effects. Every drug comes with adverse effects, but it is important to find a balance between the adverse effects and the clinical outcome to have the drug approved by the FDA.

5.2 | Targeting the extrinsic apoptosis pathway

The treatment modalities involving the extrinsic caspase-dependant apoptosis pathway are made up of death receptor agonists and activators, p53 pathway-related therapies, and other cell death mechanisms, such as activation of ATF4 and epigenetic mechanisms that favor intrinsic apoptosis.²⁴⁰ The focus of treatment via death receptors have focused on DR4 and DR5 agonists as they have shown selective apoptosis of malignant cells without effects on surrounding nonmalignant cells unlike other agonists, such as CD95R/FasR, which was associated with severe liver toxicity, and TNFR, which was associated with inflammation.²⁵⁵ Earlier studies extensively looked at dulanerin, a recombinant monoclonal antibody with anti DR4 and DR5 activity, as a monotherapy and as a combination therapy, but no clinical efficacy was noted, most likely secondary to its short half-life (30 min) and limited ability to induce receptor clustering.^{256–261} To combat the short half-life and decreased receptor clustering ability of soluble agonists, DR4 and DR5 activating monoclonal antibodies (e.g., mapatumumab, lexatumumab, conatumumab, tigatuzumab, and drozitumab) were studied. Mapatumumab, as mono and combination therapy, was well tolerated but showed no clinical efficacy in both phase I and II trials in patients with non-small cell lung carcinoma (NSCLC), colorectal cancer, and other solid tumors, and was associated with grade 3–4 lymphopenia when compared to other arms in the study.^{262–264} Lexatumumab, studied as mono and combination therapy, showed stable disease results in children with osteosarcoma and adults with sarcoma, but no statistically significant results were noted and dose-limited transaminitis limited the study.²⁶⁵ Frequently inactivated in human cancers, the function of p53 has been the target of MDM2 and MDM4 inhibitors, which block the degradation of p53 without inducing DNA damage.²⁶⁶ ATF4 activation, via ONC201, leading to CHOP-dependent DR5 upregulation and cell death, has shown to cause the death of tumor cells in both preclinical and clinical trials and remains under investigation as a therapeutic strategy.^{267,268} Histone deacetylase (HDAC) or bromodomains and extra

terminal domain (BET) protein inhibitors are epigenetic modulators that have shown anticancer activity via several mechanisms that lead to cell death.²⁴⁰ BET inhibitors have shown positive activity in AML cell lines and patient-derived cutaneous T cell lymphoma cells via synergy when used in combination with Bcl-2 inhibitors, such as ABT-199.²⁶⁹ HDAC inhibitors, which alter chromatin remodeling and induce apoptosis via downstream activation of the intrinsic pathway and subsequent cell death, have shown positive results in rhabdomyosarcoma cell lines when combined with ABT-199.^{270–272} Positive results were also seen when HDAC inhibitors were used in combination with panobinostat and fimepinostat in diffuse large B cell lymphoma, multiple myeloma cell lines, and refractory lymphoma, respectfully.^{273,274}

6 | CONCLUDING REMARKS

This review thoroughly describes the caspase-dependant apoptotic pathways and highlights the major mutations involved in cancer cell resistance to chemotherapy. Mutations in the apoptotic pathway are the main source of chemoresistance in cancer cells. The major advances in medicine led to the development of personalized medicine, that focuses on the treatment of each tumor according to its genetics. Experimental studies have thus led to the development of selective inhibitors of the Bcl-2 family of proteins, known to be the most abundant mutations in malignant tumors. But what about the other mutations? Every year, a significant number of researchers work on better understanding the impact of these mutations in cancer cell signaling, to develop potent therapies. It is important to have a solid knowledge of the fundamental molecular basics, to better understand the impact of these mutations. We thus gathered the main mutations identified in cancers until today, to open light on new studies.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank Servier Medical Art (<http://smart.servier.com/>) for the access to the images used to create the figures. MK is an MD-PhD student, AP is an MSc student, and DO is a medical resident in internal medicine. This study was supported by an NSERC operating grant 1257509 to JB.

CONFLICT OF INTERESTS

The authors declare that there are no conflict of interests.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Merve Kulbay and Adeline Paimboeuf performed the literature search and designed the figures. Merve Kulbay, Adeline Paimboeuf, and Derman Ozdemir wrote the

manuscript. Jacques Bernier guided during the writing process and revised the manuscript. All authors approved the final manuscript.

ORCID

Merve Kulbay  <https://orcid.org/0000-0003-2756-3973>

Jacques Bernier  <http://orcid.org/0000-0002-0594-5922>

REFERENCES

- Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* 2007;35(4):495-516. doi:10.1080/01926230701320337
- Levoine N, Jean M, Legembre P. CD95 structure, aggregation and cell signaling. *Front Cell Dev Biol.* 2020;8:314. doi:10.3389/fcell.2020.00314
- Hotchkiss RS, Nicholson DW. Apoptosis and caspases regulate death and inflammation in sepsis. *Nat Rev Immunol.* 2006;6(11):813-822. doi:10.1038/nri1943
- Yanumula A, Cusick JK. Biochemistry, extrinsic pathway of apoptosis. StatPearls. StatPearls Publishing LLC; 2020.
- Sordo-Bahamonde C, Lorenzo-Herrero S, Payer Á, Gonzalez R, López-Soto S. A. Mechanisms of apoptosis resistance to NK cell-mediated cytotoxicity in cancer. *Int J Mol Sci.* 2020;21(10). doi:10.3390/ijms21103726
- Ucker DS, Levine JS. Exploitation of apoptotic regulation in cancer. *Front Immunol.* 2018;9:241. doi:10.3389/fimmu.2018.00241
- Krzyszczak P, Acevedo A, Davidoff EJ, et al. The growing role of precision and personalized medicine for cancer treatment. *Technology (Singap World Sci).* 2018;6(3-4):79-100. doi:10.1142/s2339547818300020
- Ma L, Hernandez MO, Zhao Y, et al. Tumor cell biodiversity drives microenvironmental reprogramming in liver cancer. *Cancer Cell.* 2019;36(4):418-430. doi:10.1016/j.ccell.2019.08.007
- Burney IA, Lakhtakia R. Precision medicine: where have we reached and where are we headed. *Sultan Qaboos Univ Med J.* 2017;17(3):e255-e258. doi:10.18295/squmj.2017.17.03.001
- Solano-Gálvez SG, Abadi-Chiriti J, Gutiérrez-Velez L, et al. Apoptosis: activation and inhibition in health and disease. *Med Sci.* 2018;6(3):54. doi:10.3390/medsci6030054
- Chai J, Shi Y. Apoptosome and inflammasome: conserved machineries for caspase activation. *Natl Sci Rev.* 2014;1(1):101-118.
- Huai J, Jöckel L, Schrader K, Borner C. Role of caspases and non-caspase proteases in cell death. *F1000 Biol Rep.* 2010;2:48. doi:10.3410/B2-48
- Yang Y, Zhao S, Song J. Caspase-dependent apoptosis and -independent poly (ADP-ribose) polymerase cleavage induced by transforming growth factor beta1. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004;17:1357-2725.
- Miller DR, Cramer SD, Thorburn A. The interplay of autophagy and non-apoptotic cell death pathways. *Int Rev Cell Mol Biol.* 2020;352:159-187.
- Wanderoy S, Hees JT, Klesse R, Edlich F, Harbauer AB. Kill one or kill the many: interplay between mitophagy and apoptosis. *Biol Chem.* 2021;402(1):73-88. doi:10.1515/hsz-2020-0231
- Vakifahmetoglu H, Olsson M, Zhivotovsky B. Death through a tragedy: mitotic catastrophe. *Cell Death Differ.* 2008;15(7):1153-1162. doi:10.1038/cdd.2008.47
- Gomes LR, Menck CFM, Leandro GS. Autophagy roles in the modulation of DNA repair pathways. *Int J Mol Sci.* 2017;18(11):2351. doi:10.3390/ijms18112351
- Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell.* 2001;104(4):487-501. doi:10.1016/s0092-8674(01)00237-9
- Naserian S, Abdelgawad ME, Afshar Bakshloo M, et al. The TNF/TNFR2 signaling pathway is a key regulatory factor in endothelial progenitor cell immunosuppressive effect. *Cell Commun Signaling.* 2020;18(1):94. doi:10.1186/s12964-020-00564-3
- Wajant H, Siegmund D. TNFR1 and TNFR2 in the control of the life and death balance of macrophages. *Front Cell Dev Biol.* 2019;7:91. doi:10.3389/fcell.2019.00091
- Kulbay M, Bernier-Parker N, Bernier J. The role of the DFF40/CAD endonuclease in genomic stability. *Apoptosis.* 2021;26(1):9-23. doi:10.1007/s10495-020-01649-7
- Morton PE, Perrin C, Levitt J, et al. TNFR1 membrane reorganization promotes distinct modes of TNF α signaling. *Sci Signal.* 2019;12(592). doi:10.1126/scisignal.aaw2418
- Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P. Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ.* 2003;10(1):45-65. doi:10.1038/sj.cdd.4401189
- Kemanetozoglou E, Andreadou E. CNS demyelination with TNF- α blockers. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 2017;17(4):36. doi:10.1007/s11910-017-0742-1
- Liu J, Dong Z, Zhu Q, et al. TNF- α promoter polymorphisms predict the response to etanercept more powerfully than that to infliximab/adalimumab in spondyloarthritis. *Sci Rep.* 2016;6:32202. doi:10.1038/srep32202
- Chadwick L, Zhao S, Mysler E, Moots RJ. Review of biosimilar trials and data on etanercept in rheumatoid arthritis. *Curr Rheumatol Rep.* 2018;20(12):84. doi:10.1007/s11926-018-0799-0
- Urriola-Muñoz P, Lagos-Cabré R, Patiño-García D, Reyes JG, Moreno RD. Bisphenol-A and nonylphenol induce apoptosis in reproductive tract cancer cell lines by the activation of ADAM17. *Int J Mol Sci.* 2018;19(8):2238. doi:10.3390/ijms19082238
- Crisafulli C, Galuppo M, Cuzzocrea S. Effects of genetic and pharmacological inhibition of TNF-alpha in the regulation of inflammation in macrophages. *Pharmacol Res.* 2009;60(4):332-340. doi:10.1016/j.phrs.2009.05.001
- Suda T, Takahashi T, Golstein P, Nagata S. Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell.* 1993;75(6):1169-1178. doi:10.1016/0092-8674(93)90326-1
- Siegmund D, Lang I, Wajant H. Cell death-independent activities of the death receptors CD95, TRAILR1, and TRAILR2. *FEBS J.* 2017;284(8):1131-1159. doi:10.1111/febs.13968
- Peter ME, Krammer PH. The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond. *Cell Death Differ.* 2003;10(1):26-35. doi:10.1038/sj.cdd.4401186
- Siegel RM, Frederiksen JK, Zacharias DA, et al. Fas pre-association required for apoptosis signaling and dominant inhibition by pathogenic mutations. *Science.* 2000;288(5475):2354-2357. doi:10.1126/science.288.5475.2354
- Papoff G, Hausler P, Eramo A, et al. Identification and characterization of a ligand-independent oligomerization

- domain in the extracellular region of the CD95 death receptor. *J Biol Chem.* 1999;274(53):38241-38250. doi:10.1074/jbc.274.53.38241
34. Sharma S, Carmona A, Skowronek A, et al. Apoptotic signalling targets the post-endocytic sorting machinery of the death receptor Fas/CD95. *Nat Commun.* 2019;10(1):3105. doi:10.1038/s41467-019-11025-y
 35. Qadir AS, Stults AM, Murmann AE, Peter ME. The mechanism of how CD95/Fas activates the Type I IFN/STAT1 axis, driving cancer stemness in breast cancer. *Sci Rep.* 2020; 10(1):1310. doi:10.1038/s41598-020-58211-3
 36. Liu XM, Yang ZM, Liu XK. Fas/FasL induces myocardial cell apoptosis in myocardial ischemia-reperfusion rat model. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2017;21(12):2913-2918.
 37. Jodo S, Kung JT, Xiao S, et al. Anti-CD95-induced lethality requires radioresistant Fcγ₂ RII⁺ cells. A novel mechanism for fulminant hepatic failure. *J Biol Chem.* 2003; 278(9):7553-7557.
 38. Kakinuma C, Takagaki K, Yatomi T, et al. Acute toxicity of an anti-Fas antibody in mice. *Toxicol Pathol.* 1999;27:412-420.
 39. Gomez-Santos L, LukaWagner, C, et al. Inhibition of natural killer cells protects the liver against acute injury in the absence of glycine N-methyltransferase. *Hepatology.* 2013; 56(2):747-759.
 40. Minagawa M, Deng Q, Liu ZX, Tsukamoto H, Dennert G. Activated natural killer T cells induce liver injury by Fas and tumor necrosis factor-α during alcohol consumption. *Gastroenterology.* 2004;126(5):1387-1399.
 41. Al-Saedi M, Steinebrunner N, Kudsi H, et al. Neutralization of CD95 ligand protects the liver against ischemiareperfusion injury and prevents acute liver failure. *Cell Death Dis.* 2018; 9(2):132. doi:10.1038/s41419-017-0150-0
 42. Huang DCS, Hahne M, Schroeter M, et al. Activation of Fas by FasL induces apoptosis by a mechanism that cannot be blocked by Bcl-2 or Bcl-xL. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999; 96(26):14871. doi:10.1073/pnas.96.26.14871
 43. Tanaka M, Itai T, Adachi M, Nagata S. Downregulation of Fas ligand by shedding. *Nat Med.* 1998;4:31-36.
 44. Diaz-Gerevini GT, Repossì G, Dain A, Tarres MC, Das UN, Eynard AR. Beneficial action of resveratrol: how and why. *Nutrition.* 2016;32(2):174-178. doi:10.1016/j.nut.2015.08.017
 45. Krishnan A, Kocab AJ, Zacks DN, Marshak-Rothstein A, Gregory-Ksander M. A small peptide antagonist of the Fas receptor inhibits neuroinflammation and prevents axon degeneration and retinal ganglion cell death in an inducible mouse model of glaucoma. *J Neuroinflammation.* 2019;16(1): 184. doi:10.1186/s12974-019-1576-3
 46. Besirli CG, Chinskey ND, Zheng Q-D, Zacks DN. Inhibition of retinal detachment-induced apoptosis in photoreceptors by a small peptide inhibitor of the fas receptor. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2010;51(4):2177-2184. doi:10.1167/iovs.09-4439
 47. Wang X, DeFrances MC, Dai Y, et al. A mechanism of cell survival: sequestration of Fas by the HGF receptor met. *Mol Cell.* 2002;9(2):411-421. doi:10.1016/S1097-2765(02)00439-2
 48. Planells-Ferrer L, Urresti J, Coccia E, et al. Fas apoptosis inhibitory molecules: more than death-receptor antagonists in the nervous system. *J Neurochem.* 2016;139(1):11-21. doi:10.1111/jnc.13729
 49. Staniek J, Lorenzetti R, Heller B, et al. TRAIL-R1 and TRAILR2 mediate TRAIL-dependent apoptosis in activated primary human B lymphocytes. *Front Immunol.* 2019;10:951. doi:10.3389/fimmu.2019.00951
 50. Schneider P, Thome M, Burns K, et al. TRAIL receptors 1 (DR4) and 2 (DR5) signal FADD-dependent apoptosis and activate NF-κB. *Immunity.* 1997;7(6):831-836. doi:10.1016/s1074-7613(00)80401-x
 51. Vunnam N, Lo CH, Grant BD, Thomas DD, Sachs JN. Soluble extracellular domain of death receptor 5 inhibits TRAIL-induced apoptosis by disrupting receptor-receptor interactions. *J Mol Biol.* 2017;429(19):2943-2953. doi:10.1016/j.jmb.2017.08.009
 52. Yoshimura S, Sano E, Hanashima Y, et al. IFN-β sensitizes TRAIL-induced apoptosis by upregulation of death receptor 5 in malignant glioma cells. *Oncol Rep.* 2019;42(6):2635-2643. doi:10.3892/or.2019.7383
 53. von Karstedt S, Walczak H. An unexpected turn of fortune: targeting TRAIL-Rs in KRAS-driven cancer. *Cell Death Discov.* 2020;6:14. doi:10.1038/s41420-020-0249-4
 54. Wang S, El-Deiry WS. TRAIL and apoptosis induction by TNF-family death receptors. *Oncogene.* 2003;22(53):8628-8633. doi:10.1038/sj.onc.1207232
 55. Yuan X, Gajan A, Chu Q, Xiong H, Wu K, Wu GS. Developing TRAIL/TRAIL death receptor-based cancer therapies. *Cancer Metastasis Rev.* 2018;37(4):733-748. doi:10.1007/s10555-018-9728-y
 56. Zhong HH, Wang HY, Li J, Huang YZ. TRAIL-based gene delivery and therapeutic strategies. *Acta Pharmacol Sin.* 2019;40(11):1373-1385. doi:10.1038/s41401-019-0287-8
 57. Almasan A, Ashkenazi A. Apo2L/TRAIL: apoptosis signaling, biology, and potential for cancer therapy. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2003;14(3-4):337-348. doi:10.1016/s1359-6101(03)00029-7
 58. Gandini M, Gras C, Azeredo EL, et al. Dengue virus activates membrane TRAIL relocalization and IFN-α production by human plasmacytoid dendritic cells in vitro and in vivo. *PLOS Negl Trop Dis.* 2013;7(6):e2257. doi:10.1371/journal.pntd.0002257
 59. Woo SM, Kwon TK. E3 ubiquitin ligases and deubiquitinases as modulators of TRAIL-mediated extrinsic apoptotic signaling pathway. *BMB Rep.* 2019;52(2):119-126. doi:10.5483/BMBRep.2019.52.2.011
 60. Pan Y, Xu R, Peach M, et al. Evaluation of pharmacodynamic biomarkers in a Phase 1a trial of dulanermin (rhApo2L/TRAIL) in patients with advanced tumours. *Br J Cancer.* 2011;105(12):1830-1838. doi:10.1038/bjc.2011.456
 61. Pajak B, Orzechowski A, Gajkowska B. Molecular basis of sodium butyrate-dependent proapoptotic activity in cancer cells. *Adv Med Sci.* 2007;52:83-88.
 62. Koltai T. Nelfinavir and other protease inhibitors in cancer: mechanisms involved in anticancer activity. *F1000Research.* 2015;4:9. doi:10.12688/f1000research.5827.2
 63. Loreto C, La Rocca G, Anzalone R, et al. The role of intrinsic pathway in apoptosis activation and progression in Peyronie's disease. *BioMed Res Int.* 2014;2014 616149. doi:10.1155/2014/616149
 64. Zhang W, Konopleva M, Ruvolo VR, et al. Sorafenib induces apoptosis of AML cells via Bim-mediated activation of the intrinsic apoptotic pathway. *Leukemia.* 2008;22(4):808-818. doi:10.1038/sj.leu.2405098

65. Kusaczuk M, Krętownski R, Naumowicz M, Stypułkowska A, Cechowska-Pasko M. Silica nanoparticle-induced oxidative stress and mitochondrial damage is followed by activation of intrinsic apoptosis pathway in glioblastoma cells. *Int J Nanomedicine*. 2018;13:2279-2294. doi:10.2147/ijn.S158393
66. Thangam R, Sathuvan M, Poongodi A, et al. Activation of intrinsic apoptotic signaling pathway in cancer cells by Cymbopogon citratus polysaccharide fractions. *Carbohydr Polym*. 2014;107:138-150. doi:10.1016/j.carbpol.2014.02.039
67. Marchi S, Giorgi C, Suski JM, et al. Mitochondria-Ros crosstalk in the control of cell death and aging. *J Signal Transduct*. 2012;2012:329635. doi:10.1155/2012/329635
68. Lin JH, Walter P, Yen TS. Endoplasmic reticulum stress in disease pathogenesis. *Annu Rev Pathol*. 2008;3:399-425. doi:10.1146/annurev.pathmechdis.3.121806.151434
69. Kim C, Kim B. Anti-cancer natural products and their bioactive compounds inducing ER stress-mediated apoptosis: a review. *Nutrients*. 2018;10(8):1021. doi:10.3390/nu10081021
70. Nakamura M, Gotoh T, Okuno Y, et al. Activation of the endoplasmic reticulum stress pathway is associated with survival of myeloma cells. *Leuk Lymphoma*. 2006;47(3):531-539. doi:10.1080/10428190500312196
71. Dafflon C, Gaulis S, Barys L, et al. DOT1L inhibition is lethal for multiple myeloma due to perturbation of the endoplasmic reticulum stress pathway. *Oncotarget*. 2020;11(11):956-968. doi:10.18632/oncotarget.27493
72. Limonta P, Moretti RM, Marzagalli M, Fontana F, Raimondi M, Montagnani Marelli M. Role of endoplasmic reticulum stress in the anticancer activity of natural compounds. *Int J Mol Sci*. 2019;20(4):961. doi:10.3390/ijms20040961
73. Wang M, Law ME, Castellano RK, Law BK. The unfolded protein response as a target for anticancer therapeutics. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2018;127:66-79. doi:10.1016/j.critrevonc.2018.05.003
74. Roy S, Nicholson DW. Cross-talk in cell death signaling. *J Exp Med*. 2000;192(8):F21-F25.
75. Wong SHM, Kong WY, Fang CM, et al. The TRAIL to cancer therapy: hindrances and potential solutions. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2019;143:81-94. doi:10.1016/j.critrevonc.2019.08.008
76. Cavalcante GC, Schaan AP, Cabral GF, et al. A cell's fate: an overview of the molecular biology and genetics of apoptosis. *Int J Mol Sci*. 2019;20(17):4133. doi:10.3390/ijms20174133
77. Seo J, Lee EW, Shin J, et al. K6 linked polyubiquitylation of FADD by CHIP prevents death inducing signaling complex formation suppressing cell death. *Oncogene*. 2018;37(36):4994-5006. doi:10.1038/s41388-018-0323-z
78. Masuda A, Isobe Y, Sugimoto K, Yoshimori M, Arai A, Komatsu N. Efficient recruitment of c-FLIP(L) to the death-inducing signaling complex leads to Fas resistance in natural killer-cell lymphoma. *Cancer Sci*. 2020;111(3):807-816. doi:10.1111/cas.14296
79. Shen C, Pei J, Guo X, Zhou L, Li Q, Quan J. Structural basis for dimerization of the death effector domain of the F122A mutant of Caspase-8. *Sci Rep*. 2018;8(1):16723. doi:10.1038/s41598-018-35153-5
80. Ivanisenko NV, Lavrik IN. Mechanisms of procaspase-8 activation in the extrinsic programmed cell death pathway. *Mol Biol*. 2019;53(5):830-837. doi:10.1134/s0026898419050094
81. Hillert LK, Ivanisenko NV, Espe J, et al. Long and short isoforms of c-FLIP act as control checkpoints of DED filament assembly. *Oncogene*. 2020;39(8):1756-1772. doi:10.1038/s41388-019-1100-3
82. Seyrek K, Ivanisenko NV, Richter M, Hillert LK, König C, Lavrik IN. Controlling cell death through post-translational modifications of DED proteins. *Trends Cell Biol*. 2020;30(5):354-369. doi:10.1016/j.tcb.2020.02.006
83. Mandal R, Barrón JC, Kostova I, Becker S, Strebhardt K. Caspase-8: the double-edged sword. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*. 2020;1873(2):188357. doi:10.1016/j.bbcan.2020.188357
84. Bagheri F, Safarian S, Eslaminejad MB, Sheibani N. Sensitization of breast cancer cells to doxorubicin via stable cell line generation and overexpression of DFF40. *Biochem Cell Biol*. 2015;93(6):604-610. doi:10.1139/bcb-2015-0007
85. Nuñez G, Benedict MA, Hu Y, Inohara N. Caspases: the proteases of the apoptotic pathway. *Oncogene*. 1998;17(25):3237-3245. doi:10.1038/sj.onc.1202581
86. Vigneswara V, Ahmed Z. The role of caspase-2 in regulating cell fate. *Cells*. 2020;9(5):1259. doi:10.3390/cells9051259
87. Roy S, Nicholson DW. Cross-talk in cell death signaling. *J Exp Med*. 2000;192:F21-F26.
88. Li H, Zhu H, Xu C-j, Yuan J. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell*. 1998;94(4):491-501. doi:10.1016/S0092-8674(00)81590-1
89. Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C, Wang X. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell*. 1998;94(4):481-490. doi:10.1016/S0092-8674(00)81589-5
90. Uren RT, Iyer S, Kluck RM. Pore formation by dimeric Bak and Bax: an unusual pore. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2017;372(1726):20160218. doi:10.1098/rstb.2016.0218
91. Smaili SS, Hsu YT, Sanders KM, Russell JT, Youle RJ. Bax translocation to mitochondria subsequent to a rapid loss of mitochondrial membrane potential. *Cell Death Differ*. 2001;8(9):909-920. doi:10.1038/sj.cdd.4400889
92. Dorstyn L, Akey CW, Kumar S. New insights into apoptosome structure and function. *Cell Death Differ*. 2018;25(7):1194-1208. doi:10.1038/s41418-017-0025-z
93. Adrain C, Creagh EM, Martin SJ. Apoptosis-associated release of Smac/DIABLO from mitochondria requires active caspases and is blocked by Bcl-2. *EMBO J*. 20(23):6627-6636.
94. Kadowaki H, Nishitoh H. Signaling pathways from the endoplasmic reticulum and their roles in disease. *Genes*. 2013;4(3):306-333. doi:10.3390/genes4030306
95. Chu Q, Martinez TF, Novak SW, et al. Regulation of the ER stress response by a mitochondrial microprotein. *Nat Commun*. 2019;10(1):4883. doi:10.1038/s41467-019-12816-z
96. Yadav RK, Chae SW, Kim HR, Chae HJ. Endoplasmic reticulum stress and cancer. *Journal of Cancer Prevention*. 2014;19:75-88.
97. Spierings DC, de Vries EG, Vellenga E, et al. Tissue distribution of the death ligand TRAIL and its receptors. *J Histochem Cytochem*. 2004;52(6):821-831.
98. Neumann S, Hasenauer J, Pollak N, Scheurich P. Dominant negative effects of tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) receptor 4 on TRAIL

- receptor 1 signaling by formation of heteromeric complexes. *J Biol Chem.* 2014;289(23):16576-16587. doi:10.1074/jbc.M114.559468
99. Pan G, Ni J, Wei YF, Yu G, Gentz R, Dixit VM. An antagonist decoy receptor and a death domain-containing receptor for TRAIL. *Science.* 1997;277(5327):815-818. doi:10.1126/science.277.5327.815
 100. Takahashi M, Miura Y, Hayashi S, Tateishi K, Fukuda K, Kurosaka M. DcR3-TL1A signalling inhibits cytokine-induced proliferation of rheumatoid synovial fibroblasts. *Int J Mol Med.* 2011;28(3):423-427. doi:10.3892/ijmm.2011.687
 101. Liang C, Xu Y, Li G, et al. Downregulation of DcR3 sensitizes hepatocellular carcinoma cells to TRAIL-induced apoptosis. *Onco Targets Ther.* 2017;10:417-428. doi:10.2147/ott.S127202
 102. Vasilyev FF, Lopatnikova JA, Sennikov SV. Optimized flow cytometry protocol for analysis of surface expression of interleukin-1 receptor types I and II. *Cytotechnology.* 2013; 65(5):795-802. doi:10.1007/s10616-013-9546-6
 103. Shatnyeva OM, Kubarenko AV, Weber CE, et al. Modulation of the CD95-induced apoptosis: the role of CD95 Nglycosylation. *PLOS One.* 2011;6(5):e19927. doi:10.1371/journal.pone.0019927
 104. Seyrek K, Richter M, Lavrik IN. Decoding the sweet regulation of apoptosis: the role of glycosylation and galectins in apoptotic signaling pathways. *Cell Death Differ.* 2019;26(6): 981-993. doi:10.1038/s41418-019-0317-6
 105. Ekert PG, Silke J, Vaux DL. Caspase inhibitors. *Cell Death Differ.* 1999;6(11):1081-1086. doi:10.1038/sj.cdd.4400594
 106. Zhou Q, Krebs JF, Snipas SJ, et al. Interaction of the baculovirus anti-apoptotic protein p35 with caspases. Specificity, kinetics, and characterization of the caspase/p35 complex. *Biochemistry.* 1998;37(30):10757-10765. doi:10.1021/bi980893w
 107. Wu CC, Lee S, Malladi S, et al. The Apaf-1 apoptosome induces formation of caspase-9 homo- and heterodimers with distinct activities. *Nat Commun.* 2016;7:13565. doi:10.1038/ncomms13565
 108. Degtarev A, Boyce M, Yuan J. A decade of caspases. *Oncogene.* 2003;22(53):8543-8567. doi:10.1038/sj.onc.1207107
 109. Callus BA, Vaux DL. Caspase inhibitors: viral, cellular and chemical. *Cell Death Differ.* 2007;14(1):73-78. doi:10.1038/sj.cdd.4402034
 110. Wang K, Lin B. Inhibitor of apoptosis proteins (IAPs) as regulatory factors of hepatic apoptosis. *Cell Signal.* 2013; 25(10):1970-1980. doi:10.1016/j.cellsig.2013.06.003
 111. Feltham R, Khan N, Silke J. IAPs and ubiquitylation. *IUBMB Life.* 2012;64(5):411-418. doi:10.1002/iub.565
 112. Chen SN, Fang T, Kong JY, Pan BB, Su XC. Third BIR domain of XIAP binds to both Cu(II) and Cu(I) in multiple sites and with diverse affinities characterized at atomic resolution. *Sci Rep.* 2019;9(1):7428. doi:10.1038/s41598-019-42875-7
 113. Takahashi R, Deveraux Q, Tamm I, et al. A single BIR domain of XIAP sufficient for inhibiting caspases. *J Biol Chem.* 1998;273(14):7787-7790. doi:10.1074/jbc.273.14.7787
 114. Allègre J, Cartier J, Glorian V, et al. E2F1 binds to the peptide-binding groove within the BIR3 domain of cIAP1 and requires cIAP1 for chromatin binding. *PLOS One.* 2018; 13(10):e0206253.
 115. Mamriev D, Abbas R, Klingler FM, et al. A small-molecule ARTS mimetic promotes apoptosis through degradation of both XIAP and Bcl-2. *Cell Death Dis.* 2020;11(6):483. doi:10.1038/s41419-020-2670-2
 116. Abbas R, Larisch S. Targeting XIAP for promoting cancer cell death-the story of ARTS and SMAC. *Cells.* 2020;9(3):663. doi:10.3390/cells9030663
 117. Jost PJ, Grabow S, Gray D, et al. XIAP discriminates between type I and type II FAS-induced apoptosis. *Nature.* 2009; 460(7258):1035-1039. doi:10.1038/nature08229
 118. Meng X, Chang Z, Che N, Wu J, Dang T, Chai J. Acid/bile exposure triggers TRAIL-mediated apoptosis in esophageal cancer cells by suppressing the decoy receptors and c-FLIP (R). *Int J Biochem Cell Biol.* 2020;122:105736. doi:10.1016/j.biocel.2020.105736
 119. Schleich K, Buchbinder JH, Pietkiewicz S, et al. Molecular architecture of the DED chains at the DISC: regulation of procaspase-8 activation by short DED proteins c-FLIP and procaspase-8 prodomain. *Cell Death Differ.* 2016;23(4): 681-694. doi:10.1038/cdd.2015.137
 120. Widlak P, Li P, Wang X, Garrard WT. Cleavage preferences of the apoptotic endonuclease DFF40 (caspase-activated DNase or nuclease) on naked DNA and chromatin substrates. *J Biol Chem.* 2000;275(11):8226-8232. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10713148>
 121. Widlak P, Kalinowska M, Parseghian MH, Lu X, Hansen JC, Garrard WT. The histone H1 C-terminal domain binds to the apoptotic nuclease, DNA fragmentation factor (DFF40/CAD) and stimulates DNA cleavage. *Biochemistry.* 2005;44(21): 7871-7878. doi:10.1021/bi050100n
 122. Kalinowska-Herok M, Widlak P. High mobility group proteins stimulate DNA cleavage by apoptotic endonuclease DFF40/CAD due to HMG-box interactions with DNA. *Acta Biochim Pol.* 2008;55(1):21-26. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18239742>
 123. Durrieu F, Samejima K, Fortune JM, Kandels-Lewis S, Osheroff N, Earnshaw WC. DNA topoisomerase IIalpha interacts with CAD nuclease and is involved in chromatin condensation during apoptotic execution. *Curr Biol.* 2000;10(15): 923-926. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10959840>
 124. Widlak P, Garrard WT. Discovery, regulation, and action of the major apoptotic nucleases DFF40/CAD and endonuclease G. *J Cell Biochem.* 2005;94(6):1078-1087. doi:10.1002/jcb.20409
 125. Dai H, Pang YP, Ramirez-Alvarado M, Kaufmann SH. Evaluation of the BH3-only protein Puma as a direct Bak activator. *J Biol Chem.* 2014;289(1):89-99. doi:10.1074/jbc.M113.505701
 126. Kale J, Osterlund EJ, Andrews DW. BCL-2 family proteins: changing partners in the dance towards death. *Cell Death Differ.* 2018;25(1):65-80. doi:10.1038/cdd.2017.186
 127. Tzifi F, Economopoulou C, Gourgiotis D, Ardavanis A, Papageorgiou S, Scorilas A. The role of BCL2 family of apoptosis regulator proteins in acute and chronic leukemias. *Adv Hematol.* 2012;2012:524308. doi:10.1155/2012/524308
 128. Hardwick JM, Soane L. Multiple functions of BCL-2 family proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013;5(2):a008722. doi:10.1101/cshperspect.a008722

129. Stevens M, Oltean S. Modulation of the apoptosis gene Bcl-x function through alternative splicing. *Front Genet.* 2019;10:804.
130. Edlich F, Banerjee S, Suzuki M, et al. Bcl-x(L) retro-translocates Bax from the mitochondria into the cytosol. *Cell.* 2011;145:104-116.
131. Flores-Romero H, Landeta O, Ugarte-Urbe B, et al. BFL1 modulates apoptosis at the membrane level through a bifunctional and multimodal mechanism showing key differences with BCLXL. *Cell Death Differ.* 2019;26(10):1880-1894. doi:10.1038/s41418-018-0258-5
132. Ku B, Liang C, Jung JU, Oh BH. Evidence that inhibition of BAX activation by BCL-2 involves its tight and preferential interaction with the BH3 domain of BAX. *Cell Res.* 2011;21(4):627-641. doi:10.1038/cr.2010.149
133. Hartman ML, Czyz M. BCL-w: apoptotic and non-apoptotic role in health and disease. *Cell Death Dis.* 2020;11(4):260. doi:10.1038/s41419-020-2417-0
134. Thomas LW, Lam C, Edwards SW. Mcl-1; the molecular regulation of protein function. *FEBS Lett.* 2010;584(14):2981-2989. doi:10.1016/j.febslet.2010.05.061
135. Wang H, Guo M, Wei H, Chen Y. Targeting MCL-1 in cancer: current status and perspectives. *J Hematol Oncol.* 2021;14(1):67. doi:10.1186/s13045-021-01079-1
136. Westphal D, Dewson G, Czabotar PE, Kluck RM. Molecular biology of Bax and Bak activation and action. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* 2011;1813(4):521-531. doi:10.1016/j.bbamcr.2010.12.019
137. Harada H, Becknell B, Wilm M, et al. Phosphorylation and inactivation of BAD by mitochondria-anchored protein kinase A. *Mol Cell.* 1999;3(4):413-422. doi:10.1016/S1097-2765(00)80469-4
138. Adams CJ, Kopp MC, Larburu N, Nowak PR, Ali MMU. Structure and molecular mechanism of ER stress signaling by the unfolded protein response signal activator IRE1 [Review]. *Front Mol Biosci.* 2019;6(11):11. doi:10.3389/fmolb.2019.00011
139. Panganiban RA, Park H-R, Sun M, Shumyatcher M, Himes BE, Lu Q. Genome-wide CRISPR screen identifies suppressors of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2019;116:13384-13393.
140. Pistritto G, Trisciunglio D, Ceci C, Garufi A, D'Orazi G. Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies. *Aging.* 2016;8(4):603-619. doi:10.18632/aging.100934
141. Fernald K, Kurokawa M. Evading apoptosis in cancer. *Trends Cell Biol.* 2013;23(12):620-633. doi:10.1016/j.tcb.2013.07.006
142. Gerl R, Vaux DL. Apoptosis in the development and treatment of cancer. *Carcinogenesis.* 2005;26(2):263-270. doi:10.1093/carcin/bgh283
143. Ghavami S, Hashemi M, Ande SR, et al. Apoptosis and cancer: mutations within caspase genes. *J Med Genet.* 2009;46(8):497-510. doi:10.1136/jmg.2009.066944
144. Hopkins-Donaldson S, Ziegler A, Kurtz S, et al. Silencing of death receptor and caspase-8 expression in small cell lung carcinoma cell lines and tumors by DNA methylation. *Cell Death Differ.* 2003;10(3):356-364. doi:10.1038/sj.cdd.4401157
145. Tauzin S, Debure L, Moreau JF, Legembre P. CD95-mediated cell signaling in cancer: mutations and post-translational modulations. *Cell Mol Life Sci.* 2012;69(8):1261-1277.
146. Lambotte O, Neven B, Galicier L, et al. Diagnosis of autoimmune lymphoproliferative syndrome caused by FAS deficiency in adults. *Haematologica.* 2013;98(3):389-392. doi:10.3324/haematol.2012.067488
147. Nabhani S, Ginzel S, Miskin H, et al. Deregulation of Fas ligand expression as a novel cause of autoimmune lymphoproliferative syndrome-like disease. *Haematologica.* 2015;100(9):1189-1198. doi:10.3324/haematol.2014.114967
148. Tourneur L, Buzyn A, Chiocchia G. FADD adaptor in cancer. *Med Immunol.* 2005;4(1):1. doi:10.1186/1476-9433-4-1
149. Gómez-Angelats M, Cidowski JA. Molecular evidence for the nuclear localization of FADD. *Cell Death Differ.* 2003;10(7):791-797. doi:10.1038/sj.cdd.4401237
150. Chan AW, Zhang Z, Chong CC, Tin EK, Chow C, Wong N. Genomic landscape of lymphoepithelioma-like hepatocellular carcinoma. *J Pathol.* 2019;249(2):166-172. doi:10.1002/path.5313
151. Zhang W, Hong R, Li L, et al. The chromosome 11q13.3 amplification associated lymph node metastasis is driven by miR-548k through modulating tumor microenvironment. *Mol Cancer.* 2018;17(1):125. doi:10.1186/s12943-018-0871-4
152. Soung YH, Lee JW, Kim SY, et al. CASPASE-8 gene is inactivated by somatic mutations in gastric carcinomas. *Cancer Res.* 2005;65(3):815-821.
153. Li M, Le W, Zhang XM, Zhang YJ, Jiang J, Liu PY. The M476W/Q482H mutation of procaspase-8 restored caspase-8-mediated apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2019;514(3):653-658. doi:10.1016/j.bbrc.2019.05.023
154. Verhaak RG, Hoadley KA, Purdom E, et al. Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell.* 2010;18:78-91.
155. Fianco G, Mongiardi MP, Levi A, et al. Caspase-8 contributes to angiogenesis and chemotherapy resistance in glioblastoma. *eLife.* 2017;6:e22593.
156. Fianco G, Cenci C, Barilà D. Caspase-8 expression and its Src-dependent phosphorylation on Tyr380 promote cancer cell neoplastic transformation and resistance to anoikis. *Exp Cell Res.* 2016;347:114-122.
157. Soung YH, Lee JW, Kim SY, et al. Mutational analysis of proapoptotic caspase-9 gene in common human carcinomas. *APMIS.* 2006;114(4):292-297. doi:10.1111/j.1600-0463.2006.apm_364.x
158. Abel F, Sjöberg RM, Ejeskär K, Krona C, Martinsson T. Analyses of apoptotic regulators CASP9 and DFFA at 1P36.2, reveal rare allele variants in human neuroblastoma tumours. *Br J Cancer.* 2002;86(4):596-604.
159. Park JY, Park JM, Jang JS, et al. Caspase 9 promoter polymorphisms and risk of primary lung cancer. *Hum Mol Genet.* 2006;15:1963-1971.
160. Soung YH, Lee JW, Kim SY, et al. Somatic mutations of CASP3 gene in human cancers. *Hum Genet.* 2004;115(2):112-115. doi:10.1007/s00439-004-1129-3
161. Chen K, Zhao H, Hu Z, et al. CASP3 polymorphisms and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clinical Cancer Research.* 2008;14:6343-6349.
162. Soung YH, Lee JW, Kim HS, et al. Inactivating mutations of CASPASE-7 gene in human cancers. *Oncogene.* 2003;22(39):8048-8052. doi:10.1038/sj.onc.1206727

163. Hsieh SY, Liaw SF, Lee SN, et al. Aberrant caspase-activated DNase (CAD) transcripts in human hepatoma cells. *Br J Cancer*. 2003;88(2):210-216. doi:10.1038/sj.bjc.6600695
164. Kulbay M, Johnson B, Bernier J. DNA fragmentation factor 40 expression in T cells confers sensibility to tributyltin-induced apoptosis. *Toxicology*. 2019;426:152255. doi:10.1016/j.tox.2019.152255
165. Banas T, Pitynski K, Okon K, Czerw A. DNA fragmentation factors 40 and 45 (DFF40/DFF45) and B-cell lymphoma 2 (Bcl-2) protein are underexpressed in uterine leiomyosarcomas and may predict survival. *OncoTargets Ther*. 2017;10:4579-4589. doi:10.2147/OTT.S142979
166. Fong WG, Liston P, Rajcan-Separovic E, St Jean, M, Craig C, Korneluk RG. Expression and genetic analysis of XIAP-associated factor 1 (XAF1) in cancer cell lines. *Genomics*. 2000;70(1):113-122. doi:10.1006/geno.2000.6364
167. Majorini MT, Manenti G, Mano M, et al. cIAP1 regulates the EGFR/Snai2 axis in triple-negative breast cancer cells. *Cell Death Differ*. 2018;25(12):2147-2164. doi:10.1038/s41418-018-0100-0
168. Jaiswal PK, Goel A, Mittal RD. Survivin: a molecular biomarker in cancer. *Indian J Med Res*. 2015;141(4):389-397. doi:10.4103/0971-5916.159250
169. Bagnoli M, Canevari S, Mezzanzanica D. Cellular FLICE-inhibitory protein (c-FLIP) signalling: a key regulator of receptor-mediated apoptosis in physiologic context and in cancer. *Int J Biochem Cell Biol*. 2010;42(2):210-213. doi:10.1016/j.biocel.2009.11.015
170. Safa AR, Day TW, Wu CH. Cellular FLICE-like inhibitory protein (C-FLIP): a novel target for cancer therapy. *Curr Cancer Drug Targets*. 2008;8(1):37-46. doi:10.2174/156800908783497087
171. Rigaud S, Fondanèche MC, Lambert N, et al. XIAP deficiency in humans causes an X-linked lymphoproliferative syndrome. *Nature*. 2006;444(7115):110-114. doi:10.1038/nature05257
172. Parackova Z, Milota T, Vrabцова P, et al. Novel XIAP mutation causing enhanced spontaneous apoptosis and disturbed NOD2 signalling in a patient with atypical adult-onset Crohn's disease. *Cell Death Dis*. 2020;11(6):430. doi:10.1038/s41419-020-2652-4
173. Oh S, Xiaofei E, Ni D, et al. Downregulation of autophagy by Bcl-2 promotes MCF7 breast cancer cell growth independent of its inhibition of apoptosis. *Cell Death Differ*. 2011;18(3):452-464. doi:10.1038/cdd.2010.116
174. Du C, Zhang X, Yao M, et al. Bcl-2 promotes metastasis through the epithelial-to-mesenchymal transition in the BCap37 medullary breast cancer cell line. *Oncol Lett*. 2018;15(6):8991-8898. doi:10.3892/ol.2018.8455
175. Real PJ, Sierra A, De Juan A, Segovia JC, Lopez-Vega JM, Fernandez-Luna JL. Resistance to chemotherapy via Stat3-dependent overexpression of Bcl-2 in metastatic breast cancer cells. *Oncogene*. 2002;21(50):7611-7618. doi:10.1038/sj.onc.1206004
176. Jäger R, Herzer U, Schenkel J, Weiher H. Overexpression of Bcl-2 inhibits alveolar cell apoptosis during involution and accelerates c-myc-induced tumorigenesis of the mammary gland in transgenic mice. *Oncogene*. 1997;15(15):1787-1795. doi:10.1038/sj.onc.1201353
177. Wick W, Wagner S, Kerkau S, Dichgans J, Tonn JC, Weller M. BCL-2 promotes migration and invasiveness of human glioma cells. *FEBS Lett*. 1998;440(3):419-424. doi:10.1016/s0014-5793(98)01494-x
178. Wick W, Wild-Bode C, Frank B, Weller M. BCL-2-induced glioma cell invasiveness depends on furin-like proteases. *J Neurochem*. 2004;91(6):1275-1283. doi:10.1111/j.1471-4159.2004.02806.x
179. Noujaim D, van Golen CM, van Golen KL, Grauman A, Feldman EL. N-Myc and Bcl-2 coexpression induces MMP-2 secretion and activation in human neuroblastoma cells. *Oncogene*. 2002;21(29):4549-4557. doi:10.1038/sj.onc.1205552
180. Choi J, Choi K, Benveniste EN, et al. Bcl-2 promotes invasion and lung metastasis by inducing matrix metalloproteinase-2. *Cancer Res*. 2005;65(13):5554-5560. doi:10.1158/0008-5472.Can-04-4570
181. Koehler BC, Scherr AL, Lorenz S, et al. Beyond cell death – antiapoptotic Bcl-2 proteins regulate migration and invasion of colorectal cancer cells in vitro. *PLOS One*. 2013;8(10):e76446. doi:10.1371/journal.pone.0076446
182. Trisciuglio D, Desideri M, Ciuffreda L, et al. Bcl-2 overexpression in melanoma cells increases tumor progression-associated properties and in vivo tumor growth. *J Cell Physiol*. 2005;205(3):414-421. doi:10.1002/jcp.20413
183. Zuo J, Ishikawa T, Boutros S, Xiao Z, Humtsoe JO, Kramer RH. Bcl-2 overexpression induces a partial epithelial to mesenchymal transition and promotes squamous carcinoma cell invasion and metastasis. *Mol Cancer Res*. 2010;8(2):170-182. doi:10.1158/1541-7786.Mcr-09-0354
184. Um HD. Bcl-2 family proteins as regulators of cancer cell invasion and metastasis: a review focusing on mitochondrial respiration and reactive oxygen species. *Oncotarget*. 2016;7(5):5193-5203. doi:10.18632/oncotarget.6405
185. Bodner K, Bodner-Adler B, Kimberger O, Czerwenka K, Mayerhofer K. Bcl-2 expression and other clinicopathologic parameters in uterine leiomyosarcoma. *Wien Klin Wochenschr*. 2004;116(4):135-139. doi:10.1007/bf03040751
186. Dorjgochoo T, Xiang YB, Long J, et al. Association of genetic markers in the BCL-2 family of apoptosis-related genes with endometrial cancer risk in a Chinese population. *PLOS One*. 2013;8(4):e60915. doi:10.1371/journal.pone.0060915
187. Bae IH, Park MJ, Yoon SH, et al. Bcl-w promotes gastric cancer cell invasion by inducing matrix metalloproteinase-2 expression via phosphoinositide 3-kinase, Akt, and Sp1. *Cancer Res*. 2006;66(10):4991-4995. doi:10.1158/0008-5472.Can-05-4254
188. Bae IH, Yoon SH, Lee SB, Park JK, Ho JN, Um HD. Signaling components involved in Bcl-w-induced migration of gastric cancer cells. *Cancer Lett*. 2009;277(1):22-28. doi:10.1016/j.canlet.2008.11.022
189. Ho JN, Kang GY, Lee SS, et al. Bcl-XL and STAT3 mediate malignant actions of gamma-irradiation in lung cancer cells. *Cancer Sci*. 2010;101(6):1417-1423. doi:10.1111/j.1349-7006.2010.01552.x
190. Kim EM, Kim J, Park JK, et al. Bcl-w promotes cell invasion by blocking the invasion-suppressing action of Bax. *Cell Signal*. 2012;24(6):1163-1172. doi:10.1016/j.cellsig.2012.01.019
191. Kim EM, Park JK, Hwang SG, et al. Nuclear and cytoplasmic p53 suppress cell invasion by inhibiting respiratory complex-I activity

- via Bcl-2 family proteins. *Oncotarget*. 2014;5(18):8452-8465. doi:10.18632/oncotarget.2320
192. Weiler M, Bähr O, Hohlweg U, et al. BCL-xoma cells. *Cell Death Differ*. 2006;13(7):1156-1169. doi:10.1038/sj.cdd.4401786
 193. Xu Y, Zhao F, Wang Z, et al. MicroRNA-335 acts as a metastasis suppressor in gastric cancer by targeting Bcl-w and specificity protein 1. *Oncogene*. 2012;31(11):1398-1407. doi:10.1038/onc.2011.340
 194. Yang J, Sun M, Zhang A, Lv C, De W, Wang Z. Adenovirus-mediated siRNA targeting Bcl-xL inhibits proliferation, reduces invasion and enhances radiosensitivity of human colorectal cancer cells. *World J Surg Oncol*. 2011;9:117. doi:10.1186/1477-7819-9-117
 195. Gül N, Temel B, Ustek D, et al. Association of pro-apoptotic bad gene expression changes with benign thyroid nodules. *In Vivo*. 2018;32(3):555-559. doi:10.21873/invivo.11275
 196. Cekanova M, Fernando RI, Siriwardhana N, et al. BCL-2 family protein, BAD is down-regulated in breast cancer and inhibits cell invasion. *Exp Cell Res*. 2015;331(1):1-10. doi:10.1016/j.yexcr.2014.11.016
 197. Boac BM, Abbasi F, Ismail-Khan R, et al. Expression of the BAD pathway is a marker of triple-negative status and poor outcome. *Sci Rep*. 2019;9(1):17496. doi:10.1038/s41598-019-53695-0
 198. Marchion DC, Cottrill HM, Xiong Y, et al. BAD phosphorylation determines ovarian cancer chemosensitivity and patient survival. *Clin Cancer Res*. 2011;17(19):6356-6366. doi:10.1158/1078-0432.Ccr-11-0735
 199. Lee JW, Soung YH, Kim SY, et al. Inactivating mutations of proapoptotic Bad gene in human colon cancers. *Carcinogenesis*. 2004;25(8):1371-1376. doi:10.1093/carcin/bgh145
 200. Green MML, Hutchison GJ, Valentine HR, et al. Expression of the proapoptotic protein Bid is an adverse prognostic factor for radiotherapy outcome in carcinoma of the cervix. *Br J Cancer*. 2005;92(3):449-458. doi:10.1038/sj.bjc.6602344
 201. Isobe K, Hata Y, Tochigi N, et al. Clinical significance of BIM deletion polymorphism in non-small-cell lung cancer with epidermal growth factor receptor mutation. *J Thorac Oncol*. 2014;9(4):483-487. doi:10.1097/jto.0000000000000125
 202. Kim MS, Kim SS, Yoo NJ, Lee SH. Rare somatic mutation of pro-apoptotic BAX and BAK genes in common human cancers. *Tumori*. 2012;98(6):149e-151e. doi:10.1700/1217.13509
 203. Bargou RC, Daniel PT, Mapara MY, et al. Expression of the BCL-2 gene family in normal and malignant breast tissue: low BAX-alpha expression in tumor cells correlates with resistance towards apoptosis. *Int J Cancer*. 1995;60(6):854-859. doi:10.1002/ijc.2910600622
 204. Krajewski S, Blomqvist C, Franssila K, et al. Reduced expression of proapoptotic gene BAX is associated with poor response rates to combination chemotherapy and shorter survival in women with metastatic breast adenocarcinoma. *Cancer Res*. 1995;55(19):4471-4478.
 205. Pluta P, Smolewski P, Pluta A, et al. Significance of Bax expression in breast cancer patients. *Pol Przegl Chir*. 2011; 83(10):549-553. doi:10.2478/v10035-011-0087-4
 206. Sturm I, Papadopoulos S, Hillebrand T, et al. Impaired BAX protein expression in breast cancer: mutational analysis of the BAX and the p53 gene. *Int J Cancer*. 2000;87(4):517-521. doi:10.1002/1097-0215(20000815)87:4<517::aid-ijc9>3.0.co;2-b
 207. Gascoyne RD, Krajewska M, Krajewski S, Connors JM, Reed JC. Prognostic significance of Bax protein expression in diffuse aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *Blood*. 1997; 90(8):3173-3178.
 208. Tai YT, Lee S, Niloff E, Weisman C, Strobel T, Cannistra SA. BAX protein expression and clinical outcome in epithelial ovarian cancer. *J Clin Oncol*. 1998;16(8):2583-2590. doi:10.1200/jco.1998.16.8.2583
 209. Friess H, Lu Z, Graber HU, et al. BAX, but not BCL-2, influences the prognosis of human pancreatic cancer. *Gut*. 1998;43(3):414-421. doi:10.1136/gut.43.3.414
 210. Sturm I, Köhne CH, Wolff G, et al. Analysis of the p53/BAX pathway in colorectal cancer: low BAX is a negative prognostic factor in patients with resected liver metastases. *J Clin Oncol*. 1999;17(5):1364-1374. doi:10.1200/jco.1999.17.5.1364
 211. Carberry S, D'Orsi B, Monsefi N, et al. The BAX/BAK-like protein BOK is a prognostic marker in colorectal cancer. *Cell Death Dis*. 2018;9(2):125. doi:10.1038/s41419-017-0140-2
 212. Luo Y, Wang X, Wang H, et al. High Bak expression is associated with a favorable prognosis in breast cancer and sensitizes breast cancer cells to paclitaxel. *PLOS One*. 2015; 10(9):e0138955. doi:10.1371/journal.pone.0138955
 213. Konishi S, Ishiguro H, Shibata Y, et al. Decreased expression of DFF45/ICAD is correlated with a poor prognosis in patients with esophageal carcinoma. *Cancer*. 2002;95(12): 2473-2478. doi:10.1002/ncr.10987
 214. Yang HW, Chen YZ, Piao HY, Takita J, Soeda E, Hayashi Y. DNA fragmentation factor 45 (DFF45) gene at 1p36.2 is homozygously deleted and encodes variant transcripts in neuroblastoma cell line. *Neoplasia*. 2001;3(2):165-169. doi:10.1038/sj/neo/7900141
 215. Abel F, Sjöberg RM, Krona C, Nilsson S, Martinsson T. Mutations in the N-terminal domain of DFF45 in a primary germ cell tumor and in neuroblastoma tumors. *Int J Oncol*. 2004;25(5): 1297-1302. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15492818>
 216. Takahashi M, Ozaki T, Takahashi A, et al. DFF45/ICAD restores cisplatin-induced nuclear fragmentation but not DNA cleavage in DFF45-deficient neuroblastoma cells. *Oncogene*. 2007;26(38):5669-5673. doi:10.1038/sj.onc.1210352
 217. Helmbach H, Kern MA, Rossmann E, et al. Drug resistance towards etoposide and cisplatin in human melanoma cells is associated with drug-dependent apoptosis deficiency. *J Invest Dermatol*. 2002;118(6):923-932. doi:10.1046/j.1523-1747.2002.01786.x
 218. Banas T, Pitynski K, Okon K, Winiarska A. Nonendometrioid and high-grade endometrioid endometrial cancers show DNA fragmentation factor 40 (DFF40) and Bcell lymphoma 2 protein (BCL2) underexpression, which predicts disease-free and overall survival, but not DNA fragmentation factor 45 (DFF45) underexpression. *BMC Cancer*. 2018;18(1):418. doi:10.1186/s12885-018-4333-6
 219. Hlavac V, Kovacova M, Elsnerova K, et al. Use of germline genetic variability for prediction of chemoresistance and prognosis of breast cancer patients. *Cancers*. 2018;10(12), doi:10.3390/cancers10120511
 220. Oakes SA. Endoplasmic reticulum proteostasis: a key checkpoint in cancer. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2017;312(2): C93-C102. doi:10.1152/ajpcell.00266.2016

221. Fernandez PM, Tabbara SO, Jacobs LK, et al. Overexpression of the glucose-regulated stress gene GRP78 in malignant but not benign human breast lesions. *Breast Cancer Res Treat.* 2000;59(1):15-26. doi:10.1023/a:1006332011207
222. Moore PC, Qi JY, Thamsen M, et al. Parallel signaling through IRE1 α and PERK regulates pancreatic neuroendocrine tumor growth and survival. *Cancer Res.* 2019;79(24):6190-6203. doi:10.1158/0008-5472.CAN-19-1116
223. Daneshmand S, Quek ML, Lin E, et al. Glucose-regulated protein GRP78 is up-regulated in prostate cancer and correlates with recurrence and survival. *Hum Pathol.* 2007;38(10):1547-1552. doi:10.1016/j.humpath.2007.03.014
224. Greenman C, Stephens P, Smith R, et al. Patterns of somatic mutation in human cancer genomes. *Nature.* 2007;446(7132):153-158. doi:10.1038/nature05610
225. Oakes SA. Endoplasmic reticulum stress signaling in cancer cells. *Am J Pathol.* 2020;190(5):934-946. doi:10.1016/j.ajpath.2020.01.010
226. Chen X, Iliopoulos D, Zhang Q, et al. XBP1 promotes triplenegative breast cancer by controlling the HIF1 α pathway. *Nature.* 2014;508(7494):103-107. doi:10.1038/nature13119
227. Thorpe JA, Schwarze SR. IRE1 α controls cyclin A1 expression and promotes cell proliferation through XBP-1. *Cell Stress Chaperones.* 2010;15(5):497-508. doi:10.1007/s12192-009-0163-4
228. Carrasco DR, Sukhdeo K, Protopopova M, et al. The differentiation and stress response factor XBP-1 drives multiple myeloma pathogenesis. *Cancer Cell.* 2007;11(4):349-360. doi:10.1016/j.ccr.2007.02.015
229. Slawson C, Hart GW. O-GlcNAc signalling: implications for cancer cell biology. *Nat Rev Cancer.* 2011;11(9):678-684. doi:10.1038/nrc3114
230. Wang ZV, Deng Y, Gao N, et al. Spliced X-box binding protein 1 couples the unfolded protein response to hexosamine biosynthetic pathway. *Cell.* 2014;156(6):1179-1192. doi:10.1016/j.cell.2014.01.014
231. Hanaoka M, Ishikawa T, Ishiguro M, et al. Expression of ATF6 as a marker of pre-cancerous atypical change in ulcerative colitis-associated colorectal cancer: a potential role in the management of dysplasia. *J Gastroenterol.* 2018;53(5):631-641. doi:10.1007/s00535-017-1387-1
232. Harrington PE, Biswas K, Malwitz D, et al. Unfolded protein response in cancer: IRE1 α inhibition by selective kinase ligands does not impair tumor cell viability. *ACS Med Chem Lett.* 2015;6(1):68-72. doi:10.1021/ml500315b
233. Salaroglio IC, Panada E, Moiso E, et al. PERK induces resistance to cell death elicited by endoplasmic reticulum stress and chemotherapy. *Mol Cancer.* 2017;16(1):91. doi:10.1186/s12943-017-0657-0
234. Sheng X, Nenseth HZ, Qu S, et al. IRE1 α -XBPs pathway promotes prostate cancer by activating c-MYC signaling. *Nat Commun.* 2019;10(1):323. doi:10.1038/s41467-018-08152-3
235. Bobrovnikova-Marjon E, Grigoriadou C, Pytel D, et al. PERK promotes cancer cell proliferation and tumor growth by limiting oxidative DNA damage. *Oncogene.* 2010;29(27):3881-3895. doi:10.1038/onc.2010.153
236. Feng Y-x, Sokol ES, Del Vecchio CA, et al. Epithelial-tomesenchymal transition activates PERK-eIF2 α and sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress. *Cancer Discov.* 2014;4(6):702-715. doi:10.1158/2159-8290.CD-13-0945
237. Morgan G, Ward R, Barton M. The contribution of cytotoxic chemotherapy to 5-year survival in adult malignancies. *Clin Oncol (R Coll Radiol).* 2004;16(8):549-560. doi:10.1016/j.clon.2004.06.007
238. Zhao X, Kim I-K, Kallakury X, et al. Acquired small cell lung cancer resistance to Chk1 inhibitors involves Wee1 up-regulation. *Mol Oncol.* 2020;15:1130-1145. doi:10.1002/1878-0261.12882
239. Herbst RS, Giaccone G, de Marinis F, et al. Atezolizumab for first-line treatment of PD-L1-selected patients with NSCLC. *N Engl J Med.* 2020;383(14):1328-1339. doi:10.1056/NEJMoa1917346
240. Carneiro BA, El-Deiry WS. Targeting apoptosis in cancer therapy. *Nat Rev Clin Oncol.* 2020;17(7):395-417. doi:10.1038/s41571-020-0341-y
241. Bose P, Gandhi V, Konopleva M. Pathways and mechanisms of venetoclax resistance. *Leuk Lymphoma.* 2017;58(9):1-17. doi:10.1080/10428194.2017.1283032
242. Souers AJ, Levenson JD, Boghaert ER, et al. ABT-199, a potent and selective BCL-2 inhibitor, achieves antitumor activity while sparing platelets. *Nat Med.* 2013;19(2):202-208. doi:10.1038/nm.3048
243. Roberts AW, Davids MS, Pagel JM, et al. Targeting BCL2 with venetoclax in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med.* 2016;374(4):311-322. doi:10.1056/NEJMoa1513257
244. Fischer K, Al-Sawaf O, Bahlo J, et al. Venetoclax and obinutuzumab in patients with CLL and coexisting conditions. *N Engl J Med.* 2019;380(23):2225-2236. doi:10.1056/NEJMoa1815281
245. DiNardo CD, Pratz K, Pullarkat V, et al. Venetoclax combined with decitabine or azacitidine in treatment-naive, elderly patients with acute myeloid leukemia. *Blood.* 2019;133(1):7-17. doi:10.1182/blood-2018-08-868752
246. Roberts AW, Seymour JF, Brown JR, et al. Substantial susceptibility of chronic lymphocytic leukemia to BCL2 inhibition: results of a phase I study of navitoclax in patients with relapsed or refractory disease. *J Clin Oncol.* 2012;30(5):488-496. doi:10.1200/jco.2011.34.7898
247. Kipps TJ, Eradat H, Grosicki S, et al. A phase 2 study of the BH3 mimetic BCL2 inhibitor navitoclax (ABT-263) with or without rituximab, in previously untreated B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma.* 2015;56(10):2826-2833. doi:10.3109/10428194.2015.1030638
248. Tao ZF, Hasvold L, Wang L, et al. Discovery of a potent and selective BCL-XL inhibitor with in vivo activity. *ACS Med Chem Lett.* 2014;5(10):1088-1093. doi:10.1021/ml5001867
249. Lessene G, Czabotar PE, Sleebs BE, et al. Structure-guided design of a selective BCL-XL inhibitor. *Nat Chem Biol.* 2013;9(6):390-397. doi:10.1038/nchembio.1246
250. Harrington EA, Bebbington D, Moore J, et al. VX-680, a potent and selective small-molecule inhibitor of the Aurora kinases, suppresses tumor growth in vivo. *Nature Med.* 2004;10(3):262-267. doi:10.1038/nm1003
251. Moore MJ, Wang Q, Kenned CJ, Silver PA. An alternative splicing network links cell-cycle control to apoptosis. *Cell.* 2010;142:625-636.

252. Wertz IE, Kusam S, Lam C, et al. Sensitivity to antitubulin chemotherapeutics is regulated by MCL1 and FBW7. *Nature*. 2011;471(7336):110-114. doi:10.1038/nature09779
253. Xin M, Li R, Xie M, et al. Small-molecule Bax agonists for cancer therapy. *Nat Commun*. 2014;5:4935. doi:10.1038/ncomms5935
254. Pirocanac EC, Nassirpour R, Yang M, et al. Bax-induction gene therapy of pancreatic cancer. *J Surg Res*. 2002;106(2):346-351. doi:10.1006/jsre.2002.6473
255. Falschlehner C, Ganten TM, Koschny R, Schaefer U, Walczak H. TRAIL and other TRAIL receptor agonists as novel cancer therapeutics. *Adv Exp Med Biol*. 2009;647:195-206. doi:10.1007/978-0-387-89520-8_14
256. Herbst RS, Eckhardt SG, Kurzrock R, et al. Phase I dose-escalation study of recombinant human Apo2L/TRAIL, a dual proapoptotic receptor agonist, in patients with advanced cancer. *J Clin Oncol*. 2010;28(17):2839-2846. doi:10.1200/jco.2009.25.1991
257. Soria JC, Márk Z, Zatloukal P, et al. Randomized phase II study of dulanermin in combination with paclitaxel, carboplatin, and bevacizumab in advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2011;29(33):4442-4451. doi:10.1200/jco.2011.37.2623
258. Cheah CY, Belada D, Fanale MA, et al. Dulanermin with rituximab in patients with relapsed indolent B-cell lymphoma: an open-label phase 1b/2 randomised study. *Lancet Haematol*. 2015;2(4):e166-e174. doi:10.1016/s2352-3026(15)00026-5
259. Wainberg ZA, Messersmith WA, Peddi PF, et al. A phase 1B study of dulanermin in combination with modified FOL-FOX6 plus bevacizumab in patients with metastatic colorectal cancer. *Clin Colorectal Cancer*. 2013;12(4):248-254. doi:10.1016/j.clcc.2013.06.002
260. Mühlenbeck F, Schneider P, Bodmer JL, et al. The tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptors TRAIL-R1 and TRAIL-R2 have distinct cross-linking requirements for initiation of apoptosis and are non-redundant in JNK activation. *J Biol Chem*. 2000;275(41):32208-32213. doi:10.1074/jbc.M000482200
261. Berg D, Lehne M, Müller N, et al. Enforced covalent trimerization increases the activity of the TNF ligand family members TRAIL and CD95L. *Cell Death Differ*. 2007;14(12):2021-2034. doi:10.1038/sj.cdd.4402213
262. von Pawel J, Harvey JH, Spigel DR, et al. Phase II trial of mapatumumab, a fully human agonist monoclonal antibody to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor 1 (TRAIL-R1), in combination with paclitaxel and carboplatin in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *Clin Lung Cancer*. 2014;15(3):188-196. doi:10.1016/j.clcc.2013.12.005
263. Trarbach T, Moehler M, Heinemann V, et al. Phase II trial of mapatumumab, a fully human agonistic monoclonal antibody that targets and activates the tumour necrosis factor apoptosis-inducing ligand receptor-1 (TRAIL-R1), in patients with refractory colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2010;102(3):506-512. doi:10.1038/sj.bjc.6605507
264. Mom CH, Verweij J, Oldenhuis CN, et al. Mapatumumab, a fully human agonistic monoclonal antibody that targets TRAIL-R1, in combination with gemcitabine and cisplatin: a phase I study. *Clin Cancer Res*. 2009;15(17):5584-5590. doi:10.1158/1078-0432.Ccr-09-0996
265. Plummer R, Attard G, Pacey S, et al. Phase 1 and pharmacokinetic study of lexatumumab in patients with advanced cancers. *Clin Cancer Res*. 2007;13(20):6187-6194. doi:10.1158/1078-0432.Ccr-07-0950
266. Wang S, Zhao Y, Aguilar A, Bernard D, Yang CY. Targeting the MDM2-p53 protein-protein interaction for new cancer therapy: progress and challenges. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2017;7(5):a026245. doi:10.1101/cshperspect.a026245
267. Wagner J, Kline CL, Zhou L, et al. Dose intensification of TRAIL-inducing ONC201 inhibits metastasis and promotes intratumoral NK cell recruitment. *J Clin Invest*. 2018;128(6):2325-2338. doi:10.1172/jci96711
268. Stein MN, Malhotra J, Tarapore RS, et al. Safety and enhanced immunostimulatory activity of the DRD2 antagonist ONC201 in advanced solid tumor patients with weekly oral administration. *J Immunother Cancer*. 2019;7(1):136. doi:10.1186/s40425-019-0599-8
269. Kim SR, Lewis JM, Cyrenne BM, et al. BET inhibition in advanced cutaneous T cell lymphoma is synergistically potentiated by BCL2 inhibition or HDAC inhibition. *Oncotarget*. 2018;9(49):29193-29207. doi:10.18632/oncotarget.25670
270. Heinicke U, Haydn T, Kehr S, Vogler M, Fulda S. BCL-2 selective inhibitor ABT-199 primes rhabdomyosarcoma cells to histone deacetylase inhibitor-induced apoptosis. *Oncogene*. 2018;37(39):5325-5339. doi:10.1038/s41388-018-0212-5
271. Zhang Y, Adachi M, Kawamura R, Imai K. Bmf is a possible mediator in histone deacetylase inhibitors FK228 and CBHA-induced apoptosis. *Cell Death Differ*. 2006;13(1):129-140. doi:10.1038/sj.cdd.4401686
272. Zhao Y, Tan J, Zhuang L, Jiang X, Liu ET, Yu Q. Inhibitors of histone deacetylases target the Rb-E2F1 pathway for apoptosis induction through activation of proapoptotic protein Bim. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005;102(44):16090-16095. doi:10.1073/pnas.0505585102
273. Liu Y, Mondello P, Erazo T, et al. NOXA genetic amplification or pharmacologic induction primes lymphoma cells to BCL2 inhibitor-induced cell death. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2018;115(47):12034-12039. doi:10.1073/pnas.1806928115
274. Ramakrishnan VG, Miller KC, Macon EP, et al. Histone deacetylase inhibition in combination with MEK or BCL-2 inhibition in multiple myeloma. *Haematologica*. 2019;104(10):2061-2074. doi:10.3324/haematol.2018.211110

How to cite this article: Kulbay M, Paimboeuf A, Ozdemir D, Bernier J. Review of cancer cell resistance mechanisms to apoptosis and actual targeted therapies. *J Cell Biochem*. 2021;1-26. doi:10.1002/jcb.30173