



Institut national  
de la santé et de la recherche médicale

UNIVERSITE DE BOURGOGNE

UFR des Sciences de la Vie



ÉCOLE DOCTORALE  
Environnements - Santé  
Bourgogne Franche-Comté

## THÈSE

Pour obtenir le grade de Docteur de l'Université de Bourgogne

Ecole Doctorale Environnements Santé n°554

Discipline : Sciences de la Vie et de la Santé

Spécialité : Biochimie, Biologie Cellulaire et Moléculaire

Soutenue publiquement à Dijon le mercredi 5 avril 2023 par

**Aymeric ZADOROZNYJ**

## Analyse des propriétés oncogéniques et pro-fibrosantes de cIAP1/TRAFF2

### Membres du jury :

Dr. Damien ARNOULT	Rapporteur
Dr. Olivier BURGY	Examinateur
Dr. Laurence DUBREZ	Directrice de Thèse
Dr. Amandine HURBIN	Examinateuse
Pr. Catherine PAUL	Présidente du Jury
Pr. Bruno SEGUI	Rapporteur

Unité INSERM U1231 « Lipides, Nutrition, Cancer », équipe HSP-Pathies

UFR des Sciences de Santé, 7 Bd Jeanne d'Arc, 21000 Dijon

*« Être conscient de son ignorance est le premier pas vers la connaissance. »*

*Benjamin Disraeli*

*« Si la barbe donnait la science, les chèvres seraient toutes docteurs. »*

*Proverbe français*

## Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les membres de mon jury qui m'ont fait l'honneur d'évaluer mon travail de thèse. Un grand merci au Professeur Bruno Segui et au Docteur Damien Arnoult qui ont accepté d'analyser ces travaux en tant que rapporteurs. Je remercie également le Professeur Catherine Paul ainsi que les Docteurs Olivier Burgy et Amandine Hurbin pour avoir accepté de juger mes travaux en qualité d'examinateurs.

Un immense merci au Docteur Laurence Dubrez, qui m'a accueillie au sein de son équipe après ma deuxième année de Master et m'a accompagné pendant ces trois années. J'ai énormément appris grâce à votre encadrement et vous avez fait de moi un meilleur scientifique. Vous m'avez toujours guidé tout en étant à l'écoute de mes idées et m'avez poussé à aller toujours plus loin. Merci pour votre disponibilité, votre confiance ainsi que votre aide pour la rédaction de rapports et la préparation de présentations. Vous avez toujours été présente pour moi malgré vos responsabilités. Merci pour tout !

Je remercie ma famille, sans qui je ne serais pas là aujourd'hui. Merci à mes parents de m'avoir soutenu tout au long de ces années. Vous m'avez laissé choisir ma voie et avez toujours été derrière moi. Votre gentillesse, votre soutien et vos encouragements sont inestimables. Si j'en suis là aujourd'hui, c'est grâce à vous. Un grand merci à ma grande sœur Alizée. Tu m'as toujours soutenu quand j'en avais besoin. Je sais qu'au moindre souci je peux compter sur toi. Et un énorme merci à mon petit frère Arthur. Nous avons passé toute notre enfance constamment ensemble et tu as toujours été là pour moi. Toutes ces discussions non-stop pendant plusieurs heures quand je rentrais m'ont toujours fait un bien fou.

Je remercie aussi ma belle-famille avec qui j'ai passé de super moments. Votre accueil a toujours été incroyable et je me suis toujours senti comme chez moi. J'espère vous revoir très vite à Dijon. Je tiens aussi à remercier tout particulièrement Tobias. Ce voyage au Mexique restera à jamais gravé dans ma mémoire. Et comment ne pas évoquer les photos incroyables que tu as pris là-bas. Il y a toujours une série de trois images que je dois faire imprimer et accrocher dans l'appartement...

Un grand merci à Lilian et Delphine. Vous êtes deux personnes exceptionnelles avec qui j'ai passé des moments incroyables pendant ces trois années. Nos soirées jeux, que ce soit pour me voir faire d'horribles dessins, chasser des fantômes ou des trésors m'ont toujours beaucoup amusé et m'ont permis de me déconnecter. J'espère de tout cœur que cette amitié perdurera au fil du temps. Et Lilian, dans un an ce sera à ton tour et je serai là pour voir ça.

C'est à ton tour Tristan. Cela fait plus de 10 ans que nous nous connaissons et tu as toujours été là quand j'avais besoin de parler. Les années ont beau passer mais nous sommes toujours aussi proches. Il m'est impossible de retourner en région parisienne sans passer te voir. J'espère de tout mon cœur que tu réussiras à accomplir ton rêve d'aller travailler au Japon. Merci aussi à Suzanne, Chris et Laeticia, c'était toujours un immense plaisir de passer du temps avec vous lorsque je retournais en région parisienne.

On arrive maintenant à quelqu'un de très particulier, Baptise D. Si ma thèse s'est bien passée, c'est grâce à toi. Tes conseils et ton expérience m'ont été d'une grande aide pendant ces trois ans. Nos longues discussions pour parler de recherche ou toute autre chose, nos matchs de baskets ou tout simplement la bonne ambiance que tu aménais avec moi me manquent déjà. Et merci à Laure pour ton humour et ces raclées que tu as pu nous mettre au basket. J'espère de tout cœur que tout se passera bien au Canada pour vous mais au vu des personnes que vous êtes, je ne suis pas inquiet.

Je remercie également toutes les personnes passées par la team Dubrez et en particulier Manon, la nouvelle thésarde de l'équipe. Merci pour toute l'aide que tu as pu m'apporter, ta bonne humeur et ta motivation. Tu as toujours été à l'écoute et ça a été un plaisir de travailler avec toi. Et bon, tes petites étourderies m'ont toujours fait mourir de rire. Nos discussions au laboratoire et nos soirées autour d'un verre ont rendu cette dernière année de thèse très agréable et je n'ai aucun doute que ta thèse se passera bien, tu en as les capacités. Je te souhaite en tout cas le meilleur pour la suite, tu le mérites.

Je remercie aussi toute l'équipe Delva, nos voisins de box, pour toutes ces belles journées passées ensemble. J'avais l'impression de faire partie de l'équipe. Vous êtes tous des personnes exceptionnelles. Je remercie tout particulièrement Baptiste P pour tous ces très bons moments passés à l'intérieur et en dehors du labo, ces longues discussions ont toujours été un réel plaisir, et bien sûr Aziza pour la bonne humeur que tu apportais dans le box.

Je tiens à remercier tous mes confrères de promo John, Kévin, Aline, Abdel et Christophe, pour ne citer qu'eux. Cela va faire 5 ans que l'on se connaît et j'ai vraiment passé de très bons moments avec vous que ce soit à l'intérieur ou à l'extérieur du laboratoire. Ces soirées aux bars et ces sessions de sport avec vous John et Kévin, sont à jamais gravées dans ma mémoire. Et merci pour ton infinie gentillesse Abdel, ainsi que ces tranches de rire que tu nous procures, que ce soit au basket ou au laboratoire.

Je remercie également l'équipe Bonniaud pour toute l'aide qu'elle m'a apporté pendant ma thèse. Un grand merci à Julie pour ta joie de vivre et à mes collègues de box Clémence, Sabrina et Judith. Un grand merci à toi Lucile, tu as toujours pris du temps pour moi quand j'en avais besoin. Tu m'as tout appris pour les manips vivo et ma thèse aurait été très difficile sans toi.

Un grand merci à l'EPHE. J'ai effectué mon stage de Master 2 avec vous et je n'en garde que des bons souvenirs. Je remercie tout particulièrement Cindy et Silvia. Vous m'avez énormément appris pendant mon stage mais aussi pendant ma thèse. Je n'oublierai pas toutes nos discussions, votre bonne humeur et votre bienveillance.

Je tiens aussi à te remercier Rony. Ta générosité est sans limite et ton départ a laissé un grand vide au laboratoire. Et merci à toi François pour toutes ces connaissances que tu nous apportes et surtout pour tes blagues parfois douteuses...

Et un grand merci à tous les autres membres du troisième étage que je n'ai pas cité pour toutes ces belles années passées en votre compagnie et toute l'aide que vous m'avez apportée au cours de ma thèse.

Pour terminer, j'aimerais remercier profondément ma chérie, Camille. Tu as tellement fait pour moi que je ne pourrais pas tout lister ici. Cela fait plus de cinq ans que j'ai la chance et le bonheur de t'avoir à mes côtés. Tu m'as supporté pendant ces trois ans de thèse, malgré mes moments de stress ou de déprime. Sans toi, ma thèse aurait été très difficile. Nos discussions boulot m'ont toujours aidé à y voir plus clair. Toutes nos soirées passées ensemble m'ont fait un bien fou et me permettaient de me déconnecter et penser à autre chose. Merci pour tous ces fous rires que l'on a pu avoir (t'entendre miauler pour me faire croire que le chat te répond quand tu l'appelles reste un de mes moments préférés). Ta capacité à détecter les espaces en trop m'impressionnera toujours. Tu as été présente pour moi quand j'en avais besoin et tu m'as toujours encouragé et soutenu. Merci pour tout.

## Analyse des propriétés oncogéniques et pro-fibrosantes de cIAP1/TRAFF2

cIAP1 (*cellular Inhibitor of Apoptosis*) est un important régulateur de la signalisation cellulaire et moléculaire appartenant à la famille des IAP (*Inhibitor of Apoptosis*). Elle interagit avec ses différents partenaires par ses domaines BIR (*Baculovirus IAP repeat*) et possède un domaine RING (*Really interesting New Gene*) lui conférant une activité E3 ubiquitine ligase. cIAP1 est impliquée dans différentes fonctions telles que l'inflammation, la différenciation, la migration et la prolifération cellulaire. Des anomalies d'expression ont été détectées dans différents types de cancers et sont très souvent associées à un mauvais pronostic et à une résistance aux traitements chimiothérapeutiques. Une surexpression de cIAP1 a aussi été retrouvée chez des patients atteints de fibrose pulmonaire idiopathique. Mon projet de thèse porte sur l'analyse des propriétés oncogéniques et pro-fibrosantes de cIAP1. Mes travaux ont démontré que son interaction avec son partenaire TRAF2 (*TNF Receptor-Associated Factor 2*) est nécessaire à ses propriétés oncogéniques, dans un modèle de MEF (*Mouse Embryonic Fibroblasts*) transformés avec l'oncogène H-Ras V12. TRAF2 est un adaptateur moléculaire permettant le recrutement de cIAP1 dans des plateformes de signalisation. Elle se lie sous forme de trimère au domaine BIR1 de cIAP1. La mutation ou la déplétion de ce domaine inhibe la croissance tumorale et la formation de métastases. L'expression d'un domaine BIR1 isolé force l'agrégation de TRAF2 et suffit à stimuler la croissance tumorale. Le binôme cIAP1/TRAFF2 stimulate l'activation des voies de signalisation ERK1/2 (*Extracellular signal-Regulated Kinase*) et NF- $\kappa$ B (*Nuclear Factor  $\kappa$ B*). L'activation de NF- $\kappa$ B stimule la production d'IL-6, menant à l'activation autocrine de la voie STAT3 (*Signal Transducers and Activators of Transcription 3*) /JAK (*Janus Kinase*). L'utilisation du niclosamide, un inhibiteur de l'activation de STAT3, inhibe la croissance tumorale des MEF exprimant cIAP1 mais n'a pas d'effet sur les MEF exprimant le mutant de cIAP1 déplété de son domaine BIR1, dans un modèle de xénogreffe chez la souris. Ces résultats montrent pour la première fois l'importance de la voie JAK/STAT3 dans les propriétés oncogéniques de cIAP1/TRAFF2. La suite de mes travaux de thèse a porté sur l'étude du rôle du binôme cIAP1/TRAFF2 dans le développement de la fibrose pulmonaire. Dans un modèle murin de fibrose pulmonaire induite à la bléomycine, l'utilisation du GDC-0152, un antagoniste des IAP, inhibe le développement de la maladie. Le développement de la fibrose pulmonaire est étroitement lié au TGF- $\beta$  (*Transforming Growth Factor- $\beta$* ). Pour la première fois, un rôle de cIAP1 dans les processus cellulaires médiés par le TGF- $\beta$  a été démontré. La déplétion de cIAP1 ou de TRAF2 bloque les processus cellulaires médiés par le TGF- $\beta$  : il inhibe l'expression des marqueurs terminaux de différenciation mésenchymateuse et inhibe les différentes voies de signalisation, canonique ou non canonique activées par la cytokine. Une interaction entre cIAP1 et le récepteur TGFBR2 (*TGF- $\beta$  Receptor 2*) a été détectée. L'ensemble de ces données mettent en évidence de nouvelles propriétés oncogéniques et pro-fibrosantes de cIAP1 dépendantes de son interaction avec TRAF2.

**Mots clés :** Signalisation cellulaire, IAP, TRAF2, TGF- $\beta$ , STAT3, Fibrose

## Analysis of the oncogenic and pro-fibrotic properties of cIAP1/TRAFF2

cIAP1 (*cellular Inhibitor of Apoptosis*) is an important regulator of cellular and molecular signaling belonging to the IAP (*Inhibitor of Apoptosis*) family. It interacts with its partners through its BIR domain (*Baculovirus IAP repeat*) and has a RING domain (*Really interesting New Gene*) conferring an E3 ubiquitin ligase activity. cIAP1 participates in various functions such as inflammation, differentiation, migration and cell proliferation. Expression abnormalities have been detected in various types of cancers and are often associated with poor prognosis and resistance to chemotherapy. Over-expression of cIAP1 was found in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. My research project aimed to analyze the oncogenic and pro-fibrotic properties of cIAP1. My thesis work has shown that its interaction with its partner TRAF2 (*TNF Receptor-Associated Factor 2*) is essential for cIAP1's oncogenic properties in a model of Mouse Embryonic Fibroblasts transformed with the H-Ras V12 oncogene. TRAF2 is a molecular adaptor allowing the recruitment of cIAP1 in signaling platforms. TRAF2 trimer binds to the BIR1 domain of cIAP1 and mutation or depletion of this domain inhibited tumor growth and metastases formation. The expression of an isolated BIR1 domain forced the aggregation of TRAF2 and was sufficient to stimulate tumor growth. cIAP1/TRAFF2 stimulated the activation of ERK1/2 (*Extracellular signal-Regulated Kinase*) and NF- $\kappa$ B (*Nuclear Factor  $\kappa$ B*) signaling pathways. The activation of NF- $\kappa$ B stimulated the production of IL-6, leading to autocrine activation of STAT3 (*Signal Transducers and Activators of Transcription 3*) /JAK (*Janus Kinase*) pathway. Niclosamide, an inhibitor of STAT3 activation, inhibited tumor growth of MEF expressing cIAP1 but had no effect on MEF expressing the cIAP1 mutant depleted from its BIR1 domain in a xenograft model in mice. These results showed for the first time the importance of JAK/STAT3 pathway in the oncogenic properties of cIAP1/TRAFF2. The rest of my thesis work focused on the study of the role of cIAP1/TRAFF2 in the development of pulmonary fibrosis. In a mouse model of pulmonary fibrosis induced by bleomycin, the use of GDC-0152, an IAP antagonist, inhibited the disease development. The development of pulmonary fibrosis is closely related to TGF- $\beta$  (*Transforming Growth Factor- $\beta$* ). For the first time, a role of cIAP1 in cellular processes mediated by TGF- $\beta$  has been demonstrated. Depletion of cIAP1 blocked cellular processes mediated by TGF- $\beta$ . In addition, the expression of a cIAP1 mutant without E3 ubiquitin ligase activity or BIR1 domain also inhibited these cellular processes. The latter are dependent of the canonical and alternative signaling pathways of TGF- $\beta$ . Depletion of cIAP1 blocked the activation of these signaling pathways. An interaction between cIAP1 and the TGFBR2 (*TGF- $\beta$  Receptor 2*) was detected by GST pull-down and co-immunoprecipitation. All these data highlight new oncogenic and pro-fibrotic properties of cIAP1 dependent on its interaction with TRAF2.

**Keywords:** Cell signaling, IAP, TRAF2, TGF- $\beta$ , STAT3, Fibrosis

## Sommaire

<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>18</b>
<b>I. Préambule .....</b>	<b>19</b>
<b>II. cIAP1 et la famille des IAP .....</b>	<b>20</b>
A. Historique des IAP .....	20
B. Structure et fonction de cIAP1 .....	21
1. Domaine BIR .....	21
2. Domaine CARD .....	22
3. Domaine UBA .....	22
4. Le domaine RING et l'activité E3 ubiquitine ligase .....	23
a) <i>Le processus d'ubiquitination .....</i>	23
b) <i>Fonctions du domaine RING .....</i>	25
c) <i>Régulation de cIAP1 par la protéine SMAC/DIABLO .....</i>	26
C. L'importance de l'homologie de structure entre cIAP1 et cIAP2 .....	27
D. cIAP1 dans les cancers humains .....	28
1. Surexpression de cIAP1 dans les cancers .....	28
2. Importance de la localisation nucléaire de cIAP1 .....	29
3. Le cas particulier du myélome multiple .....	29
4. Thérapie ciblée à base de SMAC mimétiques .....	30
a) <i>Le développement des SMAC mimétiques .....</i>	30
b) <i>Les SMAC mimétiques en monothérapie .....</i>	31
c) <i>Les thérapies combinées .....</i>	32
<b>III. La protéine TRAF2 et la famille des TRAF .....</b>	<b>35</b>
A. La famille des TRAF .....	35
B. Structure des protéines de la famille des TRAF .....	36
1. Le domaine TRAF .....	36
2. Le domaine RING et l'activité E3 ubiquitine ligase .....	37
C. TRAF2, un adaptateur moléculaire au service des récepteurs .....	38
1. TRAF2 et les récepteurs de la superfamille du TNF .....	39
2. TRAF2 et les PRR .....	39
a) <i>TRAF2 et les TLR .....</i>	40
b) <i>TRAF2 et les NLR .....</i>	40
c) <i>TRAF2 et les RLR .....</i>	41

3.	TRAF2 et les récepteurs aux cytokines.....	41
D.	TRAF2 dans les différentes pathologies .....	42
1.	TRAF2 dans les cancers.....	42
a)	<i>TRAF2 et son activité pro-tumorale</i> .....	42
b)	<i>TRAF2 et son activité anti-tumorale</i> .....	43
2.	TRAF2 et les maladies inflammatoires.....	43
3.	Les thérapies anti-TRAF2 .....	43
<b>IV.</b>	<b>TRAF2 et cIAP1 dans la signalisation cellulaire.....</b>	<b>45</b>
A.	cIAP1 et TRAF2, des partenaires historiques .....	45
B.	Les voies de signalisation NF-κB et des MAPK .....	46
1.	La voie NF-κB .....	46
a)	<i>Les voies NF-κB canonique et non canonique</i> .....	46
b)	<i>La régulation de IKK<math>\gamma</math> par cIAP1</i> .....	46
c)	<i>Régulation de la voie NF-κB non canonique par cIAP1/TRAF2</i> .....	47
2.	Les MAPK.....	48
a)	<i>Les différentes voies des MAPK</i> .....	48
b)	<i>Régulation des MAPK ERK1, 2 et 5 par cIAP1</i> .....	49
C.	La régulation du récepteur TNFR1 .....	50
1.	Activation des voies NF-κB et des MAPK induites par le TNFR1 .....	51
a)	<i>Formation du complexe I</i> .....	51
b)	<i>Rôle de TRAF2 et cIAP1 dans le complexe 1</i> .....	51
2.	Recrutement de LUBAC et activation de NF-κB et des MAPK .....	52
3.	La régulation de la mort cellulaire .....	53
a)	<i>Formation du complexe IIa</i> .....	53
b)	<i>Le ripoptosome</i> .....	54
c)	<i>Le nécrosome et le déclenchement de la nécroptose</i> .....	54
4.	Régulation des processus d'ubiquitination médiés par le TNFR1.....	56
D.	Stimulation des autres récepteurs de la famille du TNF et activation de la voie NF-κB non canonique .....	57
1.	Activation des récepteurs de la famille du TNF .....	57
2.	Régulation de la voie canonique de NF-κB par le TNFR2 .....	57
3.	Régulation des MAPK.....	58
E.	La régulation des PRR par cIAP1 et TRAF2.....	59
1.	La régulation des TLR.....	59
a)	<i>Régulation du TLR4</i> .....	59
b)	<i>Régulation du TLR3</i> .....	61
2.	La régulation des NLR .....	62

a)	<i>NOD1 et NOD2</i> .....	62
b)	<i>Régulation de l'inflamasome</i> .....	62
3.	La régulation des RLR .....	63
4.	Le cas particulier de IKK $\epsilon$ .....	64
5.	La régulation des récepteurs aux cytokines par TRAF2 .....	64
a)	<i>TRAF2 et l'IL-17R</i> .....	64
b)	<i>TRAF2 et l'IFN de type I</i> .....	65
c)	<i>TRAF2 et le récepteur à l'IL-6</i> .....	65
F.	Localisation nucléaire de cIAP1 et régulation des facteurs de transcription .....	66
1.	Régulation du programme transcriptionnel.....	66
2.	Régulation du cycle cellulaire.....	67
a)	<i>Régulation de p21</i> .....	67
b)	<i>Régulation du facteur de transcription E2F1</i> .....	67
G.	Régulation de la migration et de la motilité cellulaire .....	68
H.	Régulation du stress du réticulum endoplasmique .....	70
1.	TRAF2 dans le stress du réticulum endoplasmique .....	70
2.	cIAP1 et la régulation de CHOP .....	71
I.	Régulation de l'autophagie et de la mitophagie .....	72
1.	Régulation de l'autophagie.....	72
2.	Régulation de la mitophagie par TRAF2 .....	72
J.	TRAF2 et la voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine .....	73
<b>V. Le TGF-<math>\beta</math> et ses voies de signalisation</b>	.....	<b>75</b>
A.	Le TGF- $\beta$ et sa superfamille .....	75
B.	Activation du TGF .....	76
C.	Les récepteurs au TGF- $\beta$ .....	77
D.	Les voies de signalisation du TGF- $\beta$ .....	78
1.	La voie de signalisation canonique .....	78
a)	<i>Structure des protéines SMAD</i> .....	79
b)	<i>Activation des protéines SMAD par le TGF-<math>\beta</math></i> .....	80
c)	<i>Rôles des I-SMAD</i> .....	81
2.	Les voies de signalisation indépendantes des SMAD .....	81
a)	<i>L'activation des voies de signalisation des MAPK</i> .....	81
b)	<i>Régulation des Rho GTPases</i> .....	83
c)	<i>Activation de la voie de signalisation PI3K/Akt</i> .....	84
d)	<i>Activation de STAT3/JAK</i> .....	85
E.	Régulation des voies de signalisation du TGF- $\beta$ .....	85
1.	Les processus d'endocytose des récepteurs .....	85

2. Les processus de phosphorylation/déphosphorylation .....	87
3. La régulation par des processus d'ubiquitination.....	87
F. Le rôle ambigu du TGF- $\beta$ dans le développement tumoral.....	88
G. TGF- $\beta$ et fibrose pulmonaire idiopathique.....	88
<b>RÉSULTATS ET DISCUSSION.....</b>	<b>90</b>
<b>I. Analyse du rôle de TRAF2 dans les propriétés oncogéniques de cIAP1 ..</b>	<b>91</b>
<b>II. Discussion sur les propriétés oncogéniques de cIAP1 et TRAF2.....</b>	<b>112</b>
A. Les mécanismes des propriétés oncogéniques de cIAP1 .....	112
B. L'agrégation de TRAF2 et ses propriétés oncogéniques .....	113
C. Les voies de signalisation régulées par l'interaction entre cIAP1 et TRAF2 .....	115
1. Le rôle des récepteurs dans l'activité de cIAP1/TRAF2.....	115
2. La régulation des MAPK ERK1/2 .....	116
3. La voie de signalisation NF- $\kappa$ B canonique .....	116
4. La voie de signalisation NF- $\kappa$ B non canonique .....	117
5. L'interaction cIAP1/TRAF2 régule l'activation de STAT3.....	118
D. Récapitulatif des propriétés oncogéniques du binôme cIAP1/TRAF2.....	121
<b>III. Le rôle de cIAP1 et TRAF2 dans la fibrose pulmonaire et la signalisation médiée par le TGF-<math>\beta</math> .....</b>	<b>123</b>
A. Le GDC-0152 bloque le développement de la fibrose pulmonaire .....	124
1. Le GDC-0152 inhibe l'apparition de la fibrose pulmonaire <i>in vivo</i> .....	124
2. Le GDC-0152 possède un effet curatif sur le développement de la fibrose pulmonaire <i>in vivo</i> .....	128
B. Le TGF- $\beta$ provoque la surexpression de cIAP1 .....	129
C. Le binôme cIAP1/TRAF2 régule les processus biologiques médiés par le TGF- $\beta$ .....	131
1. cIAP1 et TRAF2 régulent l'activité du TGF- $\beta$ .....	131
2. L'action de cIAP1 sur les effets du TGF- $\beta$ est dépendante de son interaction avec TRAF2 et de son activité E3 ubiquitine ligase .....	133
3. Le système ubiquitine/protéasome régule les processus cellulaires médiés par le TGF- $\beta$ .....	134
D. cIAP1 régule les voies canoniques et alternatives du TGF- $\beta$ .....	135
1. cIAP1 est nécessaire à l'activation des MAPK et NF- $\kappa$ B par le TGF- $\beta$ .....	135
2. cIAP1 régule l'activation de la voie canonique du TGF- $\beta$ .....	137
E. cIAP1 interagit avec les récepteurs au TGF- $\beta$ et régule leur quantité à la membrane .....	138

<b>IV. Discussion sur le rôle de cIAP1 dans la fibrose pulmonaire et les voies de signalisation médiées par le TGF-β .....</b>	<b>143</b>
A.    Les IAP dans la fibrose .....	143
B.    Le rôle de cIAP1 et TRAF2 dans l'action du TGF-β.....	144
1.    L'expression cellulaire des IAP médiée par le TGF-β.....	144
2.    cIAP1 dans les processus cellulaires médiés par le TGF-β.....	144
3.    Le rôle de l'interaction entre cIAP1 et TRAF2 .....	145
4.    L'activité E3 ubiquitine ligase de cIAP1.....	146
5.    cIAP1 et les voies de signalisation du TGF-β.....	147
6.    cIAP1/TRAF2 et les récepteurs TGFBR1 et 2 .....	148
a) <i>La localisation cellulaire de TRAF2 .....</i>	148
b) <i>cIAP1 et son interaction avec le TGFBR2 .....</i>	149
<b>V. Conclusions et perspectives.....</b>	<b>150</b>

## **ANNEXES ..... 152**

<b>I. Résultats annexes : Développement d'inhibiteurs du domaine BIR2 de XIAP .....</b>	<b>153</b>
A.    L'AlphaScreen permet de détecter l'interaction entre le domaine BIR2 de XIAP et l'AVPI.....	154
B.    Le criblage des molécules a permis la sélection de 22 molécules potentiellement inhibitrices de l'interaction .....	155
C.    6 molécules inhibent efficacement l'interaction entre le BIR2 de XIAP et l'AVPI.....	156
<b>II. Matériel et méthodes.....</b>	<b>159</b>
<b>III. Revue : <i>IAP-mediated protein ubiquitination in regulating cell signaling</i>.....</b>	<b>161</b>
<b>IV. Revue : <i>Cross Kingdom Immunity: The Role of Immune Receptors and Downstream Signaling in Animal and Plant Cell Death</i>.....</b>	<b>190</b>
<b>V. Revue : <i>Cytoplasmic and Nuclear Functions of cIAP1</i>.....</b>	<b>212</b>

## **BIBLIOGRAPHIE ..... 232**

## Liste des figures

<b>Figure 1</b> : Représentation de la structure des membres de la famille des IAP .....	20
<b>Figure 2</b> : Structure du domaine UBA de cIAP2.....	23
<b>Figure 3</b> : La réaction d'ubiquitination et les différentes chaînes d'ubiquitine.....	25
<b>Figure 4</b> : Fonction de la protéine SMAC/DIABLO .....	27
<b>Figure 5</b> : Structure du motif AVPI de SMAC/DIABLO et des SMAC mimétiques utilisés en essai clinique .....	31
<b>Figure 6</b> : Structure des membres de la famille des TRAF.....	36
<b>Figure 7</b> : Représentation des domaines TRAF .....	37
<b>Figure 8</b> : La dimérisation des domaines RING forme des ponts pour stabiliser les réseaux de trimères de TRAF.....	38
<b>Figure 9</b> : Principaux récepteurs recrutant TRAF2 .....	42
<b>Figure 10</b> : Schéma de l'interaction entre cIAP1 et TRAF2.....	45
<b>Figure 11</b> : Les voies de signalisation NF-κB .....	47
<b>Figure 12</b> : Schéma récapitulatif des différentes voies des MAPK.....	49
<b>Figure 13</b> : Régulation des voies ERK1/2 et ERK5 par cIAP1 .....	50
<b>Figure 14</b> : Rôle de cIAP1 et TRAF2 dans l'activation de NF-κB et des MAPK par le TNFR1 .....	53
<b>Figure 15</b> : Régulation des voies de mort cellulaire médiées par le TNFR1.....	55
<b>Figure 16</b> : Régulation des processus d'ubiquitination en réponse à l'activation du TNFR1 .....	56
<b>Figure 17</b> : Régulation des voies NF-κB canonique et non canonique par le TNFR2 .....	58
<b>Figure 18</b> : Régulation des MAPK par le TNFR2 et CD40 .....	59
<b>Figure 19</b> : Régulation de la signalisation du TLR4 par cIAP1 et TRAF2.....	61
<b>Figure 20</b> : Régulation du TLR3 par cIAP1 et 2 .....	62
<b>Figure 21</b> : Régulation des NLR et RLR par cIAP1 et TRAF2.....	64
<b>Figure 22</b> : Régulation de la voie IL-6 par TRAF2.....	66
<b>Figure 23</b> : Régulation de cdc42 par TRAF2 et cIAP1/2 .....	70
<b>Figure 24</b> : Régulation du stress du réticulum endoplasmique par TRAF2 .....	71
<b>Figure 25</b> : Régulation de la mitophagie par cIAP1 et TRAF2.....	73
<b>Figure 26</b> : Régulation de la voie Wnt/β-caténine par TRAF2 .....	74
<b>Figure 27</b> : Activation du TGF-β .....	77
<b>Figure 28</b> : Structure des SMAD .....	79

<b>Figure 29</b> : Activation de la voie canonique du TGF- $\beta$ .....	80
<b>Figure 30</b> : Activation des MAPK en réponse au TGF- $\beta$ .....	83
<b>Figure 31</b> : Régulation des Rho GTPases par le TGF- $\beta$ .....	84
<b>Figure 32</b> : Activation de PI3K/Akt par le TGF- $\beta$ .....	85
<b>Figure 33</b> : Les processus d'endocytose des récepteurs du TGF- $\beta$ .....	86
<b>Figure 34</b> : STAT3 dans les propriétés oncogéniques de l'interaction entre cIAP1 et TRAF2 .....	93
<b>Figure 35</b> : Le domaine BIR2 est nécessaire aux propriétés migratoires de cIAP1 .....	113
<b>Figure 36</b> : La voie de signalisation classique de l'IL-6 .....	119
<b>Figure 37</b> : Effet du GDC sur la voie de l'IL-6 dans les cellules A549 .....	121
<b>Figure 38</b> : Rôle de cIAP1/TRAF2 dans le modèle de MEF transformées avec H-Ras V12 .....	121
<b>Figure 39</b> : Surexpression de cIAP1 dans des échantillons de poumons fibrosés .....	123
<b>Figure 40</b> : Structure du GDC-0152 et du Debio 1143 .....	125
<b>Figure 41</b> : Le GDC-0152 inhibe l'apparition de la fibrose pulmonaire .....	127
<b>Figure 42</b> : Le GDC-0152 inhibe efficacement le développement de la fibrose pulmonaire .....	129
<b>Figure 43</b> : Le TGF- $\beta$ induit la surexpression de cIAP1 .....	130
<b>Figure 44</b> : La dépléction de cIAP1 inhibe les processus cellulaires médiés par le TGF- $\beta$ .....	132
<b>Figure 45</b> : Le rôle de cIAP1 sur les processus biologiques médiés par le TGF- $\beta$ est dépendant de son interaction avec TRAF2 et de son activité E3 ubiquitine ligase .....	135
<b>Figure 46</b> : cIAP1 régule l'activation des voies alternatives du TGF- $\beta$ .....	136
<b>Figure 47</b> : cIAP1 régule la voie de signalisation canonique du TGF- $\beta$ .....	138
<b>Figure 48</b> : cIAP1 interagit avec le récepteur TGFB2 à la suite d'une stimulation au TGF- $\beta$ .....	140
<b>Figure 49</b> : cIAP1 régule l'activation des voies de signalisation du TGF- $\beta$ .....	141
<b>Figure 50</b> : Rôle de XIAP dans les voies de signalisation médiées par le TGF- $\beta$ .....	148
<b>Figure 51</b> : Représentation schématique de la technique AlphaScreen.....	154
<b>Figure 52</b> : Les concentrations optimales du domaine BIR2 de XIAP et de l'AVPI sont de 30 nM .....	155
<b>Figure 53</b> : Sélection des molécules inhibant efficacement l'interaction entre le domaine BIR2 de XIAP et l'AVPI .....	156
<b>Figure 54</b> : Exemple d'effet-doses réalisés pour les 22 molécules sélectionnées.....	157

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1</b> : Les SMAC mimétiques en essai clinique de phase II.....	33
<b>Tableau 2</b> : Tableau récapitulatif des facteurs de transcriptions régulés par cIAP1 .....	68
<b>Tableau 3</b> : Récapitulatif de l'ensemble des IC <sub>50</sub> déterminés pour les 22 molécules sélectionnées.....	157

## Liste des Abréviations

Act1	NF-κB Activator 1
ALK1	Activin receptor-Like Kinase 1
ASK1	Apoptosis Signal-regulating Kinase 1
BAX	Bcl-2–Associated X
BIR	Baculoviral IAP Repeat
BMP	Bone Morphogenetic Protein
CARD	CAspase Recruitment Domain
CD40	Cluster Differentiation 40
cdc42	cell division cycle 42
CDK	Cyclin-Dependent Kinase 1
CHIP	Carboxyl terminus Hsp70/90 Interacting Protein
ChIP	Chromatin ImmunoPrecipitation
CHOP	C/EBP Homologue Protein
cIAP	cellular Inhibitor of Apoptosis
co-SMAD	common-mediator SMAD
C-RAF	RAF proto-oncogene serine/threonine-protein kinase
CREB	CAMP Response Element-Binding protein
CtBP2	C-terminal Binding Protein 2
CYLD	Cylindromatosis
DAMP	Danger-Associated Molecular Pattern
DD	Death Domain
DIABLO	Direct IAP-Binding protein with LOw PI
DR	Death Receptor
DUB	DeUbiquitinating enzyme
E2F	E2 promoter binding Factor 1
EGF	Epidermal Growth Factor
ERK	Extracellular signal-Regulated Kinase
FADD	Fas-Associated protein with Death Domain
FN14	Fibroblast growth factor-inducible protein 14
FPI	Fibrose Pulmonaire Idiopathique
GAP	GTPase-Activating Protein
GDI	Guanine nucleotide Dissociation Inhibitor
GDP	Guanosine 5'-DiPhosphate
GEF	Guanine nucleotide Exchange Factor

GTP	Guanosine-5'-TriPhosphate
HOIP	HOIL-1 (Heme-Oxidized IRP2 ubiquitin Ligase 1) -Interacting Protein
Hsp	Heat shock protein
IAP	Inhibitor of Apoptosis
IBM	IAP Binding Motif
IFN	Interféron
IFNAR1	IFN-Alpha/beta Receptor 1
IKK	Inhibitor of κB Kinase
IL	InterLeukine
ILP-2	Inhibitor of apoptosis protein-related-Like Protein 2
IRE1α	Inositol-Requiring Enzyme 1α
IRF	Interferon Regulatory Factor
I-SMAD	Inhibitor-SMAD
IVM	IVerMectin
IκBα	NF-κB Inhibitor α
JAK	Janus Kinase
JNK	c-Jun N-terminal Kinase
KO	Knock-Out
LAP	Latency-Associated Peptide
LBA	Lavage BronchoAlvéolaire
LDA	LiquiDambaric Acid
LGP2	Laboratory of Genetics and Physiology 2
LLC	Large Latent Complex
LPS	LipoPolySaccharide
LRR	Leucine-Rich Repeat
LTBP	Latent TGF-β Binding Protein
LTβR	LymphoToxin β Receptor
LUBAC	Linear Ubiquitin Assembly Complex
Mad1	Mitotic arrest deficient 1
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MAPKKK	MAPK kinase kinase
MAVS	Mitochondrial AntiViral Signaling adaptor
MCV	Molluscum Contagiosum Virus
MDA5	Melanoma Differentiation-Associated protein 5
MEF	Mouse Embryonic Fibroblast
MEKK	MAPK/ERK Kinase Kinase

MH1	Mad Homology 1
ML-IAP	MeLanoma Inhibitor of Apoptosis
MLKL	Mixed Lineage Kinase domain-Like pseudokinase
MMP	Matrix MetalloProteinase
mTOR	mechanistic Target Of Rapamycin
MyD88	Myeloid Differentiation primary response 88
NAIP	Neuronal Apoptosis Inhibitor Protein
NEMO	NF-κB Essential MOdulator
NF-κB	Nuclear Factor κB
NIK	NF-κB Inducing Kinase
NLR	NOD Like Receptor
NOD	Nucleotide binding Oligomerization Domain-containing protein
NR4A1	Nuclear Receptor subfamily 4 group A member 1
PAI-1	Plasminogen Activator Inhibitor-1
PAK2	P21-Activated Kinase 2
PAMP	Pathogen-Associated Molecular Pattern
Par6	Partitioning defective protein 6
Pi3k	Phospholnositide 3-Kinases
PINK1	PTEN-Induced putative Kinase 1
PPP1R15A	Protein PhosPhatase 1 Regulatory subunit 15A
PRR	Pattern Recognition Receptor
Rac1	Rac Family Small GTPase 1
RANK	Receptor Activator of Nuclear factor κB
Ras	Rat sarcoma
RHIM	RIP Homotypic Interaction Motif
RIG-1	Retinoic acid-Inducible Gene 1
RING	Really Interesting New Gene
RIPK1	Receptor-Interacting serine/threonine-Protein Kinase 1
RLR	RIG-1 Like Receptor
ROS	Reactive Oxygen Species
R-SMAD	Receptor-associated SMAD
SARA	SMAD Anchor for Receptor Activation
ShcA	Scr homology domain-22 containing-transforming protein C1
siRNA	small interfering RiboNucleic Acid
SLC	Small Latent Complex
SMAC	Second Mitochondria-derived Activator of Caspase
SMURF	SMAD Ubiquitin Regulatory Factor 1

SPHK1	SPHingosine Kinase 1
Src	SRC Proto-Oncogene
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
TAB	TAK1-Binding protein
TAK	TGF- $\beta$ -Activated Kinase 1
TCF4	Transcription Factor 4
TEM	Transition Épithélio-Mésenchymateuse
TGFBR	TGF- $\beta$ receptor
TGF- $\beta$	Transforming Growth Factor- $\beta$
Th17	T helper 17
TLR	Toll-Like Receptor
TNFR	Tumor Necrosis Factor Receptor
TNF $\alpha$	Tumor Necrosis Factor $\alpha$
TNIK	TRAF2 And NCK Interacting Kinase
TRADD	TNFR1-Associated Death Domain Protein
TRAF	TNF Receptor-Associated Factor
TRAIL	Tumor-necrosis-factor Related Apoptosis Inducing Ligand
TRIF	Toll-interleukin 1 Receptor domain-containing adaptor inducing IFN- $\beta$
TSP1	ThromboSPondin 1
UBA	UBiquitin-Associated
UBC	UBiquitin-Conjugating enzyme
UPR	Unfolded Protein Response
VGL-4	VestiGial-Like 4
WT	Wild Type
XIAP	X-Linked Inhibitor Of Apoptosis
YAP	Yes-Associated Protein 1
$\alpha$ -SMA	$\alpha$ -Smooth Muscle Actin

# **INTRODUCTION**

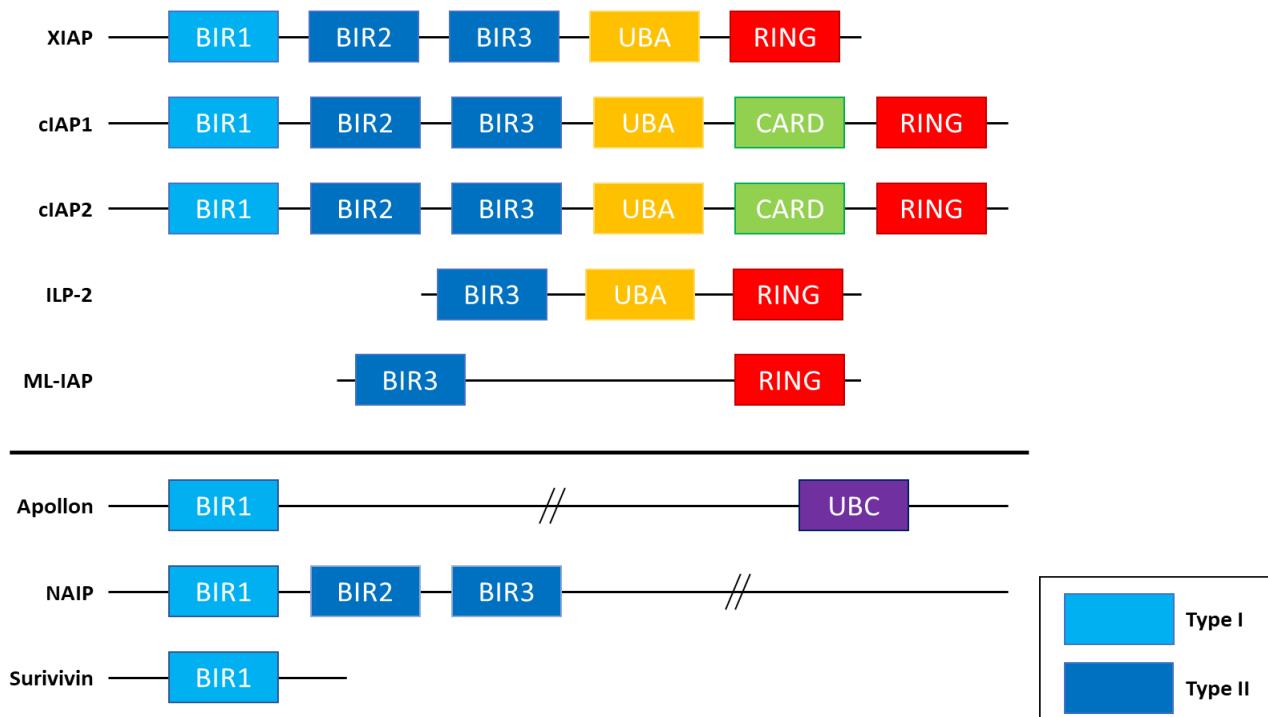
## I. Préambule

Le cancer représente la deuxième cause de mortalité dans le monde après les maladies cardio-vasculaires (OMS, 2021). L'INCa (Institut National du Cancer) définit le cancer comme une maladie provoquée par la transformation de cellules qui deviennent anormales et prolifèrent de façon excessive. Elles finissent par former une masse nommée tumeur maligne. Les cellules cancéreuses ont tendance à envahir les tissus voisins et à se détacher de la tumeur. Elles migrent alors par les vaisseaux sanguins et les vaisseaux lymphatiques pour aller former une autre tumeur appelée métastase. Les cancers les plus meurtriers sont ceux du poumon, du côlon et du foie. La lutte contre cette maladie est donc devenue un enjeu majeur de la recherche médicale. Sa prise en charge a considérablement évolué ces 15 dernières années avec le développement de molécules capables de neutraliser directement les anomalies cellulaires à l'origine du développement tumoral. Des cibles thérapeutiques très prometteuses sont les protéines de réponse au stress cellulaire, que les cellules cancéreuses utilisent pour s'adapter à un environnement cellulaire pas toujours très favorable et échapper à la surveillance immunitaire. Elles sont aussi des facteurs importants de résistance des cellules cancéreuses aux traitements chimiothérapeutiques. Parmi ces protéines, notre équipe s'intéresse plus spécifiquement aux protéines de la famille des IAP (*Inhibitors of Apoptosis*) et à leur rôle dans le cancer et la fibrose pulmonaire. Dans cette famille, cIAP1 (*cellular Inhibitor of Apoptosis 1*) joue un rôle décisionnaire dans la mise en place d'une réponse appropriée des cellules (survie, différenciation, inflammation ou mort cellulaire) à la suite d'une stimulation des récepteurs de la superfamille des TNFR (*Tumor Necrosis Factor Receptors*), de certains PRR (*Pattern Recognition Receptors*) ou récepteurs de cytokines (Dumétier, Zadoroznyj et Dubrez, 2020). Des travaux effectués dans mon équipe d'accueil ont montré que cIAP1 pouvait contrôler aussi la réponse des cellules à un endommagement de l'ADN (Acide DésoxyriboNucléique) (Cartier *et al.*, 2011; Glorian *et al.*, 2017; Allègre *et al.*, 2018). De nombreuses anomalies d'expression de cIAP1 ont été observées dans différents types de cancers et sa surexpression a souvent été corrélée à un mauvais pronostic, faisant de cette protéine une cible de choix pour les traitements anti-cancéreux. Des inhibiteurs pharmacologiques ciblant les IAP ont donc été développés et sont actuellement testés en essais cliniques, seuls ou en combinaison avec d'autres agents chimiothérapeutiques ou de la radiothérapie. Le sujet de ma thèse porte sur l'analyse des propriétés oncogéniques et pro-fibrosantes de l'interaction entre cIAP1 et son partenaire historique TRAF2 (*TNF Receptor-Associated Factor 2*). Les propriétés pro-fibrosantes de cette interaction seront étudiées par l'intermédiaire de l'étude des voies de signalisation médiées par le TGF- $\beta$  (*Transforming Growth Factor- $\beta$* ). L'introduction de ce manuscrit présentera pour commencer la protéine cIAP1 puis la protéine TRAF2. Les rôles de ces protéines dans les différentes voies de signalisation seront ensuite abordés. Pour conclure cette introduction, le TGF- $\beta$  ainsi que ses différentes voies de signalisation seront développés.

## II. cIAP1 et la famille des IAP

### A. Historique des IAP

Les IAP constituent une famille de protéines caractérisées par la présence d'au moins un domaine BIR (*Baculoviral IAP Repeat*), retrouvées dans de nombreux organismes tels que les virus, les levures, les insectes ou les mammifères. Elles ont été identifiées au départ chez le baculovirus en tant que protéines virales permettant d'inhiber la mort cellulaire dans les cellules d'insecte afin de permettre la réPLICATION du virus (Crook, Clem et Miller, 1993; Seshagiri et Miller, 1997). Elles ont ensuite été observées chez le nématode, le papillon, la drosophile ou les mammifères mais pas chez les plantes (il y a présence en revanche de protéines dites « *IAP-like* ») (Cao *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2011). La première IAP découverte chez les mammifères a été NAIP (*Neuronal Apoptosis Inhibitor Protein*). L'étude de gènes impliqués dans l'amyotrophie spinale a mis en évidence l'importance de NAIP dans l'inhibition de l'apoptose de motoneurones (Roy *et al.*, 1995; Duckett *et al.*, 1996). Chez les mammifères, 8 membres possédant tous au moins un domaine BIR ont été découverts : cIAP1, cIAP2 (*Cellular Inhibitor of Apoptosis 2*) XIAP (*X-Linked Inhibitor Of Apoptosis*), ILP-2 (*Inhibitor of apoptosis protein-related-Like Protein 2*), ML-IAP (*MeLanoma Inhibitor of Apoptosis*), NAIP, Apollon et la survivine. Ces protéines ont été identifiées en premier lieu comme étant des inhibiteurs de l'apoptose mais ce sont avant tout des régulateurs de la signalisation cellulaire (Berthelet et Dubrez, 2013; Dubrez et Rajalingam, 2015; Kocab et Duckett, 2016). Elles possèdent toutes au moins un domaine BIR et la plupart d'entre elles présentent en C-ter un domaine RING (*Really Interesting New Gene*) leur conférant une activité E3 ubiquitine ligase (Figure 1).



**Figure 1 : Représentation de la structure des membres de la famille des IAP.** Les membres de la famille des IAP possèdent entre 1 et 3 domaines BIR impliqués dans les interactions avec leurs partenaires. Ces

derniers sont divisés en deux types : les domaines de type II (en bleu foncé) possèdent une poche hydrophobe permettant d'interagir avec le motif IBM (*IAP Binding Motif*) de leurs partenaires et les domaines de type I (en bleu clair) ne possèdent pas cette poche. Cinq d'entre elles présentent un domaine RING en C-terminal leur conférant une activité E3 ubiquitine ligase. cIAP1 et cIAP2 arborent un domaine CARD impliqué dans la régulation de leur activité E3 ligase et leur stabilité. cIAP1, cIAP2, XIAP et ILP-2 présentent un domaine UBA (*UBiquitin-Associated*) permettant la fixation de molécules d'ubiquitine. Apollon possède un domaine UBC (*UBiquitin-Conjugating enzyme*) lui conférant une fonction E2/E3 ubiquitine ligase.

## B. Structure et fonction de cIAP1

### 1. Domaine BIR

L'ensemble des protéines de la famille des IAP possède entre 1 et 3 domaines BIR positionnés en N-terminal, impliqués dans les interactions avec leurs partenaires protéiques. Ce sont des structures en doigts de zinc composés d'environ 80 acides aminés structurés en trois feuillets  $\beta$  et entre 4 et 5 hélices  $\alpha$  stabilisées par un atome de zinc (Birnbaum, Clem et Miller, 1994; Hinds *et al.*, 1999; Sun *et al.*, 1999). Trois résidus cystéine et un résidu histidine sont conservés, permettant la conjugaison de l'atome de zinc (Srinivasula et Ashwell, 2008). Ces domaines sont divisés en deux types distincts :

- Les domaines BIR de type II : Ils forment une poche hydrophobe sur laquelle va pouvoir se lier un motif peptidique de 4 acides aminés appelé IBM (*IAP binding motif*) (Wu *et al.*, 2000; Silke et Meier, 2013). La principale caractéristique de ce motif est la présence d'un résidu alanine et pour certains d'entre eux un résidu sérine qui interagit avec la poche hydrophobe. Ce motif est retrouvé dans l'extrémité N-terminale de la sous-unité de certaines caspases ou dans les antagonistes des IAP (Liu *et al.*, 2000; Srinivasula *et al.*, 2001; Scott *et al.*, 2005; Choi *et al.*, 2009). Des modes d'interaction alternatifs existent aussi : le domaine BIR3 de cIAP1 peut fixer certains de ses partenaires avec un IBM non conventionnel (Kurakin et Bredesen, 2007) et la protéine ARTS est capable de se lier au BIR3 de XIAP indépendamment de l'IBM (Bornstein *et al.*, 2011). Les domaines BIR de type II sont essentiels aux propriétés anti-apoptotiques de XIAP, permettant à ce dernier d'interagir avec les caspases 3, 7 et 9 et de les inhiber (Abbas et Larisch, 2020). cIAP1 et 2 peuvent aussi interagir avec les caspase 7 et 9 par leur domaine BIR de type II mais ne semblent en revanche pas pouvoir les inhiber (Eckelman et Salvesen, 2006).
- Les domaines BIR de type I : Les domaines BIR1 de XIAP et cIAP1/2 possèdent des résidus positifs, altérant la formation de la poche hydrophobe et bloquant l'interaction avec les protéines arborant un motif IBM. Ils n'interagissent donc pas avec les caspases et antagonistes des IAP. En revanche, ils interagissent de manière différente avec d'autres acteurs des voies de signalisation cellulaire (Samuel *et al.*, 2006; Lu *et al.*, 2007). Par exemple, ce domaine est primordial à l'interaction entre cIAP1 et son principal partenaire TRAF2 (Samuel *et al.*, 2006). Cette interaction sera développée plus en profondeur dans la partie [\*\*IV.A\*\*](#).

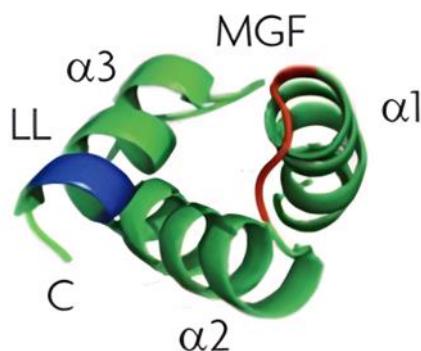
## 2. Domaine CARD

Le domaine CARD (*Caspase Recruitment Domain*) est un petit domaine protéique impliqué dans les interactions entre les protéines. Il fait partie des domaines de mort et a été décrit dans un premier temps dans les caspases. Ce domaine joue un rôle important dans le recrutement de protéines au sein de complexes et donc dans les voies de signalisation telles que NF-κB (*Nuclear Factor κB*). Il est retrouvé dans de nombreux médiateurs apoptotiques tels que la caspase 9 ou APAF-1 (*Apoptotic Peptidase Activating Factor 1*) et dans des médiateurs inflammatoires tels que la caspase 1 et NOD2 (*Nucleotide binding Oligomerization Domain-containing protein 2*) (Bouchier-Hayes et Martin, 2002). Il est composé de six hélices  $\alpha$  antiparallèles, un cœur central hydrophobe et de deux surfaces distinctes composées respectivement de résidus acides et basiques (Weber et Vincenz, 2001). Ces derniers permettent la formation d'interactions homotypiques entre les protéines retrouvées dans des complexes protéiques tels que l'apoptosome, l'inflammasome ou le NODosome. Le domaine CARD de cIAP1 n'est en revanche pas impliqué dans la formation d'interactions homotypiques (Lopez *et al.*, 2011). Ce phénomène pourrait s'expliquer par la position du domaine CARD au sein de cIAP1 comparé aux autres protéines arborant ce domaine. cIAP1 présente ce domaine au milieu de sa structure alors que les protéines formant des interactions homotypiques avec leur domaine CARD le présentent à leur extrémité N-terminale ou C-terminale (Jiang et Lin, 2012). Le domaine CARD de cIAP1 stabilise cette dernière en inhibant son activité E3-ubiquitine ligase. En effet, la présence d'acides aminés chargés positivement à la surface du domaine CARD maintient cIAP1 dans une configuration fermée inactive. Cette configuration empêche la dimérisation de son domaine RING, la transition vers une forme ouverte active, le recrutement d'enzymes E2 et son auto-ubiquitination induisant sa propre dégradation (Lopez *et al.*, 2011). Il possède aussi un NES (*Nuclear Export Signal*) régulant la localisation de cIAP1 (Plenchette *et al.*, 2004). De plus, les travaux de l'équipe du docteur Mosley ont montré l'importance du domaine CARD de cIAP1 dans le déclenchement de l'apoptose induite par BAX (*Bcl-2-Associated X*). L'épissage alternatif du gène murin codant pour cIAP1 génère une protéine cIAP1 tronquée de son domaine CARD. L'expression dans des cellules 293T de ce variant inhibe l'apoptose induite par l'expression de BAX plus efficacement que la forme totale de cIAP1. La perte de ce domaine semble aussi bloquer la capacité de cIAP1 à activer la voie NF-κB (Mosley et Keri, 2006).

## 3. Domaine UBA

Le domaine UBA fait le lien entre le domaine BIR3 et le domaine RING de plusieurs IAP possédant 3 domaines BIR comme cIAP1, cIAP2 et XIAP. Il possède une structure compacte composée de trois hélices  $\alpha$  et va interagir directement avec les molécules d'ubiquitine. Cette interaction se fait par l'intermédiaire d'une région hydrophobe composée de deux motifs conservés : un motif MGF (Met/Leu-Gly-Phe/Tyr) situé en C-terminal de la première hélice  $\alpha$  et un motif LL (Leu-Leu/Val) situé à la fin de la troisième hélice  $\alpha$  (Swanson, Hicke et Radhakrishnan, 2006; Tse *et al.*, 2011) (Figure 2). Le domaine UBA de cIAP1 lie de la mono-ubiquitine ainsi que des molécules

d'ubiquitine de type K48 et K63 (Blankenship *et al.*, 2008; Gyrd-Hansen *et al.*, 2008) et une mutation du motif MGF abolit entièrement la fixation des molécules d'ubiquitine (Blankenship *et al.*, 2008). Il facilite l'ubiquitination de cIAP1 en favorisant l'interaction avec les enzymes E2 et régule ainsi son activité E3 ubiquitine ligase (Budhidarmo et Day, 2014). De plus, les travaux de l'équipe du professeur Meier ont démontré que le domaine UBA joue un rôle sur les propriétés oncogéniques de cIAP1 en favorisant l'inhibition de la mort cellulaire induite par RIPK1 (*Receptor-Interacting serine/threonine-Protein Kinase 1*) (Annibaldi *et al.*, 2018) et en favorisant les voies de survie cellulaire (Gyrd-Hansen *et al.*, 2008).



**Figure 2 : Structure du domaine UBA de cIAP2.** Repris de Hansen et Meier, « IAPs: from caspase inhibitors to modulators of NF- $\kappa$ B, inflammation and cancer », *Nature Reviews Cancer*, 2010 (Gyrd-Hansen et Meier, 2010).

#### 4. Le domaine RING et l'activité E3 ubiquitine ligase

Sur les 8 protéines humaines de la famille des IAP, 5 possèdent en C-terminal un domaine RING (Dumétier, Zadoroznyj et Dubrez, 2020). Il est en doigt de zinc et est composé d'environ 40 acides aminés. Il possède une séquence consensus composée de 8 résidus cystéine et histidine permettant la conjugaison de deux atomes de zinc. C'est ce domaine qui permet aux IAP de conjuguer des molécules d'ubiquitine à leurs partenaires.

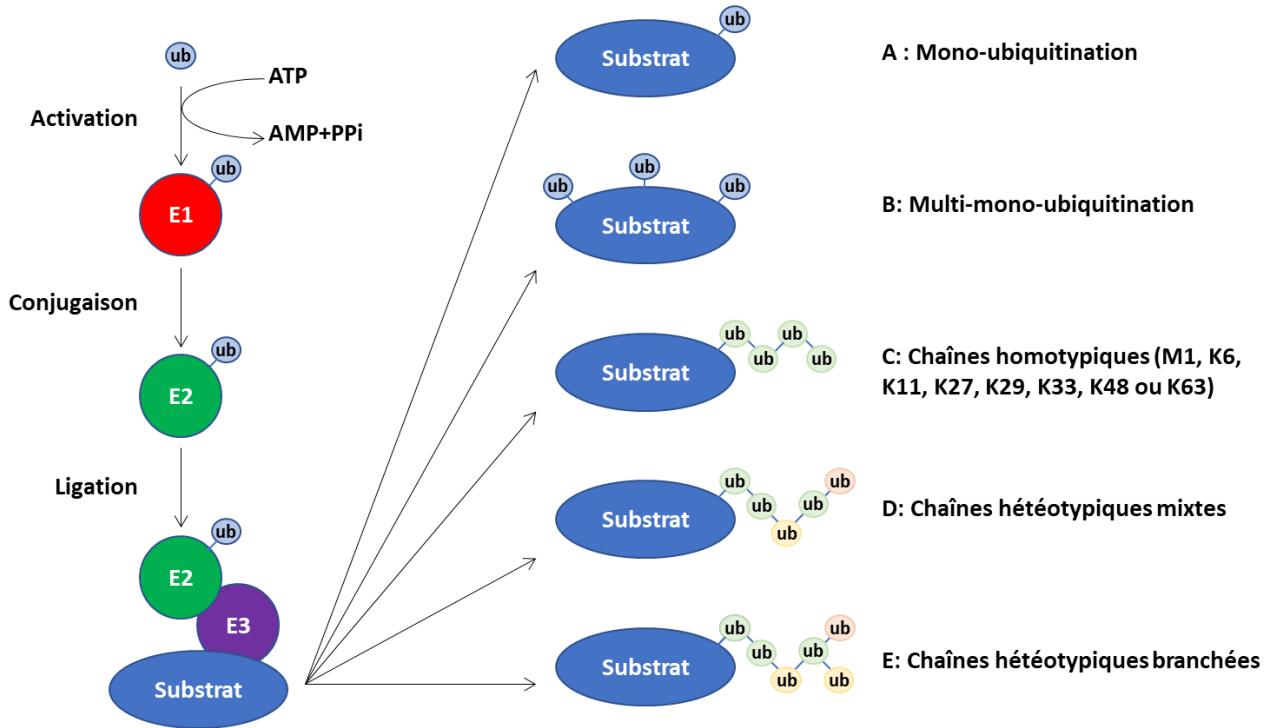
##### a) Le processus d'ubiquitination

L'ubiquitination est une modification post-traductionnelle initialement décrite comme étant la principale méthode pour réguler la demi-vie des protéines ou induire la dégradation de protéines défectueuses. Ces recherches, réalisées sur la dégradation des protéines médiée par l'ubiquitine, ont mené au prix Nobel 2004 pour Aaron Ciechanover, Avram Hershko et Irvin Rose. À la suite de cette récompense, les recherches sur ce domaine ont pris beaucoup d'ampleur et ont permis de mettre en évidence un système beaucoup plus complexe impliqué aussi bien dans la dégradation des protéines que dans leur activation ou leur localisation, jouant ainsi un rôle dans de nombreuses voies de signalisation cellulaire.

L'ubiquitine est une petite protéine ubiquitaire de 76 acides aminés qui peut se fixer de façon covalente aux protéines. La conjugaison de molécules d'ubiquitine implique le recrutement de trois

enzymes appelées E1 (*ubiquitin-activating enzyme*), E2 (*ubiquitin-conjugating enzyme*) et E3 (*ubiquitin protein-ligase*). Dans certains cas, une quatrième enzyme E4 peut aussi être impliquée (Hoppe, 2005). L'ubiquitine est dans un premier temps sujette à un processus d'activation, consistant à son transfert au niveau du site actif d'une enzyme E1 de manière dépendante de l'ATP. Elle est ensuite transférée à un résidu cystéine de l'enzyme E2. L'enzyme E3 recrute l'enzyme E2 et la protéine cible, et induit le transfert de l'ubiquitine vers un résidu lysine de cette protéine (Zheng et Shabek, 2015). Actuellement, uniquement deux enzymes E1, une trentaine d'enzymes E2 et plus de 600 enzymes E3 sont connues. Les molécules d'ubiquitine se lient à leurs substrats par une interaction entre leur domaine C-terminal et le groupe amine de la lysine, sur un site (mono-ubiquitination) ou plusieurs sites (multi-mono-ubiquitination) de la protéine. Elles peuvent aussi se lier les unes aux autres par leurs résidus lysine. Elles en possèdent sept (K6, K11, K27, K29, K33, K48, K63) qui peuvent tous former des liaisons covalentes avec d'autres molécules d'ubiquitine et former ainsi des chaînes d'ubiquitine (poly-ubiquitination) du type des résidus lysine impliqués (Dumétier, Zadoroznyj et Dubrez, 2020). Elles ont aussi la faculté de se lier entre elles par une interaction N-terminal/C-terminal et former ainsi une chaîne linéaire de type M1 (Kirisako *et al.*, 2006). Ces chaînes sont classifiées en fonction du type de lien entre les molécules d'ubiquitine :

- Chaînes homotypiques : les molécules d'ubiquitine sont liées les unes aux autres uniformément *via* le même type d'interaction (M1, K6, K11, K27, K29, K33, K48, K63).
- Chaînes hétérotypiques : les molécules d'ubiquitine sont liées les unes aux autres *via* différents types de fixation. Ces chaînes sont classées en deux catégories :
  - Mixtes : les molécules d'ubiquitine de la chaîne ne sont modifiées que sur un seul site récepteur.
  - Branchées : au moins une molécule d'ubiquitine de la chaîne est modifiée sur deux sites récepteurs ou plus (Figure 3).



**Figure 3 : La réaction d'ubiquitination et les différentes chaînes d'ubiquitine.** Dans un premier temps, l'ubiquitine est sujette à un processus d'activation, consistant à son transfert au niveau du site actif d'une enzyme E1 de manière dépendante de l'ATP puis est transférée à l'enzyme E2. L'enzyme E2 se lie à l'enzyme E3 qui catalyse la fixation de l'ubiquitine sur son substrat pour former différents types d'ubiquitination : A. Mono-ubiquitination : une seule molécule d'ubiquitine est conjuguée au substrat. B. Multi-mono-ubiquitination : une seule molécule d'ubiquitine est conjuguée sur plusieurs sites du substrat. C. Chaînes homotypiques : plusieurs molécules d'ubiquitine sont liées les unes aux autres uniformément via le même type d'interaction. D. Chaînes hétéotypiques mixte : plusieurs molécules d'ubiquitine sont liées les unes aux autres via différents types de fixation. Chaque ubiquitine n'est modifiée que sur un site récepteur. E. Chaînes hétéotypiques branchées : au moins une molécule d'ubiquitine de la chaîne est modifiée sur deux sites récepteurs ou plus.

Cette grande variété permet aux chaînes d'ubiquitine d'accomplir de nombreuses fonctions différentes. Par exemple, les protéines conjuguées avec une chaîne homotypique K48 sont adressées au protéasome pour dégradation. À l'inverse, les chaînes homotypiques de type M1 ou K63 jouent plutôt un rôle dans la stabilité et le recrutement des protéines sur les plateformes de signalisation (Pickart et Fushman, 2004; Feltham, Khan et Silke, 2012; Akutsu, Dikic et Bremm, 2016).

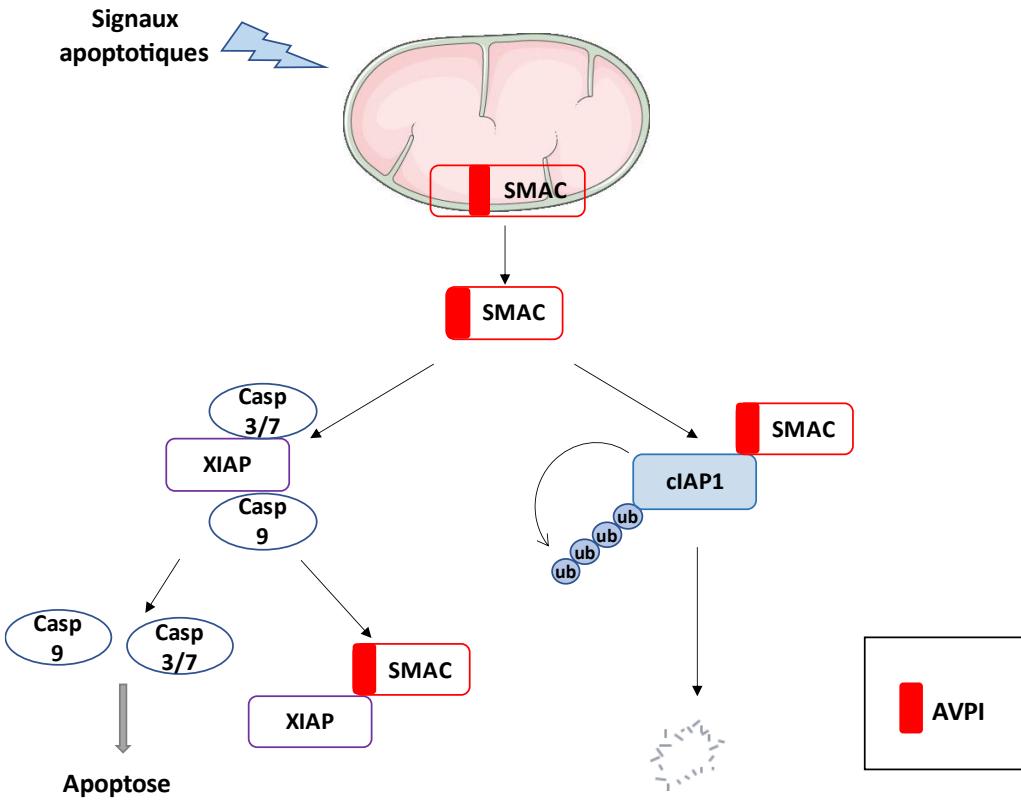
### b) Fonctions du domaine RING

Le domaine RING confère une activité E3 ubiquitine ligase aux IAP. Ces dernières vont donc pouvoir recruter des enzymes E2 afin de transférer des molécules d'ubiquitine à leurs partenaires protéiques recrutés à l'aide de leurs domaines BIR. Pour cela, la dimérisation du domaine RING est nécessaire (Mace *et al.*, 2008; Feltham *et al.*, 2011) et est réalisée à partir de l'extrémité C-terminale de ce domaine. En effet, une étude de mutagénèse réalisée par l'équipe du professeur Vaux a mis en évidence l'importance des 13 acides aminés suivant le domaine RING en C-terminal dans la dimérisation des IAP (Silke *et al.*, 2005a). Sous leur forme monomérique, les IAP sont stables mais

inactives. Une analyse cristallographique des domaines UBA, CARD, RING et BIR3 de cIAP1 a démontré que cette dernière, sous sa forme monomérique, est repliée et séquestre le domaine RING en son cœur et ne peut donc pas jouer son rôle d'E3 ligase (Dueber *et al.*, 2011). La fixation d'une E2 ligase est possible mais ne suffit pas à induire sa dimérisation et donc le transfert de l'ubiquitine (Feltham *et al.*, 2011; Phillips *et al.*, 2014). De la même manière que le domaine CARD, le domaine BIR3 semble être capital au maintien de cIAP1 sous sa forme monomérique. De plus, une étude réalisée sur les HEK293 (cellules embryonnaires de rein humain) dans lesquelles cIAP1 a été surexprimée a permis de mettre en évidence la capacité de cIAP1 à induire sa propre dégradation par le protéasome en s'auto-ubiquitinant, ce qui pourrait démontrer sa capacité à se dimériser spontanément. En revanche, l'expression de TRAF2, une protéine appartenant à la famille des TRAF interagissant avec le domaine BIR1 de cIAP1, stabilise cIAP1 et bloque son auto-ubiquitination et donc sa dégradation (Csomos, Brady et Duckett, 2009).

### c) Régulation de cIAP1 par la protéine SMAC/DIABLO

La protéine mitochondriale SMAC (Second Mitochondria-derived Activator of Caspases) aussi appelée DIABLO (*Direct IAP-Binding protein with Low PI*) est l'antagoniste endogène des IAPs. Des expériences de co-immunoprecipitation ont démontré sa capacité à interagir à la fois avec XIAP ainsi que cIAP1 et 2 (Du *et al.*, 2000; Verhagen *et al.*, 2000). SMAC/DIABLO est séquestrée dans les mitochondries mais, en cas d'induction de l'apoptose, est libérée dans le cytosol. Le clivage protéolytique de la séquence de criblage mitochondrial de 55 acides aminés à son extrémité N-terminal expose une séquence IBM de quatre acides aminés hydrophobes (AVPI) qui peut interagir avec les domaines BIR2 et BIR3 de XIAP et cIAP1/2 (Liu *et al.*, 2000; Verhagen *et al.*, 2000). Dans le cadre d'une interaction avec XIAP, le domaine IBM de SMAC/DIABLO entre en compétition avec celui des caspases 3 et 7 pour le domaine BIR2 et de la caspase 9 pour le domaine BIR3, bloquant ainsi leurs inhibitions et favorisant le déclenchement de l'apoptose (Ekert *et al.*, 2001; Suzuki, Nakabayashi et Takahashi, 2001; Huang *et al.*, 2003; Kulathila *et al.*, 2009; Hui *et al.*, 2011). Une interaction de SMAC/DIABLO ou de SMAC mimétiques (des composés mimant l'action de SMAC/DIABLO) avec cIAP1 stimule sa dimérisation, son activation, son auto-ubiquitination et donc sa dégradation (Yang et Du, 2004; Dueber *et al.*, 2011) (Figure 4). De façon inverse, le KO (*knock-out*) de SMAC dans un modèle murin de cancer du côlon augmente le taux de cIAP1. De plus, le taux de SMAC/DIABLO est inversement proportionnel à la progression de cancer du côlon humain (Qiu *et al.*, 2013).



**Figure 4 : Fonction de la protéine SMAC/DIABLO.** La protéine SMAC/DIABLO est une protéine mitochondriale. L'arrivée de signaux apoptotiques induit sa sortie de la mitochondrie et le clivage des 55 premiers acides aminés en N-terminal, permettant l'exposition de son motif AVPI. Ce motif habilite SMAC à interagir avec les protéines de la famille des IAP possédant des domaines BIR de type II. Son interaction avec XIAP libère les caspases et induit le déclenchement de l'apoptose. Sa liaison avec cIAP1 déclenche l'activation et l'auto-ubiquitination de cIAP1, ayant pour conséquence la dégradation par le protéasome de cIAP1.

### C. L'importance de l'homologie de structure entre cIAP1 et cIAP2

Au sein de la famille des IAP, cIAP1 et cIAP2 présentent une très forte homologie structurale (Figure 1). Elles se rapprochent également de XIAP, mais à la différence de cette dernière, elles possèdent un domaine CARD ainsi que certaines différences importantes dans leurs domaines BIR. Par exemple, cIAP1 et 2 ont, au sein de leur domaine BIR3, certains résidus incompatibles avec l'inhibition de la caspase 9 (Eckelman et Salvesen, 2006). Ces importantes similarités structurales entre cIAP1 et cIAP2 leur confèrent une certaine redondance de fonction. Elles interagissent avec de nombreuses protéines en commun telles que TRAF2 et sont donc très souvent impliquées dans les mêmes voies de signalisation (Dumétier, Zadoroznyj et Dubrez, 2020), qui seront développées plus en profondeur dans la partie **IV**. Par exemple, Mahoney *et al.* ont démontré que la déplétion de cIAP1 ou cIAP2 ne bloque que très peu l'activation de la voie NF- $\kappa$ B, alors que leur double inhibition diminue drastiquement l'activation de cette voie (Mahoney *et al.*, 2008). cIAP2 est même retrouvée surexprimée dans des modèles murins KO pour cIAP1, démontrant un possible système de compensation entre ces deux protéines (Conze *et al.*, 2005; Heard, Bertrand et Barker, 2015).

Pour autant, la similarité structurale de cIAP1 et cIAP2 n'empêche pas ces protéines de posséder des fonctions distinctes. cIAP1 joue par exemple un rôle important dans la régulation du cycle cellulaire en modulant l'action de E2F1 (*E2 promoter binding Factor 1*) et p21, rôle qui ne semble pas pouvoir être exercé par cIAP2 (Glorian *et al.*, 2017; Chen *et al.*, 2018). En 2012, l'équipe de Vaux a de plus démontré que la déplétion de cIAP2 et XIAP dans un modèle murin ne pose pas de problème au développement embryonnaire. À l'inverse, la double déplétion de cIAP1 et cIAP2 ou XIAP et cIAP1 conduit à la mort *in utero* seulement 10 jours après la gestation (Moulin *et al.*, 2012). cIAP1 est aussi exprimée dans la plupart des tissus humains alors que cIAP2 est principalement retrouvée dans les tissus lymphoïdes, le système urinaire et l'appareil digestif (Zadoroznyj et Dubrez, 2022).

## D. cIAP1 dans les cancers humains

### 1. Surexpression de cIAP1 dans les cancers

Les gènes codant cIAP1 et cIAP2 chez l'humain sont retrouvés à proximité l'un de l'autre sur la région du chromosome 11q21-22. Elle code aussi pour des MMP (*Matrix MetalloProteinase*) et la protéine YAP (*Yes-Associated Protein 1*). Cette région a été retrouvée amplifiée dans de nombreux cancers tels que le cancer du foie (Zender *et al.*, 2006), le carcinome mammaire (Cheng *et al.*, 2010; Pluta *et al.*, 2015), le médulloblastome (Reardon *et al.*, 1997), les cancers du poumon à petites cellules et non à petites cellules (Ferreira *et al.*, 2001; Dai *et al.*, 2003), le cancer du pancréas (Esposito *et al.*, 2007) et la leucémie lymphoïde chronique (Vallat *et al.*, 2003). L'équipe du professeur Inazawa a retrouvé une amplification de 11q21-22 dans deux lignées cellulaires dérivées d'une tumeur primaire de carcinome épidermoïde de l'œsophage. Parmi les protéines potentiellement amplifiées, seule cIAP1 a été retrouvée amplifiée dans les deux tumeurs et est associée avec une résistance aux traitements chimiothérapeutiques (Imoto *et al.*, 2001). L'analyse de cIAP1 dans 60 lignées de cancers humains par Tamm *et al.* démontre une corrélation entre la résistance des lignées cancéreuses au cisplatine et au carboplatine, à l'inhibiteur de la topoisomérase VP-16 (ou étoposide) et aux agents alkylants et le niveau de protéine cIAP1. Surprenamment, le taux de cIAP1 n'est pas corrélé avec la quantité d'ARN messager mais serait plutôt lié à une régulation de la stabilité de la protéine (Tamm *et al.*, 2000). L'analyse des cellules leucémiques de 100 patients atteints de leucémie lymphoïde chronique comparée à 27 contrôles par cytométrie en flux et *Western Blot* montre une surexpression de cIAP1 et cIAP2 et une baisse d'expression de leur antagoniste SMAC/DIABLO. Un fort taux de cIAP1 et cIAP2 et un faible taux de SMAC/DIABLO est retrouvé chez les patients atteints d'une pathologie progressive. De plus, un fort taux de survivine et de cIAP1 au début du traitement est facteur de mauvais pronostic (Grzybowska-Izydorczyk *et al.*, 2010). L'étude par immunohistochimie de 75 carcinomes épidermoïdes de la langue par Qi *et al.* révèle la présence de cIAP1 dans le cytoplasme (63% des échantillons), le noyau (51%) ou les deux (49%). Ils ont mis en évidence une corrélation entre

l'expression de cIAP1 dans ces différents compartiments avec la formation de métastases, suggérant un rôle de cIAP1 comme marqueur prédictif de la formation de métastases (Qi *et al.*, 2008).

## 2. Importance de la localisation nucléaire de cIAP1

À la différence de XIAP et cIAP2, qui sont principalement cytoplasmiques, cIAP1 est retrouvée à la fois dans le cytoplasme et dans le noyau. L'équipe du professeur Inazawa a réalisé une étude immunohistochimique sur 70 tumeurs primaires de patientes atteintes de cancer du col de l'utérus et a mis en évidence une corrélation inverse entre le taux de cIAP1 nucléaire et la survie ainsi que la durée sans récidive après un traitement radiothérapeutique, démontrant que le taux de cIAP1 nucléaire pourrait être un marqueur prédictif de la résistance aux radiothérapies (Imoto *et al.*, 2002). De la même manière, l'analyse par immunohistochimie de 102 patients atteints d'un cancer de la vessie par Che *et al.* montre la présence de cIAP1 dans le cytoplasme et le noyau. Sa présence ne semble jouer aucun rôle sur la survie ou le risque de récidive. En revanche, un taux élevé de cIAP1 nucléaire est corrélé avec un faible taux de survie, un fort taux de rechute et une expression élevée de KI67, un marqueur de prolifération, faisant de cIAP1 un marqueur de mauvais pronostic dans le cancer de la vessie (Che *et al.*, 2012). Une autre étude sur le cancer de la vessie a relié un fort taux de survivine et de cIAP1 nucléaire avec un mauvais pronostic et un risque de rechute rapide (Chen *et al.*, 2013). Les mêmes types de résultats ont été obtenus par l'équipe du docteur Matsubara par *Western Blot* et immunohistochimie sur 57 cas de carcinome épidermoïde de la tête et du cou. cIAP1 a été détectée dans la fraction nucléaire (30 % des cas) et cytoplasmique (49%). La localisation nucléaire est corrélée avec la formation de métastases, un stade avancé de la maladie et un mauvais pronostic alors que la localisation cytoplasmique semble être uniquement associée à la formation de métastases (Tanimoto *et al.*, 2005). Les propriétés de cIAP1 semblent donc dépendantes à la fois de son expression et de sa localisation.

## 3. Le cas particulier du myélome multiple

Les propriétés pro-tumorales de cIAP1 sont en général associées à sa surexpression. De manière inattendue, Keats *et al.* ont découvert une perte d'expression de cIAP1 dans certains cas de myélome multiple. Une analyse par hybridation génomique comparative sur micro-réseau d'ADN à haute résolution de 155 échantillons humains a mis en évidence une dérégulation de la voie NF-κB dans 20% des cas. De plus, des mutations causant l'inactivation de cIAP1 et 2 ainsi que TRAF2 et 3 ont été détectées, or ces dernières ont la capacité d'inhiber la voie NF-κB non canonique (Dumétier, Zadoroznyj et Dubrez, 2020). De plus, une surexpression de NIK (*NF-κB Inducing Kinase*), un acteur de l'activation de la voie NF-κB non canonique, a été recensée. Cette voie de signalisation sera développée plus en profondeur dans la partie [\*\*IV.B.1\*\*](#). Ces mutations permettent donc l'activation de la voie NF-κB non canonique induisant potentiellement le développement de la maladie (Keats *et al.*, 2007). Un essai clinique de phase 2 a analysé l'action du Bortezomib comme

étant prometteur dans des cas de myélomes multiples (Richardson *et al.*, 2003). Cette molécule est utilisée en tant qu'inhibiteur du protéasome mais des études ont montré sa capacité à inhiber la voie NF-κB (Waes, 2007). L'activation de la voie NF-κB semble donc jouer un rôle important dans le développement de myélomes multiples.

#### **4. Thérapie ciblée à base de SMAC mimétiques**

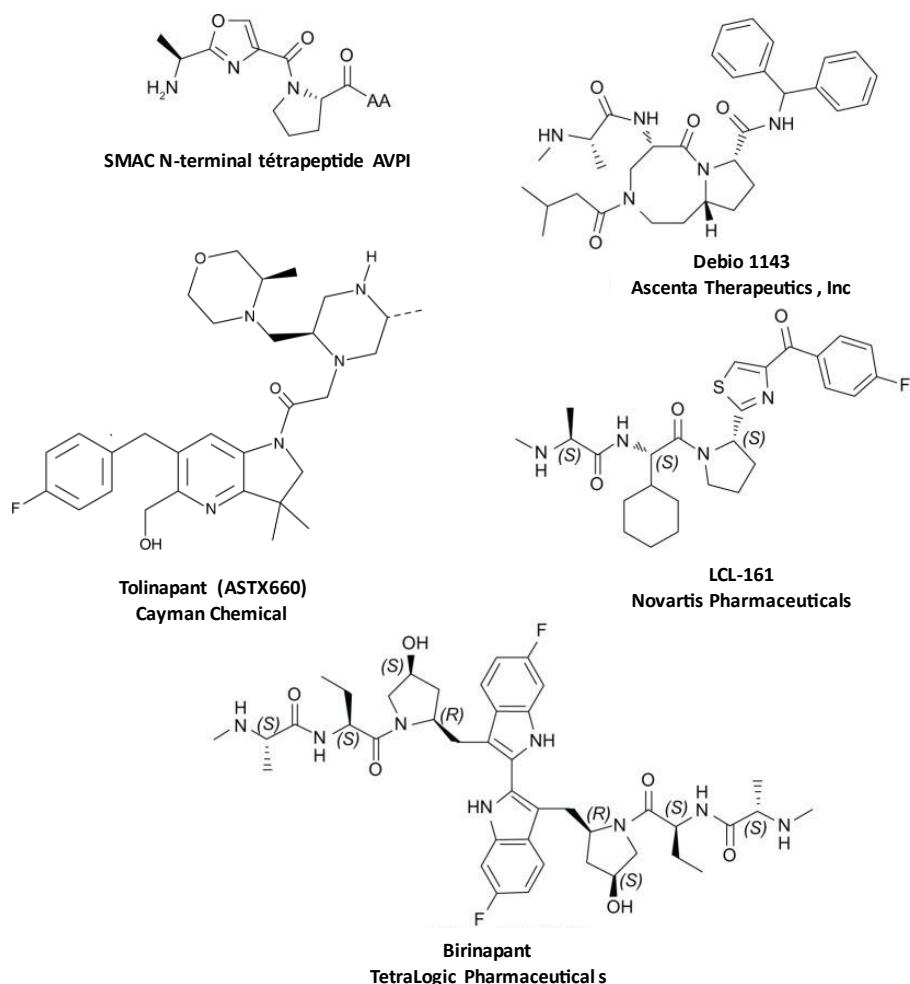
Le rôle des IAP dans de nombreux types de cancers les a mis en évidence comme potentielles cibles thérapeutiques. C'est pour cela que de nombreux SMAC mimétiques, des composés capables de mimer l'action de la protéine SMAC/DIABLO ont été développés et sont actuellement utilisés en essai clinique (phase I, II ou III).

##### **a) Le développement des SMAC mimétiques**

L'effet de SMAC/DIABLO sur XIAP ainsi que l'analyse précise du domaine d'interaction (Liu *et al.*, 2000; Shi, 2002) a mené dans un premier temps au développement de peptides de SMAC afin d'inhiber l'activité anti-apoptotique de XIAP. Fulda *et al.* ont été les premiers à mettre en évidence la capacité de ces peptides à accroître la mort cellulaire induite par TRAIL (*Tumor-necrosis-factor Related Apoptosis Inducing Ligand*) ou par des composés chimiothérapeutiques (Fulda *et al.*, 2002). Il a ensuite été démontré que ces peptides pouvaient se lier directement à XIAP, mais aussi à d'autres IAP tels que cIAP1 et ML-IAP et ainsi inhibiter leurs activités, notamment leur capacité à inhiber l'apoptose (Arnt *et al.*, 2002; Vucic *et al.*, 2002; Franklin *et al.*, 2003). Ces études ont donc été les premières à démontrer que mimer le motif AVPI de SMAC/DIABLO était une méthode efficace pour inhiber les IAP. En revanche, ces composés ne possèdent pas les propriétés pharmacologiques nécessaires pour être utilisés en clinique. C'est pour cela que de nouveaux composés appelés SMAC mimétiques, capables de mimer l'action du motif AVPI, ont été développés. Ce sont des composés capables de se fixer aux domaines BIR2 et BIR3 des IAP afin de bloquer leur activité et d'induire l'auto-ubiquitination et la dégradation de cIAP1 (Varfolomeev *et al.*, 2007; Dueber *et al.*, 2011; Feltham *et al.*, 2011).

Les SMAC mimétiques sont divisés en deux groupes : monovalents s'ils ne possèdent qu'un seul motif AVPI ou bivalents s'ils en possèdent deux (Sun *et al.*, 2008) (Figure 5). Le premier SMAC mimétique développé en 2004 par Sun *et al.* était monovalent et était 23 fois plus affin pour le domaine BIR3 de XIAP que la protéine native (Sun *et al.*, 2004). Le problème représenté par les SMAC monovalents était qu'ils ne pouvaient se lier qu'à un seul domaine BIR à la fois (en général le BIR3), or comme cela a été mentionné précédemment, les deux domaines BIR sont impliqués dans l'interaction avec les caspases. De plus, la protéine SMAC/DIABLO est active sous forme d'homodimère et il a été montré que ce dernier pouvait se fixer simultanément aux domaines BIR2 et BIR3 (Huang *et al.*, 2003). C'est pour cela que les SMAC mimétiques bivalents, capables de se lier aux deux domaines à la fois, ont été développés. Une étude réalisée sur le SMAC mimétique bivalent SM-164 a montré une efficacité plus importante que son homologue monovalent et une

capacité à induire l'apoptose à une concentration de  $1\mu\text{M}$  dans la lignée leucémique HL-60 (Sun et al., 2007).



**Figure 5 : Structure du motif AVPI de SMAC/DIABLO et des SMAC mimétiques utilisés en essai clinique.** Adapté de Dubrez et al., « IAP proteins as targets for drug development in oncology », *OncoTargets and Therapy*, 2013. (Dubrez, Berthelet et Glorian, 2013)

### b) Les SMAC mimétiques en monothérapie

Plusieurs inhibiteurs des IAP ont été ou sont actuellement testés en essais cliniques de phase II. Le LCL-161 est un SMAC mimétique bivalent testé en essai clinique. Il se lie préférentiellement à cIAP1 et induit sa dégradation mais inhibe aussi cIAP2 et XIAP. Des études *in vivo* sur des modèles de xénogreffes de tumeurs solides murines montrent une diminution de la croissance tumorale à la suite de l'administration par gavage de LCL-161 (Houghton et al., 2012). Un essai clinique de phase II sur des patients atteint de myélofibrose résistants aux inhibiteurs de JAK (*Janus kinases*) montre une réponse positive au traitement chez 30% des patients. De plus, une partie des patients ne répondant pas positivement au traitement présentent une diminution du taux de cIAP1 mais présentent également une augmentation du taux de XIAP, suggérant un nouveau mécanisme d'échappement tumoral dépendant de XIAP (Pemmaraju et al., 2018).

Le tolinapant (ASTX660) est un nouveau SMAC mimétique non peptidomimétique ayant une affinité équivalente pour cIAP1 et XIAP et conçu par l'approche *Fragment-Based Drug Design*. Cette méthode consiste à identifier des petites molécules organiques, appelées fragments, ciblant des protéines impliquées dans différentes pathologies. Ces fragments, ne présentant en général qu'une faible affinité pour leurs cibles, sont ensuite liés entre eux ou modifiés afin d'améliorer leur affinité et en faire de bons médicaments candidats. L'utilisation du tolinapant dans un essai clinique de phase I a montré une activité clinique chez les patients atteints de lymphome T tout en ne présentant que très peu d'effets indésirables (Mita *et al.*, 2020). Des essais cliniques de phase II sont en cours (NCT02503423 et NCT04362007) et montrent déjà des effets très encourageants sur les lymphomes T cutanés et périphériques (Samaniego *et al.*, 2019).

Le birinapant est un des antagonistes des IAP les plus étudiés et les plus utilisés dans les essais cliniques. C'est un SMAC mimétique bivalent pouvant se fixer à XIAP et cIAP1/2 mais qui possède une affinité beaucoup plus grande pour cIAP1. Son utilisation sur un modèle d'adénocarcinome du pancréas primaire stoppe ou diminue de façon significative la croissance tumorale (Ma *et al.*, 2012). De la même manière, il induit une rémission des leucémies aigües lymphoblastiques dans des modèles de xénogreffes (Smith *et al.*, 2012). Ces résultats ont mené à l'utilisation du birinapant en monothérapie lors d'essais cliniques et en particulier en phase II sur des cancers de l'ovaire épithéliaux ne répondant pas aux traitements à base de sels de platine. Le traitement a été bien toléré et une inhibition des IAP a été détectée. Malheureusement, aucun effet thérapeutique n'a été détecté, entraînant la fin de cet essai et incitant plutôt à la mise en place de thérapies combinées utilisant les SMAC mimétiques (Noonan *et al.*, 2016).

### c) Les thérapies combinées

L'efficacité modérée des monothérapies à base de SMAC mimétiques a mené à la mise en place de combinaisons avec d'autres traitements afin d'accroître leur efficacité. Par exemple, l'utilisation du birinapant dans un modèle de glioblastome multiforme chez la souris sensibilise les cellules à un rayonnement ionisant. Le birinapant, comme le LCL-161 ont été utilisés en étude de phase II en thérapie combinée avec plus ou moins de succès. La combinaison du birinapant avec le 5-Azacytidine, un analogue de la cytidine qui agit comme un inhibiteur de la synthèse et de la méthylation de l'ADN, n'a montré aucun effet thérapeutique et augmente même le risque d'effets secondaires graves tels que des infections ou des thrombocytopénies (Donnellan *et al.*, 2016). À l'inverse, sa combinaison avec l'irinotécan, un dérivé semi-synthétique de la camptothécine utilisé pour le traitement des cancers colorectaux, a montré des bénéfices cliniques chez les patients résistants au traitement à l'irinotécan seul (Senzer *et al.*, 2013). De la même manière, la combinaison du LCL-161 avec le paclitaxel, un agent anti-mitotique utilisé dans le traitement du cancer du sein triple négatif, semble être efficace mais possède une toxicité élevée (Parton *et al.*, 2015).

Le Debio 1143 (Xevinapant) est un SMAC mimétique monovalent ciblant XIAP et cIAP1/2. Son utilisation sur un modèle de xénogreffe de cancer d'ovaire murin sensibilise les cellules au carboplatine, un sel de platine utilisé comme agent chimiothérapeutique (Brunckhorst *et al.*, 2012). Deux études de phase II chez des patients ayant un cancer épidermoïde localement avancé de la tête et du cou ont démontré l'efficacité de la combinaison du Debio 1143 avec le cisplatine, un autre sel de platine utilisé en chimiothérapie. La première étude montre que la combinaison des deux est bien tolérée et permet d'accroître le nombre de lymphocytes T PD1 (*Programmed cell Death 1*) /PD-L1 (*PD-ligand 1*) positifs mais un marquage au Ki67 montre que la combinaison n'a pas d'effet sur la prolifération tumorale (Gomez-Roca *et al.*, 2019). La seconde étude combine ces deux agents avec un traitement radiothérapeutique. La combinaison de ces trois agents n'a pas d'effet secondaire majeur et accroît la durée de survie sans progression et le contrôle locorégional (Bourhis *et al.*, 2019). Ces résultats ont mené à la mise en place d'une étude de phase III sur les cancers épidermoïdes localement avancés de la tête et du cou, encore en cours aujourd'hui qui est actuellement la seule étude de phase III impliquant des antagonistes des IAP (Tableau 1).

**Tableau 1 : Les SMAC mimétiques en essai clinique de phase II.** Adapté de Kumar *et al.*, « The Multiple Roles of the IAP Super-family in cancer », *Pharmacology & Therapeutics*, 2020. CBPC : Cancer Bronchique à Petites Cellules, PTCL : Lymphome T périphérique, CTCL : Lymphome T cutané, ATLL : lymphome/leucémie à cellules T de l'adulte, SMD : syndrome myélodysplasique, LMMC : Leucémie MyéloMonocytaire Chronique et AZA : AZAcitidine (Kumar *et al.*, 2020).

SMAC mimétique	Type de cancer	Combinaison	Patients	Début d'inclusion	Fin d'inclusion	Statut	Référence et numéro d'essai clinique
Debio 1143	Carcinome épidermoïde de la tête et du cou	Cisplatine + radiothérapie	110	Oct 2013	Juin 2022	Complété	NCT02022098 (Bourhis <i>et al.</i> , 2019)
		Cisplatine	24	Août 2015	Juillet 2018	Complété	2014-004655-31 (Gomez-Roca <i>et al.</i> , 2019)
	Cancer solide	Nivolumab	72	Avril 2019	Mai 2022	Complété	NCT04122625
			69	Mai 2019	En cours	Recrutement	2018-003546-16
	Cancer épithelial de l'ovaire	Carboplatine + paclitaxel	35	Juin 2016	Janvier 2018	Fin anticipée	2015-005137-42
LCL-161	Myélome multiple	Cyclophosphamide	25	Nov 2013	Juin 2017	Complété	NCT01955434
	Myélofibrose	Monothérapie	40	Déc 2014	Déc 2021	Complété	NCT02098161

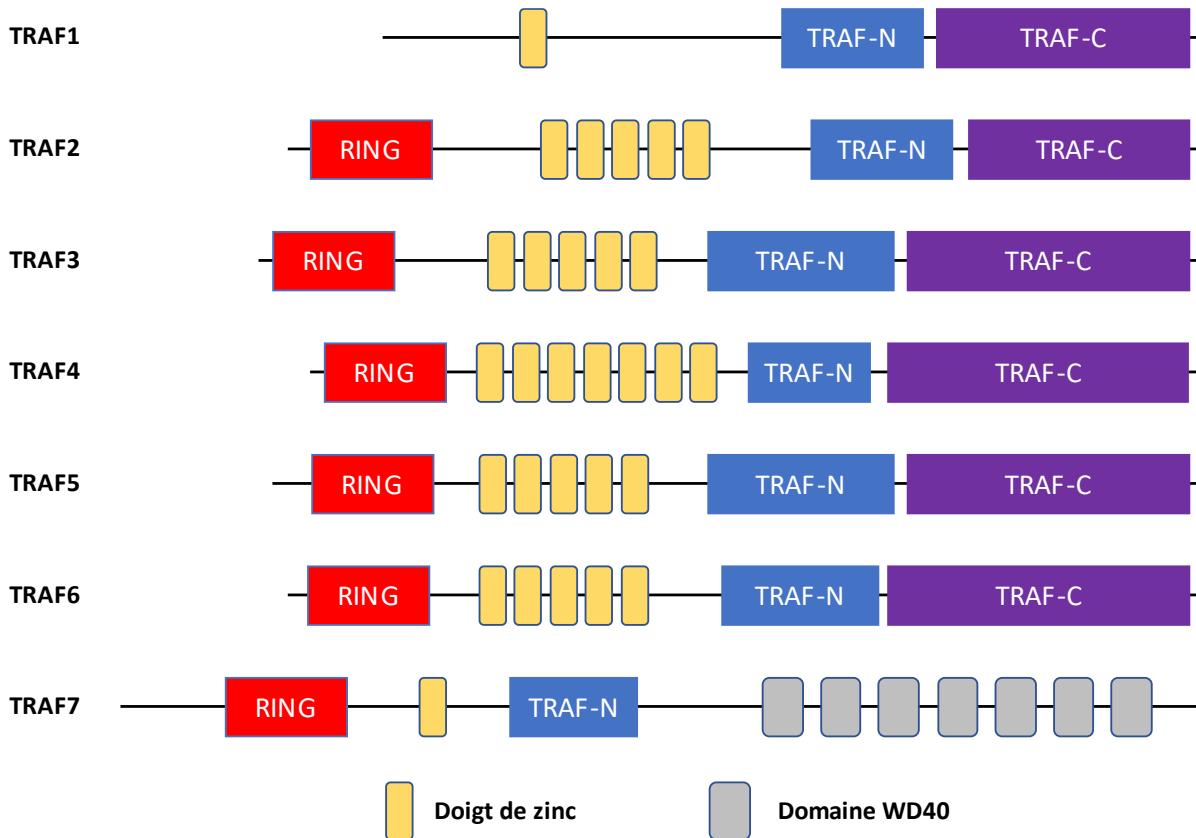
							(Pemmaraju et al., 2018)
	CBPC et cancer des ovaires	Topotecan	52	Mars 2016	Juillet 2019	Interrompue par Novartis	NCT02649673
	Cancer du sein triple négatif	Paclitaxel	209	Août 2012	Sept 2014	Complété	2012-000677-23 (Parton et al., 2015; Bardia et al., 2018)
ASTX 660	Tumeurs solides	Monothérapie	230	Juillet 2015	En cours	Active	NCT02503423 (Samaniego et al., 2019)
	PTCL, CTCL et ATLL	Monothérapie	61	Avril 2020	Sept 2024	Active	NCT04362007
Brinapant	Tumeurs solides	Pembrolizumabe	135	Août 2017	Juin 2021	Complété	NCT02587962
		Carboplatine et Paclitaxel, Irinotecan	176	Oct 2010	Mars 2014	Complété	NCT01188499 (Senzer et al., 2013)
	SMD	AZA	21	Juin 2013	Nov 2015	Complété	NCT01828346
	SMD et LMMC	AZA	118	Juin 2014	Juin 2016	Fin anticipée	NCT02147873 (Donnellan et al., 2016)
	Cancer des ovaires	Monothérapie	11	Août 2012	Avril 2014	Fin anticipée	NCT01681368 (Noonan et al., 2016)
APG-1387	Tumeurs solides avancées	Toripalimab	108	Avril 2020	Avril 2024	Recrutement	NCT04284488

### **III. La protéine TRAF2 et la famille des TRAF**

La protéine TRAF2 est la principale partenaire de cIAP1. Elle appartient à la famille des TRAF, une famille d'adaptateurs cytoplasmiques impliqués dans la transmission de signaux de nombreux récepteurs et permet donc le recrutement de cIAP1 dans les complexes de signalisation.

#### **A. La famille des TRAF**

La famille des TRAF est une famille de protéines composée de 7 membres chez les mammifères découverte au milieu des années 1990. L'équipe du docteur Goddel a étudié le récepteur TNFR2, un des deux récepteurs au TNF $\alpha$  (*Tumor Necrosis Factor  $\alpha$* ) et a ainsi identifié 4 protéines partenaires de ce récepteur. Deux d'entre elles étaient les protéines cIAP1 et cIAP2. Les deux autres correspondaient aux protéines TRAF1 et TRAF2. Elles ne présentaient pas d'homologies avec les protéines connues à l'époque mais présentaient un domaine conservé en C-terminal d'environ 200 acides aminés, qui a été nommé domaine TRAF et qui caractérise les membres de la famille des TRAF (Rothe *et al.*, 1994). Quatre autres protéines présentant ce domaine ont été découvertes et ont été nommées TRAF3, 4, 5 et 6 (Siegmund, Wagner et Wajant, 2022). Une septième protéine, TRAF7, appartient à cette famille mais sa présence est discutée, TRAF7 ne possédant qu'un domaine TRAF partiel (Xie, 2013). Ces protéines sont impliquées dans de nombreuses voies de signalisation menant à l'activation de facteurs de transcription telles que NF- $\kappa$ B, les MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinases*) et les IRF (*Interferon Regulatory Factors*), leur permettant de jouer un rôle dans de nombreuses fonctions parmi lesquelles se trouvent le développement embryonnaire, la réponse au stress et le métabolisme des os (So, Nagashima et Ishii, 2015; Yang et Sun, 2015). Le rôle majeur des TRAF est de servir d'adaptateur dans l'assemblage des plateformes de signalisation. Excepté TRAF1, toutes les protéines de cette famille possèdent en N-terminal un domaine RING suivi de 5 à 7 structures en doigt de zinc leur conférant une activité E3 ubiquitine ligase. Ces protéines régulent donc les voies de signalisation par leur activité E3 ligase et leur rôle d'adaptateur (Figure 6).



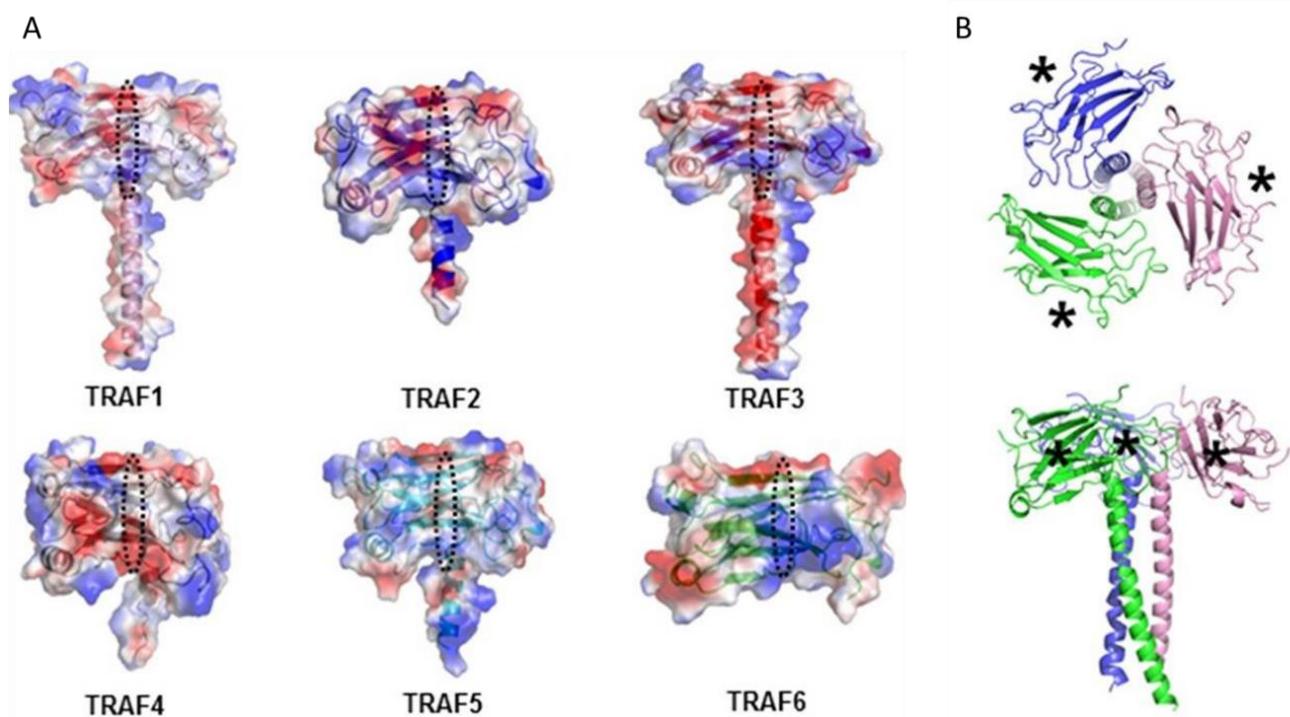
**Figure 6 : Structure des membres de la famille des TRAF.** Les protéines de la famille des TRAF sont composées d'un domaine TRAF impliqué dans les interactions entre protéines en C-terminal. Ce domaine TRAF est divisé en deux parties : une région TRAF-C impliquée principalement dans l'interaction des TRAF avec différents récepteurs et la région TRAF-N, nécessaire à la trimérisation des TRAF et à leurs interactions avec leurs partenaires protéiques. TRAF7 ne possède pas de région TRAF-C mais arbore des domaines WD40 impliqués dans les interactions protéine/protéine et protéine/ADN. Excepté TRAF1, les TRAF présentent un domaine RING en N-terminal, suivi de motifs en doigts de zinc, leur conférant une activité E3 ubiquitine ligase.

## B. Structure des protéines de la famille des TRAF

### 1. Le domaine TRAF

Le domaine TRAF est un domaine situé en C-terminal d'environ 180 acides aminés. Il est impliqué dans les interactions entre les protéines et il caractérise les membres de la famille des TRAF. Les structures du domaine TRAF de TRAF2 et TRAF6 ont été étudiées en premier par l'équipe du docteur Wu en 1999 et 2002 (Park *et al.*, 1999; Ye *et al.*, 2002). Depuis, les structures des domaines des autres protéines de cette famille ont aussi été étudiées (Zhang *et al.*, 2012; Niu *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2016). Ce domaine est divisé en deux parties : la région située du côté N-terminal en super hélice appelée TRAF-N et la région située du côté C-terminal formé de 7 à 8 feuillets  $\beta$  antiparallèles appelée TRAF-C ou MATH (*Meprin And TRAF Homology*) (Lalani *et al.*, 2018). La région TRAF-C reconnaît certaines séquences consensus des fractions cytoplasmiques des différents récepteurs ou d'autres protéines adaptatrices avec lesquelles interagissent les TRAF. Cette région est fortement conservée et uniquement de petites modifications structurales vont définir la spécificité des TRAF pour certains récepteurs (Chung *et al.*, 2007; Ely, Kodandapani et Wu, 2007).

À l'inverse, la région TRAF-N est beaucoup plus variable. Par exemple, les boucles connectant les feuillets  $\beta$ 5 et  $\beta$ 6 ainsi que  $\beta$ 6 et  $\beta$ 7 sont plus longues que celles des autres TRAF et ces légères différences pourraient être responsables des différences fonctionnelles des TRAF (Park, 2018). De plus, la région TRAF-N est impliquée dans la stabilisation des trimères de TRAF. En effet, les protéines de la famille des TRAF forment des structures homo- ou hétérotrimériques stables et fonctionnelles, stabilisées par le domaine TRAF-N, capables de se lier à des récepteurs sous forme trimérique (Rothe *et al.*, 1994; Ceccarelli *et al.*, 2015; Kim *et al.*, 2016) (Figure 7). Il a été démontré que TRAF2 pouvait s'hétérotrimériser avec TRAF1 ou TRAF3 (He *et al.*, 2004; Mace *et al.*, 2010).

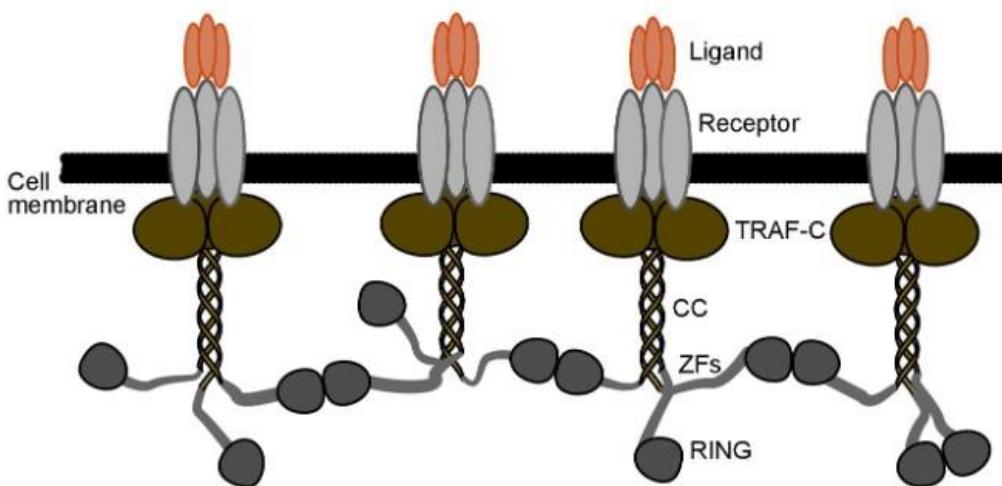


**Figure 7 : Représentation des domaines TRAF.** Schéma repris de la revue de Park : « Structure of TRAF Family: Current Understanding of Receptor Recognition », *Frontiers in Immunology*, 2018. (A) Représentation électrostatique de la surface des domaines TRAF des protéines de la famille des TRAF. Pymol a été utilisé pour calculer le potentiel électrostatique. Les régions de liaison aux récepteurs des domaines TRAF sont indiquées par des cercles en pointillés. (B) Schéma des trimères de TRAF. Les monomères sont représentés en différentes couleurs. Les vues du dessus (image supérieure) et de coté (image inférieure) sont représentées. Les astérisques représentent les domaines d'interaction avec les récepteurs (Park, 2018).

## 2. Le domaine RING et l'activité E3 ubiquitine ligase

Le domaine RING est retrouvé sur 6 des 7 protéines de la famille des TRAF : TRAF1 ne présente pas ce domaine. Il est suivi de 5 à 7 domaines à doigts de zinc. De la même manière que les IAP, ce domaine confère une activité E3 ubiquitine ligase aux TRAF. Ces dernières sont donc capables de réguler les différentes voies de signalisation par des processus d'ubiquitination. Le domaine RING a la capacité de se dimériser mais les dimères ne sont pas stables (Yin, Lamothe, *et al.*, 2009; Yin, Lin, *et al.*, 2009). Plus récemment, l'équipe du professeur Day a démontré que lors de l'interaction des trimères de TRAF avec les différents récepteurs, un réseau de trimères de TRAF

se forme, stabilisé par l'homo- ou l'hétérodimérisation des domaines RING des différents TRAF (Das *et al.*, 2021, 2022) (Figure 8). Le domaine RING de TRAF6 est le domaine RING qui a été le plus étudié chez les TRAF. Ce dernier catalyse spécifiquement la formation de chaînes de type K63 impliquées dans l'activation de voies de signalisation (Deng *et al.*, 2000; Liu et Chen, 2011). Il induit l'auto-ubiquitination de TRAF6 qui est nécessaire à l'activation de IKK (*Inhibitor of κB Kinase*) par TRAF6 et donc à l'activation de NF-κB (Lamothe *et al.*, 2007). Le domaine RING de TRAF2 semble être associé à la formation de chaînes d'ubiquitine de type K48 (Gonzalvez *et al.*, 2012; Xu *et al.*, 2017) et K63 (Vallabhapurapu *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2021). Cette activité est toutefois remise en cause dans plusieurs voies de signalisation cellulaire et en particulier dans la voie NF-κB induite par le TNF $\alpha$ . TRAF2 ne jouerait que le rôle d'adaptateur pour les IAP, et en particulier cIAP1, et ce dernier jouerait le rôle d'E3 ubiquitine ligase (Vince *et al.*, 2009; Yin, Lin, *et al.*, 2009; Silke, 2011). De plus, l'analyse cristallographique du domaine RING de TRAF2 démontre des différences structurales avec le domaine RING de TRAF6, et en particulier au niveau des acides aminés impliqués dans l'interaction avec l'enzyme E2 UBC13. Ces différences bloquent l'interaction de TRAF2 avec cette enzyme E2 et mettent en avant un potentiel rôle de TRAF2 indépendant de son activité E3 ubiquitine ligase (Yin, Lamothe, *et al.*, 2009).



**Figure 8 : La dimérisation des domaines RING forme des ponts pour stabiliser les réseaux de trimères de TRAF.** Schéma repris de l'article de Das *et al.* : « TRAF trimers form immune signalling networks via RING domain dimerization », FEBS Letters, 2022. Lors de l'interaction de ligands avec leurs récepteurs, ces derniers recrutent des trimères de TRAF. Les domaines RING de différents trimères de TRAF se dimérisent afin de stabiliser un réseau formé à partir de ces trimères (Das *et al.*, 2022).

### C. TRAF2, un adaptateur moléculaire au service des récepteurs

TRAF2 ainsi que les autres protéines de la famille des TRAF ont été décrites avant tout comme des adaptateurs moléculaires se liant, directement ou indirectement, à de nombreux

récepteurs régulant une grande variété de processus cellulaires. TRAF2 régule donc ainsi une grande panoplie de voies de signalisation qui seront décrites plus précisément dans la partie [IV](#).

## 1. TRAF2 et les récepteurs de la superfamille du TNF

TRAF2 est un adaptateur protéique détecté au niveau de nombreux récepteurs (Figure 9). Il a été découvert lors d'une étude des partenaires du récepteur TNFR2, un récepteur de la superfamille du TNF. Cette superfamille de récepteurs régule de nombreuses fonctions biologiques telles que la réponse immunitaire, l'inflammation, le développement du cerveau ou l'homéostasie des tissus (Twohig *et al.*, 2011; Cabal-Hierro et Lazo, 2012; Ward-Kavanagh *et al.*, 2016). Ces récepteurs se caractérisent par la présence d'un domaine riche en résidus cystéine impliqué dans l'interaction avec leurs ligands (Bodmer, Schneider et Tschopp, 2002). Ces récepteurs sont divisés en deux groupes :

- Les récepteurs FAS, DR4 (*Death Receptor 4*), DR5 et TNFR1, appelés aussi récepteurs de mort, présentent dans leur région intracellulaire un DD (*Death Domain*), originellement identifié chez les récepteurs TNFR1 et FAS comme étant responsable de leur fonction apoptotique (Itoh et Nagata, 1993; Tartaglia *et al.*, 1993). En fonction du contexte cellulaire, le TNFR1 conduit à l'activation de différents types de signalisation cellulaire tels que la mort par apoptose, par nécroptose ou la survie cellulaire médiée par NF-κB (Wajant et Scheurich, 2011; Dondelinger *et al.*, 2016). TRAF2 ne peut pas interagir directement avec ces récepteurs mais régule la signalisation du TNFR1 par des interactions indirectes *via* des adaptateurs : la protéine TRADD (TNFR1-Associated Death Domain Protein) interagit avec le récepteur TNFR1 et sert d'adaptateur à TRAF2, qui pourra ainsi réguler l'activité de ce récepteur (Mantané, 2011).
- La majorité d'entre eux, tels que les récepteurs CD40 (*Cluster Differentiation 40*), BAFF-R (*B-cell Activating Factor Receptor*), TNFR2, FN14 (*Fibroblast growth factor-inducible protein 14*), LT $\beta$ R (*LymphoToxin  $\beta$  Receptor*) et RANK (*Receptor Activator of Nuclear factor  $\kappa$ B*) ne possède pas ce DD mais possède des TIM (*TRAF-Interacting Motifs*) dans leur région intracellulaire (Muppidi, Tschopp et Siegel, 2004; Cabal-Hierro et Lazo, 2012), permettant à TRAF2 d'interagir directement avec une partie de ces récepteurs. Son interaction directe avec TNFR2 est la première à avoir été démontrée et est impliquée dans l'activation des voies des MAPK et NF-κB (Cabal-Hierro et Lazo, 2012). TRAF2 interagit aussi directement avec d'autres récepteurs de cette famille tels que CD40, lui permettant ainsi de réguler la voie NF-κB alternative (Hostager et Bishop, 2013).

## 2. TRAF2 et les PRR

Les membres de la famille des TRAF ont été retrouvés au niveau de certains PRR (*Pattern Recognition Receptors*) (Figure 9). Les PRR sont des protéines capables de reconnaître des PAMP (*Pathogen-Associated Molecular Pattern*), telles que les composants des membranes bactériennes et fongiques ou DAMP (*Danger-Associated Molecular Pattern*), correspondant par exemple à des

molécules libérées par des cellules endommagées. Ils sont retrouvés associés à la membrane de nombreux types cellulaires, immunitaires ou non, tels que les cellules dendritiques, les fibroblastes, les macrophages ou les cellules épithéliales mais ils sont aussi retrouvés dans le cytosol, les mitochondries et même sécrétés dans la circulation sanguine et les liquides interstitiels (Amarante-Mendes *et al.*, 2018). Les PRR sont divisés en quatre familles : les TLR (*Toll-Like Receptors*), les NLR (*NOD Like Receptors*), les RLR (*RIG-1 (Retinoic acid-Inducible Gene 1) -Like Receptors*) et les CLR (*C-type Lectin Receptors*) (Walsh *et al.*, 2013).

### **a) TRAF2 et les TLR**

La famille des TLR est la famille de récepteurs la plus étudiée parmi les PRR. Ces récepteurs possèdent un domaine LRR (*Leucine-Rich Repeat*) extra-cytoplasmique qui reconnaît les PAMP et les DAMP et induit l'homo- ou l'hétérodimérisation des TLR, permettant le recrutement des différents adaptateurs protéiques sur le domaine TIR (*Toll/IL(InterLeukin)-1 Receptor*) cytoplasmique et donc la transduction du signal. Ces récepteurs sont soit retrouvés à la membrane (TRL1, 2, 4, 5, 6 et 10) et reconnaissent les lipides et les protéines, soit dans le cytosol (TLR3, 7, 8, 9) et reconnaissent les acides nucléiques exogènes (Ostuni, Zanoni et Granucci, 2010). TRAF6 et TRAF3 sont les protéines de la famille des TRAF les mieux décrites au niveau des TLR et en particulier les TLR3 et TLR4. Ils n'interagissent pas directement avec ces récepteurs mais à partir d'adaptateurs et vont réguler les voies de signalisation déclenchées par ces derniers telles que les voies NF-κB, les MAPK et les IRF (Häcker *et al.*, 2006; Oganesyan *et al.*, 2006; Keating et Bowie, 2009). Le rôle de TRAF2 dans la régulation des TLR est moins clair mais elle semble réguler la réponse antivirale médiée par le TLR3 par l'axe GSK3β (*Glycogen Synthase Kinase 3β*) -TRAF2-Src (*SRC Proto-Oncogene*) (Ko *et al.*, 2019), ainsi que les voies de signalisation induites par l'activation du TLR4 (Jin *et al.*, 2015; Busca *et al.*, 2018; Sujitha, Dinesh et Rasool, 2018). Ces voies de signalisation seront approfondies dans la partie [\*\*IV.E.1\*\*](#). De plus, Xie *et al.* ont démontré dans un modèle de souris KO inducible pour TRAF2 l'importance de cette dernière dans la production d'IFN (Interféron) de type I dépendante des TLR3 et 4 dans certains types cellulaires tels que les cellules dendritiques, les macrophages et les MEF (*Mouse Embryonic Fibroblasts*) (Xie *et al.*, 2019).

### **b) TRAF2 et les NLR**

Les NLR sont une famille de récepteurs cytosoliques, sensibles aux PAMP et DAMP et dont la fonction est analogue aux TLR. Leur activation va par exemple induire la production de cytokines inflammatoires, d'IFN ou de ROS (*Reactive Oxygen Species*) (Philpott et Girardin, 2010). Ils sont caractérisés par la présence d'un domaine NOD central permettant la liaison aux nucléotides, un domaine LRR en C-terminal et des domaines permettant le recrutement de protéines en N-terminal tels que des domaines CARD. La protéine de la famille des IAP NAIP fait aussi partie de cette famille et présente donc des domaines BIR en N-terminal (Elinav *et al.*, 2011; Bonardi *et al.*, 2012). NOD1 et 2 sont les deux premiers récepteurs de la famille NLR découverts par l'équipe du professeur

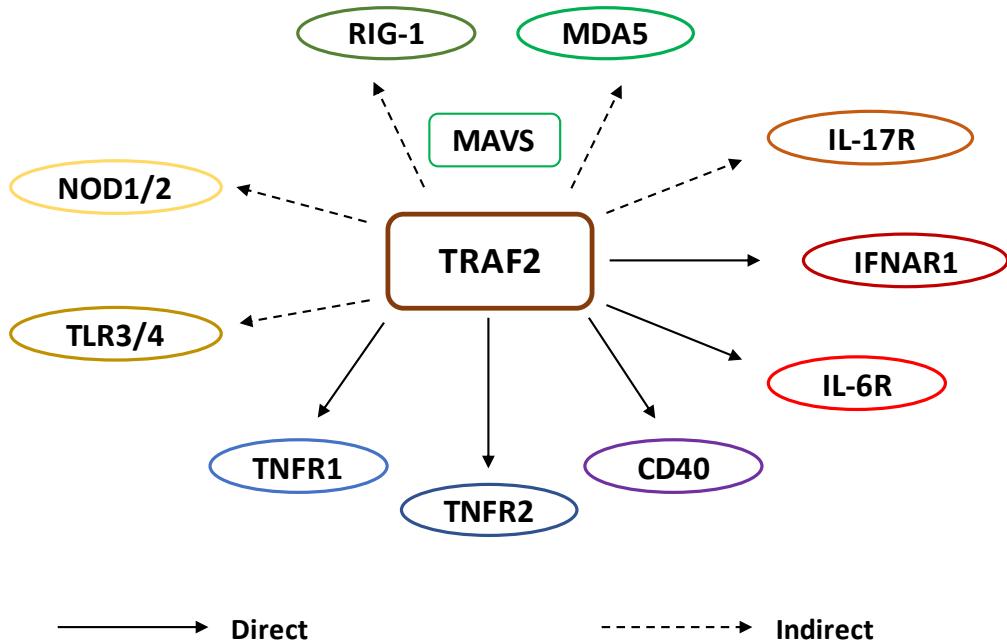
Nunez, respectivement en 1999 et 2001 (Inohara *et al.*, 1999; Ogura *et al.*, 2001). Leur stimulation par des motifs bactériens mène à l'activation de la voie NF-κB et des MAPK (Caruso *et al.*, 2014), dépendante d'une interaction indirecte avec les protéines TRAF2, 5 et 6 (Abbott *et al.*, 2007; Hasegawa *et al.*, 2008; Brodsky et Monack, 2009; Xie, 2013).

### c) TRAF2 et les RLR

La famille des RLR est une famille d'hélicases à ARN qui détectent l'ARN viral accumulé durant les infections virales. Elles sont indispensables à la réponse antivirale dans la plupart des types cellulaires. Cette famille est composée de trois membres : RIG-I, MDA5 (*Melanoma Differentiation-Associated protein 5*) et LGP2 (*Laboratory of Genetics and Physiology 2*). RIG-1 et MDA5 possèdent un domaine CARD leur permettant le recrutement de la protéine MAVS (*Mitochondrial AntiViral Signaling adaptor*) par une interaction CARD/CARD à la membrane de la mitochondrie (Rehwinkel et Gack, 2020). MAVS recrute directement TRAF2, déclenchant le recrutement d'autres acteurs des voies de signalisation et l'activation de la MAPK p38 (Mikkelsen *et al.*, 2009; Nakhaei *et al.*, 2009) et de la voie NF-κB (Fang *et al.*, 2017), qui sera approfondie dans la partie [\*\*IV.E.3\*\*](#). De plus, les déplétions de TRAF2 et TRAF5 mènent à une diminution de l'activation d'IRF3 et de NF-κB médiée par RIG-1 (Xie, 2013).

## 3. TRAF2 et les récepteurs aux cytokines

Les cytokines sont des acteurs clé de l'inflammation. Elles sont sécrétées à la suite de stimuli, sont reconnues par leur récepteur présent à la surface de différents types cellulaires et régulent ainsi de nombreuses fonctions biologiques. De nombreuses études ont montré une interaction des TRAF avec les récepteurs aux cytokines. Il a été démontré que TRAF2 pouvait réguler la signalisation de l'IL-17 en se liant à Act1 (*NF-κB Activator 1*), un adaptateur de l'IL-17R (Swaidani *et al.*, 2019), ainsi que celle de l'IFN en interagissant directement avec la sous unité IFNAR1 (*IFN-Alpha/beta Receptor 1*) du récepteur à l'IFN (Yang *et al.*, 2015). Elle peut aussi réguler négativement les voies de signalisation médiées par l'IL-6 en se liant directement à la sous-unité gp130 de l'IL-6R (Kimura *et al.*, 2018).



**Figure 9 : Principaux récepteurs recrutant TRAF2.** Les interactions indirectes sont représentées par des flèches en pointillés et les interactions directes par des flèches pleines. La protéine MAVS sert d'adaptateur à TRAF2 pour les récepteurs RIG-1 et MDA5.

## D. TRAF2 dans les différentes pathologies

### 1. TRAF2 dans les cancers

À partir des bases de données TCGA (*The Cancer Genome Atlas*) et COSMIC (*Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer*), Zhu et al. ont analysé la fréquence des altérations génétiques de TRAF2 dans différents cancers humains. Elles sont inférieures à 6%, sont retrouvées principalement dans les cancers de la prostate (5.5%), des ovaires (5.1%), de l'utérus (4.4%), de l'œsophage, de la peau (3.9%), de la tête et du cou (3.2%), de la vessie (3.2%) et de l'estomac (3.1%) et correspondent à des délétions, des amplifications ou des mutations (Zhu et al., 2018). Une autre étude réalisée par l'équipe du professeur Hahn sur 3131 échantillons de cancer humain (2520 carcinomes et 311 lignées cellulaires) a mis en avant une amplification récurrente de TRAF2 dans environ 13% de l'ensemble des cancers humains et plus spécifiquement dans 15% des cancers épithéliaux (Shen et al., 2015).

#### a) TRAF2 et son activité pro-tumorale

Une amplification de TRAF2 associée avec une activité pro-tumorale a été observée dans les cancers de la prostate (Wei et al., 2017), du pancréas (Trauzold et al., 2005), du poumon (Zheng et al., 2008), gastriques (Zhao et al., 2018), du côlon (Peng et al., 2012) et les glioblastomes (Zhang et al., 2017). Des analyses par immunohistochimie de 36 échantillons de patients atteints de cancer du pancréas et par *Western blot* de lignées cancéreuses résistantes à l'apoptose induite par FAS présentent une surexpression de TRAF2. La surexpression de TRAF2 dans la lignée de cancer humaine colorectale colo357, sensible à l'apoptose provoquée par FAS, inhibe la mort induite par

cette dernière, l'activation de la voie NF-κB et l'augmentation du potentiel invasif (Trauzold *et al.*, 2005). L'équipe du docteur Qin a observé une corrélation entre l'expression de TRAF2 et l'invasion tumorale ainsi que les métastases. L'étude des lignées cancéreuses MGC80-3 et AGS a permis d'associer l'action pro-migratoire de TRAF2 avec l'activation de la voie NF-κB et l'augmentation de la production d'IL-8 (Zhao *et al.*, 2018). De la même manière, un fort taux de TRAF2 est retrouvé dans des cancers de la prostate présentant un faible temps de survie sans récurrence et un fort score de Gleason (score utilisé dans les cancers de la prostate, plus il est élevé, plus le cancer est agressif et la mortalité élevée). Un KO TRAF2 dans des lignées de cancer de la prostate humaine augmente leur sensibilité à la protéine TRAIL (Wei *et al.*, 2017).

### **b) TRAF2 et son activité anti-tumorale**

Certaines études présentent TRAF2 comme un suppresseur de tumeur. Une expression diminuée de TRAF2 associée avec un mauvais pronostic a été décrite dans les lymphomes (Compagno *et al.*, 2009; Rahal *et al.*, 2014; Saba et Wiestner, 2014) et les cancers du foie (Schneider *et al.*, 2017). L'équipe du professeur Stegmeier a analysé 165 échantillons de patients atteints de lymphome du Manteau et a détecté une mutation de TRAF2 ou cIAP2 dans 15 % des patients, associée avec une résistance à l'ibrutinib qui serait due à une activation accrue de la voie NF-κB dépendante de NIK en absence de cIAP2 ou TRAF2 (Rahal *et al.*, 2014). Une étude de 99 patients atteints de cancer du foie a mis en avant une corrélation inverse entre le taux de TRAF2/RIPK1 et la survie. La déplétion de RIPK1 ou TRAF2 dans des modèles murins a induit l'altération de la voie NF-κB, l'hyperactivation de la caspase 8 et le développement spontané de carcinomes hépatocellulaires (Schneider *et al.*, 2017).

## **2. TRAF2 et les maladies inflammatoires**

L'analyse de nombreuses pathologies inflammatoires a permis de mettre en évidence une surexpression de TRAF2 dans un bon nombre d'entre elles. Chez l'humain, une surexpression de TRAF2 a été observée lors d'expositions de la peau à des UV (Tobin, Hogerlinden et Toftgård, 1998), dans des plaques d'athérosclérose (Zirlik *et al.*, 2007), dans des tissus inflammés ou non de patients atteints de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (cette surexpression est associée à des risques de rechute (Qiao *et al.*, 2013; Shen *et al.*, 2013)), et chez des patients atteints de la maladie d'Alzheimer ou de Parkinson (Culpan *et al.*, 2009; Chung *et al.*, 2013). TRAF2 joue un rôle au niveau de nombreux récepteurs impliqués dans la régulation de l'inflammation. Il n'est donc pas surprenant de le retrouver surexprimé dans certaines pathologies inflammatoires.

## **3. Les thérapies anti-TRAF2**

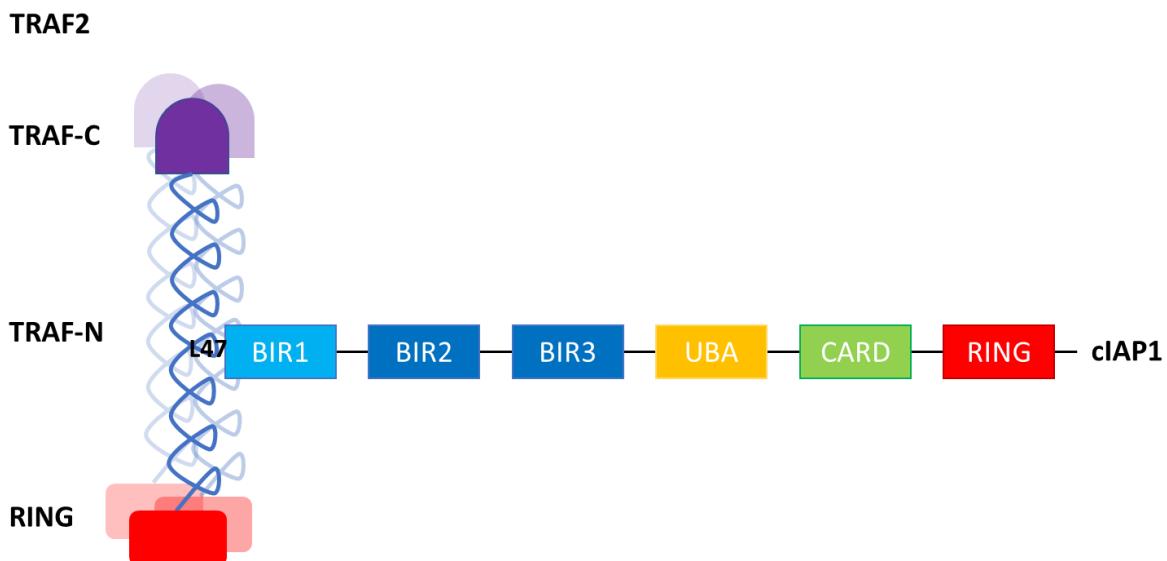
Au vu de ses propriétés pro-tumorales et de son rôle dans les pathologies inflammatoires, TRAF2 serait une cible potentielle pour les traitements anti-cancéreux. Malheureusement, connaissant les nombreux événements intracellulaires dans lesquels TRAF2 est impliquée, il est difficile d'établir un axe permettant son inhibition générale. Il n'existe donc pas actuellement

d'antagoniste de TRAF2 permettant son inhibition complète. En revanche, le développement de petites molécules qui inhiberaient spécifiquement certains aspects de TRAF2 pourrait être une possibilité. En effet, la capacité du LDA (*LiquiDambaric Acid*) à cibler TRAF2 a été découverte par Yan et al. et permet l'inhibition de l'interaction entre TRAF2 et la  $\beta$ -caténine. Cette inhibition bloque l'activation de la voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine dans un modèle de cancer du côlon mais n'a pas d'effet sur l'interaction entre TRAF2 et TRADD (Yan et al., 2022). De plus, TRAF2 agit principalement en collaboration avec cIAP1 et cIAP2, donc les SMAC mimétiques seraient de potentiels inhibiteurs indirects de l'action de TRAF2 (Siegmund, Wagner et Wajant, 2022).

## IV. TRAF2 et cIAP1 dans la signalisation cellulaire

### A. cIAP1 et TRAF2, des partenaires historiques

L'étude du récepteur TNFR2 par co-immunoprecipitation a permis de découvrir la protéine cIAP1 ainsi que son binôme TRAF2 (Rothe *et al.*, 1995). L'interaction entre ces deux protéines a été décrite avec précision par le groupe du Dr Mace. Elle a lieu au niveau du domaine TRAF-N de TRAF2 et en particulier au niveau des résidus 282 à 294. Ces résidus sont conservés chez TRAF1, étant aussi capable de lier cIAP1 mais avec une affinité moins grande que TRAF2. La liaison a lieu au niveau du domaine BIR1 de cIAP1 et plus particulièrement au niveau des résidus 40 à 119. Les résidus L47, M50 et R65 sont capitaux pour l'interaction avec TRAF2. En effet, la délétion de L47 inhibe complètement l'interaction entre cIAP1 et TRAF2 et celle de M50 ou de R65 diminue partiellement leur interaction. Les résidus L47 et M50 forment une surface hydrophobe cohérente avec les interactions entre protéines. L'étude de la masse moléculaire du complexe par MALLS (*Multiangle Laser Light Scattering*) a mis en avant la capacité de cIAP1 à lier un trimère de TRAF2 (Figure 10). Un dimère de cIAP1 aurait donc la possibilité d'interagir avec deux trimères de TRAF2. En revanche, un trimère de TRAF2 ne semble pouvoir lier qu'une seule protéine cIAP1, probablement à cause de la présence d'un encombrement stérique à la suite de la première interaction ou d'un réarrangement local qui perturbe les autres liaisons (Mace *et al.*, 2010). Ce binôme est impliqué dans la régulation de nombreux récepteurs, tels que les TNFR ou les PRR et donc dans le contrôle des voies de signalisation médiées par ces derniers (Dumétier, Zadoroznyj et Dubrez, 2020).



**Figure 10 : Schéma de l'interaction entre cIAP1 et TRAF2.** Schéma adapté de la revue de Zadoroznyj et Dubrez : « Cytoplasmic and Nuclear Functions of cIAP1 », *Biomolecules*, 2022. cIAP1 se lie à au domaine TRAF-N de TRAF2 par son domaine BIR1 et interagit avec un trimère de TRAF2. Cette interaction nécessite le résidu K47 de TRAF2 (Mace *et al.*, 2010).

## B. Les voies de signalisation NF-κB et des MAPK

Les voies de signalisation NF-κB et des MAPK sont activées par une très grande panoplie de récepteurs tels que les récepteurs de la famille du TNFα ou les PRR. Elles sont donc régulées par un très grand nombre de protéines parmi lesquelles se trouvent cIAP1 et TRAF2.

### 1. La voie NF-κB

#### a) Les voies NF-κB canonique et non canonique

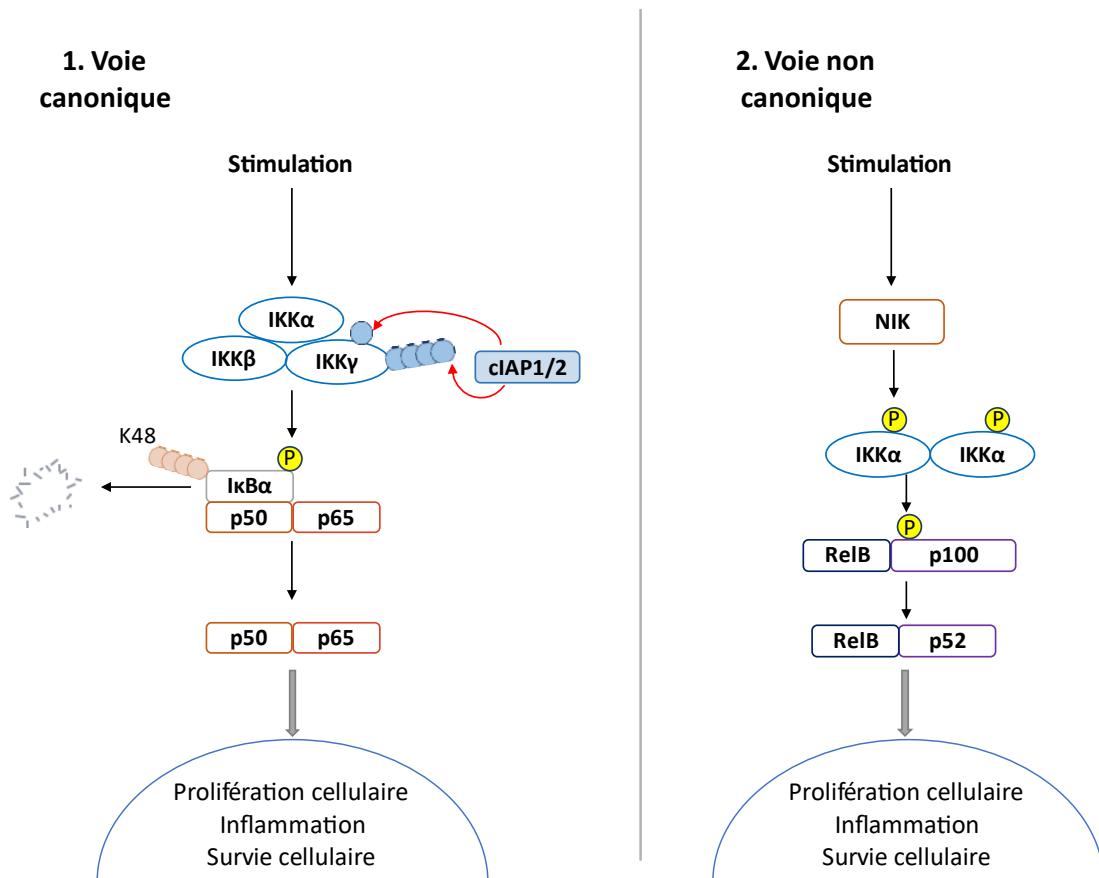
La famille NF-κB est une famille de facteurs de transcription fonctionnant sous forme d'homodimères ou hétérodimères composés de 5 protéines : p65 (ou RelA), RelB, cRel, p50 (NF-κB1) et p52 (NF-κB2) (Yu, Wan et Huang, 2009). Ils sont responsables de l'expression de nombreux gènes anti-apoptotiques et cytokines pro-inflammatoires régulant l'immunité innée. En général, les dimères de NF-κB sont composés d'une des trois protéines Rel, synthétisées sous forme de protéines matures possédant un domaine TAD (*Transcription transActivation Domain*), et de p50 ou p52, synthétisées sous forme de précurseurs p105 ou p100 possédant une répétition ankyrine en C-terminal inhibant p50 et p52. En absence de stimulation, les dimères sont en général retenus dans le cytoplasme et l'activation des voies NF-κB permet leur translocation dans le noyau. Il existe deux voies NF-κB :

- La voie canonique (ou classique) de NF-κB dans laquelle IκBα (*NF-κB Inhibitor α*), une protéine inhibitrice de la voie NF-κB, séquestre le dimère p65/p50. Le complexe IKK, composé de trois protéines : IKKα, IKKβ et IKKγ (ou NEMO (*NF-κB Essential MODulator*)) provoque la phosphorylation de IκBα suivie de son ubiquitination et de sa dégradation par le protéasome, permettant ainsi la libération suivie de la translocation dans le noyau du dimère p65/p50 (Zhang, Lenardo et Baltimore, 2017; Xia *et al.*, 2018).
- La voie non canonique (ou alternative) qui met en jeu le dimère RelB/p52. La protéine NIK promeut la phosphorylation et l'activation de l'homodimère d'IKKα. Ce dernier phosphoryle le précurseur inactif p100 du dimère RelB/p100, déclenchant sa dégradation partielle par le protéasome en p52 active et la translocation du dimère RelB/p52 dans le noyau (Zhang, Lenardo et Baltimore, 2017; Xia *et al.*, 2018) (Figure 11).

#### b) La régulation de IKKγ par cIAP1

La sous-unité IKKγ est la sous-unité régulatrice du complexe IKK. Elle est soumise à des mécanismes d'ubiquitination menant à son activation. cIAP1 fait partie des E3 ubiquitine ligases capables d'induire par exemple la poly-ubiquitination et mono-ubiquitination d'IKKγ (Tang *et al.*, 2003; Jin *et al.*, 2009; Hinz *et al.*, 2010). TRAF6 est capable de se lier à IKKγ et ainsi recruter cIAP1 qui pourra ainsi mono-ubiquitinier IKKγ sur son résidu K285 et activer la voie NF-κB (Hinz *et al.*, 2010). Le domaine BIR2/3 de cIAP1 a même la capacité à lier directement la région N-terminale de IKKγ afin d'induire la mono-ubiquitination de IKK sur les résidus K277 et K309, contribuant à l'activation de NF-κB (Jin *et al.*, 2009) (Figure 11). Le MCV (*Molluscum Contagiosum Virus*) est un

poxvirus capable d'inhiber l'activation d'IKK $\gamma$ . Des analyses mutationnelles ont démontré que son site de fixation sur IKK $\gamma$  est le même que cIAP1. MCV peut donc inhiber compétitivement l'interaction entre cIAP1 et IKK $\gamma$  et ainsi bloquer la poly-ubiquitination d'IKK $\gamma$  (Biswas et Shisler, 2017) (Figure 11).



**Figure 11 : Les voies de signalisation NF-κB.** 1. La stimulation de certains récepteurs tels que le TNFR1 mène à l'activation de la voie canonique de NF-κB. Le complexe IKK, composé de IKK $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  y est recruté. cIAP1 et 2 activent IKK $\gamma$  par ubiquitination. Le complexe IKK phosphoryle I $\kappa$ B $\alpha$ , induisant son ubiquitination et sa dégradation par le protéasome, libérant ainsi p50 et p65. Ces dernières sont ensuite transloquées dans le noyau et déclenchent des processus de prolifération, d'inflammation et de survie cellulaire. 2. La stimulation d'autres récepteurs comme le TNFR2 entraîne la voie non canonique de NF-κB. NIK active par phosphorylation IKK $\alpha$ , qui a son tour phosphoryle p100, déclenchant sa dégradation partielle en p52. Le dimère RelB/p52 est ensuite transloqué dans le noyau et favorise la survie cellulaire, l'inflammation et la prolifération.

### c) Régulation de la voie NF-κB non canonique par cIAP1/TRAFF2

L'accumulation de NIK dans le cytoplasme est le facteur décisif et déclencheur de l'activation de la voie non canonique de NF-κB. cIAP1 et cIAP2, par l'intermédiaire de TRAF2 et 3 ainsi que du système UPS (*Ubiquitin Proteasome System*), régulent le niveau d'expression de NIK (Zarnegar et al., 2008; Sun, 2017). Dans un premier temps, TRAF3 se fixe à NIK et recrute TRAF2 (Vallabhanapurapu et al., 2008). TRAF2 recrute ensuite spécifiquement cIAP1 et 2, qui vont induire l'ubiquitination de type K48 de NIK et ainsi déclencher la dégradation de ce dernier et donc inhiber

la voie NF-κB non canonique (Zarnegar *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2014). La déplétion de cIAP1 et 2 ou l'utilisation de SMAC mimétiques stabilise NIK et accroît l'activation de la voie NF-κB non canonique (Vince *et al.*, 2007). L'étude de lignées cellulaires humaines de myélome multiple a associé une forte expression de NIK, entraînant une activation importante de NF-κB, avec une faible expression de cIAP1 et 2, sans que l'expression de TRAF3 ne soit altérée (Annunziata *et al.*, 2007; Keats *et al.*, 2007). NIK présente un domaine IBM avec lequel le domaine BIR2 de cIAP1 va interagir afin de renforcer les interactions entre les protéines du complexe cIAP1-2/TRAF2-3/NIK. De plus, la mutation de ce domaine IBM provoque l'activation accrue de la voie NF-κB non canonique, démontrant l'importance de l'interaction directe entre cIAP1 et NIK dans l'inhibition de cette voie (Lee *et al.*, 2014) (Figure 17).

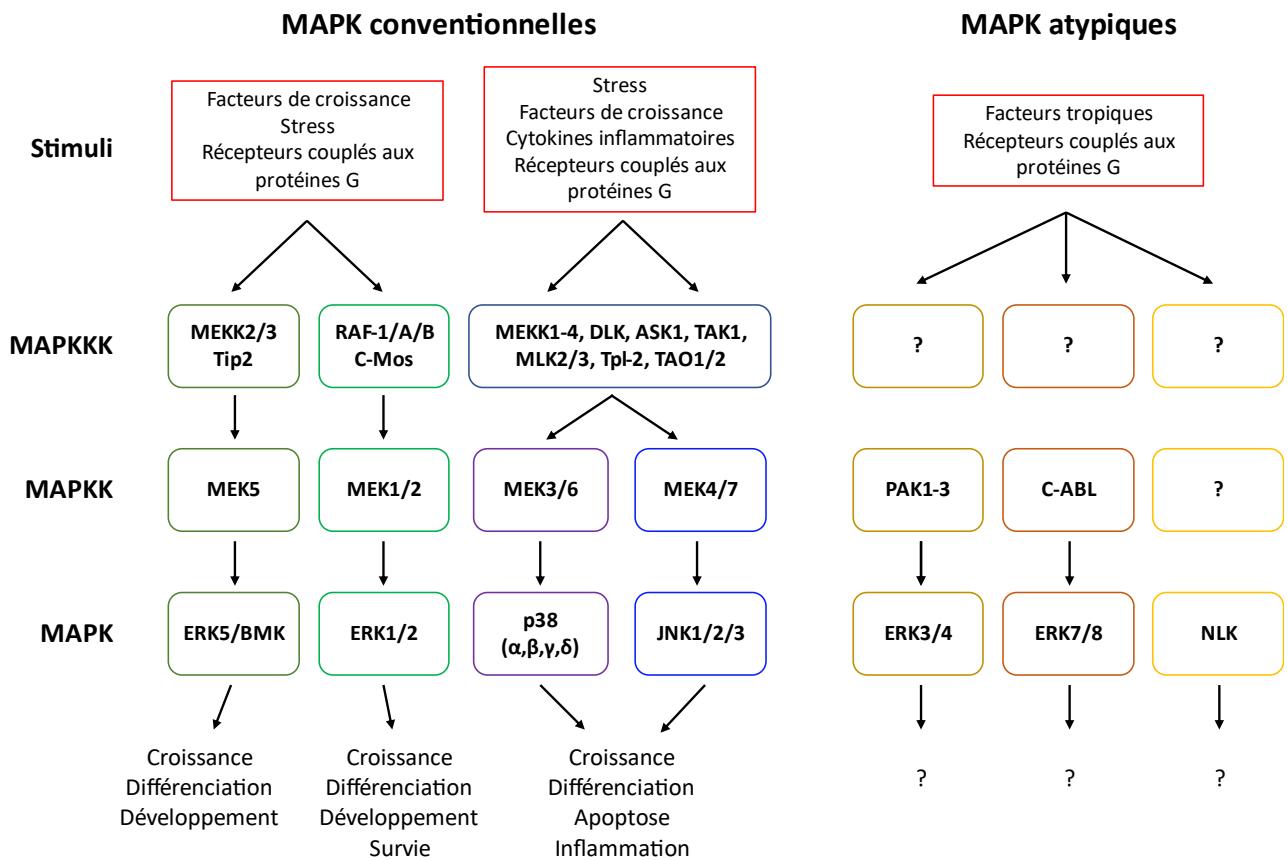
## 2. Les MAPK

### a) Les différentes voies des MAPK

La signalisation cellulaire transmise par de nombreux récepteurs tels que les GPCR (*G Protein-Coupled Receptor*), les RTK (*Receptor Tyrosine Kinase*) ainsi que les récepteurs aux cytokines induisent l'activation de la cascade de signalisation des MAPK, une famille de sérolé/thréonine kinases ubiquitaires (Kholodenko et Birtwistle, 2009). Elles sont impliquées dans la régulation de nombreux processus cellulaires fondamentaux tels que la migration, la différenciation, la croissance, la prolifération et la mort cellulaire. Cette cascade de signalisation est en général divisée en trois étapes de phosphorylation impliquant trois kinases. Elle est initiée par l'activation d'une MAPKKK (*MAPK Kinase Kinase*) à la suite de stimuli extracellulaires. Cette MAPKKK phosphoryle et active ensuite directement une MAPKK (*MAPK Kinase*), qui à son tour active une MAPK par la phosphorylation d'un motif thréonine-x-tyrosine. La MAPK phosphoryle ensuite différentes protéines, régulant ainsi la fonction de ces protéines et l'expression de certains gènes et permettant à la cellule d'exécuter une réponse appropriée (Zhang et Dong, 2007; Morrison, 2012; Guo *et al.*, 2020).

Chez les mammifères, 14 MAPK ont été identifiées et sont divisées en deux groupes. Le premier groupe correspond aux MAPK conventionnelles et représente l'ensemble des MAPK dont la cascade de phosphorylation se déroule en trois étapes. Ce groupe est divisé en quatre sous-groupes : les MAPK ERK1/2 (*Extracellular signal-Regulated Kinases 1/2*), JNK (*c-Jun N-terminal Kinase*), la MAPK p38 et la MAPK ERK5. Le second groupe correspond aux MAPK atypiques et regroupe l'ensemble des MAPK dont la cascade de signalisation ne suit pas les trois étapes conventionnelles. Elles sont divisées en trois sous-groupes : les MAPK ERK3/4, ERK7/8 et NLK (*NEMO-Like Kinase*) (Moens, Kostenko et Sveinbjörnsson, 2013) (Figure 12). Parmi ces protéines, une attention toute particulière a été portée sur les MAPK ERK1/2, JNK et p38. Les voies de signalisation de JNK et p38 sont en général activées en réponse aux cytokines inflammatoires et au

stress induit par des stimuli chimique, biologique ou physique alors que la voie ERK1/2 est en général initiée par des facteurs de croissance (Morrison, 2012; Yue et López, 2020).



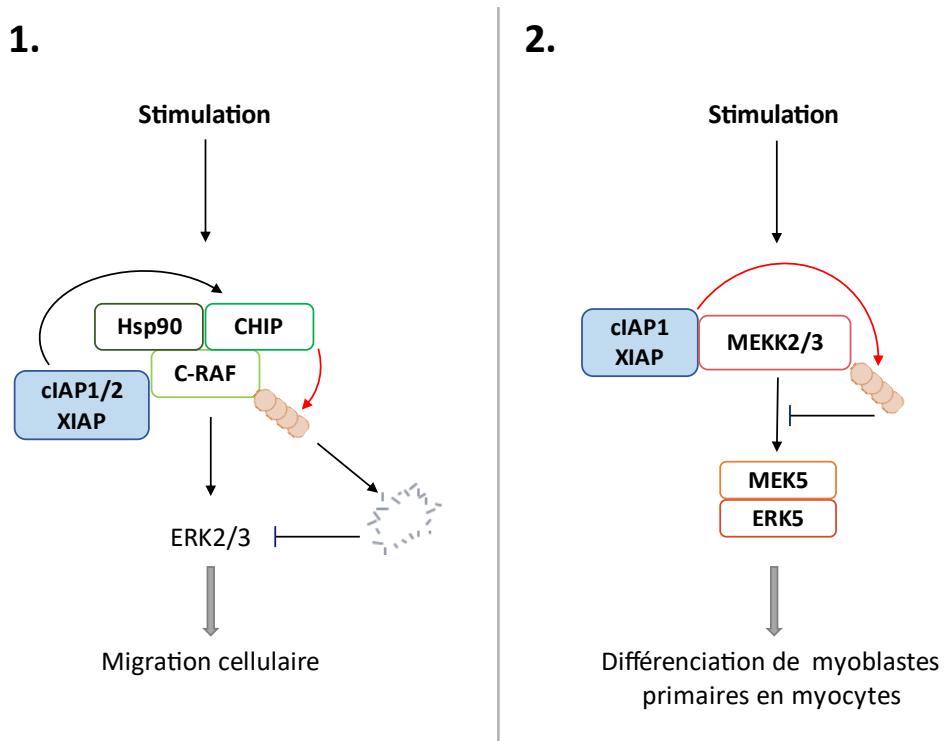
**Figure 12 : Schéma récapitulatif des différentes voies des MAPK.** Schéma adapté de la revue de Moens : « The Role of Mitogen-Activated Protein Kinase-Activated Protein Kinases (MAPKAPKs) in Inflammation », Genes, 2013. Les MAPK sont divisées en deux groupes, les MAPK conventionnelles et les MAPK atypiques. Les MAPKs conventionnelles sont activées en trois étapes impliquant des MAPKKK, des MAPKK puis les MAPK. Les MAPK ERK1/2/5, activées principalement par des facteurs de croissance, mènent à des processus de croissance, différenciation et développement cellulaire. Les MAPK p38 et JNK, stimulées principalement par des facteurs de stress et des cytokines inflammatoires, conduisent à des processus de croissance, différenciation, d'apoptose et d'inflammation. Les MAPK atypiques ne sont pas activées par un processus en trois étapes. Leur activation et leur rôle sont encore peu caractérisés (Moens, Kostenko et Sveinbjörnsson, 2013).

### b) Régulation des MAPK ERK1, 2 et 5 par cIAP1

En 2008, Dogan et al. ont démontré que cIAP1 et 2 ainsi que XIAP peuvent réguler négativement la voie ERK1/2 en liant et en déstabilisant la MAPKKK C-RAF (*RAF proto-oncogene serine/threonine-protein kinase*). Ils ont démontré que XIAP ainsi que cIAP1 et 2 pouvaient interagir directement avec C-RAF en utilisant le système Biacore, un système utilisant le principe SPR (résonance plasmonique de surface) pour mesurer les caractéristiques d'interaction entre deux molécules. XIAP possède en revanche une plus grande affinité que cIAP1 et 2 pour C-RAF. L'inhibition de XIAP ou cIAP1 et 2 dans des cellules HeLa augmente la stabilité de C-RAF, menant à l'activation des MAPK ERK1/2 et à l'augmentation de la motilité cellulaire. Ces processus sont

dépendants de la protéine chaperonne Hsp90 (*Heat shock protein 90*) et du recrutement de la protéine CHIP (*Carboxyl terminus Hsp70/90 Interacting Protein*). XIAP ainsi que cIAP1 et 2 accroissent la fixation de CHIP sur le complexe Hsp90/C-RAF menant à l'ubiquitination dégradative de C-RAF et donc à l'inhibition des voies ERK1/2. La déplétion de CHIP accroît l'activation de ERK1/2 et les processus de migration cellulaire (Dogan *et al.*, 2008) (Figure 13).

cIAP1 et XIAP pourraient aussi réguler négativement ERK5 en conjuguant de l'ubiquitine de type K63 sur les MAPKKK MEKK2 (*MAPK/ERK Kinase Kinase 2*) et 3, ce qui entraverait la liaison entre MEK5 et ERK5, nécessaire à l'activation d'ERK5. La déplétion de XIAP dans des cellules HeLa mène à l'hyperactivation de ERK5 ainsi qu'à la différenciation de myoblastes primaires en myocytes. La simple déplétion de cIAP1 provoque aussi une hyperactivation de ERK5 mais n'a en revanche pas d'effet sur la différenciation, peut-être à cause d'un système de compensation mis en place par XIAP (Takeda *et al.*, 2014) (Figure 13).



**Figure 13 : Régulation des voies ERK1/2 et ERK5 par cIAP1.** 1. La stimulation de certains récepteurs provoque l'activation de C-RAF, qui en retour mène à l'activation des MAPK ERK2 et 3 et à des processus de migration cellulaire. Les protéines XIAP ainsi que cIAP1 et 2 favorisent le recrutement de CHIP sur le complexe C-RAF/Hsp90. CHIP peut ainsi ubiquiter C-RAF, déclenchant sa dégradation et inhibant l'activation de ERK1/2 (Dogan *et al.*, 2008). 2. L'activation de MEKK2 et 3 est nécessaire à la formation du complexe MEK5/ERK5, induisant la différenciation de myoblastes en myocytes. XIAP et cIAP1 peuvent se lier à MEKK2 et 3 et les ubiquiter, inhibant la formation du complexe MEK5/ERK5 (Takeda *et al.*, 2014).

### C. La régulation du récepteur TNFR1

Le TNF $\alpha$  peut être reconnu par deux récepteurs différents : le TNFR1 et le TNFR2. À la différence du TNFR2, le TNFR1 possède un DD et sa stimulation peut induire l'activation de voies

de signalisation cellulaire telles que la voie NF-κB et les MAPK ou bien la formation de complexes secondaires impliqués dans le déclenchement de la mort cellulaire (Estornes et Bertrand, 2015).

## 1. Activation des voies NF-κB et des MAPK induites par le TNFR1

Le TNFR1 est exprimé dans l'ensemble des tissus humains. Sa stimulation par le TNFα déclenche le recrutement de plusieurs protéines adaptatrices sur sa partie cytoplasmique telles que RIPK1 et TRADD.

### a) Formation du complexe I

RIPK1 est une sérine/théonine kinase de la famille des RIP. Elle est composée d'un domaine kinase en N-terminal, déclenchant sa propre activation par autophosphorylation, d'un domaine RHIM (*RIP Homotypic Interaction Motif*), impliqué dans des interactions homotypiques avec des protéines présentant ce domaine telles que RIPK3, et d'un DD en C-terminal qui lie RIPK1 au TNFR1 par une interaction homotypique entre les DD (Mifflin, Ofengeim et Yuan, 2020). Elle détermine la réponse induite par la stimulation de plusieurs récepteurs tels que le TNFR1, menant soit à l'activation de voies de signalisation pro-survie telles que les voies de signalisation NF-κB et des MAPK ou à la formation de complexes menant à la mort cellulaire en coopérant avec RIPK3 (Mifflin, Ofengeim et Yuan, 2020). TRADD est une protéine adaptatrice, présentant un DD interagissant directement avec le TNFR1 par une interaction homotypique entre les DD et est nécessaire à la régulation de la signalisation induite par le TNFR2 par cIAP1 et TRAF2. En effet, TRADD recrute TRAF2 au niveau du TNFR1, par une interaction entre la partie N-terminale de TRADD et le domaine TRAF-C de TRAF2 (Hsu *et al.*, 1996), qui va à son tour recruter cIAP1 et 2 et former ainsi le complexe I composé de cIAP1, cIAP2, TRAF2, TRADD et RIPK1. cIAP1 induit ensuite l'ubiquitination de RIPK1 nécessaire à l'activation des voies de signalisation MAPK et NF-κB (Bertrand *et al.*, 2008).

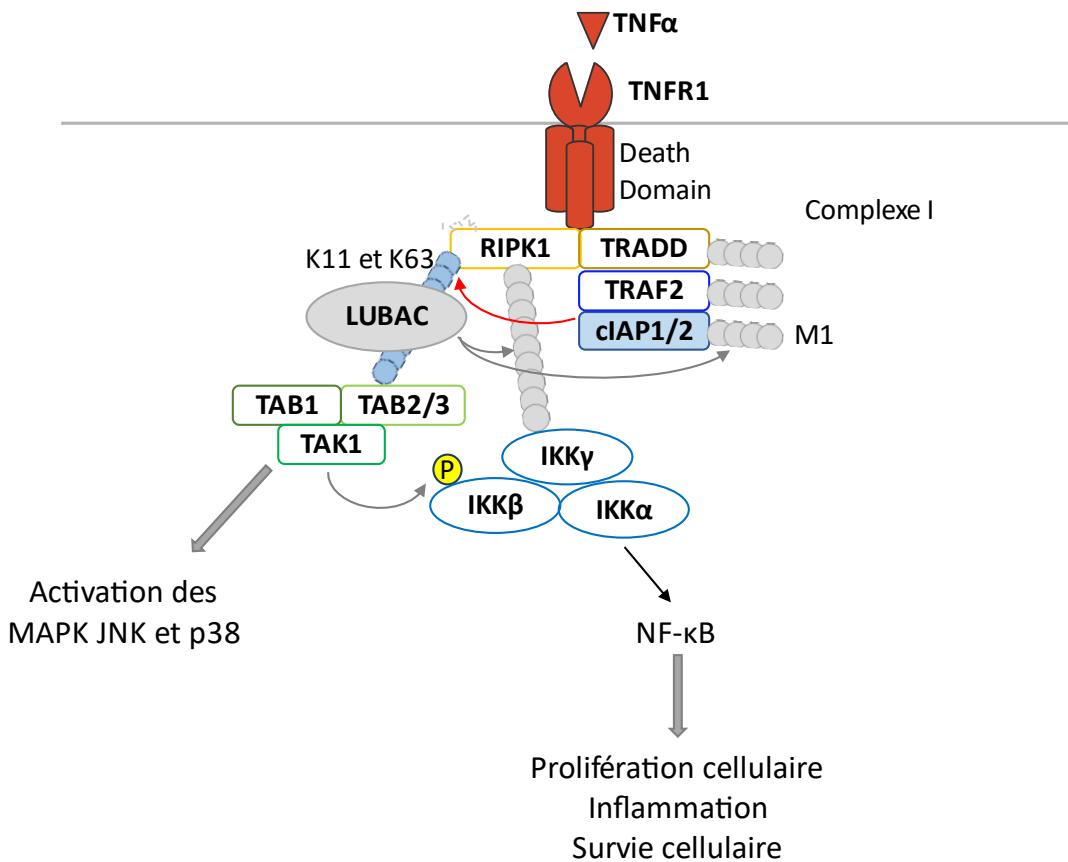
### b) Rôle de TRAF2 et cIAP1 dans le complexe I

Très rapidement, l'importance de TRAF2 dans l'ubiquitination de RIPK1 a été démontrée. En effet, des lignées cellulaires KO pour TRAF2 sont dans l'incapacité d'induire l'ubiquitination de RIPK1 (Lee *et al.*, 2004). Au départ, cet effet a été associé à l'activité E3 ubiquitine ligase de TRAF2 (Lee *et al.*, 2004; O'Donnell *et al.*, 2007). Pourtant, le rôle de TRAF2 est aujourd'hui remis en question. L'équipe de Silke a bien confirmé l'importance de TRAF2 dans l'activation de la voie NF-κB, mais l'analyse de MEF présentant une protéine TRAF2 n'arborant pas de domaine RING ne démontrait pas d'inhibition de la voie NF-κB. À l'inverse, des MEF KO pour cIAP1 et cIAP2 sont dans l'incapacité d'ubiquitinier RIPK1 (Vince *et al.*, 2009). De plus, des expériences d'ubiquitination *in vitro* ont prouvé la capacité de cIAP1 à ubiquitinier RIPK1 tout en démontrant l'incapacité de TRAF2 à réaliser ce processus (Park, Yoon et Lee, 2004). TRAF2 aurait donc plutôt un rôle d'adaptateur permettant le recrutement et la mise en place de l'activité E3 ubiquitine ligase de cIAP1.

L'équipe de Vucic a démontré l'association entre cIAP1 et l'enzyme E2 UBCH5a dans l'ubiquitination de RIPK1 (Varfolomeev *et al.*, 2008; Dynek *et al.*, 2010). L'activation du TNFR1 par le TNF $\alpha$  induit les ubiquitinations de type K11 et K63 de RIPK1. Elle est dépendante des enzymes E2 de la famille UBCH5 et de cIAP1 et est nécessaire à l'activation de la voie NF- $\kappa$ B. En effet, la délétion de cIAP1 ou l'utilisation du SMAC mimétique BV6 bloque les ubiquitinations de type K11 et K63 de RIPK1, l'activation de la voie NF- $\kappa$ B et sensibilise les cellules à la mort cellulaire induite par le TNF $\alpha$  (Varfolomeev *et al.*, 2008; Dynek *et al.*, 2010). Bertrand *et al.* ont aussi décrit la capacité de cIAP1 à induire la liaison de chaîne linéaire d'ubiquitine et de type K48, en plus des chaînes de type K11 et K63, sur RIPK1 mais aussi RIPK2, 3 et 4. Ces chaînes d'ubiquitine sont aussi nécessaires à l'activation de la voie NF- $\kappa$ B. cIAP2 induit aussi l'ubiquitination de ces protéines mais avec une affinité moins importante que cIAP1 (Bertrand *et al.*, 2011).

## 2. Recrutement de LUBAC et activation de NF- $\kappa$ B et des MAPK

L'ubiquitination de RIPK1 déclenche le recrutement de LUBAC (*Linear Ubiquitin Assembly Complex*) qui va induire le recrutement de chaînes linéaires d'ubiquitine sur l'ensemble des composants du complexe I. L'ensemble des chaînes d'ubiquitine vont servir de plateformes d'amarrage aux complexes IKK, impliqués dans l'activation de NF- $\kappa$ B, et TAK1 (*TGF- $\beta$ -Activated Kinase 1*) /TAB1 (*TAK1-Binding protein 1*) /TAB2. Le complexe TAK1/TAB1/TAB2 est nécessaire à l'activation du complexe IKK en induisant la phosphorylation de IKK $\beta$ , qui à son tour phosphoryle I $\kappa$ B $\alpha$  et active ainsi la voie NF- $\kappa$ B. Il induit aussi l'activation de la voie des MAPK, en particulier par l'intermédiaire de TAK1, une MAPKKK qui va induire l'ubiquitination de MAPKK et activer ainsi les MAPK JNK et p38 (Witt et Vucic, 2017; Dumétier, Zadoroznyj et Dubrez, 2020; Mifflin, Ofengeim et Yuan, 2020) (Figure 14).



**Figure 14 : Rôle de ciAP1 et TRAF2 dans l'activation de NF-κB et des MAPK par le TNFR1.** La stimulation du TNFR1 par le TNF $\alpha$  provoque le recrutement de RIPK1 et de la protéine adaptatrice TRADD par une interaction homotypique avec le domaine de mort du TNFR1. TRADD recrute TRAF2 qui à son tour lie ciAP1, formant ainsi le complexe 1 composé de ciAP1, TRAF2, RIPK1 et TRADD. ciAP1 provoque l'ubiquitinatation de type K11 et K63 de RIPK1 permettant l'arrivée de LUBAC. LUBAC catalyse l'ubiquitinatation de type M1 des composants du complexe 1. L'ensemble de ces chaînes d'ubiquitine permet le recrutement des complexes TAB1/TAB2-3/TAK1 et IKK composé de IKK $\alpha$ , IKK $\beta$  et IKK $\gamma$ . TAK1 mène à l'activation des MAPK JNK et p38 ainsi qu'à la phosphorylation activatrice de IKK $\beta$ , déclenchant l'activation de la voie NF-κB canonique menant à des processus de prolifération, d'inflammation et de survie cellulaire.

### 3. La régulation de la mort cellulaire

#### a) Formation du complexe IIa

En absence de ciAP1 ou TRAF2, la stimulation du TNFR1 par le TNF $\alpha$  ne stimule plus les voies de survie cellulaire mais provoque la mort cellulaire. En effet, l'utilisation du SMAC mimétique BV6 stimule la mort cellulaire lors de traitements au TNF $\alpha$  (Varfolomeev *et al.*, 2007). De la même façon, la déplétion de TRAF2 dans un modèle murin déclenche aussi la mort cellulaire. Cette dernière, induite en absence de TRAF2 par le TNF $\alpha$ , est inhibée par la déplétion du récepteur TNFR1 (Guo *et al.*, 2017). De plus, le traitement au TNF $\alpha$  de cellules KO pour TRAF2 reconstituées avec un TRAF2 ne pouvant plus interagir avec ciAP1, à la suite d'une mutation dans son domaine TRAF-N, déclenche aussi la mort cellulaire. TRAF2 inhibe donc la mort cellulaire déclenchée par le TNF $\alpha$  en recrutant ciAP1 au niveau du TNFR1 (Vince *et al.*, 2009). En absence de ciAP1, RIPK1 n'est plus ubiquitinée, va se séparer du TNFR2 et former le complexe IIa composé de RIPK1,

TRADD, FADD (*Fas-Associated protein with Death Domain*) et de la procaspase 8. La présence dans ce complexe de la procaspase 8 provoque sa maturation et le déclenchement de la mort cellulaire par apoptose (Schilling, Geserick et Leverkus, 2014; Borghi, Verstrepen et Beyaert, 2016). Le KO de cIAP1 ou l'utilisation de SMAC mimétiques stimule la formation de ce complexe IIa, dépendante du TNF $\alpha$ , à la suite de l'inhibition de l'ubiquitination de RIPK1 (Petersen *et al.*, 2007; Bertrand *et al.*, 2008; Moulin *et al.*, 2012). L'équipe du professeur Meier a démontré la capacité de cIAP1 à réguler différemment la cytotoxicité du TNF $\alpha$ . Le domaine UBA de cIAP1 lui permet d'induire l'ubiquitination de type K48 de RIPK1, déclenchant sa dégradation par le protéasome et inhibant ainsi la formation du complexe IIa et donc le déclenchement de l'apoptose (Annibaldi *et al.*, 2018) (Figure 15).

### **b) Le ripoptosome**

La déplétion de cIAP1 peut aussi provoquer la formation spontanée du complexe IIb ou ripoptosome, composé de RIPK1, FADD et de la procaspase 8 (Feoktistova *et al.*, 2011; Tenev *et al.*, 2011; Schilling, Geserick et Leverkus, 2014). La formation de ce complexe n'est pas dépendante de la stimulation du TNFR1 mais peut être induite par exemple par un stress génotoxique ou bien l'activation des TLR et déclenche aussi la mort cellulaire par apoptose (Schilling, Geserick et Leverkus, 2014). En revanche, cIAP1 peut ubiquitinier RIPK1, induisant l'inactivation ou la dégradation de RIPK1, bloquant ainsi la formation spontanée du ripoptosome et le déclenchement de la mort cellulaire (Feoktistova *et al.*, 2011; Tenev *et al.*, 2011) (Figure 15).

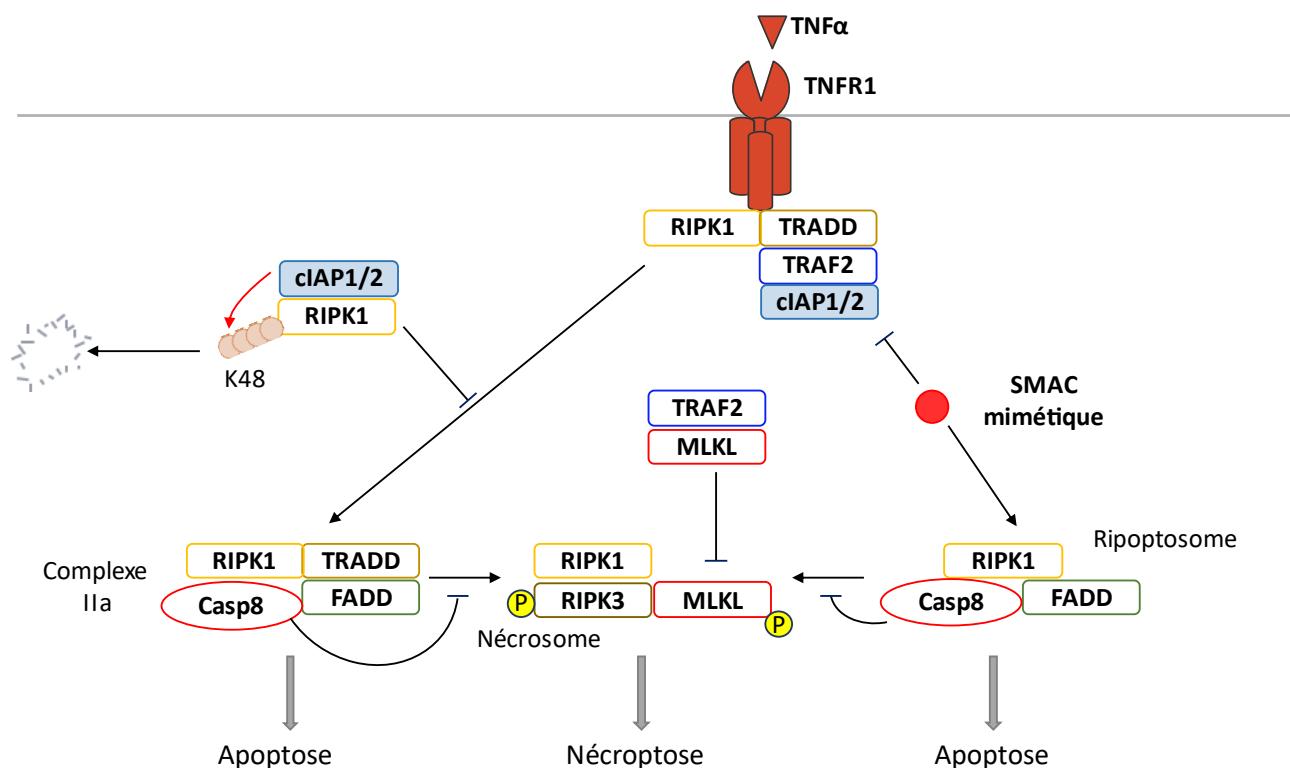
### **c) Le nécrosome et le déclenchement de la nécroptose**

Le changement de la signalisation pro-survie vers la signalisation pro-mort cellulaire déclenche l'activation par auto-ubiquitination de RIPK1 sur son résidu S161 (Degterev *et al.*, 2008). La protéine RIPK1 activée peut interagir avec RIPK3 par leur domaine RHIM et former ainsi le nécrosome composé de RIPK1, RIPK2 et MLKL (*Mixed Lineage Kinase domain-Like pseudokinase*) (Li *et al.*, 2012; Gong *et al.*, 2019). Le nécrosome provoque la mort cellulaire par nécroptose. De la même manière que l'apoptose, c'est aussi une mort cellulaire programmée induite par la transmission de signaux médiée par les récepteurs de mort et dont les effets ressemblent morphologiquement à la nécrose. Dans un premier temps, RIPK1 active RIPK3 par phosphorylation. RIPK3 active ensuite par phosphorylation MLKL qui va s'oligomériser, puis va ensuite se transloquer à la membrane et induire la perméabilisation nécrotique de la membrane plasmique, caractérisée par la perte d'intégrité de la cellule et des organites (Gong *et al.*, 2019).

La présence de la caspase 8 active bloque la formation du nécrosome et promeut la formation du ripoptosome et donc le déclenchement de l'apoptose. L'inactivation de l'activité de la caspase 8 stimule la formation du nécrosome (Park *et al.*, 2021). L'inhibition des IAP par des SMAC mimétiques accroît la mort cellulaire par nécroptose dans les cellules traitées au TNF $\alpha$  mais cet effet est inhibé par l'inhibition de RIPK1, démontrant un rôle de cIAP1 dans la régulation de la formation

du nécrosome (Vanlangenakker *et al.*, 2011; McComb *et al.*, 2012). Petersen *et al.* ont aussi démontré l'importance de TRAF2 dans le déclenchement de la nécroptose. En effet, la déplétion de TRAF2 accroît la nécroptose induite par le TNF $\alpha$  dans des modèles de MEF. La reconstitution de TRAF2 n'arborant pas de domaine RING inhibe la mort par nécroptose de la même manière que le TRAF2 WT (*Wild Type*), présentant un rôle indépendant du domaine RING. De la même manière, un TRAF2 muté incapable d'interagir avec cIAP1 bloque le déclenchement de la nécroptose, confirmant un rôle de TRAF2 indépendant de cIAP1. Une co-immunoprecipitation a démontré une interaction entre TRAF2 et MLKL. TRAF2 peut donc interagir avec MLKL afin de bloquer son interaction avec RIPK3 et bloquer la formation du nécrosome. Le KO de TRAF2 est létal dans un modèle de souris adulte mais le KO de RIPK3 bloque cet effet, confirmant le rôle de TRAF2 dans la nécroptose médiée par MLKL/RIPK3 (Petersen *et al.*, 2015) (Figure 15).

Durant le déclenchement de la nécroptose, RIPK1 est régulé par des processus de polyubiquitination de type K63 et linéaire. Le KO de cIAP1 n'a aucun effet sur l'ubiquitination de RIPK1 lors du déclenchement de la nécroptose, qui semble plutôt être dépendante de LUBAC, excluant un rôle régulateur de cIAP1 lors du déclenchement de la nécroptose. En revanche, l'absence de cIAP1 dans la lignée cellulaire HT29 induit une augmentation de l'activation de la voie NF- $\kappa$ B non canonique et une surexpression de cIAP2, réduisant le déclenchement de la nécroptose et démontrant donc un rôle plus complexe de cIAP1 dans la formation du nécrosome (Almagro *et al.*, 2015).

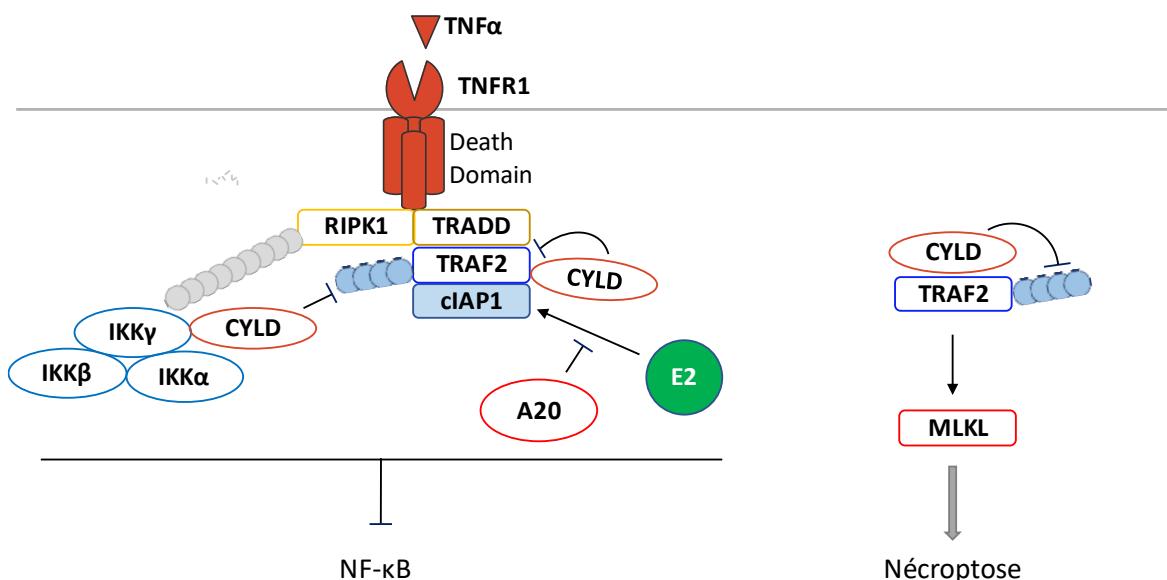


**Figure 15 : Régulation des voies de mort cellulaire médiées par le TNFR1.** La déplétion de cIAP1 et 2, par des SMAC mimétiques par exemple, mène à la formation du complexe IIa lors de la stimulation du TNFR1.

Ce complexe est composé de RIPK1, TRADD, FADD ainsi que de la caspase 8 et déclenche l'apoptose. L'ubiquitination de type K48 de RIPK1 par cIAP1 et 2 inhibe la formation de ce complexe. En absence de stimulation, la déplétion de cIAP1 et 2 peut déclencher la formation spontanée du ripoptosome composé de RIPK1, FADD et la caspase 8, induisant l'apoptose. L'inactivation de la caspase 8 induit la formation du nécrosome, composé de RIPK1, RIPK3 et MLKL. RIPK1 active RIPK3 par phosphorylation. RIPK3 fait ensuite de même avec MLKL conduisant à la mort par nécroptose. TRAF2 peut se lier à MLKL afin d'empêcher son association à RIPK3 et inhiber la nécroptose.

#### 4. Régulation des processus d'ubiquitination médiés par le TNFR1

L'activation des voies de signalisation médiées par le TNFR1 et dépendantes de cIAP1/TRAF2 nécessite de nombreux processus d'ubiquitination. La présence de DUB (*DeUbiquitinating enzymes*) a donc un rôle central dans la régulation de ces voies. La protéine A20 peut interagir directement avec TRAF2 et cIAP1 afin de bloquer leurs interactions avec leurs enzymes E2 et bloque ainsi l'activation de la voie NF-κB médiée par le TNF $\alpha$  (Shembade, Ma et Harhaj, 2010). Le rôle de la DUB CYLD (*Cylindromatosis*) a été le mieux décrite dans la régulation du TNFR1 (Trompouki *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2006; Tesio *et al.*, 2015; Lork, Verhelst et Beyaert, 2017). CYLD interagit directement avec TRAF2 et bloque ainsi l'activation des MAPK p38 (Tesio *et al.*, 2015), JNK (Zhang *et al.*, 2006), et permet aussi le déclenchement de la nécroptose. En se liant à TRAF2, CYLD déclenche la dé-ubiquitination de TRAF2 nécessaire à sa dissociation de MLKL. MLKL peut ensuite interagir avec RIPK3 et former ainsi le nécrosome et déclencher la nécroptose (Petersen *et al.*, 2015). CYLD peut aussi se lier à IKK $\gamma$  et pourrait ainsi cibler l'autoubiquitination activatrice de type K63 de TRAF2, bloquant ainsi sa capacité à activer la voie NF-κB (Trompouki *et al.*, 2003) (Figure 16).



**Figure 16 : Régulation des processus d'ubiquitination en réponse à l'activation du TNFR1.** La protéine A20 peut se lier à cIAP1 et bloquer son interaction avec les enzymes E2, inhibant ainsi son activité E3 ubiquitine ligase. CYLD peut se lier à TRAF2 ou IKK $\gamma$  afin d'inhiber l'ubiquitination activatrice de TRAF2. Ces

*processus inhibent l'activation de NF-κB et des MAPK p38 et JNK. CYLD libère aussi MLKL de son interaction avec TRAF2 en déubiquitinant TRAF2, favorisant ainsi la nécroptose.*

## **D. Stimulation des autres récepteurs de la famille du TNF et activation de la voie NF-κB non canonique**

La stimulation du TNFR2 ainsi que d'autres récepteurs de la famille du TNF, tels que CD40-R, BAFF-R, FN14, LTβR et RANK déclenche la voie non canonique de NF-κB. L'implication des protéines cIAP1 et 2 ainsi que TRAF2 et 3 dans les mécanismes de régulation de cette voie a été largement démontrée (Sun, 2017).

### **1. Activation des récepteurs de la famille du TNF**

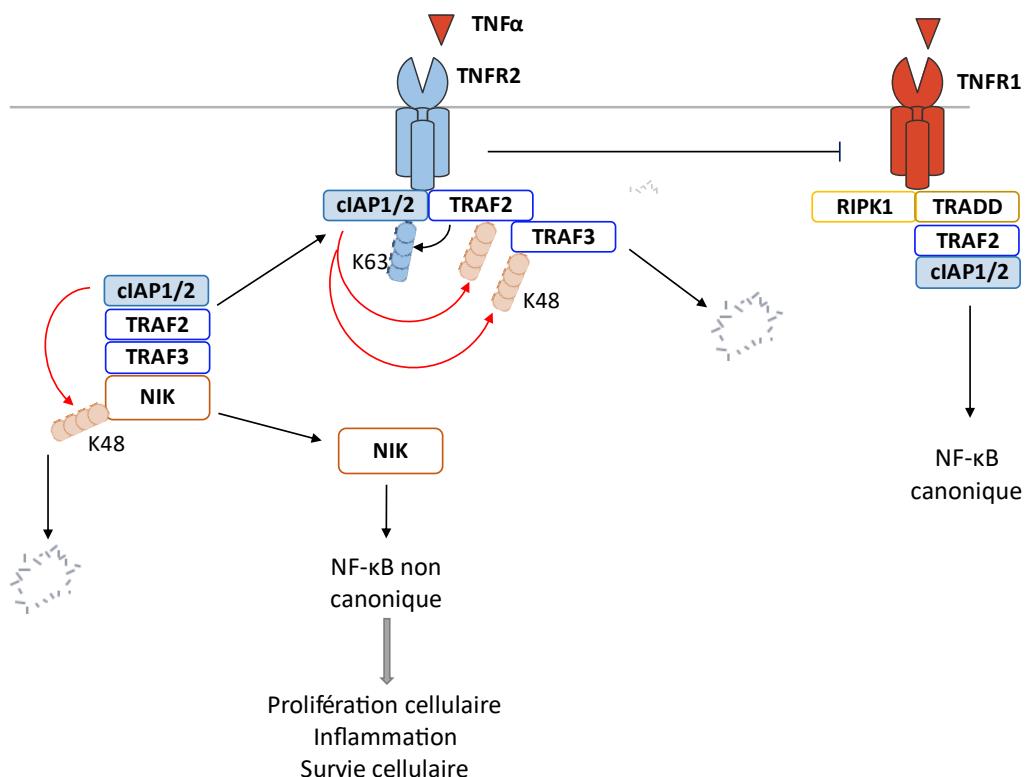
La stimulation des récepteurs de la famille du TNF CD40, BAFF-R, TNFR2, FN14, LTβR et RANK conduit au recrutement de TRAF3, TRAF2, cIAP1 et cIAP2 à la partie cytoplasmique des récepteurs, à l'ubiquitination de type K48 de TRAF3 par cIAP1, induisant sa dégradation, et donc à l'inhibition de la dégradation de NIK, menant à l'activation de la voie NF-κB non canonique (Dejardin, 2006; Matsuzawa *et al.*, 2008; Vallabhapurapu *et al.*, 2008; Rauert *et al.*, 2010; Gardam *et al.*, 2011; Varfolomeev *et al.*, 2012; Enwere *et al.*, 2014). La liaison de cIAP1 et 2 ainsi que TRAF2 aux récepteurs CD40R et BAFF-R conduit à l'activation de cIAP1 et 2 par des processus d'ubiquitination de type K63 médiés par TRAF2 et provoquant l'ubiquitination de type K48 de TRAF3 (Vallabhapurapu *et al.*, 2008) (Figure 17).

Gardam *et al.* ont analysé le rôle de cIAP1 et 2 ainsi que TRAF2 et 3 dans la signalisation médiée par BAFF-R et CD40 dans les lymphocytes B, la stimulation de ces récepteurs étant nécessaire à la survie et à l'activation de ces cellules. Ils ont développé des modèles murins permettant l'étude du KO de cIAP1 et/ou cIAP2 dans le développement des lymphocytes B. En présence de cIAP1 et/ou cIAP2, l'injection de la cytokine BAFF provoque la dégradation de TRAF3 mais cette dernière est totalement inhibée en absence de cIAP1 et 2, démontrant une certaine redondance dans le rôle de cIAP1 et cIAP2. Les lymphocytes B KO pour cIAP1 et 2 présentent une hyperactivation de la voie NF-κB non canonique, voient leur survie accrue et s'accumulent de manière incontrôlée. De plus, la stimulation de BAFF-R n'est plus nécessaire à leur maturation et à leur survie. En revanche, en absence de cIAP1, cIAP2 ou TRAF2 mais pas TRAF3, la signalisation induite par la stimulation du récepteur CD40 est compromise. En effet, l'activation des voies des MAPK ERK, JNK et p38 ainsi que la voie canonique de NF-κB est fortement diminuée. De plus, ces cellules sont incapables de former des centres germinatifs (Gardam *et al.*, 2011).

### **2. Régulation de la voie canonique de NF-κB par le TNFR2**

La stimulation du TNFR2 déclenche principalement la voie non canonique de NF-κB et recrute donc cIAP1 et TRAF2 à sa fraction cytoplasmique. L'activation simultanée du TNFR2 et du TNFR1 provoque le déclenchement de l'apoptose médiée par le TNFR1. Le TNFR1 et le TNFR2

entrent en compétition pour le recrutement de TRAF2, stimulant ainsi l'activation de la caspase 8 par le TNFR1 (Fotin-Mleczek *et al.*, 2002). Le TNFR2 a aussi la capacité d'activer la voie canonique de NF-κB. Il peut recruter HOIP (*HOIL-1 (Heme-Oxidized IRP2 ubiquitin Ligase 1)-Interacting Protein*), la sous-unité catalytique de LUBAC capable d'induire la fixation de chaînes de polyubiquitine linéaires, qui va à son tour ubiquitinier le complexe de signalisation relié au TNFR2 et ainsi déclencher l'activation de la voie canonique NF-κB. cIAP1 est aussi recrutée au niveau du TNFR1 et semble être nécessaire au recrutement de HOIP. En effet, l'utilisation d'antagonistes des IAP bloque le recrutement de LUBAC, suggérant un rôle de cIAP1 dans l'activation de la voie NF-κB canonique dépendante de TRAF2 (Borghi *et al.*, 2018) (Figure 17).



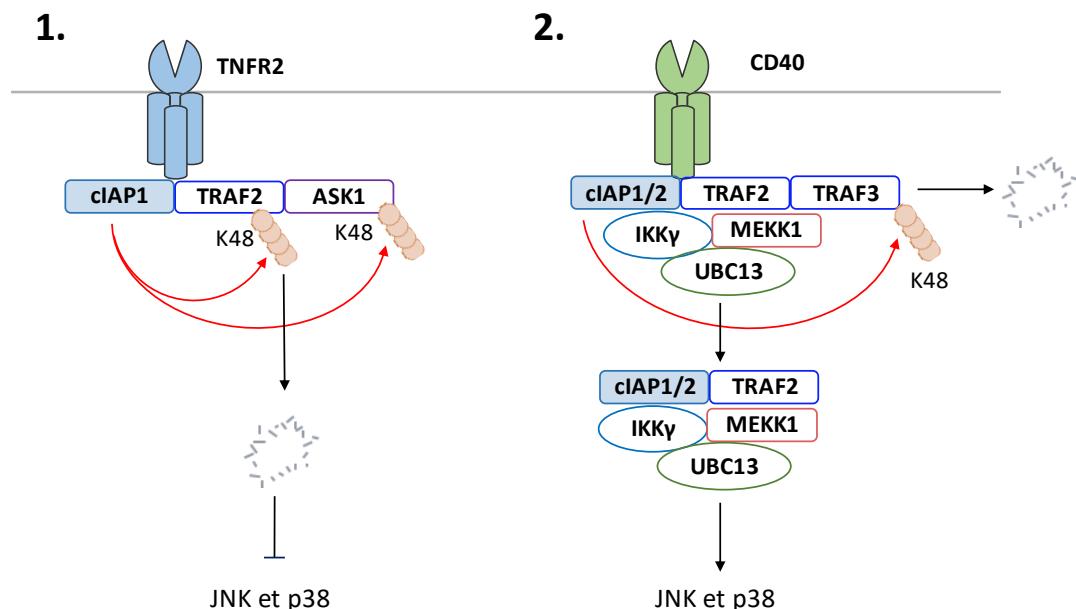
**Figure 17 : Régulation des voies NF-κB canonique et non canonique par le TNFR2.** TRAF3 interagit avec NIK et recrute TRAF2 qui lie cIAP1 et 2. Ces derniers induisent l'ubiquitination de type K48 de NIK, menant à sa dégradation par le protéasome et à l'inhibition de la voie NF-κB non canonique. Lors de l'activation du TNFR2 par le TNF $\alpha$ , cIAP1 et 2, TRAF2 et TRAF3 sont adressées au TNFR2. TRAF2 active cIAP1 et 2 par ubiquitination de type K63, qui vont à leur tour induire l'ubiquitination de type K48 de TRAF2 et 3 et donc leur dégradation par le protéasome. NIK est donc libérée et active la voie NF-κB non canonique et favorise la survie cellulaire. Le recrutement de TRAF2 et cIAP1 et 2 au TNFR2 inhibe le recrutement de ces derniers au TNFR1, bloquant l'activation de la voie NF-κB canonique.

### 3. Régulation des MAPK

Dans les lymphocytes B naïfs, la stimulation du TNFR1 provoque l'ubiquitination puis la dégradation par le protéasome de TRAF2 et de ASK1 (*Apoptosis Signal-regulating Kinase 1*), une MAPKKK, et déclenche une activation rapide mais courte des voies des MAPK JNK et p38. TRAF2 peut se lier à ASK1 par son domaine RING et activer ainsi les voies de signalisation des MAPK JNK

et p38. Lors de l'activation du TNFR2, elle peut aussi servir d'adaptateur à cIAP1 et lui permettre d'induire l'ubiquitination de type K48 de TRAF2 et ASK1. La déplétion de cIAP1 inhibe la dégradation de TRAF2 et ASK1 et stimule le maintien des voies de signalisation JNK et p38 dans le temps (Zhao *et al.*, 2007) (Figure 18).

La stimulation du CD40 provoque la formation d'un complexe de signalisation composé de TRAF2 et 3, cIAP1 et 2, IKK $\gamma$ , l'enzyme E2 UBC13 et la MAPKK MEKK1. La dégradation de TRAF3 par cIAP1 et 2 libère le complexe dans le cytosol. MEKK1 peut ensuite être activée et exige pour cela la présence de TRAF2, UBC13 et IKK $\gamma$ , induisant l'activation des MAPK p38 et JNK. La déplétion de cIAP1 ou l'inhibition du protéasome dans des lymphocytes B bloque la translocation du complexe dans le cytoplasme et inhibe ainsi l'activation des MAPK (Matsuzawa *et al.*, 2008) (Figure 18).



**Figure 18 : Régulation des MAPK par le TNFR2 et CD40.** 1. L'activation du TNFR2 provoque le recrutement de cIAP1, TRAF2 et ASK1 sur le récepteur. cIAP1 induit l'ubiquitination dégradative de type K48 de ASK1 et TRAF2 bloquant ainsi l'activation de JNK et p38. 2. L'activation de CD40 mène à la formation d'un complexe à la membrane composé de cIAP1 et 2, TRAF2 et 3, IKK $\gamma$ , MEKK1 et UBC13. cIAP1 provoque l'ubiquitination de type K48 de TRAF3 menant à sa dégradation. Le complexe est ainsi libéré dans le cytoplasme et active les voies p38 et JNK.

## E. La régulation des PRR par cIAP1 et TRAF2

### 1. La régulation des TLR

#### a) Régulation du TLR4

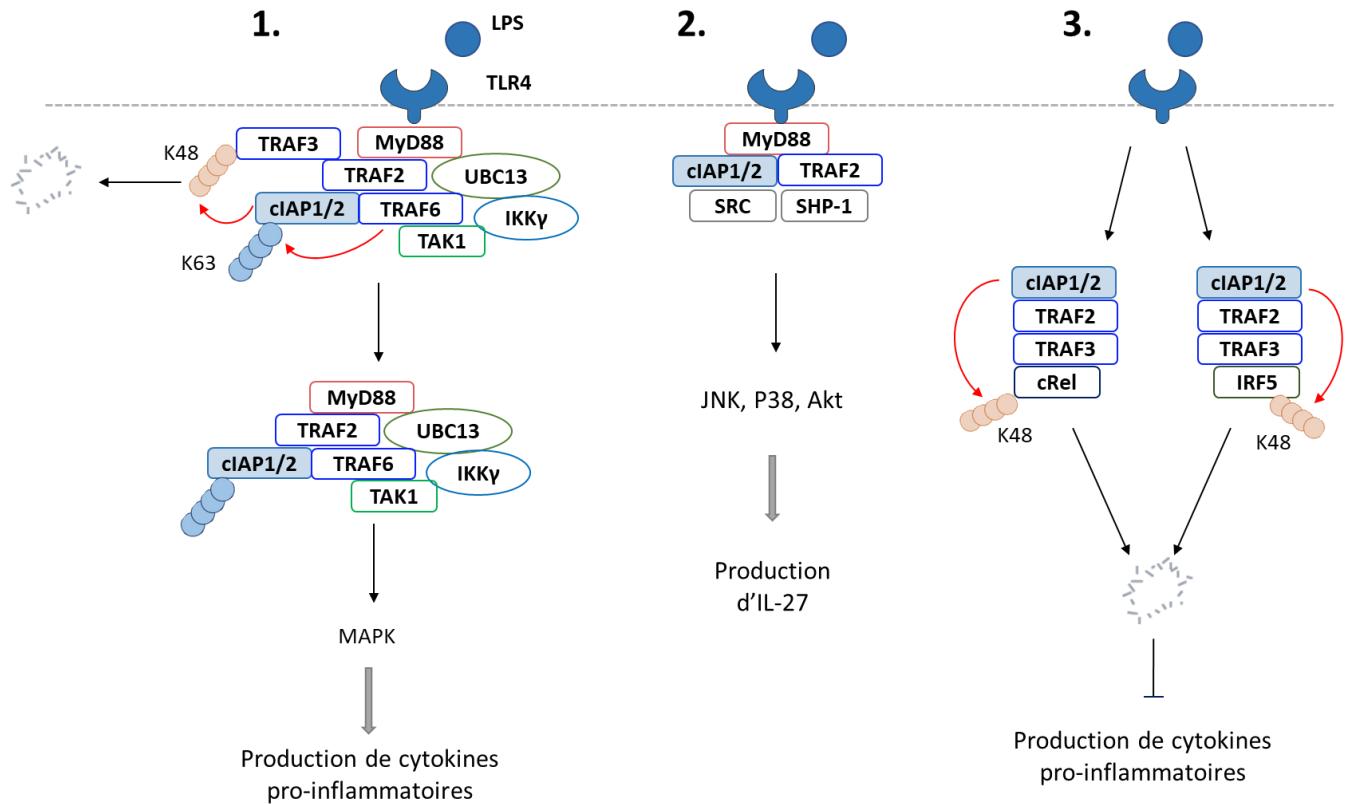
Le TLR4 est un récepteur membranaire de la famille des TLR mis en évidence pour sa capacité à être stimulé tout particulièrement par le LPS (lipopolysaccharide). Sa stimulation provoque le recrutement de deux protéines adaptatrices, MyD88 (*Myeloid Differentiation primary response 88*) et TRIF (*Toll-interleukin 1 Receptor domain-containing adaptor inducing IFN- $\beta$* ). Le

recrutement de MyD88 est associé à l'activation des voies de signalisation des MAPK et la production de cytokines pro-inflammatoires, alors que TRIF est plutôt impliquée dans la production d'IFN. L'activation de ces deux voies de signalisation sont compétitives et mutuellement exclusives (Kuzmich *et al.*, 2017). L'équipe de Karin a mis en évidence un rôle de cIAP1 dans la régulation de l'activité du TLR4. Sa stimulation induit la formation d'un complexe composé de MyD88, TRAF6, TRAF3, UBC13, IKK $\gamma$ , la MAPKKK TAK1 ainsi que cIAP1 et 2. La formation de ce complexe déclenche l'activation de TRAF6, qui à son tour active cIAP1 et 2 par ubiquitination de type K63. Il va ainsi engendrer l'ubiquitination de type K48 puis la dégradation par le protéasome de TRAF3. Le complexe est alors transloqué dans le cytoplasme et TAK1 peut donc activer les voies des MAPK et donc la production de cytokines pro-inflammatoires. L'utilisation de SMAC mimétiques, comme le birinapant, bloque la dégradation de TRAF3, inhibant ainsi la translocation du complexe dans le cytoplasme et donc l'activation des MAPK et la production de cytokines pro-inflammatoires (Tseng *et al.*, 2010; Xiao *et al.*, 2013; Hongxiang Liu *et al.*, 2017). TRAF3 est aussi impliquée dans la signalisation déclenchée par TRIF mais est ici essentielle à son activation. L'endocytose du TLR4 induit l'auto-ubiquitination de TRAF3, nécessaire à la production d'IFN (Tseng *et al.*, 2010) (Figure 19).

cIAP1 est aussi impliquée dans la production d'IL-27 induite par le LPS. Lors de la stimulation du TLR4 par le LPS, un complexe composé de cIAP1/2, de TRAF2, des tyrosine kinases SHP-1 et Src ainsi que de MyD88 se forme. Ce complexe conduit à l'activation des voies de signalisation p38, JNK et Akt et ultimement à l'activation de la voie canonique de NF- $\kappa$ B. L'utilisation d'antagonistes des IAP bloque complètement l'activation de ces voies de signalisation (Busca *et al.*, 2018) (Figure 19).

L'équipe de Vince a aussi démontré qu'en absence de XIAP, la stimulation du TLR4 dans des macrophages peut provoquer la dégradation de cIAP1 et TRAF2 et conduire à la mort cellulaire. Elle est dépendante du recrutement de MyD88, conduisant à la production de TNF $\alpha$ , activant ainsi le TNFR2. Ce dernier recrute cIAP1 et TRAF2 et déclenche leur dégradation. RIPK1 va ainsi pouvoir s'associer à RIPK3 et induire la mort cellulaire par apoptose, en interagissant avec la caspase 8, par nécroptose, en se liant à MLKL si l'activité de la caspase 8 n'est pas suffisante, et l'activation de l'IL-1 $\beta$  (Lawlor *et al.*, 2017).

cIAP1 et TRAF2 régulent aussi plus tardivement la signalisation induite par le TLR4. Lors d'une stimulation au LPS, l'ablation de TRAF2 ou TRAF3 dans des cellules myéloïdes conduit à l'accumulation de cRel et IRF5. En effet, TRAF3 peut se lier à cRel et IRF5, conduisant au recrutement de TRAF2, qui permet l'engagement de cIAP1 et 2 à proximité de cRel et IRF5. cIAP1 déclenche leur ubiquitination de type K48 et leur dégradation, régulant ainsi la production de cytokines pro-inflammatoires (Jin *et al.*, 2015) (Figure 19).

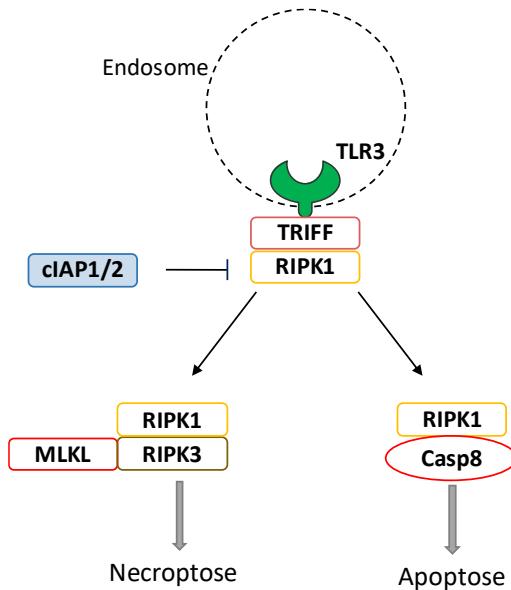


**Figure 19 : Régulation de la signalisation du TLR4 par cIAP1 et TRAF2.** 1. La stimulation du TLR4 par le LPS provoque la formation d'un complexe protéique dans lequel TRAF6 active cIAP1 et 2 par ubiquitination de type K63. cIAP1 et 2 déclenchent l'ubiquitination de type K48 de TRAF3, aboutissant à sa dégradation par le protéasome. Le complexe est ainsi libéré dans le cytoplasme et active les MAPK et donc la production de cytokines pro-inflammatoires. 2. Un second complexe composé de l'adaptateur MyD88, TRAF2, cIAP1 et 2, Src et SHP-1 peut aussi se former et conduire à l'activation de JNK, p38 et Akt et donc à la production d'IL-27. 3. cIAP1, TRAF2 et TRAF3 agissent aussi plus tardivement dans la régulation de la signalisation du TLR4. TRAF3 peut se lier à cRel ou IRF5. Elle recrute aussi TRAF2, qui est liée à cIAP1 et 2. Ces derniers provoquent l'ubiquitination dégradative de cRel et IRF5 inhibant la production de cytokines pro-inflammatoires.

### b) Régulation du TLR3

Lors de leur analyse de la signalisation médiée par le TLR4, l'équipe de Karin a démontré l'absence d'effet de SMAC mimétiques sur l'activation des MAPK médiée par le TLR3 (Tseng *et al.*, 2010), un membre de la famille des TLR impliqué dans la réponse antivirale et le seul TLR dont la signalisation est indépendante de MyD88 (Siednienko *et al.*, 2011). Pourtant, d'autres études ont mis en avant un rôle de cIAP1 et TRAF2 dans d'autres aspects de la signalisation médiée par le TLR3 et plus précisément dans la régulation de la mort cellulaire induite par ce dernier. En absence de cIAP1, la stimulation du TLR3 provoque le recrutement de l'adaptateur TRIF, qui à son tour lie RIPK1 par son domaine RHIM, qui va pouvoir recruter la caspase 8 et former le ripoptosome, ou lier RIPK3 et former le nécrosome. La déplétion de RIPK3 ne semble pas inhiber le déclenchement de l'apoptose médiée par le ripoptosome. cIAP1 a pour rôle de réguler l'activité de RIPK1 en provoquant son ubiquitination, limitant ainsi la formation des complexes de mort cellulaire en réponse à la

stimulation du TLR3 (Friboulet *et al.*, 2008; Weber *et al.*, 2010; Feoktistova *et al.*, 2011; Estornes *et al.*, 2012) (Figure 20).



**Figure 20 : Régulation du TLR3 par cIAP1 et 2.** L'activation du TLR3 mène au recrutement de RIPK1. En absence de cIAP1 et 2, il peut former un complexe avec la caspase 8 et provoquer l'apoptose ou former un complexe avec RIPK3 et MLKL et déclencher la nécroptose.

## 2. La régulation des NLR

### a) NOD1 et NOD2

Les récepteurs NOD1 et 2 appartiennent à la famille des NLR et sont des senseurs de composés de la paroi bactérienne. Ils sont stimulés respectivement par le DAP (*DiAminoPimelic acid*) et le MDP (*Muramyl DiPeptide*), des peptides dérivés de peptidoglycanes retrouvés dans les parois bactériennes. La stimulation de ces récepteurs provoque le recrutement de RIPK2 et induit principalement l'activation de la voie NF-κB (Chen *et al.*, 2009). RIPK2 est principalement régulé par des processus d'ubiquitination nécessaires à l'activation de NF-κB (Y. Yang *et al.*, 2007; Hasegawa *et al.*, 2008). La déplétion de TRAF2 ou TRAF5 dans des MEF inhibe l'activation de la voie NF-κB induite par NOD1 mais aucune preuve d'un rôle dans l'ubiquitination de RIPK2 n'a été démontrée (Hasegawa *et al.*, 2008). En revanche, une interaction directe entre XIAP, cIAP1 et cIAP2 avec RIPK2 a été démontrée et provoque l'ubiquitination de type K63 de RIPK2 nécessaire à l'activation de la voie NF-κB (Bertrand *et al.*, 2009; Krieg *et al.*, 2009; Damgaard *et al.*, 2012) (Figure 21).

### b) Régulation de l'inflammasome

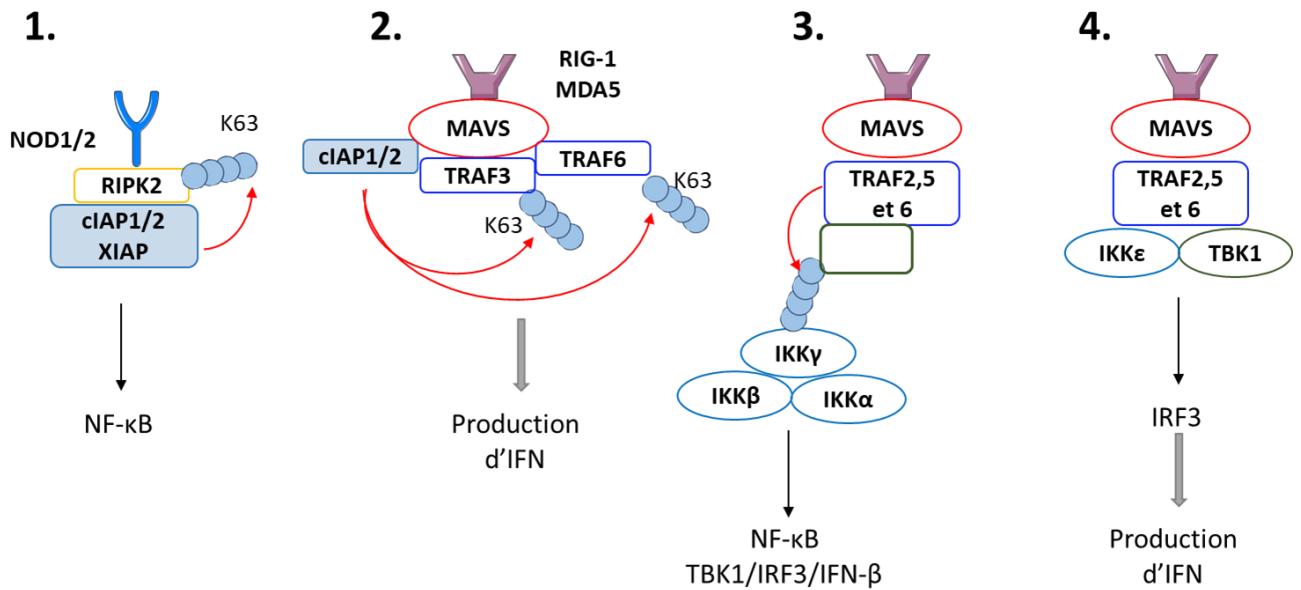
Certains membres de la famille des NLR, tels que NLRP3 et NLRC4, ne transduisent pas de signaux menant à la production de médiateurs inflammatoires, mais contribuent à la réponse inflammatoire par l'assemblage d'une plateforme conduisant à l'activation de la caspase 1 : l'inflammasome. Celui-ci provoque la maturation de l'IL-18 ainsi que l'IL-1 $\beta$  et initie un type de mort cellulaire inflammatoire appelé la pyroptose (Vladimer *et al.*, 2013). Labbé *et al.* ont démontré la

capacité de cIAP1 et cIAP2 à induire l'ubiquitination de type K63 de la caspase 1, facilitant ainsi son activation et favorisant la formation de l'inflammasome NLRP3 (Labbé *et al.*, 2011). De façon inverse, Vince *et al.* ont démontré que la déplétion des IAP stimule l'activation de l'inflammasome NLRP3 (Vince *et al.*, 2012).

### 3. La régulation des RLR

RIG-1 et MDA-5 sont des RLR nécessaires à la détection des infections de virus à ARN et déclenchent la réponse cellulaire adéquate en induisant l'activation des facteurs de transcription NF- $\kappa$ B et IRF et donc la production d'IFN. Ils recrutent l'adaptateur MAVS, nécessaire au déclenchement des différentes voies de signalisation. Mao *et al.* ont démontré que la déplétion de cIAP1 et 2 dans des cellules HEK293 infectées par le virus Sendai, un virus à ARN de la famille des paramyxoviridae, diminue l'activation d'IRF3 et de NF- $\kappa$ B, la production d'IFN- $\beta$  et facilite la réplication virale. Dans le cas d'une infection virale, cIAP1 et 2 sont recrutées avec TRAF3 et TRAF6 au niveau de MAVS et déclenchent l'ubiquitination de TRAF3 et TRAF6, principalement de type K63, qui est nécessaire à la production d'IFN (Mao *et al.*, 2010). Paradoxalement, deux études plus récentes contredisent ces résultats. En effet, l'utilisation de SMAC mimétiques lors d'infections de cellules par des virus à ARN n'influe pas sur la réponse antivirale et suggère donc que cIAP1 et 2 ne sont pas impliquées dans la réponse antivirale (Liu *et al.*, 2013; Beug *et al.*, 2014). En revanche, elles démontrent une potentielle implication de TRAF2, 5 et 6 dans la signalisation cellulaire médiée par MAVS (Liu *et al.*, 2013, 2015). L'équipe de Jiang a confirmé l'importance des protéines de la famille des TRAF dans la réponse à une infection par le virus Sendai. TRAF2, 5 et 6 sont recrutées par MAVS et déclenchent la formation de chaînes d'ubiquitine nécessaires au recrutement de IKK $\gamma$ , conduisant à l'activation de la voie NF- $\kappa$ B et de l'axe TBK1/IRF3/IFN- $\beta$ . Les TRAF sont aussi capables de lier directement TBK1 et IKK $\epsilon$  et de les activer indépendamment de leur activité E3 ubiquitine ligase, induisant l'activation d'IRF3 et la production d'IFN de type I indépendamment de la voie NF- $\kappa$ B (Fang *et al.*, 2017) (Figure 21).

LGP2 est un membre particulier des récepteurs de la famille des RLR : c'est à la fois un régulateur positif et négatif de la réponse antivirale (Rodriguez, Bruns et Horvath, 2014). Par exemple, il supprime la réponse antivirale dans des cellules HEK293 infectées par le virus Sendai. LGP2 est capable de lier les protéines TRAF2, 3, 5 et 6 par leur région N-terminale afin de bloquer leur activité E3 ubiquitine ligase et ainsi réguler négativement l'activation des voies NF- $\kappa$ B et IRF3. De plus, la déplétion de LGP2 conduit à une réponse antivirale exacerbée (Parisien *et al.*, 2018) (Figure 21).



**Figure 21 : Régulation des NLR et RLR par cIAP1 et TRAF2.** 1. La stimulation de NOD1 et 2 mène au recrutement de RIPK2. Cette dernière se lie à cIAP1 et 2 ainsi que XIAP. Ces dernières induisent l'ubiquitination activatrice de type K63 de RIPK2, menant à l'activation de la voie NF-κB. 2. La stimulation de RIG-1 ou de MDA5 provoque le recrutement de MAVS. Cette dernière peut lier cIAP1 et 2, TRAF3 et 6, menant à l'activation de TRAF3 et 6 par ubiquitination de type K63 induite par cIAP1 et 2, déclenchant l'activation de la voie NF-κB. 3. MAVS peut aussi interagir avec TRAF2, 5 et 6. Ces dernières forment des chaînes d'ubiquitine sur lesquelles le complexe IKK peut se fixer et induire l'activation de NF-κB et de l'axe TBK1/IRF3/IFN-β. 4. TRAF2, 5 et 6 recrutent aussi directement IKKε et TBK1 afin d'activer IRF3 et la production d'IFN.

#### 4. Le cas particulier de IKK $\epsilon$

IKK $\epsilon$  est une sérine/thréonine kinase et un membre non canonique de la famille IKK. Elle est impliquée dans l'induction du signal de plusieurs récepteurs tels que le TLR3, RIG-1 et MDA5, et mène à l'activation de diverses voies de signalisation telles que les voies NF-κB, Akt, STAT (*Signal Transducers and Activators of Transcription*) et Wnt/ $\beta$ -caténine (Yin, Wang et Lu, 2020). Un complexe composé de cIAP1, cIAP2 et TRAF2 peut se lier directement à IKK $\epsilon$  et provoquer ainsi son activation par ubiquitination de type K63 sur ses résidus K30 et K401. Cette activation est essentielle à l'activation de la voie canonique de NF-κB dirigée par IKK $\epsilon$ , nécessaire aux propriétés oncogéniques de cette dernière (Zhou *et al.*, 2013).

#### 5. La régulation des récepteurs aux cytokines par TRAF2

##### a) TRAF2 et l'IL-17R

En 2000, Schwandner *et al.* ont montré un rôle de TRAF6, indépendant de TRAF2, dans l'activation de NF-κB médiée par le récepteur à l'IL-17 (Schwandner, Yamaguchi et Cao, 2000). Pour autant, TRAF2 est impliquée dans la régulation de la signalisation de l'IL-17. Elle interagit avec l'adaptateur de l'IL-17R, Act1, et régule ainsi la stabilité des ARN messagers de nombreuses

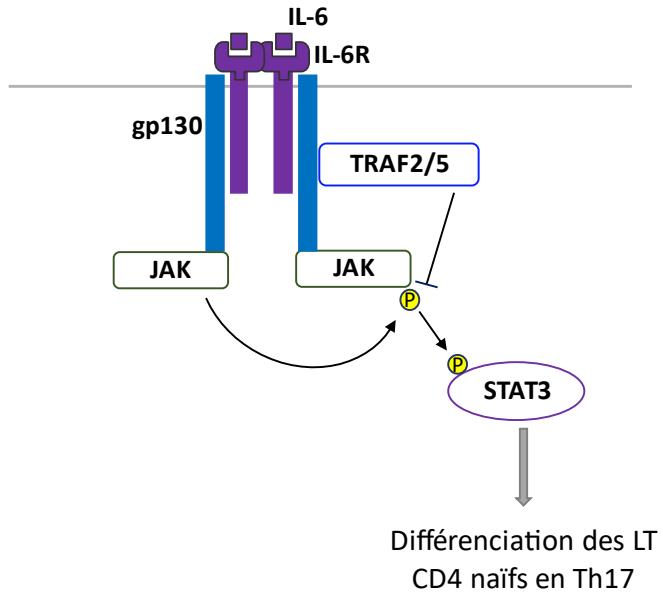
cytokines pro-inflammatoires (Swaidani *et al.*, 2019). De plus, l'équipe du professeur Chang a mis en exergue un nouveau mécanisme dépendant du récepteur TNFR2. Des expériences de co-immunoprecipitation ont démontré une interaction entre l'IL-17RD (un membre de la famille des IL-17R) et le TNFR2, menant au recrutement de TRAF2 et à l'induction de la voie NF-κB (Yang *et al.*, 2015).

### **b) TRAF2 et l'IFN de type I**

L'IFN de type I est un élément important de l'immunité innée. Il induit la synthèse de nombreuses protéines antivirales (Koyama *et al.*, 2008) et est reconnu par un récepteur membranaire ubiquitaire composé de deux sous-unités : IFNAR1 et IFNAR2. La transduction du signal est dépendante du recrutement des protéines STAT par les protéines JAK (Horvath, 2004). Une analyse par co-immunoprecipitation a mis en avant une interaction directe entre la sous-unité IFNAR1 et TRAF2 lors d'une stimulation à l'IFN. De plus, l'étude de MEF dérivées d'un modèle murin KO pour TRAF2 a démontré l'importance de TRAF2 dans l'activation de la voie alternative de NF-κB dépendante de l'IFN de type I (Yang *et al.*, 2008).

### **c) TRAF2 et le récepteur à l'IL-6**

L'IL-6 est une cytokine pro-inflammatoire exerçant son action *via* un récepteur composé de deux sous-unités, l'IL-6R qui reconnaît son ligand et gp130 (*glycoprotein 130*) qui sert de plateforme de signalisation. Les protéines JAK interagissent directement avec gp130 et s'activent entre elles, induisant une cascade de phosphorylation permettant le recrutement et l'activation des facteurs de transcription STAT et en particulier STAT3 (Johnson, O'Keefe et Grandis, 2018). L'activation de cette voie de signalisation est nécessaire à la différenciation de lymphocytes T CD4 naïfs en lymphocytes Th17 (*T helper 17*). La surexpression de TRAF2 et TRAF5 dans des lymphocytes T CD4 naïfs inhibe ces processus de différenciation. En effet, TRAF2 et TRAF5 peuvent se lier à la sous-unité gp130 et inhiber ainsi l'activation par phosphorylation des JAK. De cette manière, TRAF2 et TRAF5 bloquent l'initiation des voies de signalisation dépendantes de JAK/STAT3. TRAF2 et TRAF5 régulent donc la différenciation des lymphocytes T CD4 en Th17 en réponse à l'IL-6 (Nagashima *et al.*, 2016; Kimura *et al.*, 2018) (Figure 22).



**Figure 22 : Régulation de la voie IL-6 par TRAF2.** La stimulation des récepteurs à l'IL-6 provoque le recrutement des JAK sur la sous-unité gp130, qui s'activent entre elles par phosphorylation. Les JAK phosphorylent ensuite STAT3, menant à la différenciation des LT CD4 naïfs en Th17. TRAF2 et TRAF5 peuvent se lier à gp130 et inhiber l'activation de JAK.

## F. Localisation nucléaire de cIAP1 et régulation des facteurs de transcription

À la différence de XIAP qui est principalement cytoplasmique, cIAP1 est retrouvée à la fois dans le noyau et le cytoplasme. Elle régule ainsi l'activité de nombreux facteurs de transcription et l'avancée du cycle cellulaire (Tableau 2) (Zadoroznyj et Dubrez, 2022).

### 1. Régulation du programme transcriptionnel

L'équipe de Goldberg a étudié le rôle de cIAP1 dans la régulation de c-Myc, un facteur de transcription impliqué dans la régulation de la croissance cellulaire, la différenciation et l'apoptose qui est très souvent dérégulé dans les cancers humains, et plus précisément son action sur Mad1 (*Mitotic arrest deficient 1*), un inhibiteur de c-Myc exclusivement nucléaire (Madden *et al.*, 2021). Ils ont dans un premier temps mis en évidence *in vitro* que cIAP1 peut cibler Mad1 et induire son ubiquitination. Cette dernière déclenche la dégradation de Mad1 et stimule ainsi la prolifération cellulaire. cIAP1 coopère donc avec c-Myc afin de stimuler la croissance tumorale en induisant la dégradation d'un de ses principaux inhibiteurs (Xu *et al.*, 2007).

cIAP1 est aussi capable de se lier au cofacteur de transcription VGL-4 (*Vestigial-Like 4*) et au corépresseur CtBP2 (*C-terminal Binding Protein 2*) (Jin *et al.*, 2011; Seo *et al.*, 2020). Le VGL-4, en cas de surexpression, peut forcer la relocalisation de cIAP1 dans le noyau. Il bloque le recrutement de cIAP1 sur les récepteurs au TNF $\alpha$  et déclenche ainsi l'activation des voies de mort cellulaire. Une surexpression de TRAF2 est suffisante pour inhiber l'action du VGL-4 (Jin *et al.*, 2011). CtBP2 se lie au domaine BIR1 de cIAP1 au sein du noyau. La surexpression de cIAP1 dans

la lignée cancéreuse HeLa accroît le taux de CtBP2 et l'inverse est observé en cas de déplétion de cIAP1. De plus, la suppression du domaine RING ne semble pas influencer l'expression de CtBP2. Cette interaction stabilise donc CtBP2 indépendamment du domaine RING de cIAP1 et favorise la transcription des gènes cibles de CtBP2 impliqués par exemple dans la migration cellulaire (Seo et al., 2020).

CREB (*CAMP Response Element-Binding protein*) est un facteur de transcription activé par phosphorylation jouant un rôle dans la prolifération, la différenciation et la survie cellulaire, principalement dans les cellules immunitaires. Par exemple, il stimule l'activation et la prolifération des lymphocytes B (Wen, Sakamoto et Miller, 2010). L'équipe du professeur Bishop a retrouvé TRAF3 associé à CREB dans le noyau de lymphocytes B. Au sein du noyau, un complexe composé de TRAF3, TRAF2 ainsi que cIAP1 et 2 semble se former et induire l'ubiquitination puis la dégradation de CREB. La déplétion de TRAF3 accroît la stabilité et la quantité de CREB. Les pathologies dépendantes des lymphocytes B présentant une déplétion de TRAF3 pourraient donc montrer une plus grande sensibilité aux traitements ciblant CREB (Mambetsariev et al., 2016).

## 2. Régulation du cycle cellulaire

### a) Régulation de p21

Chen et al. ont étudié l'effet de SMAC mimétiques sur la régulation du cycle cellulaire sur des lignées cellulaires de méduloblastome. L'utilisation de deux SMAC mimétiques, LCL-161 et LBW242, ou de siRNA ciblant cIAP1/2 et XIAP bloquent le cycle cellulaire et entraînent l'accumulation de cellules en phase G0 et en transition G2/M. Ces traitements diminuent l'expression des cyclines A et B1 ainsi que des CDK1 (*Cyclin-Dependent Kinase 1*) et 2. Le siRNA ciblant cIAP1 provoque la surexpression de l'inhibiteur de cycline p21 et bloque ainsi le cycle cellulaire. cIAP1 peut directement interagir avec p21, favorisant la neddylation, menant à la dégradation par le protéasome de ce dernier. L'étude de tissus humains de méduloblastome a justement montré une corrélation inverse entre l'expression nucléaire de cIAP1 et de p21 (Chen et al., 2018).

### b) Régulation du facteur de transcription E2F1

E2F1 est un membre de la famille des E2F, des facteurs de transcription jouant un rôle critique dans la régulation du cycle cellulaire. E2F1 est le premier membre découvert de cette famille et le plus étudié. Son activation conduit à l'expression de gènes nécessaires à la transition G1-S et à la réplication de l'ADN. Il est aussi rapidement surexprimé en réponse à des dommages à l'ADN et régule l'arrêt du cycle cellulaire et le déclenchement de l'apoptose. Il est entre autres régulé par des processus d'ubiquitination médiés par exemple par cIAP1 (Dubrez, 2017). cIAP1 interagit directement avec E2F1 par son domaine BIR3 et est nécessaire à l'activité transcriptionnelle de E2F1. L'inhibition de cIAP1 diminue l'expression des cyclines E et A dans différentes lignées cancéreuses (CaSki et HeLa) (Cartier et al., 2011; Allègre et al., 2018). Glorian et al. ont démontré que cIAP1 pouvait induire l'ubiquitination de type K63 sur les résidus K161 et K164 de E2F1. Ce

processus est impliqué dans la stabilisation et l'activation de E2F1. Lors de la progression du cycle cellulaire ou lors de la réponse à des dommages à l'ADN, la stabilisation de E2F1 est associée à cette ubiquitination de type K63 dépendante de clAP1 (Glorian *et al.*, 2017). La surexpression de clAP1 modifie le profil d'ubiquitination de E2F1 et favorise l'ubiquitination de type K11 et K63 tout en diminuant celle de type K48, augmentant la stabilité et l'expression de E2F1. Des expériences de ChIP-seq (*Chromatin ImmunoPrecipitation Sequencing*) sur la lignée HeLa ont également démontré que clAP1 est nécessaire au recrutement de E2F1 sur la chromatine (Allègre *et al.*, 2018).

**Tableau 2 : Tableau récapitulatif des facteurs de transcriptions régulés par clAP1.**

Type de facteur	Substrat	Type d'interaction	Référence
Facteur de transcription	Mad1	Direct <i>via</i> les domaines BIR	(Xu <i>et al.</i> , 2007)
	E2F1	Direct <i>via</i> le BIR3	(Cartier <i>et al.</i> , 2011; Glorian <i>et al.</i> , 2017; Allègre <i>et al.</i> , 2018)
	CREB	Indirect <i>via</i> TRAF2 et 3	(Mambetsariev <i>et al.</i> , 2016)
	cREL	Indirect <i>via</i> TRAF2 et 3	(Jin <i>et al.</i> , 2015)
	IRF5	Indirect <i>via</i> TRAF2 et 3	(Jin <i>et al.</i> , 2015)
	CHOP	Direct	(Qi et Xia, 2012)
Cofacteur	Vgl4	Direct	(Jin <i>et al.</i> , 2011)
Corépresseur	CtBP2	Direct <i>via</i> le BIR1	(Seo <i>et al.</i> , 2020)

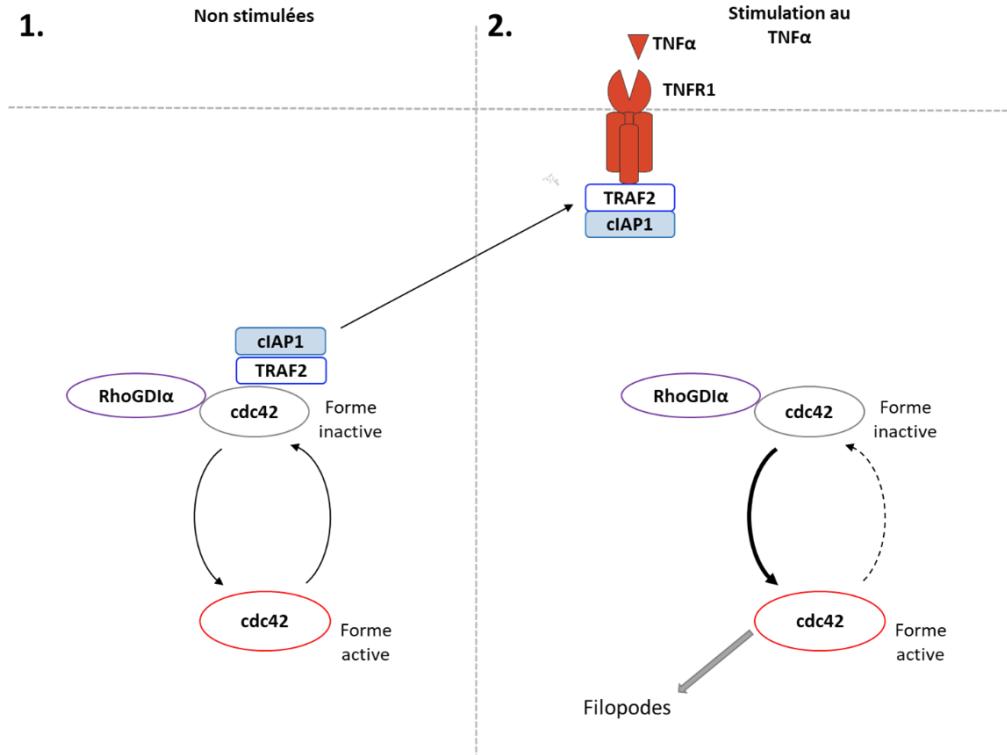
## G. Régulation de la migration et de la motilité cellulaire

La famille des Rho GTPases est une famille de petites protéines G de la famille des Ras (*Rat sarcoma*). Ces protéines se caractérisent par leur capacité à changer d'un état actif lié au GTP (*Guanosine-5'-TriPhosphate*) à un état inactif lié au GDP (*Guanosine 5'-DiPhosphate*). Leur activité est finement régulée par les GEF (*Guanine nucleotide Exchange Factors*), les GAP (*GTPase-Activating Proteins*) et les GDI (*Guanine nucleotide Dissociation Inhibitors*). Les GEF déclenchent la libération du GDP afin de permettre la fixation du GTP et l'activation des Rho GTPases. Les GAP stimulent l'hydrolyse du GTP en GDP afin d'inactiver les Rho GTPases puis les GDI lient leur extrémité C-terminale et les maintiennent dans un état inactif dans le cytosol. Au sein de cette famille, les protéines ubiquitaires RhoA, Rac1 (*Rac Family Small GTPase 1*) et cdc42 (*cell division cycle 42*) sont des régulateurs majeurs du cytosquelette d'actine et contrôlent donc la migration cellulaire. Elles sont aussi impliquées dans d'autres processus tels que la régulation et la prolifération cellulaire (Sadok et Marshall, 2014; Brakebusch, 2021).

L'équipe de Rajalingam a observé que la déplétion des IAP par le BV6 dans la lignée cancéreuse HeLa provoque l'apparition d'une morphologie allongée, une migration cellulaire accrue et une augmentation du niveau d'expression de Rac1. De plus, des MEF déficientes pour clAP1 ou

XIAP présentent aussi un allongement morphologique et une migration accrue. La suppression de Rac1 par des siRNA au sein de ces MEF abolit ces modifications. La déplétion de cIAP1 mène donc à l'activation et à la surexpression de Rac1 et à un mode de migration mésenchymateuse. cIAP1 et XIAP peuvent directement lier Rac1, induire son ubiquitination sur le résidu K147 puis sa dégradation par le protéasome, inhibant ainsi les changements morphologiques (Oberoi *et al.*, 2012). XIAP et cIAP1 sont aussi capables de lier directement RhoA indépendamment de l'activation de cette dernière. Cette interaction est nécessaire à l'activation de RhoA mais n'implique pas de processus d'ubiquitination (Hornburger *et al.*, 2014).

Le TNF $\alpha$  peut moduler la réorganisation du cytosquelette d'actine en stimulant l'activation de cdc42. Notre équipe a démontré, en comparaison avec des MEF WT, que des MEF KO pour cIAP1 présentent des modifications morphologiques, telles que la formation de structures semblables à des filopodes, indépendamment d'une stimulation au TNF $\alpha$  et à l'activation de la voie NF- $\kappa$ B. Une activation accrue de cdc42 est aussi observée. cIAP1 interagit directement avec cdc42 et module son activation en formant un complexe composé de cdc42, cIAP1, TRAF2 et RhoGDI $\alpha$ . cIAP1 stabilise donc cdc42 dans une forme inactive dans le cytosol en favorisant son interaction avec la GDI RhoGDI $\alpha$ . Surprenamment, la stimulation de MEF WT par le TNF $\alpha$  accroît la formation de filopodes mais celle-ci n'est pas observée en absence de cIAP1 ou TRAF2. Les filopodes formés à la suite de la stimulation au TNF $\alpha$  dans les MEF WT sont plus nombreux et longs que ceux formés spontanément dans les MEF KO pour cIAP1. La stimulation des MEF par le TNF $\alpha$  recrute cIAP1 et TRAF2 à leur récepteur. cIAP1 et TRAF2 ne sont donc plus disponibles pour interagir et inhiber cdc42, qui peut donc être plus facilement activé et former des filopodes. L'activation des voies de signalisation dépendantes du TNF $\alpha$  peut potentiellement augmenter l'expression de facteurs secondaires régulant l'activité de cdc42. cIAP1 semble aussi réguler l'activation de cdc42 en réponse à l'EGF (*Epidermal Growth Factor*) et à l'expression de l'oncogène H-Ras V12 (Marivin *et al.*, 2014) (Figure 23).



**Figure 23 : Régulation de cdc42 par TRAF2 et clAP1/2.** 1. À l'état basal, cdc42 est maintenue sous une forme inactive par son interaction avec RhoGDI $\alpha$ , stabilisée par TRAF2 et clAP1. 2. La stimulation du TNFR1 par le TNF $\alpha$  adresse TRAF2 et clAP1 au TNFR1, déstabilisant l'interaction entre RhoGDI $\alpha$  et cdc42. La forme active de cdc42 est donc favorisée et induit la formation de filopodes.

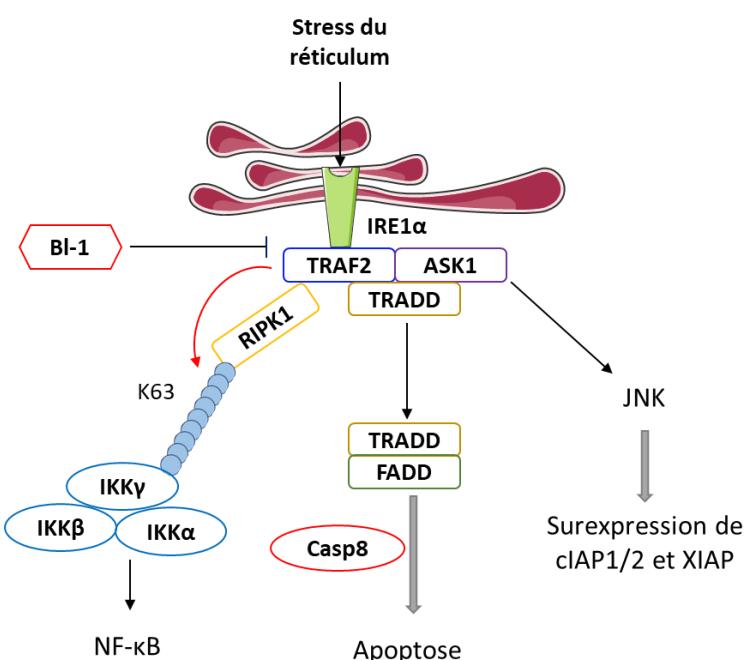
## H. Régulation du stress du réticulum endoplasmique

En cas de stress du réticulum endoplasmique, l'UPR (*Unfolded Protein Response*) est mis en place. Dans le cas d'un stress modéré, l'UPR restaure l'homéostasie du réticulum par des mécanismes de reprogrammation transcriptionnelle, d'élimination des protéines mal repliées et de recyclage de ces dernières à la suite de l'induction de l'autophagie. Si le stress est trop important, l'UPR va déclencher des mécanismes de mort cellulaire. Chez les mammifères, il existe trois protéines transmembranaires senseurs des stress du réticulum endoplasmique : ATF6 (*Activating Transcription Factor 6*), PERK (*PRKR-like ER Kinase*) et IRE1 $\alpha$  (*Inositol-Requiring Enzyme 1 $\alpha$* ). Dans un contexte de protéostase, BIP (*chaperone Binding-Immunoglobulin Protein*) se fixe à ces senseurs et les maintient dans un état inactif (Chen et Cubillos-Ruiz, 2021).

### 1. TRAF2 dans le stress du réticulum endoplasmique

TRAF2 a été principalement décrite dans la régulation du stress du réticulum endoplasmique indépendamment de clAP1. Elle peut se lier directement à la partie cytoplasmique de la forme active de IRE1 $\alpha$ . Cette interaction mène au recrutement et à l'activation de ASK1 qui conduit à l'induction des MAPK p38 et JNK (Hetz et Glimcher, 2009; Almanza *et al.*, 2019). L'activation de la MAPK JNK par le complexe IRE1 $\alpha$ /TRAF2/ASK1 mène à l'induction de gènes anti-apoptotiques tels que clAP1, XIAP et clAP2 (Brown *et al.*, 2016). L'inhibiteur BI-1 (*Bax (Bcl-2-associated X) Inhibitor 1*) s'associe

à IRE1 $\alpha$  et bloque ainsi l'interaction de cette dernière avec TRAF2, inhibant l'activation de JNK et le déclenchement de l'autophagie médiée par IRE1 $\alpha$  (Castillo *et al.*, 2011). TRAF2 semble aussi pouvoir recruter RIPK1 et TRADD au niveau de IRE1 $\alpha$  (Wang *et al.*, 2015; Park *et al.*, 2016). TRAF2 recrute RIPK1 et induit son ubiquitination de type K63, menant au recrutement du complexe IKK et à l'activation de la voie canonique de NF- $\kappa$ B (Park *et al.*, 2016). TRAF2 recrute TRADD afin de former un complexe IRE1 $\alpha$ -TRAF2-ASK1-TRADD. Dans ce complexe, TRADD enrôle FADD et stimule la mort cellulaire médiée par la caspase 8 (Wang *et al.*, 2015) (Figure 24). Mauro *et al.* ont de plus démontré que la déplétion de TRAF2 sensibilise les MEF à l'apoptose déclenchée par l'accumulation de ROS en réponse au stress du réticulum (Mauro *et al.*, 2006).



**Figure 24 : Régulation du stress du réticulum endoplasmique par TRAF2.** La stimulation de IRE1 $\alpha$  à la suite d'un stress du réticulum conduit au recrutement de TRAF2. Cette dernière peut lier RIPK1 et l'ubiquitinier, conduisant au recrutement du complexe IKK et à l'activation de NF- $\kappa$ B. TRAF2 recrute ASK1, menant à l'activation de JNK et à la surexpression de cIAP1 et 2 ainsi que XIAP. Le recrutement de ASK1 mène aussi à l'arrivée de TRADD pouvant induire la formation du complexe TRADD/FADD et la mort par apoptose dépendante de la caspase 8. L'inhibiteur BI-1 bloque l'interaction entre IRE1 $\alpha$  et TRAF2 et inhibe ainsi l'activation des MAPK.

## 2. cIAP1 et la régulation de CHOP

cIAP1 a été peu décrite dans la régulation du stress du réticulum. Pour autant, elle est impliquée dans la régulation de CHOP (*C/EBP Homologue Protein*), un facteur de transcription induit lors de l'activation de l'UPR et considéré comme un médiateur clé de la mort cellulaire provoquée en réponse au stress du réticulum endoplasmique. Son activation favorise principalement l'expression de gènes pro-apoptotiques (Hu *et al.*, 2019). Qi et Xia ont analysé le rôle de cIAP1 dans la lipotoxicité de lymphocytes B induite en réponse à un stress du réticulum. Le traitement de cellules B avec le palmitate provoque l'activation de CHOP et la dégradation de cIAP1. La surexpression de

cIAP1 inhibe en partie la lipotoxicité. cIAP1 est capable d'induire l'ubiquitination puis la dégradation de CHOP, inhibant ainsi l'expression de gènes pro-apoptotiques. cIAP1 est donc capable de prévenir la lipotoxicité médiée par le stress du réticulum endoplasmique en provoquant la dégradation de CHOP (Qi et Xia, 2012).

## I. Régulation de l'autophagie et de la mitophagie

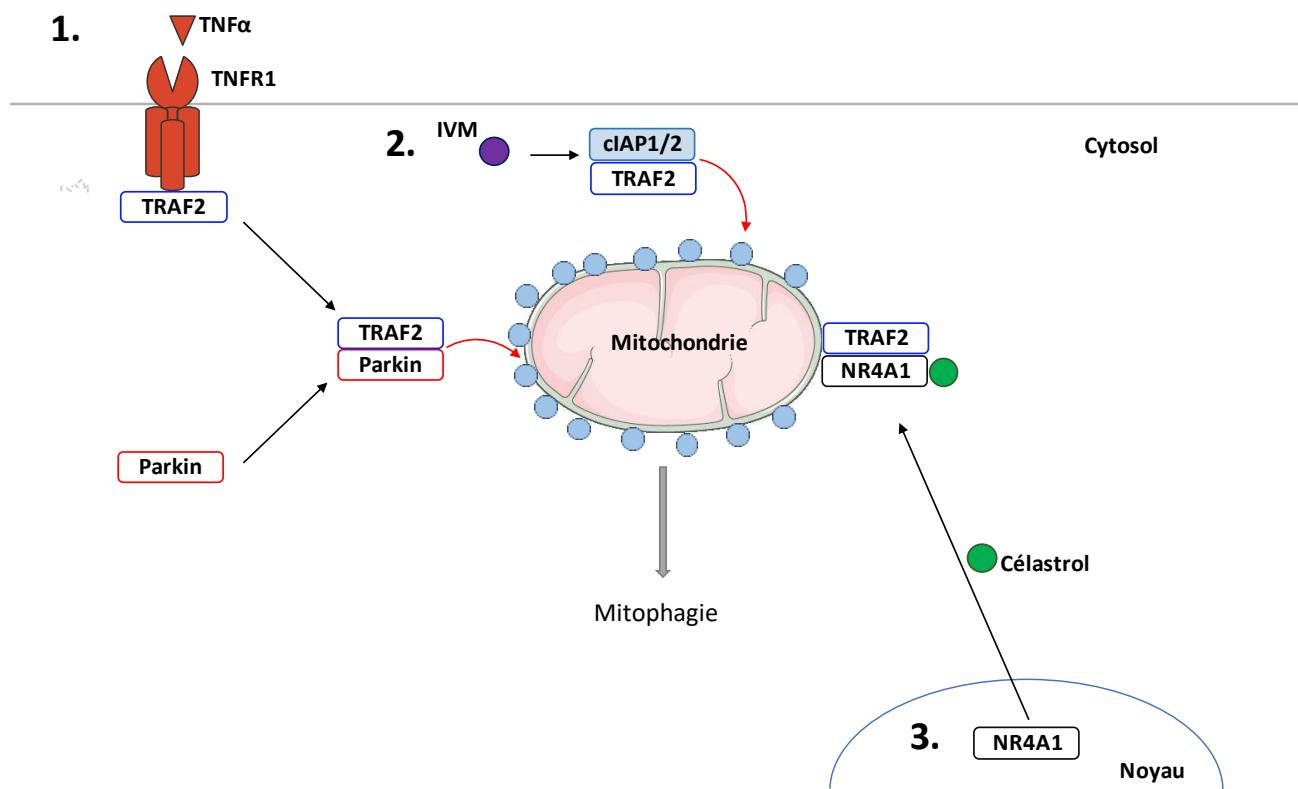
### 1. Régulation de l'autophagie

L'autophagie est un processus essentiel au maintien de l'homéostasie des cellules. C'est un processus de dégradation sélectif des composants cellulaires caractérisé par leur capture par des autophagosomes puis leur dégradation par les lysosomes. La protéine Beclin 1 joue un rôle majeur dans l'activation de l'autophagie. Son activité est régulée par de nombreux processus post-traductionnels tels que des processus de phosphorylation et d'ubiquitination (Vega-Rubín-de-Celis, 2019). L'équipe de Shao a mis en avant un rôle de TRAF2, dépendant de son domaine RING, dans l'activation de l'autophagie induite par la protéine SPHK1 (*SPHingosine Kinase 1*). Les déplétions de TRAF2 ou de son domaine RING diminuent fortement les processus d'autophagie médiés par SPHK1. Cette dernière se lie à TRAF2, qui à son tour recrute Beclin 1 et stimule l'ubiquitination de type K63 de Beclin 1 par TRAF2, menant à l'activation de l'autophagie (Hong Liu *et al.*, 2017). Un rôle de cIAP1 et 2, en supplément de TRAF2, dans l'ubiquitination de type K63 de Beclin 1 a aussi été observé (Xu *et al.*, 2020).

### 2. Régulation de la mitophagie par TRAF2

La mitophagie consiste en l'autophagie sélective des mitochondries. Plusieurs modèles de mitophagie ont été décrits mais le plus caractérisé implique les protéines PINK1 (*PTEN-Induced putative Kinase 1*) et Parkin. La dépolarisation mitochondriale mène à la stabilisation de PINK1 qui recrute Parkin. Ce dernier promeut l'ubiquitination des protéines de la partie extérieure de la membrane mitochondriale, provoquant leur dégradation par le protéasome ou facilitant le recrutement de l'autophagosome à la mitochondrie (Ding et Yin, 2012). Le traitement de NRCM (*Neonatal Rat Cardiac Myocyte*) par du TNF $\alpha$  provoque des processus de mitophagie et augmente la localisation de TRAF2 et Parkin au niveau des mitochondries. De plus, les déplétions de TRAF2 ou Parkin bloquent la mitophagie en réponse au TNF $\alpha$ . Des expériences de FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfert*) ont confirmé une interaction entre ces deux protéines, qui semblent agir de concert dans l'ubiquitination des protéines de la partie extérieure de la membrane mitochondriale. Curieusement, le KO de Parkin inhibe la mitophagie mais ce processus peut être partiellement restauré en surexprimant TRAF2, démontrant un rôle en partie redondant de TRAF2 vis-à-vis de Parkin (Yang *et al.*, 2018). L'équipe de Ktistakis a aussi démontré un rôle de TRAF2, cIAP1 et cIAP2 dans les processus de mitophagie induits par l'IVM (*liver Mectin*). Elles pourraient provoquer l'ubiquitination des mitochondries indépendamment de Parkin et PINK1 (Zachari *et al.*, 2019). Le célastrol, une molécule possédant des effets anti-inflammatoires, se lie au récepteur

nucléaire NR4A1 (*Nuclear Receptor subfamily 4 group A member 1*) et conduit à sa translocation du noyau vers la mitochondrie. NR4A1 recrute ensuite TRAF2, qui induit son ubiquitination de type K63 et le déclenchement de la mitophagie, inhibant ainsi l'inflammation (Hu *et al.*, 2017) (Figure 25).

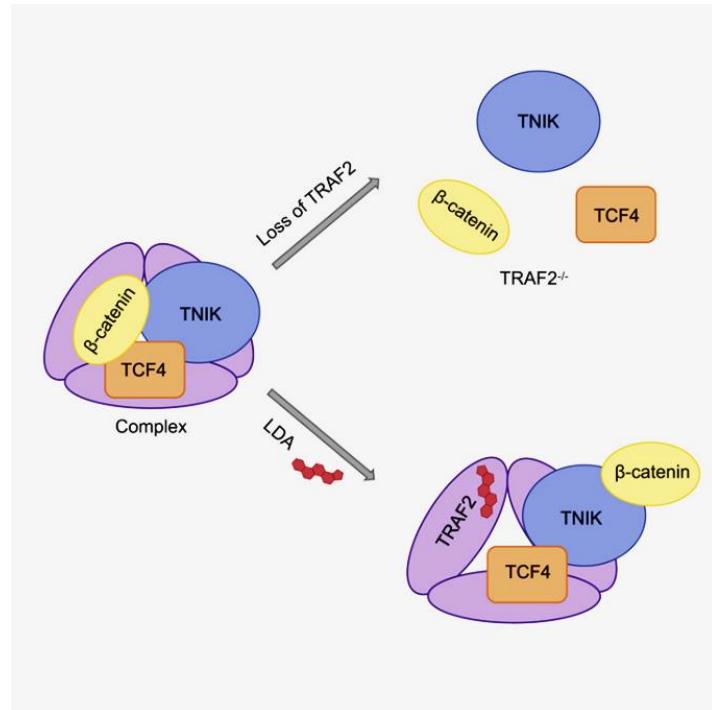


**Figure 25 : Régulation de la mitophagie par cIAP1 et TRAF2.** 1. La stimulation du TNFR1 mène à la relocalisation de TRAF2 et Parkin à la mitochondrie. Ces derniers ubiquitinrent les protéines de la partie extérieure de la membrane mitochondriale, déclenchant ainsi la mitophagie. 2. L'IVM induit aussi l'ubiquitination de ces protéines par cIAP1 et 2 ainsi que TRAF2 indépendamment de Parkin. 3. Le célastrol provoque la translocation de NR4A1 du noyau à la membrane mitochondriale. NR4A1 se lie à TRAF2 et facilite la mitophagie.

## J. TRAF2 et la voie de signalisation Wnt/β-caténine

La voie de signalisation Wnt/β-caténine régule de nombreux processus biologiques, allant du développement au maintien de l'homéostasie. L'expression des gènes cibles de cette voie de signalisation se fait grâce à la β-caténine, un effecteur nucléaire qui se lie et active des facteurs de transcription tels que TCF4 (*Transcription Factor 4*). Son activation incontrôlée est impliquée dans de nombreux types de cancers, et en particulier le cancer du côlon (Bian *et al.*, 2020). Une étude récente de l'équipe de Qu a mis en évidence un rôle de TRAF2 dans l'activation de cette voie dans le cancer du côlon. En effet, TRAF2 interagit directement avec la β-caténine par son domaine TRAF-C. Elle lie et stabilise ainsi le complexe composé de la β-caténine, TCF4 et TNIK (*TRAF2 And NCK Interacting Kinase*), nécessaire à l'activation de TFC4. Le KO de TRAF2 inhibe la formation de ce complexe et donc l'activation de TCF4. De façon surprenante, l'inhibition de l'interaction entre TRAF2 et la β-caténine par le LDA, ce dernier se liant au domaine TRAF-C de TRAF2, bloque

l'interaction entre TCF4 et la  $\beta$ -caténine mais n'a pas d'effet sur l'interaction entre TNIK et les autres membres du complexe. Ces résultats démontrent que l'interaction entre TRAF2 et la  $\beta$ -caténine, mais pas celle entre TNIK et TCF4, est essentielle à la liaison entre la  $\beta$ -caténine et TCF4 et donc à l'activation de TCF4 (Yan *et al.*, 2022) (Figure 26).



**Figure 26 : Régulation de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine par TRAF2.** Schéma repris de l'article de Yan *et al.* : « Liquidambaric acid inhibits Wnt/b-catenin signaling and colon cancer via targeting TNF receptor associated factor 2 », *Cell Reports*, 2022. TRAF2 est nécessaire à la formation du complexe composé de la  $\beta$ -caténine, TCF4 et TNIK. La déplétion de TRAF2 inhibe l'interaction entre ces protéines. Le LDA se lie au domaine TRAF-C de TRAF2, bloquant la liaison entre TRAF2 et la  $\beta$ -caténine ainsi qu'entre la  $\beta$ -caténine et TCF4. Le LDA n'a en revanche aucun effet sur l'interaction de TNIK avec ses partenaires (Yan *et al.*, 2022).

## V. Le TGF- $\beta$ et ses voies de signalisation

### A. Le TGF- $\beta$ et sa superfamille

Le TGF- $\beta$  est une cytokine observée pour la première fois en 1978 par De Larco et Todaro. Ils ont mis en évidence la sécrétion de facteurs, appelés SGF (*Sarcoma Growth Factors*) par des fibroblastes murins transformés avec le virus du sarcome, capables d'induire la transformation de fibroblastes murins sains (Larco et Todaro, 1978). Ces facteurs, correspondants au TGF, ont ensuite été décrits plus précisément en 1981 et ont été divisés en deux groupes : le TGF- $\alpha$ , capable de rentrer en compétition avec l'EGF pour l'interaction avec les récepteurs de ce dernier, et le TGF- $\beta$ , incapable de se lier à ces récepteurs mais provoquant des transformations phénotypiques en combinaison avec l'EGF (Moses, Roberts et Derynck, 2016).

La superfamille du TGF- $\beta$  comporte chez l'homme 33 membres. Elle inclut les BMP (*Bone Morphogenetic Proteins*), les GDF (*Growth and Differentiation Factors*), les MIS (*Müllerian Inhibiting Substances*), les activines et les TGF- $\beta$ . Ce sont des protéines dimériques, stabilisées par des ponts disulfures, synthétisées sous forme de précurseurs et devant être clivées afin d'être activées. Elles sont reconnues par des complexes hétérotétramériques de récepteurs présentant des domaines sérine/thréonine kinases impliqués dans l'activation de différentes voies de signalisation. Ces protéines sont impliquées dans la régulation de nombreux processus biologiques tels que l'organisation du développement tissulaire et la régulation de la croissance cellulaire et du métabolisme chez l'adulte (Kim, Henen et Hinck, 2019; Tzavlaki et Moustakas, 2020).

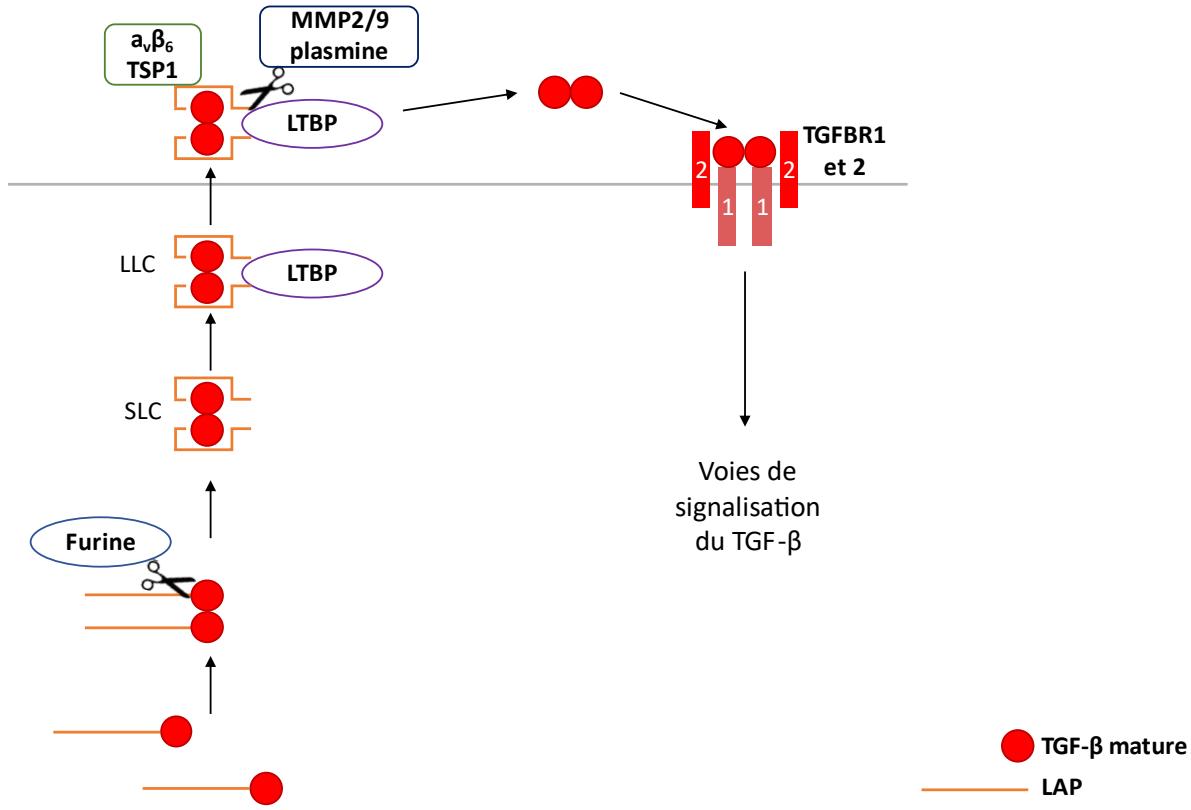
Trois isoformes de TGF- $\beta$  ont été observées chez l'Homme : le TGF- $\beta$ 1, 2 et 3 et elles jouent un rôle dans la régulation des processus cellulaires de différenciation, prolifération, apoptose et migration (Ong *et al.*, 2021; Baba *et al.*, 2022). Elles sont codées par trois gènes distincts et présentent une forte homologie de séquence (entre 70 et 82 % d'homologie) (Meng, Nikolic-Paterson et Lan, 2016). Elles interagissent avec les mêmes récepteurs (TGFBR1 (*TGF- $\beta$  Receptor 1*) et 2) mais le TGF- $\beta$ 2 possède une affinité moins importante pour ces derniers que les isoformes 1 et 3. Elles possèdent toutes les trois une activité biologique similaire (Heldin et Moustakas, 2016; Ong *et al.*, 2021). Cependant, chaque isoforme a son importance : la déplétion de l'isoforme 1 provoque la mort de 50% des fœtus de souris environ 10 jours après la fécondation à la suite d'un développement anormal du sac embryonnaire (Dickson *et al.*, 1995). Les souris mises au monde ne présentant pas de TGF- $\beta$ 1 se développent normalement les deux premières semaines mais finissent par présenter une inflammation excessive et une infiltration de macrophages et lymphocytes dans leurs cœur et poumons, menant à leur mort entre 3 et 4 semaines après la naissance (Kulkarni *et al.*, 1993). L'absence du TGF- $\beta$ 2 provoque des défauts dans le développement de nombreux organes tels que les poumons, le cœur, les yeux, les oreilles et les membres. Les souris meurent dans la période prénatale à la suite d'insuffisances respiratoires ou de problèmes cardiovasculaires

(Sanford *et al.*, 1997). La déplétion de l'isoforme 3 déclenche des défauts dans le développement crâniofacial et plus précisément la formation de fentes palatines (Proetzel *et al.*, 1995).

## B. Activation du TGF

Le TGF- $\beta$  est sécrété sous une forme latente, biologiquement inactive, et se dimérisé par l'intermédiaire de ponts disulfures. La partie C-terminale représente le TGF- $\beta$  mature et la position N-terminale le LAP (*Latency-Associated Peptide*). L'endopeptidase furine effectue un clivage protéolytique du TGF- $\beta$  entre les résidus 278 et 279 et sépare ces deux parties. Le LAP interagit avec le TGF- $\beta$  mature par des liaisons non covalentes et forme ainsi le SLC (*Small Latent Complex*). Le LAP bloque l'épitope du TGF- $\beta$  mature nécessaire à son interaction avec ses récepteurs, le rendant inactif, mais est nécessaire à son transit dans la cellule et à sa sécrétion. La protéine LTBP (*Latent TGF- $\beta$  Binding Protein*) peut aussi se lier directement au SLC par des ponts disulfures avec le LAP et former ainsi le LLC (*Large Latent Complex*) qui peut être nécessaire à la sécrétion du TGF- $\beta$  (Figure 27). La protéine LTBP va pouvoir interagir directement avec des composants de la matrice extracellulaire tels que la fibrilline et la fibronectine afin de former des réservoirs de TGF- $\beta$  (Hayashi et Sakai, 2012; Meng, Nikolic-Paterson et Lan, 2016).

Pour pouvoir être activé, le TGF- $\beta$  doit être dissocié du complexe SLC ou LLC. Plusieurs mécanismes d'activation du TGF- $\beta$  latent ont été observés *in vitro* et *in vivo*. La plasmine ainsi que les MMP2 et 9, des protéases à sérine, peuvent cliver la région N-terminale de LAP, libérant ainsi le TGF- $\beta$ . De manière différente, l'intégrine  $\alpha_v\beta_6$  et TSP1 (*ThromboSPondin 1*) peuvent interagir directement avec le LAP et ainsi perturber les complexes latents, libérant ainsi le TGF- $\beta$  actif indépendamment de l'action de protéases. Le TGF- $\beta$  ainsi libéré se lie au récepteur TGFBR2 et active ainsi les voies de signalisation dépendantes du TGF- $\beta$  (Hayashi et Sakai, 2012) (Figure 27).



**Figure 27 : Activation du TGF- $\beta$ .** Le TGF- $\beta$  est synthétisé sous forme de précurseur composé du LAP en N-terminal et du TGF- $\beta$  mature en C-terminal. Deux TGF- $\beta$  se dimérisent par l'intermédiaire de ponts disulfure. La furine clive le TGF- $\beta$  immature et sépare le TGF- $\beta$  mature du LAP. Le LAP interagit avec le TGF- $\beta$  mature, bloquant ses sites de fixation à ses récepteurs et formant le complexe SLC. Le SLC peut ensuite se lier à LTBP et former le LLC. Ces complexes sont sécrétés à l'extérieur de la cellule. La perturbation des complexes par l' $\alpha_v\beta_6$  ou TSP1 ou bien le clivage de la région N-terminale de LAP par MMP2/9 ou la plasmine libère le TGF- $\beta$  mature. Ce dernier peut se lier à ses récepteurs TGFBR1 et 2 et activer ses voies de signalisation.

### C. Les récepteurs au TGF- $\beta$

Les protéines de la famille du TGF- $\beta$  activent différentes voies de signalisation en se liant à des récepteurs membranaires présentant une activité sérine/thréonine kinase. Ces récepteurs sont en général divisés en récepteurs de type I, composé de 5 membres, et récepteurs de type II, au nombre de 7. Ils possèdent tous un domaine extracellulaire, un domaine transmembranaire et un domaine kinase intracellulaire. Ils se différencient par la présence d'un domaine GS (riche en glycine et sérine) intracellulaire en amont du domaine kinase chez les récepteurs de type I. La liaison d'un ligand de la famille du TGF- $\beta$  à un récepteur de type II conduit à la formation d'un complexe hétérotétramérique composé de deux récepteurs de type I et deux récepteurs de type II. Le récepteur de type II active le récepteur I en phosphorylant sa région GS, menant au recrutement de protéines SMAD, les médiateurs de la signalisation cellulaire stimulés par le TGF- $\beta$ . Les protéines SMAD recrutées sont spécifiques des récepteurs de type I engagés en amont. En effet, chaque domaine kinase de ces récepteurs possède une boucle L45 qui définit la spécificité des protéines pour les SMAD (Heldin et Moustakas, 2016; Ark, Cao et Li, 2018). L'inversion des boucles L45 des

récepteurs TGFBR1 et BMPR-IB inverse les protéines SMAD avec lesquelles ces derniers interagissent (Persson *et al.*, 1998).

Les trois isotypes du TGF- $\beta$  se lient au même récepteur de type II : le TGFBR2. Dans la majorité des cellules, son activation mène au recrutement du TGFBR1 et à l'activation des protéines SMAD2 et SMAD3. Pour autant, ALK1 (*Activin receptor-Like Kinase 1*), un autre récepteur de type I, a aussi été retrouvé associé au TGFBR2 dans les cellules endothéliales et active les protéines SMAD1 et SMAD5 (Goumans *et al.*, 2003).

La bêtaglycane (aussi appelé TGFBR3 ou récepteur au TGF- $\beta$  de type 3) est un corécepteur de la famille des récepteurs du TGF- $\beta$ . Elle est le TGFBR le plus exprimé mais ne présente pas d'activité kinase. Elle est capable de se lier aux trois isoformes du TGF- $\beta$  et facilite leur fixation au TGFBR2, en particulier pour le TGF- $\beta$ 2. En effet, même si les trois isotypes peuvent se lier au récepteur TGFBR2, l'affinité du TGF- $\beta$ 2 pour le TGFBR2 est moins importante que celle du TGF- $\beta$ 1 et 3 (Kim, Henen et Hinck, 2019). L'équipe de Zhu a démontré que la déplétion de la bêtaglycane dans des MEF traitées avec du TGF- $\beta$ 2 inhibe l'activation de la protéine SMAD2. À l'inverse, l'activation de SMAD2 par le TGF- $\beta$ 1 n'est pas diminuée en absence de la bêtaglycane dans des MEF (Stenvers *et al.*, 2003).

## D. Les voies de signalisation du TGF- $\beta$

La stimulation des récepteurs TGFBR1 et 2 par le TGF- $\beta$  provoque l'activation de différentes voies de signalisation. Ces dernières sont divisées en deux groupes : la voie de signalisation dépendante des protéines SMAD (dite canonique) et les voies de signalisation indépendantes des SMAD (dites non canoniques) (Batlle et Massagué, 2019).

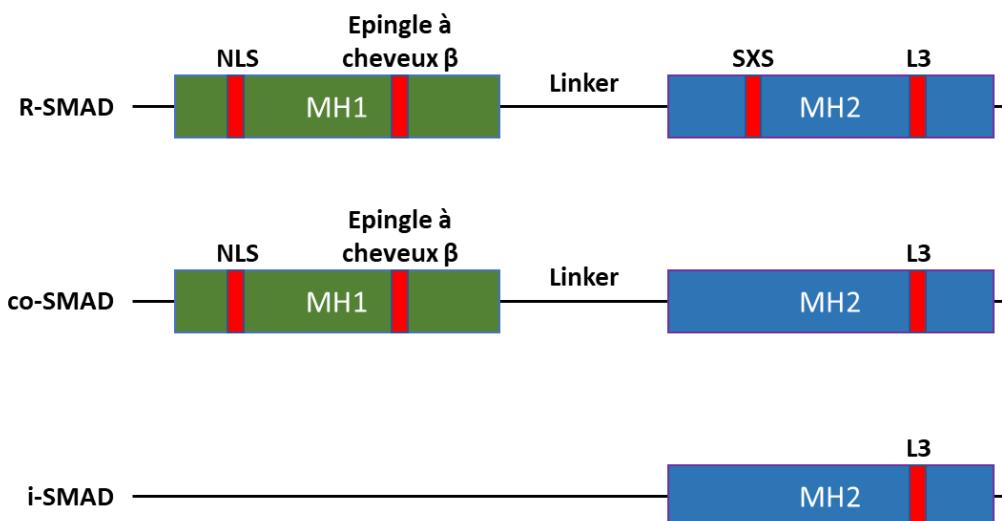
### 1. La voie de signalisation canonique

Les protéines SMAD sont les principales protéines effectrices de la voie de signalisation canonique déclenchée par le TGF- $\beta$ . Cette famille de protéines est divisée en trois groupes : les R-SMAD (*Receptor-associated SMAD*), les co-SMAD (*common-mediator SMAD*) et les I-SMAD (*Inhibitor SMAD*). Elles sont impliquées dans la transduction du signal et coopèrent avec des facteurs de transcription et des modificateurs de chromatine afin de réguler l'expression de gènes en réponse au TGF- $\beta$  (Tzavkaki et Moustakas, 2020). Ces gènes sont impliqués dans une très grande variété de processus cellulaires. Ils peuvent réguler les processus d'apoptose et d'arrêt du cycle cellulaire et sont dans ce cas associés avec une activité antitumorale. Ils peuvent autrement participer aux processus de TEM (Transition Épithélio-Mésenchymateuse), de prolifération cellulaire et de migration cellulaire et sont dans ce cas impliqués dans la promotion tumorale (Zhang, Alexander et Wang, 2017; Baba *et al.*, 2022).

### a) Structure des protéines SMAD

Les protéines R-SMAD et co-SMAD présentent toutes les deux des domaines fortement conservés : le MH1 (*Mad Homology 1*) en position N-terminale et MH2 en position C-terminale. Le MH1 est responsable de l'interaction des SMAD avec l'ADN et les facteurs de transcription. Il contient une région NLS (*Nuclear Localization Signals*), impliquée dans la translocation des SMAD dans le noyau ainsi qu'une structure en épingle à cheveux  $\beta$  nécessaire à l'interaction entre les SMAD et l'ADN (Shi *et al.*, 1998). Le MH2 présente un motif de type boucle L3, crucial dans l'interaction des R-SMAD avec les récepteurs de la famille du TGF- $\beta$  (Lo *et al.*, 1998), ainsi que dans l'interaction entre les R-SMAD et les co-SMAD (Shi *et al.*, 1997). Le MH2 des R-SMAD possède également un motif SXS (Ser-X-Ser), cible de la phosphorylation induite par les récepteurs de type I menant à l'activation des R-SMAD (Xu, 2006). Les deux domaines MH1 et 2 sont reliés entre eux par une région *linker*, riche en proline. Cette région est la cible de nombreux processus de phosphorylation médiés par exemple par les MAPK p38, ERK et JNK. Ces processus étaient au départ décrits comme régulant négativement la signalisation du TGF- $\beta$  en bloquant la translocation des protéines SMAD dans le noyau (Kretzschmar *et al.*, 1999). Toutefois, leur rôle est aujourd'hui débattu et ils sont avant tout considérés comme des modulateurs l'activité transcriptionnelle des SMAD (Rezaei *et al.*, 2012) (Figure 28).

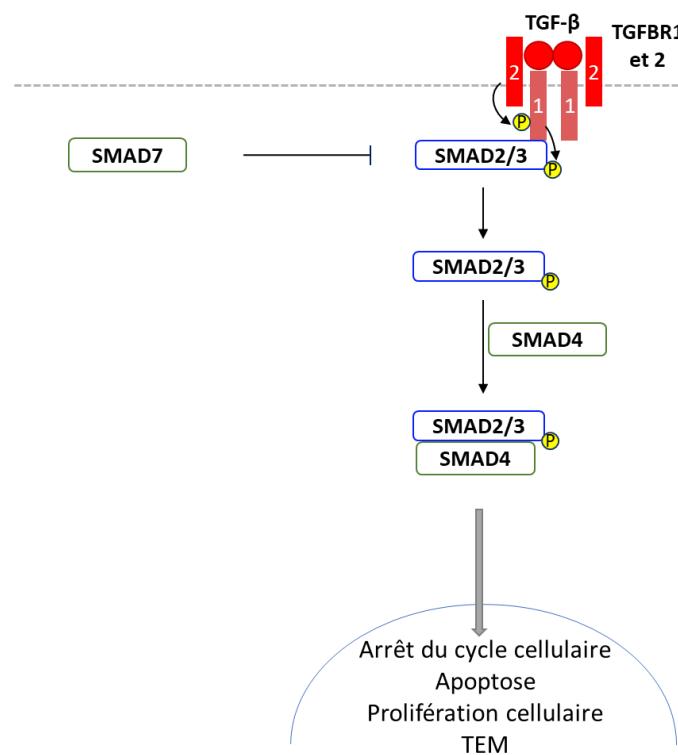
Les i-SMAD sont dépourvues de domaine MH1 mais présentent un domaine MH2 leur permettant d'interagir avec les récepteurs de la famille du TGF- $\beta$ . Le domaine MH2 est en revanche dépourvu de la région SXS (Tzavasaki et Moustakas, 2020) (Figure 28).



**Figure 28 : Structure des SMAD.** Les R-SMAD et co-SMAD présentent un domaine MH1 en N-terminal, contenant une épingle à cheveux  $\beta$  et une région NLS, et un domaine MH2 en C-terminal possédant une boucle L3. Le domaine MH2 des R-SMAD comporte en plus une séquence SXS nécessaire à l'activation des R-SMAD par les récepteurs. Les i-SMAD ne possèdent pas de domaine MH1 mais présentent un domaine MH2 dépourvu de SXS.

### b) Activation des protéines SMAD par le TGF- $\beta$

À la suite de la stimulation par le TGF- $\beta$ , le TGFBR2 phosphoryle la région GS du TGFBR1, augmentant ainsi l'affinité du TGFBR1 pour les domaines MH2 des R-SMAD SMAD2 et SMAD3 (Huse *et al.*, 2001). Le TGFBR1 provoque la phosphorylation des deux séries des motifs SXS de SMAD2 et 3 menant à leur activation et changement de conformation. Elles se dissocient ainsi du TGFBR1 et interagissent avec la co-SMAD SMAD4 par leur domaine MH2 et plus spécifiquement par la boucle L3 du domaine MH2 de SMAD4 (Shi *et al.*, 1997; Chacko *et al.*, 2004). Les motifs NLS conduisent à la translocation du complexe composé de SMAD2, 3 et 4 dans le noyau qui vont ainsi réguler la transcription de gènes cibles en coopération avec des facteurs de transcription et des modificateurs de chromatine (Ross et Hill, 2008). SMAD3 et 4 peuvent aussi directement se lier à l'ADN. En effet, leur motif en épingle à cheveux  $\beta$  présent sur leur domaine MH1 est capable de lier directement une séquence consensus GGC(GC)(CG) (Martin-Malpartida *et al.*, 2017). En revanche, SMAD2 ne peut pas se lier directement à l'ADN. Elle possède une séquence d'une trentaine d'acide aminés dans son domaine MH1, absente de SMAD3 et 4, qui interfère avec les mécanismes de liaison à l'ADN (Zawel *et al.*, 1998) (Figure 29).



**Figure 29 : Activation de la voie canonique du TGF- $\beta$ .** La fixation du TGF- $\beta$  au récepteur TGFBR2 stimule le TGFBR2 qui phosphoryle le TGFBR1. Ce dernier peut ainsi recruter les R-SMAD SMAD2 et 3 et les activer par phosphorylation. Ces dernières se séparent du TGFBR1 et se lient à la co-SMAD SMAD4. Ce complexe est ensuite transloqué dans le noyau et régule des processus d'apoptose, de TEM, de prolifération cellulaire et le cycle cellulaire. La i-SMAD peut interagir avec le TGFBR1 et bloquer le recrutement de SMAD2 et 3 et leur activation.

La stimulation du TGFBR2 par le TGF- $\beta$  peut aussi mener à l'activation du récepteur de type I ALK1 qui recrute les R-SMAD SMAD 1 et 5. L'activation de ALK1 est dépendante du TGFBR1 et semble inhiber les voies de signalisation dépendantes des SMAD2 et 3 (Goumans *et al.*, 2003). Le TGFBR1 stimule aussi par phosphorylation le récepteur de type I ALK2, qui en retour active par phosphorylation les SMAD1 et 5. Ces processus aboutissent à la transcription des gènes codants pour les ID (*Inhibitor of DNA binding*) ainsi qu'au déclenchement de la TEM, en collaboration avec la signalisation dépendante de SMAD3 (Ramachandran *et al.*, 2018). L'équipe de Hill a aussi démontré que les récepteurs de type I ALK2 et 3 peuvent se lier au TGFBR1, menant à la formation de complexes spéciaux de R-SMAD, composés des SMAD1 et 5 ainsi que des SMAD 2 et 3. Ces complexes ciblent une nouvelle série de gènes, différents des gènes cibles des complexes de SMAD1 et 5 ou de SMAD2 et 3, impliqués dans la croissance cellulaire indépendante de l'ancre (Daly, Randall et Hill, 2008).

### c) Rôles des I-SMAD

L'initiation de la signalisation médiée par le TGF- $\beta$  peut être bloquée par SMAD7, une I-SMAD. Elle peut être synthétisée en réponse à la signalisation des SMAD, créant ainsi une boucle de rétroaction négative (Ong *et al.*, 2021). Via son domaine MH2, elle peut directement interagir avec le TGFBR1 afin de bloquer la phosphorylation et donc l'activation de SMAD2 et 3, empêchant ainsi la formation du complexe composé de SMAD2, 3 et 4 (Mochizuki *et al.*, 2004). Il promeut la dégradation du TGFBR1 en recrutant l'E3 ubiquitine ligase SMURF1 (*SMAD Ubiquitin Regulatory Factors 1*) (Ebisawa *et al.*, 2001). SMAD7 est aussi localisée dans le noyau et agit ainsi indépendamment du TGFBR1. Elle rentre en compétition avec les autres SMAD actives en se liant à leur séquence cible, inhibant ainsi leur activité. L'équipe de Chen a par exemple démontré par ChIP que SMAD7 pouvait interagir par son domaine MH2 avec le promoteur de PAI-1 (*Plasminogen Activator Inhibitor-1*), un gène cible de la signalisation du TGF- $\beta$  (Zhang *et al.*, 2007).

## 2. Les voies de signalisation indépendantes des SMAD

Le TGF- $\beta$  peut aussi activer d'autres voies de signalisation cellulaire indépendamment des protéines SMAD telles que les voies des MAPK ERK, JNK et p38, des Rho GTPases, des kinases PI3K (*Phospholnositide 3-Kinases*)/Akt et de STAT3/JAK.

### a) L'activation des voies de signalisation des MAPK

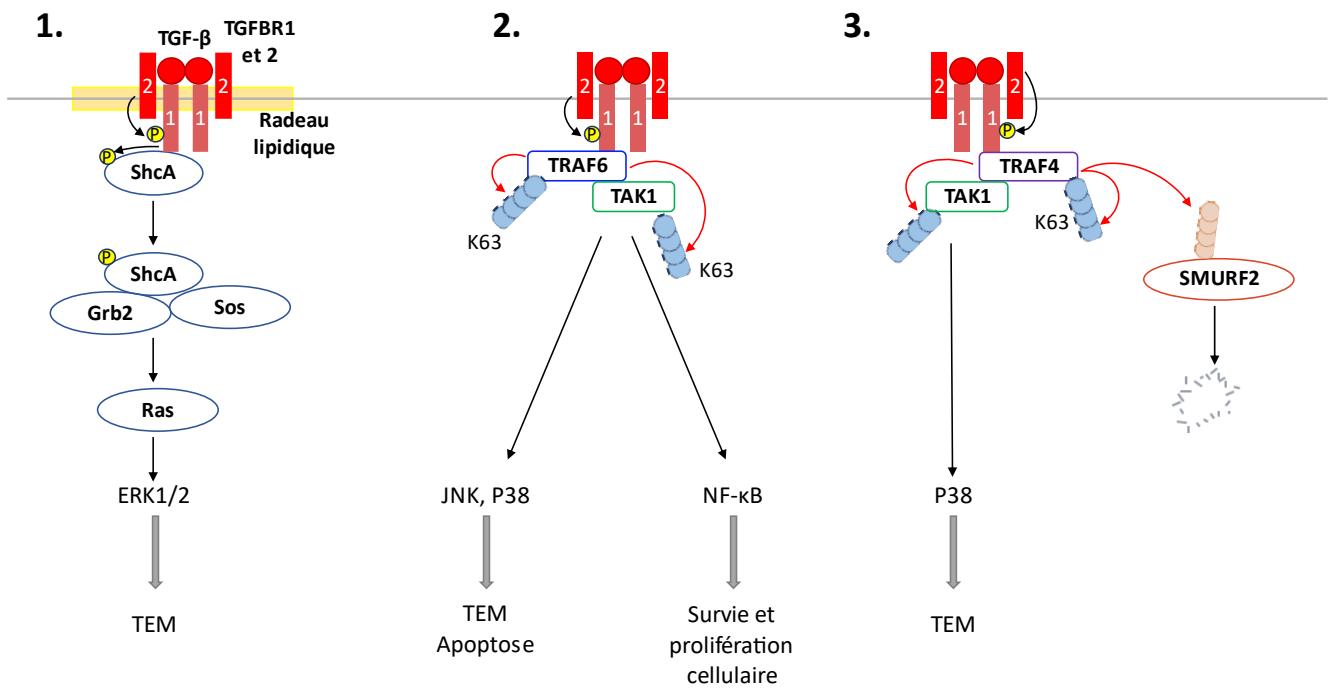
La capacité du TGF- $\beta$  à activer les MAPK ERK1/2, p38 et JNK est connue depuis de nombreuses années. Elle implique différents mécanismes de signalisation mettant en jeu différents acteurs en fonction de la MAPK activée (Hartsough et Mulder, 1995; Engel *et al.*, 1999; Yu, Hébert et Zhang, 2002).

L'activation de ERK1 par le TGF- $\beta$  a été décrite pour la première fois en 1995 par Hartsough et Mulde. Il a été démontré que ERK1 est activée très rapidement en réponse au TGF- $\beta$  (dès 5

minutes) et qu'elle joue un rôle dans l'inhibition de la croissance cellulaire par le TGF- $\beta$ . De plus, le traitement de cellules quiescentes ne semble pas induire d'activation de ERK1 (Hartsough et Mulder, 1995). L'équipe de Derynck a ensuite proposé en 2007 un mécanisme d'activation de ERK1 et 2 par le TGF- $\beta$ . Ils ont démontré que le TGF- $\beta$  déclenche le recrutement de la protéine ShcA (*Src homology domain-22 containing-transforming protein C1*) au niveau des récepteurs TGFBR1 et 2. Le TGFBR1, à la suite de son activation par le TGFBR2, phosphoryle ShcA sur ses résidus sérine et tyrosine. ShcA peut ainsi s'associer avec les protéines Grb2 (*Growth factor receptor binding protein 2*) et Sos (*Son of sevenless*), menant à l'activation de la protéine Ras. Cette dernière provoque ensuite l'activation séquentielle de C-RAF, MEK et ERK1/2 (Lee *et al.*, 2007). La localisation des récepteurs sur la membrane semble aussi être primordiale à l'activation de ERK1 et 2. En effet, la localisation des récepteurs TGFBR1 et 2 dans des radeaux lipidiques semble être nécessaire à l'activation de ERK1 et 2 et mène au processus de TEM (Zuo et Chen, 2009) (Figure 30).

Le TGF- $\beta$  a rapidement été décrit comme un régulateur des MAPK JNK et p38 (Engel *et al.*, 1999; Yu, Hébert et Zhang, 2002). De plus, en 1995, Yamaguchi *et al.* ont décrit l'implication de TAK1, la MAPKKK menant à l'activation de JNK et p38, dans la transduction du signal en réponse au TGF- $\beta$  (Yamaguchi *et al.*, 1995). En 2008, les équipes de Landström et Zhang ont décrit un rôle de TRAF6 dans l'activation de p38 et JNK. Ils ont démontré que la stimulation au TGF- $\beta$  de cellules HEK293T mène au recrutement et à l'auto-ubiquitination de type K63 de TRAF6 sur le TGFBR1. TRAF6 s'associe ensuite à TAK1 et l'active par ubiquitination de type K63 sur son résidu K34, menant à la stimulation des MAPK p38 et JNK, provoquant à terme des processus apoptotiques et de TEM (Sorrentino *et al.*, 2008; Yamashita *et al.*, 2008). L'activation de TAK1 par TRAF6 cause aussi l'activation de la voie NF- $\kappa$ B. En effet, la mutation de son résidu K34 prévient l'activation de cette voie en réponse au TGF- $\beta$  (Hamidi *et al.*, 2012) (Figure 30).

L'équipe du professeur Ten Dijke a décrit en 2013 un autre mécanisme d'activation de p38 dépendant de TRAF4 en réponse au TGF- $\beta$ . De la même manière que TRAF6, TRAF4 est recrutée au niveau du TGFBR1 activé et s'active par auto-ubiquitination de type K63. TRAF4 est ainsi capable de cibler la protéine SMURF2 afin d'induire son ubiquitination suivie de sa dégradation, inhibant ainsi la dégradation du TGFBR1 par SMURF2. De plus, de la même manière que TRAF6, TRAF4 semble pouvoir activer TAK1 par ubiquitination, menant à l'activation de p38 et à des processus de TEM, induisant la formation de métastases *in vivo* (Zhang *et al.*, 2013) (Figure 30).



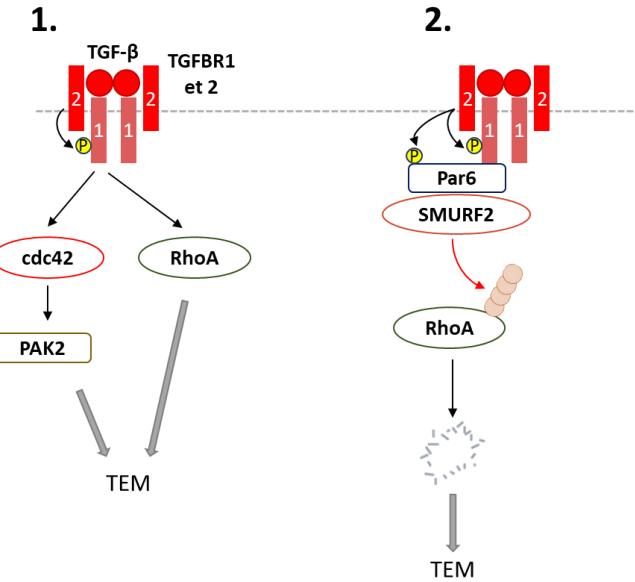
**Figure 30 : Activation des MAPK en réponse au TGF-β.** 1. En réponse à une stimulation au TGF-β, le TGFBR1 recrute ShcA et l'active par phosphorylation. Cette dernière forme ensuite un complexe composé de ShcA, Grb2 et Sos qui active Ras. En retour, ce dernier stimulate l'activation des MAPK ERK1 et 2 menant à des processus de TEM. La localisation des récepteurs dans des radeaux lipidiques semble être nécessaire à l'activation de ERK1 et 2. 2. TRAF6 peut aussi être recrutée au niveau du TGFBR1, s'activer par auto-ubiquitination de type K63, recruter TAK1 et l'activer par ubiquitination de type K63. Ces processus mènent à l'activation des MAPK p38 et JNK, régulant l'apoptose et la TEM. TAK1 peut aussi activer la voie NF-κB. 3. De la même manière, TRAF4 peut activer la MAPK p38 et provoquer la TEM. TRAF4 inhibe aussi la dégradation du TGFBR1 par SMURF2 en provoquant l'ubiquitination dégradative de cette dernière.

### b) Régulation des Rho GTPases

L'activation des Rho GTPases par le TGF-β contribue fortement à la régulation de la TEM par le TGF-β. En effet, le TGF-β induit rapidement l'activation de RhoA et cdc42, menant à la réorganisation des filaments d'actine indépendamment des protéines SMAD (Bhowmick *et al.*, 2001; Edlund *et al.*, 2002). En revanche, une coopération entre la signalisation des SMAD et des Rho GTPases semble nécessaire pour réguler la formation de fibres de stress lors de réponses à long terme (Edlund *et al.*, 2002). La stimulation de fibroblastes par le TGF-β provoque l'activation de PAK2 (*P21-Activated Kinase 2*) par cdc42, menant aussi à la réorganisation des filaments d'actine (Wilkes *et al.*, 2003) (Figure 31).

L'équipe de Wrana a démontré par un screening utilisant la méthode LUMIER (*Luminescence-based Mammalian Interactome mapping*) que la protéine Par6 (*Partitioning defective protein 6*) pouvait interagir directement avec le récepteur TGFBR1. Ils ont confirmé ces résultats par immunoprecipitation et prouvé que cette interaction est indépendante de la stimulation au TGF-β. La stimulation du TGFBR2 par le TGF-β conduit au recrutement du complexe TGFBR1 et Par6, menant à la phosphorylation activatrice des deux protéines par le TGFBR2. Par6 peut ainsi

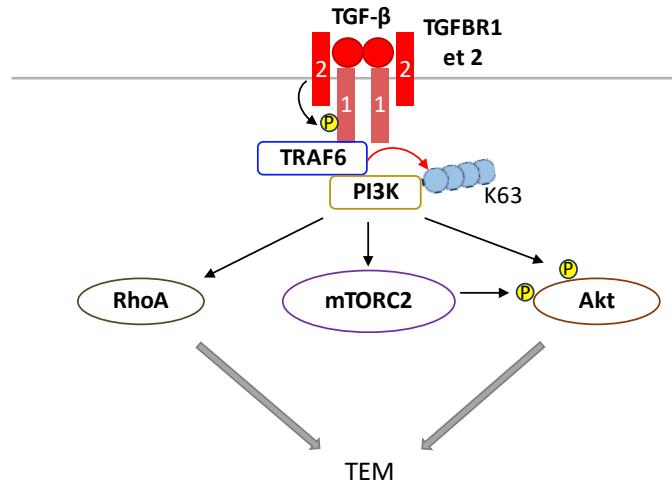
recruter la protéine SMURF1, qui en retour induit l'ubiquitination dégradative de RhoA, menant à la dissolution des jonctions serrées impliquées dans les processus de TEM (Ozdamar *et al.*, 2005) (Figure 31).



**Figure 31 : Régulation des Rho GTPases par le TGF-β.** 1. En réponse au TGF-β, le TGFBR1 active RhoA et cdc42, provoquant la mise en place de la TEM. La régulation de la TEM par cdc42 semble passer par l'activation de PAK2. Le TGFBR2 peut aussi recruter et phosphoryler Par6. Ce dernier recrute ainsi SMURF2, qui en retour induit l'ubiquitination dégradative de RhoA menant à la TEM.

### c) Activation de la voie de signalisation PI3K/Akt

La voie de signalisation PI3K/Akt joue un rôle majeur dans les mécanismes de survie et de prolifération cellulaire. Elle implique la régulation de nombreuses cibles telles que NF-κB et mTOR (*mechanistic Target Of Rapamycin*) par Akt en réponse à l'activation de PI3K. La sous-unité régulatrice p85 de PI3K peut se lier directement aux deux récepteurs TGFBR1 et 2. La liaison avec le récepteur 2 est constitutive mais celle avec le 1 est induite par le TGF-β. Le TGFBR1 stimule l'activité de PI3K menant à l'activation de Akt dépendamment de son activité kinase. En effet, l'inhibition de cette activité par le LY580276 bloque la stimulation de PI3K (Yi, Shin et Arteaga, 2005). Hamidi *et al.* ont de plus démontré que la promotion de PI3K et de la motilité cellulaire induite en réponse au TGF-β nécessitent l'ubiquitination de type K63 de PI3K par TRAF6 à la suite du recrutement de ce dernier sur le TGFBR1. En revanche, ils semblent montrer que ces effets sont indépendants du rôle de kinase du TGFBR1 (Hamidi *et al.*, 2017). Il a de plus été décrit qu'en réponse au TGF-β, PI3K active le complexe mTORC2 (*mTOR Complex 2*), qui en retour active Akt mais aussi RhoA menant à des processus de TEM (Lamouille *et al.*, 2012) (Figure 32).



**Figure 32 : Activation de PI3K/Akt par le TGF-β.** La stimulation des récepteurs par le TGF-β déclenche le recrutement de TRAF6 et PI3K au niveau du TGFBR1. TRAF6 active PI3K par ubiquitinatation de type K63. Cette dernière phosphoryle Akt, qui en réponse stimule la TEM. PI3K active aussi RhoA et mTORC2. Cette dernière stimule Akt par phosphorylation et ces processus régulent aussi la TEM.

#### d) Activation de STAT3/JAK

Les protéines STAT3 ainsi que JAK1 et 2 sont aussi impliquées dans la régulation de la signalisation indépendante des SMAD. En effet, l'analyse de fibroblastes de patients atteints de sclérodermie, une maladie caractérisée par le développement à terme d'une fibrose cutanée, par l'équipe de Distler a mis en avant une activation de JAK2, menant à l'activation de STAT3. Elle est dépendante du TGF-β et est impliquée dans la mise en place du phénotype actif des fibroblastes de sclérodermie. L'inhibition de JAK2 prévient les effets du TGF-β sur ces fibroblastes ainsi que le développement de fibroses cutanées en réponse à la bléomycine dans un modèle murin (Dees et al., 2012). JAK1 est quant à elle capable d'interagir directement avec le TGFBR1, menant à la phosphorylation activatrice de STAT3, indépendamment des SMAD très rapidement après une stimulation au TGF-β, jouant ainsi un rôle dans les processus pro-fibrosants médiés par le TGF-β (Tang et al., 2017).

### E. Régulation des voies de signalisation du TGF-β

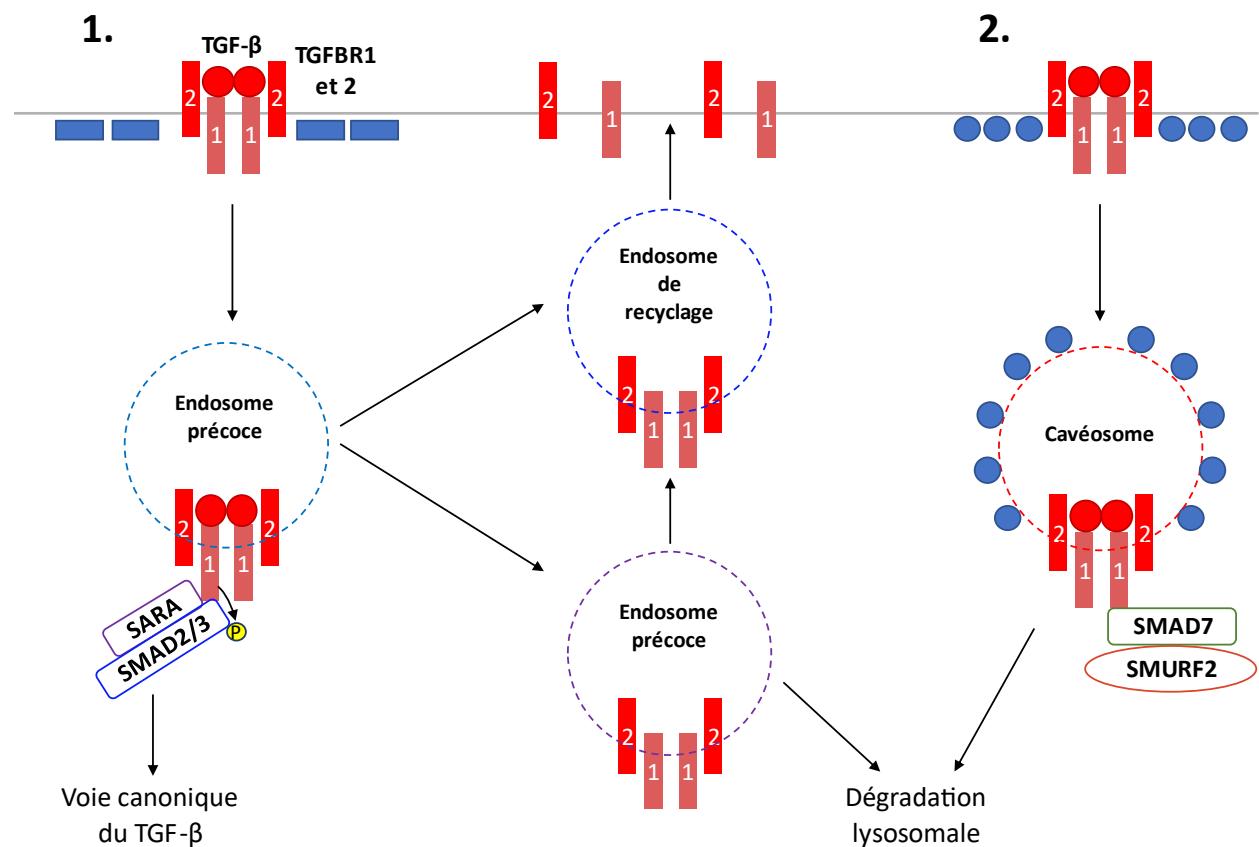
#### 1. Les processus d'endocytose des récepteurs

Un des principaux mécanismes de régulation des récepteurs du TGF-β est l'endocytose. Deux mécanismes d'endocytose ont été principalement observés : l'internalisation des récepteurs dans des vésicules recouvertes de clathrines ou recouvertes de cavéoline.

La fixation du TGF-β à ses récepteurs TGFBR1 et 2 n'initie pas seulement des processus de signalisation cellulaire mais provoque aussi l'internalisation des récepteurs et du ligand dans des vésicules entourées de clathrine, formant ainsi des endosomes précoces. La métalloprotéinase ADAM12 (*A Disintegrin And Metalloproteinase domain 12*) favorise la formation d'endosomes précoces en se liant au TGFBR2 et stabilise celui-ci en bloquant son interaction avec SMAD7 (Atfi

et al., 2007). Dans ces endosomes, les récepteurs vont se lier à la protéine SARA (*SMAD Anchor for Receptor Activation*), qui facilite l'activation de la voie canonique du TGF- $\beta$ . SARA favorise le recrutement de SMAD2 et 3 et promeut ainsi leur phosphorylation par le TGFBR1 (Chen, 2009). Le blocage de la formation de ces endosomes ou de l'interaction entre le TGFBR1 et SARA inhibent l'activation de la voie canonique du TGF- $\beta$  (Hayes, Chawla et Corvera, 2002). Dans la plupart des cas, les récepteurs sont recyclés à la membrane et peuvent de nouveau être stimulés par leur ligand (Guglielmo et al., 2003). Ce recyclage est dépendant de la petite GTPase Rab11 (Mitchell et al., 2004). Les endosomes précoces peuvent aussi se transformer en endosomes tardifs et être recyclés ou bien ciblés par les lysosomes pour être dégradés (Chen, 2009) (Figure 33).

En plus de leur internalisation dans des vésicules de clathrine promouvant l'activation des voies SMAD-dépendantes, les récepteurs du TGF- $\beta$  peuvent être endocytés via des radeaux lipidiques dans des vésicules entourées de cavéoline, formant des cavéosomes et menant à leur dégradation (Razani et al., 2001). Le complexe SMAD7/SMURF2 est recruté au niveau du TGFBR1 et promeut la dégradation des récepteurs, mettant ainsi un terme aux voies de signalisation et provoquant un renouvellement des récepteurs (Guglielmo et al., 2003) (Figure 33).



**Figure 33 : Les processus d'endocytose des récepteurs du TGF- $\beta$ .** 1. L'endocytose des récepteurs dans des vésicules entourées de clathrine forme des endosomes précoces. Au sein de ces derniers, le TGFBR1 va recruter la protéine SARA, favorisant l'activation de la voie canonique du TGF- $\beta$ . Les endosomes précoces peuvent se transformer en endosomes de recyclage menant au réadressage des récepteurs à la membrane

plasmique, ou en endosomes tardifs provoquant la dégradation lysosomale des récepteurs ou leur recyclage. 2. En présence de cavéoline, des cavéosomes se forment, menant au recrutement de SMAD7 et SMURF2 sur le TGFBR1, qui en retour déclenche la dégradation lysosomale des récepteurs.

## 2. Les processus de phosphorylation/déphosphorylation

Les protéines SMAD présentent différents sites sur leurs différents domaines sujets à des mécanismes de phosphorylation modulant leur activité (Xu, Lin et Feng, 2016). ERK1 sous forme active peut par exemple phosphoryler le résidu T8 du domaine MH1 de SMAD2 afin de le stabiliser et d'accroître son activité. La calmoduline est capable de bloquer l'action de ERK1 et ainsi réduire le niveau de SMAD2 (Funaba, Zimmerman et Mathews, 2002). Seong et Ha ont aussi démontré que MPK38 (*Murine Protein serine/threonine Kinase 38*) pouvait phosphoryler SMAD2 et 3 sur leur région *linker* et SMAD4 sur son domaine MH2 afin de réguler positivement la voie canonique du TGF- $\beta$  (Seong, Jung et Ha, 2010). À l'inverse, la protéine PAK2 phosphoryle le résidu S417 qui est à proximité de la boucle L3, inhibant ainsi l'interaction entre SMAD2 et le TGFBR1 et donc l'activation de SMAD2 (Yan *et al.*, 2012). La protéine PKC (*Protein Kinase C*) phosphoryle SMAD3 sur les résidus S47 et S70 du domaine MH1, empêchant ainsi SMAD3 de se lier directement à l'ADN (Yakymovych *et al.*, 2001).

Les processus de phosphorylation étant centraux dans l'activation des voies de signalisation en réponse au TGF- $\beta$ , il n'est pas surprenant que des phosphatases telles que l'holoenzyme PP1 (*Protein Phosphatase 1*) soient impliquées dans la régulation de ces voies. Le TGF- $\beta$  provoque la formation d'un complexe composé de la sous-unité régulatrice PPP1R15A (*Protein PhosPhatase 1 Regulatory subunit 15A*) de PP1, SMAD7 et le TGFBR1. PPP1R15A recrute la sous-unité catalytique de PP1, qui en retour déphosphoryle le TGFBR1, inhibant ainsi l'arrêt du cycle cellulaire médié par le TGF- $\beta$  et favorisant la résistance à ce dernier (Shi *et al.*, 2004). La phosphatase MTMR4 (*MyoTubularin-Related protein 4*) diminue la phosphorylation du domaine SXS des SMAD2 et 3 dans les endosomes précoce. Ce processus permet notamment de prévenir la suractivation de la voie de signalisation du TGF- $\beta$  et d'éteindre ce système lorsque son objectif a été atteint (Yu *et al.*, 2010).

## 3. La régulation par des processus d'ubiquitination

Les E3 ubiquitine ligases SMURF régulent l'activité du TGF- $\beta$ . Leur action sur le TGFBR1 a été précédemment décrite dans les parties précédentes mais elles peuvent aussi réguler directement les SMAD. En effet, SMURF2 peut directement cibler SMAD2 et provoquer sa poly-ubiquitination puis sa dégradation par le protéasome (Zhang *et al.*, 2001). Elle cible aussi directement SMAD3 en provoquant sa double mono-ubiquitination sur son domaine MH2, préférentiellement sur les résidus K333 et K378, et bloquant ainsi la formation de complexe de SMAD3 (Tang *et al.*, 2011). De manière très intéressante, l'E3 ubiquitine ligase Arkadia cible les SMAD2 et 3 afin de les ubiquitinier, causant à la fois leur dégradation mais aussi leur activation. La déplétion d'Arkadia déclenche l'accumulation de protéines SMAD2 et SMAD3 phosphorylées mais hypo-actives et bloque la formation de l'intestin antérieur et de la plaque préchordale dans un modèle

murin. Arkadia est donc nécessaire à l'amélioration de l'activité transcriptionnelle des SMAD tout en provoquant le renouvellement des protéines SMAD2 et SMAD3 (Mavrakis *et al.*, 2007).

## F. Le rôle ambigu du TGF-β dans le développement tumoral

Le rôle du TGF-β sur le développement tumoral est complexe. Il est dépendant du stade de développement de la tumeur. Durant les phases d'initiation tumorale, il possède plutôt des propriétés anticancéreuses. En effet, il peut par exemple provoquer l'inhibition de l'oncogène c-Myc et la surexpression des inhibiteurs des CDK p15 et p21, bloquant ainsi le cycle cellulaire en phase G1, ainsi que le déclenchement de l'apoptose en modulant l'expression de différents facteurs de morts tels que Bcl-2. Le TGF-β peut donc inhiber la croissance tumorale en phase précoce en provoquant l'arrêt du cycle cellulaire ou la mort par apoptose (Baba *et al.*, 2022). À l'inverse, en phase plus tardive, le TGF-β est plutôt associé à une activité pro-tumorale. Il est aujourd'hui accepté que lors des phases tardives de la progression tumorale, les effets inhibiteurs du TGF-β sur la prolifération cellulaire sont perdus. Une expression élevée du TGF-β est retrouvée dans de nombreux cancers durant la progression tumorale et est souvent associée avec un mauvais pronostic, faisant du TGF-β une cible de choix pour les traitements anti-cancéreux (Sheen *et al.*, 2013). Ces effets sont associés avec la capacité du TGF-β en phase avancée du développement tumoral à promouvoir des processus de migration cellulaire, de TEM et de prolifération cellulaire (Baba *et al.*, 2022).

## G. TGF-β et fibrose pulmonaire idiopathique

La FPI (Fibrose Pulmonaire Idiopathique) est une maladie chronique léthale et irréversible et est la pneumonie interstitielle idiopathique la plus fréquente. Il n'existe actuellement aucun traitement curatif et l'espérance de survie médiane n'est que de 2 à 5 ans après le diagnostic. Elle est caractérisée par la perte des cellules épithéliales pulmonaires, l'accumulation anormale de myofibroblastes et le dépôt excessif d'éléments de la matrice extracellulaire tels que le collagène. Ces effets mènent à une perte progressive des fonctions pulmonaires, provoquant une insuffisance respiratoire chronique puis la mort. Les causes de la FPI ne sont pas claires mais l'hypothèse dominante est que des lésions de l'épithélium alvéolaire provoquent la perte des cellules épithéliales pulmonaires, associées avec une réparation et une réépithérialisation anomale, ainsi qu'une production de médiateurs fibrogéniques tels que le TGF-β (Yue, Shan et Lasky, 2010; Fernandez et Eickelberg, 2012).

Un rôle potentiel du TGF-β dans les processus de fibrose pulmonaire a été décrit dès le début des années 90. En effet, une production accrue de TGF-β dans un modèle animal de fibrose pulmonaire est détecté en amont de la synthèse de collagène (Khalil et Greenberg, 2007). Le rôle pro-fibrosant du TGF-β a depuis grandement été étudié et est principalement dépendant de trois processus : la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes, la TEM et la fibrogenèse (Ye et Hu, 2021). Les myofibroblastes sont les principaux effecteurs des processus de fibrose pulmonaire. Ils sont impliqués dans les processus de cicatrisation, produisant la matrice extracellulaire, et

disparaissent normalement à la fin de ces processus. Leur maintien provoque l'accumulation excessive de composants de la matrice extracellulaire et le développement de pathologies profibrosantes. Ils peuvent être distingués des fibroblastes par l'expression de l' $\alpha$ -SMA ( $\alpha$ -Smooth Muscle Actin) qui leur confère des propriétés contractiles (Yue, Shan et Lasky, 2010). Dans les poumons, ces cellules peuvent avoir pour origine des fibroblastes pulmonaires résidents, des cellules épithéliales de l'épithélium alvéolaire ou des fibroblastes dérivés de la moelle osseuse. L'activation des voies de signalisation TGF- $\beta$  est nécessaire à la différenciation des fibroblastes résidents en myofibroblastes, en induisant par exemple la production d' $\alpha$ -SMA. De la même manière, le TGF- $\beta$  induit aussi la différenciation des fibroblastes dérivés de la moelle osseuse en myofibroblastes. Il peut aussi déclencher des processus de TEM dans les cellules de l'épithélium alvéolaire, provoquant l'expression de gènes cibles tels que PAI-1 ou  $\alpha$ -SMA et donc leur différenciation en myofibroblastes (Yue, Shan et Lasky, 2010; Fernandez et Eickelberg, 2012). De plus, ces processus de TEM dérégulent l'équilibre entre les cellules épithéliales et mésenchymateuses, menant à la mise en place d'un micro-environnement pro-fibrosant (Hill *et al.*, 2019). Le TGF- $\beta$  module aussi la fibrogenèse en étant capable par exemple d'induire la biosynthèse de collagène et promouvoir ainsi le développement de la FPI (Ye et Hu, 2021).

# RÉSULTATS ET DISCUSSION

Mon équipe de recherche s'intéresse aux IAP et plus particulièrement à cIAP1 et son rôle dans la différenciation, la prolifération et l'oncogenèse. Les travaux effectués dans mon équipe avant mon arrivée ont montré que cIAP1 est un régulateur important de la différenciation et l'activité des macrophages (Dupoux *et al.*, 2009). Dans ce contexte, cIAP1 contrôle le temps d'activation de NF- $\kappa$ B grâce à sa capacité à catalyser l'ubiquitination et la dégradation de l'adaptateur moléculaire TRAF2. De nouveaux partenaires, cibles d'ubiquitination de cIAP1 ont été identifiés. Il s'agit du facteur de transcription E2F1 (Cartier *et al.*, 2011; Glorian *et al.*, 2017; Allègre *et al.*, 2018), et de la petite protéine G de la famille des RhoGTPases cdc42. TRAF2 a été retrouvée, avec cIAP1 dans le complexe d'activation de cdc42 (Marivin *et al.*, 2014).

Le projet de recherche développé lors de mon arrivée avait pour but d'analyser les mécanismes moléculaires régissant l'activité oncogénique de cIAP1. Il s'agissait d'analyser le rôle de son interaction avec TRAF2, E2F1 ou cdc42 dans sa capacité à stimuler la croissance tumorale. Mon sujet de thèse a porté plus spécifiquement sur l'analyse de l'importance de l'interaction de cIAP1 avec TRAF2 dans ses propriétés oncogéniques. De plus, à la suite d'analyses *in silico* de puces à ADN à partir de tissus présentant des signes de fibrose (poumons ou reins) et montrant une forte surexpression de cIAP1 dans les tissus malades, j'ai initié un travail ayant pour but d'évaluer l'implication de cIAP1 dans la signalisation du TGF- $\beta$  et dans le développement de la fibrose dans un modèle de fibrose pulmonaire.

La section « Résultats » a été divisée en 2 parties. La première porte sur l'analyse des propriétés oncogéniques de cIAP1 et la seconde porte sur l'étude de l'influence de cIAP1 sur la signalisation du TGF- $\beta$  dans un contexte de fibrose pulmonaire.

## I. Analyse du rôle de TRAF2 dans les propriétés oncogéniques de cIAP1

Une surexpression de cIAP1 a été détectée dans de nombreux types de cancers et a été souvent associée à une résistance aux traitements et à un mauvais pronostic, comme cela a été décrit dans la partie *II.D* de l'introduction. Par ailleurs, des propriétés oncogéniques de cIAP1 ont clairement été démontrées chez la souris dans des modèles d'ostéosarcomes p53<sup>-/-</sup> (Ma *et al.*, 2009), d'hépatocarcinomes p53<sup>-/-</sup>/c-Myc (Zender *et al.*, 2006), et de carcinomes mammaires p53<sup>-/-</sup>/Rb<sup>-/-</sup> (*Retinoblastoma protein*) (Cheng *et al.*, 2010). L'activité oncogénique de cIAP1 a été expliquée par une coopération entre cIAP1 et c-Myc dans le modèle d'hépatocarcinome (Zender *et al.*, 2006). Connaissant l'importance de cIAP1 dans la régulation de NF- $\kappa$ B et l'activité promotrice de tumeur de ce facteur de transcription, il est fort probable qu'une activation de NF- $\kappa$ B participe à l'activité oncogénique de cIAP1.

Pour autant, certaines études, notamment dans les cancers de la tête et du cou (Tanimoto *et al.*, 2005), et de la vessie (Che *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2013), suggèrent que ce n'est pas l'expression de clAP1 mais sa localisation nucléaire qui serait importante. De plus, l'analyse de l'expression tissulaire de clAP1, à partir de la banque de données « *The Human Protein Atlas* », démontre une expression nucléaire de clAP1 dans le noyau de nombreuses cellules de tissus différents (Zadoroznyj et Dubrez, 2022). clAP1 aurait donc une fonction nucléaire qui pourrait être associée à ses propriétés oncogéniques dans certains types de cancers.

Ces constatations ont conduit mon équipe d'accueil à étudier précisément les fonctions nucléaires de clAP1. Ils ont démontré principalement que clAP1 est capable d'interagir directement avec le facteur de transcription E2F1 et peut ainsi réguler son activité transcriptionnelle. clAP1 module ainsi le cycle cellulaire et donc la prolifération cellulaire, comme cela a été présenté dans la partie ***IV.F.2.b)*** de l'introduction. Par ailleurs, les travaux d'Arthur Marivin et Jean Berthelet, réalisés dans l'équipe, ont montré l'importance de la régulation de la RhoGTPase cdc42 dans l'invasion tumorale (Marivin *et al.*, 2014).

La liaison de clAP1 avec E2F1 fait intervenir le domaine BIR3 (Allègre *et al.*, 2018), alors que la liaison de clAP1 avec cdc42 implique le domaine BIR2 (Marivin *et al.*, 2014). Afin d'évaluer l'importance de ces partenaires dans l'activité oncogénique de clAP1, des MEF déficientes en clAP1 ont été transformées par l'oncogène HRas-V12. Différents mutants de clAP1, dépourvus d'un des domaines BIR ont été exprimés dans ces cellules. La perte du domaine BIR3 a rendu la protéine instable. La délétion du domaine BIR2 a ralenti l'apparition de métastases mais n'a pas eu d'effet sur la croissance tumorale. En revanche, l'absence du domaine BIR1 a complètement bloqué la formation de métastases et a diminué la croissance tumorale. Ce domaine lie la protéine TRAF2. L'objectif du projet était donc d'analyser les mécanismes de l'activité oncogénique du binôme clAP1/TRAF2.

Ce travail a été publié dans « *Oncogene* » en novembre 2022.

#### **« *clAP1/TRAF2 interplay promotes tumor growth through the activation of STAT3* »**

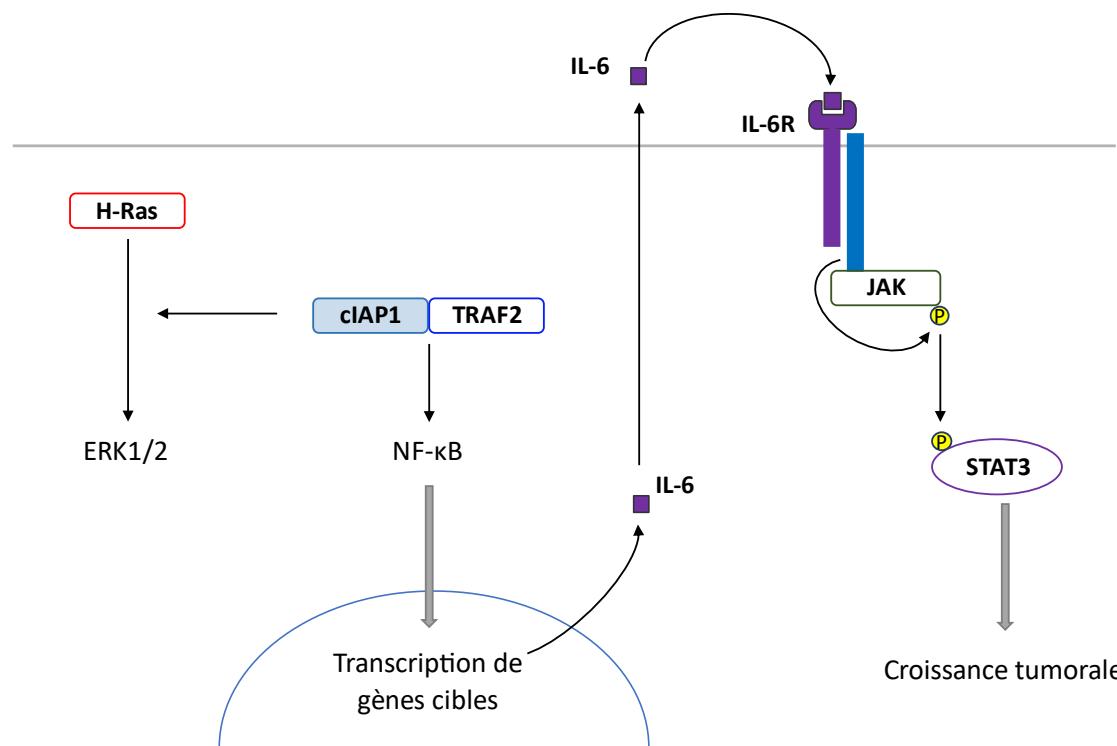
Les travaux réalisés pour cet article, dont je suis co-premier auteur, ont été initiés par Baptiste Dumétier, alors étudiant en thèse dans l'équipe.

Ces travaux ont mis en évidence l'importance de TRAF2 dans les propriétés oncogéniques de clAP1. De plus, un rôle de STAT3 dans ces propriétés oncogéniques a été décrit pour la première fois.

Ils ont permis de démontrer que (Figure 34) :

- L'interaction entre clAP1 et TRAF2 est nécessaire aux propriétés oncogéniques de clAP1,

- La trimérisation de TRAF2 par le domaine BIR1 de cIAP1 est essentielle et suffisante pour promouvoir la croissance tumorale,
- La présence de cIAP1 est nécessaire à TRAF2 pour interagir avec ses partenaires de signalisation,
- cIAP1/TRAF2 stimule l'activation de NF-κB et des MAPK ERK1/2 et inhibe l'activation de p38,
- NF-κB provoque la production d'IL-6, menant à l'activation autocrine de la voie de signalisation JAK/STAT3,
- L'activation de la voie JAK/STAT3 est essentielle dans l'activité oncogénique de cIAP1. L'interaction entre cIAP1 et TRAF2 stimule la croissance tumorale *via* l'activation autocrine de la voie de signalisation JAK/STAT3.



**Figure 34 : STAT3 dans les propriétés oncogéniques de l'interaction entre cIAP1 et TRAF2.** L'interaction entre cIAP1 et TRAF2 stimule l'activation de la MAPK ERK1/2, médiée par H-Ras et de NF-κB. L'activation de cette dernière déclenche la synthèse d'IL-6. Cette dernière est secrétée à l'extérieur de la cellule et active de manière autocrine la voie de signalisation JAK/STAT3, qui en retour provoque la croissance tumorale.

Mon travail dans ce projet a consisté à terminer la caractérisation de la croissance tumorale obtenue avec les différentes lignées cellulaires (Article, Figure 1 et 2). J'ai participé à l'analyse de la localisation de TRAF2 dans les cellules exprimant cIAP1, le mutant cIAP1ΔBIR1 ou le domaine BIR1 isolé (Article, Figure 2). J'ai participé à toute l'analyse signalétique et mis en évidence la présence d'une boucle de régulation impliquant la voie de signalisation STAT3/JAK (Article, Figure 4 et 5). Enfin, j'ai mené les expériences de traitement des souris par les inhibiteurs de STAT3 et MEK (Article, Figure 6). Baptiste Dumétier ayant quitté l'équipe fin 2020, j'ai également pris en charge l'ensemble des révisions de l'article.

## ARTICLE



# cIAP1/TRAFF2 interplay promotes tumor growth through the activation of STAT3

Baptiste Dumétier<sup>1,2,7</sup>, Aymeric Zadorozny<sup>1,2,7</sup>, Jean Berthelet<sup>1,2,6</sup>, Sébastien Causse<sup>1,2</sup>, Jennifer Allègre<sup>1,2</sup>, Pauline Bourgeois<sup>1,2</sup>, Florine Cattin<sup>1,2</sup>, Cindy Racoeur<sup>3,4</sup>, Catherine Paul<sup>3,4</sup>, Carmen Garrido<sup>1,2,5</sup> and Laurence Dubrez<sup>1,2</sup>✉

© The Author(s), under exclusive licence to Springer Nature Limited 2022

Cellular inhibitor of apoptosis-1 (cIAP1) is a signaling regulator with oncogenic properties. It is involved in the regulation of signaling pathways controlling inflammation, cell survival, proliferation, differentiation and motility. It is recruited into membrane-receptor-associated signaling complexes thanks to the molecular adaptor TRAF2. However, the cIAP1/TRAFF2 complex exists, independently of receptor engagement, in several subcellular compartments. The present work strengthens the importance of TRAF2 in the oncogenic properties of cIAP1. cIAPs-deficient mouse embryonic fibroblasts (MEFs) were transformed using the HRas-V12 oncogene. Re-expression of cIAP1 enhanced tumor growth in a nude mice xenograft model, and promoted lung tumor nodes formation. Deletion or mutation of the TRAF2-binding site completely abolished the oncogenic properties of cIAP1. Further, cIAP1 mediated the clustering of TRAF2, which was sufficient to stimulate tumor growth. Our TRAF2 interactome analysis showed that cIAP1 was critical for TRAF2 to bind to its protein partners. Thus, cIAP1 and TRAF2 would be two essential subunits of a signaling complex promoting a pro-tumoral signal. cIAP1/TRAFF2 promoted the activation of the canonical NF-κB and ERK1/2 signaling pathways. NF-κB-dependent production of IL-6 triggered the activation of the JAK/STAT3 axis in an autocrine manner. Inhibition or downregulation of STAT3 specifically compromised the growth of cIAP1-restored MEFs but not that of MEFs expressing a cIAP1-mutant and treating mice with the STAT3 inhibitor niclosamide completely abrogated cIAP1/TRAFF2-mediated tumor growth. Altogether, we demonstrate that cIAP1/TRAFF2 binding is essential to promote tumor growth via the activation of the JAK/STAT3 signaling pathway.

Oncogene; <https://doi.org/10.1038/s41388-022-02544-y>

## INTRODUCTION

Cellular Inhibitors of apoptosis 1 and 2 (cIAP1/2) and tumor necrosis factor-associated factors 2 (TRAF2) were purified together in 1995 by Rothe et al. in a pull-down experiment aiming to identify cytoplasmic components of the tumor necrosis factor receptor-2 (TNFR2) complex [1]. cIAP1/2 are RING containing-E3-ubiquitine ligases belonging to the IAP (Inhibitor of apoptosis) family [2]. They catalyze the conjugation of ubiquitin chains of different topologies including K6-, K11-, K27-, K48-, and K63-linked chains resulting in modification of the stability, activity, or interaction network of protein substrates. Their ubiquitination substrates are specifically recruited thanks to the presence of three conserved protein-protein interacting domains named BIRs (Baculoviral IAP repeats) at the N-terminal extremity. More than thirty substrates have been identified so far [3]. They comprise cell death regulators such as the IAP antagonist Smac, cell signaling intermediates including receptor-interacting kinases (RIPs), NF-κB-inducing kinase (NIK), and raf proto-oncogene serine/threonine protein kinase (Raf1), regulators of cellular architecture such as some GTPases from the Rho family and transcription factors including E2F1, the Interferon Regulatory Factor 1 (IRF1) and the C/EBP homologous

protein (CHOP) (for a review, see [3]). Thus, cIAPs have been involved in the regulation of inflammation, cell differentiation, cell death, cell proliferation, and cell migration. cIAP1 is more strongly expressed than cIAP2 in most tissues, except in bone marrow and lymphoid tissues in which cIAP2 is predominant [4]. Consistent with its functions in promoting cell survival and proliferation, oncogenic properties of cIAP1 have been demonstrated in several mouse models [5–7].

As cIAP1, TRAF2 is a RING-containing protein. However, its E3-ligase activity seems relatively weak [8, 9]. It is considered as a molecular adaptor bridging signaling molecules to receptors [10]. It can directly or indirectly bind certain members of TNFR including TNFR1, TNFR2, CD30, CD40 and B-cell activating factor (BAFF-R), toll-like receptor-4 (TLR4), some nucleotide binding-oligomerization domain (NOD)-like receptors (NLRs), retinoic acid-inducible gene 1 (RIG-1)-like receptors (RLRs) and some cytokine receptors [10]. TRAF2 serves as an intermediate for the recruitment of cIAPs into receptor-associated complexes. However, the cIAP1-TRAF2 complex has also been observed in the cytoplasm as well as in the nucleus, independently of receptor engagement [8, 11–14].

<sup>1</sup>Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm), LNC UMR1231, LabEx LipSTIC, Team with the label of excellence from «la ligue national contre le Cancer», 21000 Dijon, France. <sup>2</sup>Université de Bourgogne-Franche-Comté, 21000 Dijon, France. <sup>3</sup>LIC, EA7269, Université de Bourgogne-Franche-Comté, 21000 Paris, France. <sup>4</sup>Laboratory of Immunology and Immunotherapy of Cancers, EPHE, PSL Research University, 75000 Paris, France. <sup>5</sup>Anticancer Center Georges François Leclerc-Université, Dijon, France. <sup>6</sup>Present address: Olivia Newton-John Cancer Research Institute, Heidelberg, VIC, Australia. <sup>7</sup>These authors contributed equally: Baptiste Dumétier, Aymeric Zadorozny. ✉email: ldubreze@u-bourgogne.fr

Received: 10 March 2022 Revised: 26 October 2022 Accepted: 4 November 2022  
Published online: 18 November 2022

Here, by using HRas-V12-transformed mouse embryonic fibroblast (MEF) model, we demonstrated that TRAF2 binding was required for cIAP1 pro-tumoral activity. cIAP1 induced the clustering of TRAF2, which was sufficient to engage pro-tumoral signaling pathways independently of receptor engagement. A novel function for cIAP1 is therefore identified that appears essential for TRAF2 to associate with its protein partners. As expected, cIAP1/TRAF2 complex promoted the activation of the canonical NF- $\kappa$ B signaling pathway. Among mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathways, it stimulated ERK1/2 whereas it inhibited p38 and did not affect JNK pathway. cIAP1/TRAF2 promotes NF- $\kappa$ B dependent production of IL-6 that activates JAK2/STAT3 signaling pathway in an autocrine manner. Finally, we demonstrated for the first time that STAT3 activation was critical for the tumor-promoting activity of cIAP1/TRAF2.

## RESULTS

**Binding to TRAF2 is critical for the oncogenic activity of cIAP1**

We generated a cIAP1-deficient tumor model by transforming immortalized wt, *cIap1*<sup>-/-</sup> (SKO) or *cIap1*<sup>-/-</sup>/*cIap2*<sup>-/-</sup> (DKO) mouse embryonic fibroblasts (MEFs) (from J. Silke & D. Vaux's laboratories) by the HRas-V12 oncogene (Fig. 1A). Deletion of cIAP1 slowed down tumor growth in a xenograft model (Fig. 1B) and decreased the formation of lung cancer foci when the cells were injected into the tail vein (Fig. 1C). Double deletion of cIAP1 and cIAP2 amplified the phenomena (Figs. 1B and 1C). Rescue experiments demonstrated that restoring cIAP1 in single-knockout (SKO) or double-knockout (DKO) cells (Fig. 1D) significantly enhanced tumor cell growth (Figs. 1B & 1E) confirming the oncogenic properties of cIAP1. We next stably expressed cIAP1 mutants unable to bind TRAF2 in Hras-V12-transfomed DKO-MEFs (Fig. 1F). The mutants previously validated [11] are cIAP1<sup>ΔBIR1</sup> in which the BIR1 has been deleted, and cIAP1<sup>L47A</sup> mutant in which a point mutation within the BIR1 has been introduced. We checked that these mutants lost their ability to bind TRAF2 (Fig. S1A) and conserved their full E3-ligase activity by treating the cells with the smac mimetic GDC-0152, known to stimulate the self-ubiquitination and degradation of cIAP1 (Fig. S1B). Deletion of the BIR1 as well as mutation of Leucine 47 were sufficient to completely abolish the oncogenic activity of cIAP1, as demonstrated both in our xenograft model (Fig. 1G) and in the experimental metastasis model (Fig. 1H). Re-expression of cIAP1 into DKO also increased the number of the colonies formed in soft agar medium and deletion of BIR1 abolished the capacity of cIAP1 to stimulate anchorage-independent cell growth (Fig. 1I). By comparison, deletion of BIR2 ( $\Delta$ BIR2) did not significantly alter the clonogenic properties (Fig. 1I) of cIAP1. Of note, the mutant  $\Delta$ BIR1, devoid of oncogenic properties, was strongly expressed compared to the native full-length cIAP1 (Fig. 1F, S1B). These results demonstrate that TRAF2 binding is required for cIAP1 to stimulate tumor growth. It is worth noting that we were unable to obtain TRAF2-depleted MEFs (either by guide-RNA genome editing or shRNA), suggesting that the deletion of TRAF2 caused cell death as already reported [15].

**Clustering of TRAF2 is sufficient to stimulate tumor growth**

An immunofluorescence analysis demonstrated the presence of cytoplasmic TRAF2 clusters in DKO-cIAP1 but not in DKO-cIAP1<sup>ΔBIR1</sup> (Fig. 2A). Whereas these clusters did not colocalize with markers of calveola (calveolin-1), golgi apparatus (GM130) or lysosomes (LAMP-1), they colocalized with the endoplasmic reticulum marker PDI (Fig. 2B). Structural analyzes demonstrated that the BIR1 of cIAPs can bind a TRAF1/2 trimer [16, 17]. We hypothesized that cIAP1 could trigger the oligomerization of TRAF2 required for partner binding and the activation of downstream signaling pathways [18]. We forced the trimerization of TRAF2 by expressing isolated BIR1 (iBIR1) in DKO-MEFs using a

retroviral infection (Fig. 2C). As expected, we observed the clustering of TRAF2 in iBIR1-expressing cells (Fig. 2A). The expression of iBIR1 increased the clonogenic growth of cells, forming large and dense colonies (Fig. 2D) and was as efficient as cIAP1 to stimulate the tumor growth in mice (Fig. 2E). Expression of iBIR1 in wt MEFs also stimulated tumor growth (Fig. S2A), although the presence of iBIR1 strongly sensitized cells to TNFa-induced cell death (Fig. S2B) as a result of a competitive inhibition of cIAP1-TRAF2 association (Fig. S2C). These results suggest that TRAF2 clustering is sufficient to engage pro-tumoral signaling pathways, independently of TNFR stimulation.

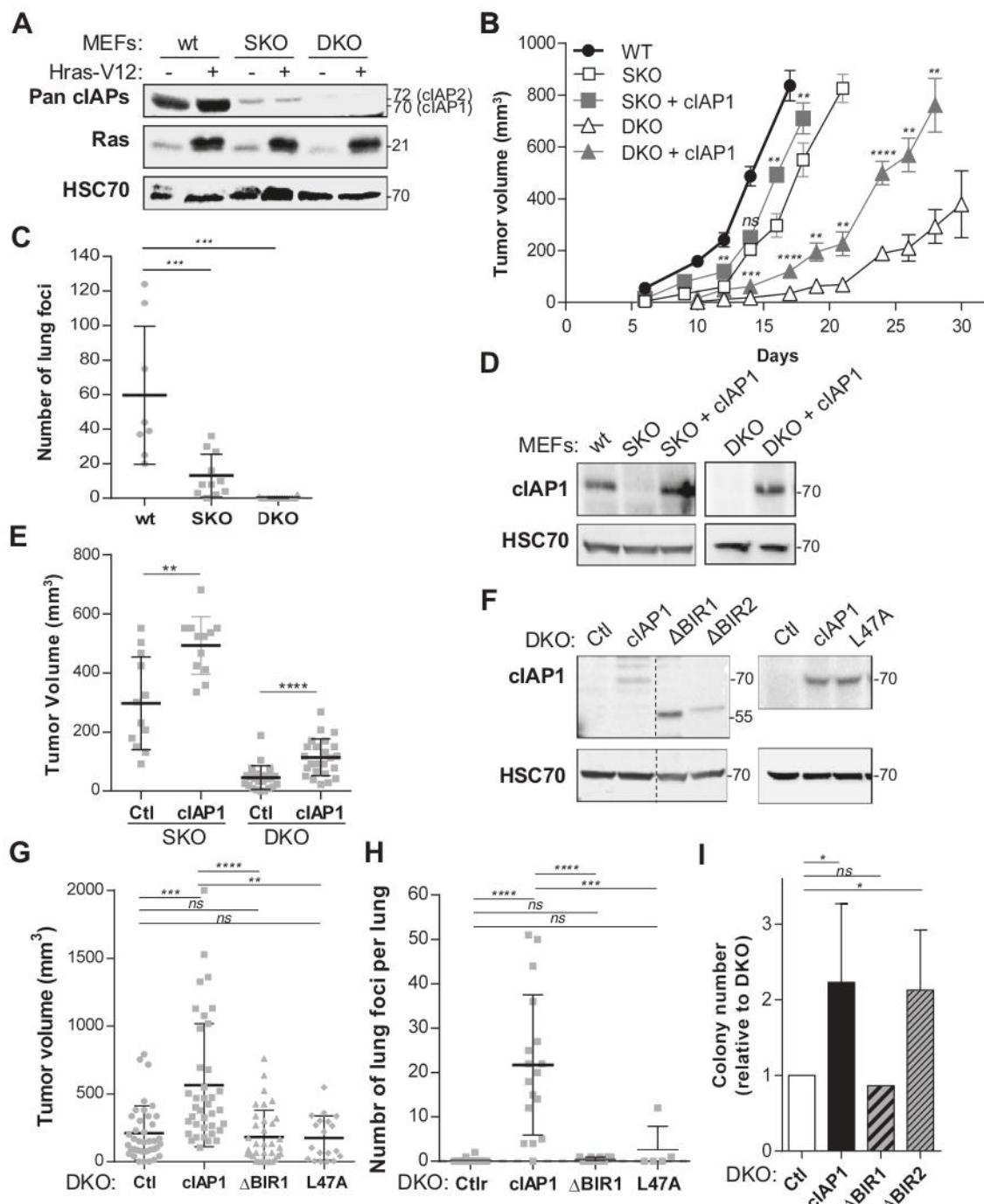
### cIAP1 is critical for TRAF2 interactome

We then investigated the influence of cIAP1 on TRAF2 protein-interacting network. The TRAF2 interactome was analyzed in cell treated with the smac mimetics GDC0152 that completely depleted cIAP1 whereas it weakly enhanced cIAP2 and XIAP and did not affect TRAF2 protein levels (Fig. 3A). TRAF2 partners were identified by performing immunoprecipitation (Fig. S3A) followed by mass spectrometry analysis (Table S1). The data were analyzed using the functional enrichment analysis tool (FunRich) and the UniProt database. We detected 419 to 797 hits in the untreated cells (Fig. 3B). As expected, we found TRAF1 and cIAP1 (BIRC2), which was the only IAP detected in the screen (Fig. 3C). In accordance with its role as a signaling adaptor, we observed an enrichment of TRAF2 partners in the membrane, protein-containing complex and membrane raft compartments (Fig. 3D). However, TRAF2 partners were also enriched in the cytoplasm, cytosol, and nucleus (Fig. 3D, S3B). Concerning biological processes, as expected, TRAF2 partners were enriched among proteins involved in TNF-mediated, NF- $\kappa$ B and MAPK-signaling pathways, apoptosis regulation, proteins ubiquitination, and regulation of protein turn-over (protein stabilization and ubiquitin/proteasome system) (Fig. 3E, S4). Interestingly, TRAF2 partners were also significantly enriched among proteins involved in epithelial cell differentiation-related pathways (Fig. 3E, S4). Use of the FunRich database confirmed a strong enrichment of TRAF2 partners in the ErbbB-mediated signaling network, compared to that observed in the TNFR-signaling pathway (Fig S5). Moreover, TRAF2 partners were enriched in cdc42-associated signaling pathways but not in RhoA or Rac1-related signaling events (Fig. 3C, S5), which is consistent with our previous work showing that the cytoplasmic cIAP1/TRAF2 complex controls the activation cycle of cdc42 RhoGTPase in unstimulated fibroblasts [11].

cIAP1 depletion drastically decreased (about 70%) the number of hits (Figs. 3B, 3F). However, it did not affect the binding of TRAF2 to TRAF1 (Fig. 3C) and it did not significantly modify the distribution of TRAF2 partners in the different subcellular compartments, biological processes or signaling pathways (Figs. 3D, 3E, S3B, S4, S5). Nevertheless, we observed a trend towards increased TRAF2 partners in negative regulation of apoptosis and protein stabilization pathways (Fig. 3E & S4). Thus, cIAP1 appears critical for the binding of TRAF2 to its protein partners.

### cIAP1/TRAF2 induces the activation of NF- $\kappa$ B and ERK1/2 signaling pathways in H-Ras-V12 transformed MEFs

We analyzed the signaling pathways activated in HRas-V12-transformed MEFs. As expected, cIAP1-expressing MEFs displays a downregulation of I $\kappa$ B- $\alpha$  (Fig. 4A) that characterizes the activation of the canonical NF- $\kappa$ B signaling pathway. This marker was not observed in the mutant cIAP1-expressing cells (Fig. 4A). Accordingly, an RT-PCR array showed a general upregulation of NF- $\kappa$ B-target genes in wt cIAP1-expressing MEFs compared to cIAP1<sup>ΔBIR1</sup>-expressing cells (Fig. 4B). On the other hand, the p52 NF- $\kappa$ B active-subunit that is mainly expressed in the nuclei-enriched fraction in DKO cells was found in the cytoplasm in cIAP1-expressing MEFs and even more in cIAP1<sup>ΔBIR1</sup>-expressing MEFs demonstrating that cIAP1 or its mutant inhibited the non-canonical NF- $\kappa$ B activating

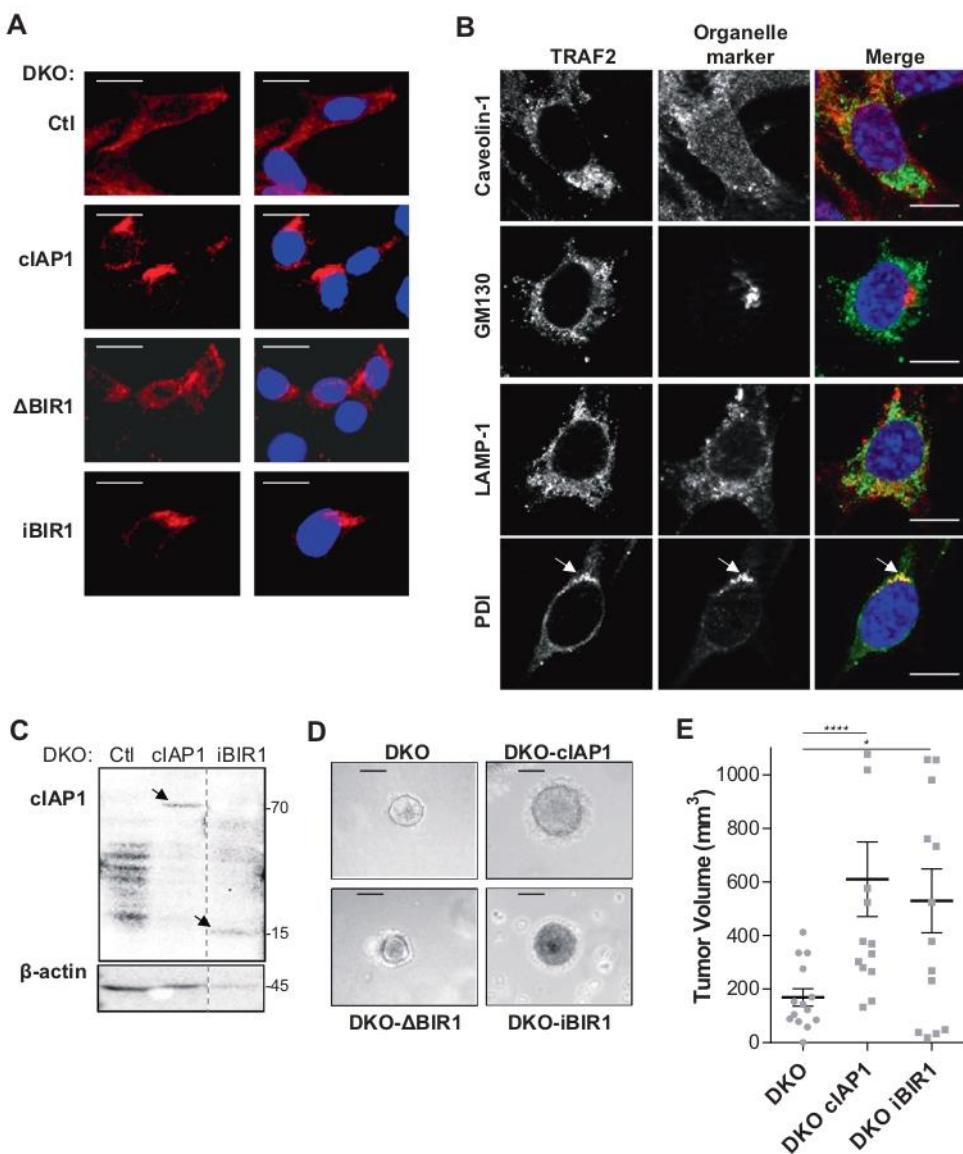


**Fig. 1 TRAF2 binding is critical for the oncogenic activity of cIAP1.** Wild type (wt), cIAP1<sup>-/-</sup> (SKO) or cIAP1<sup>-/-</sup>/cIAP2<sup>-/-</sup> (DKO) mouse embryonic fibroblasts (MEFs) were transformed by Hras-V12 oncogene and reconstituted with cIAP1, or cIAP1 mutants cIAP1<sup>ΔBIR1</sup> ( $\Delta$ BIR1), cIAP1<sup>L47A</sup> (L47A) or cIAP1<sup>ΔBIR2</sup> ( $\Delta$ BIR2). **A, D, F** Western blot analysis of cIAPs and Ras. HSC70 was used as loading control. Cells (500,000) were injected subcutaneously in nude NMRI mice. Tumor size was measured every two days (**B**), 17 days (**E**), or 3 weeks (**G**) post-injection. Statistical analyses were performed using the Mann-Whitney test. Mean  $\pm$  SEM (**B**) or Mean  $\pm$  SD (**E, G**),  $n = 10-30$ . In **B**, the statistical analyses compared SKO or DKO with cIAP1-expressing SKO or DKO respectively. **C, H** Cells ( $10^6$ ) were injected in the caudal vein in nude NMRI mice. The number of lung foci was determined 36 days after intravenous injection. Statistical analyses were performed using the Mann-Whitney test. Mean  $\pm$  SD,  $n = 8-20$ . **I** Clonogenic growth of cells in soft agar medium. Statistical analyses were performed using the Wilcoxon test. Mean  $\pm$  SD,  $n = 3-5$ .

pathway (Fig. 4C). Among MAPK signaling pathways, expression of cIAP1 but not cIAP1 mutants simulated ERK signaling characterized by ERK1/2 phosphorylation, decreased phosphorylation of p38 and did not affect the c-Jun N-terminal kinase (JNK) signaling pathway (Fig. 4A). Of note, the expression of cIAP1 or its  $\Delta$ BIR1 mutant did not significantly modify the expression level of TRAF2 and RIP1 (Fig. 4A).

#### cIAP1/TRAF2 promotes NF- $\kappa$ B-dependent production of IL-6 leading to an activation of JAK/STAT3 signaling pathway in an autocrine manner

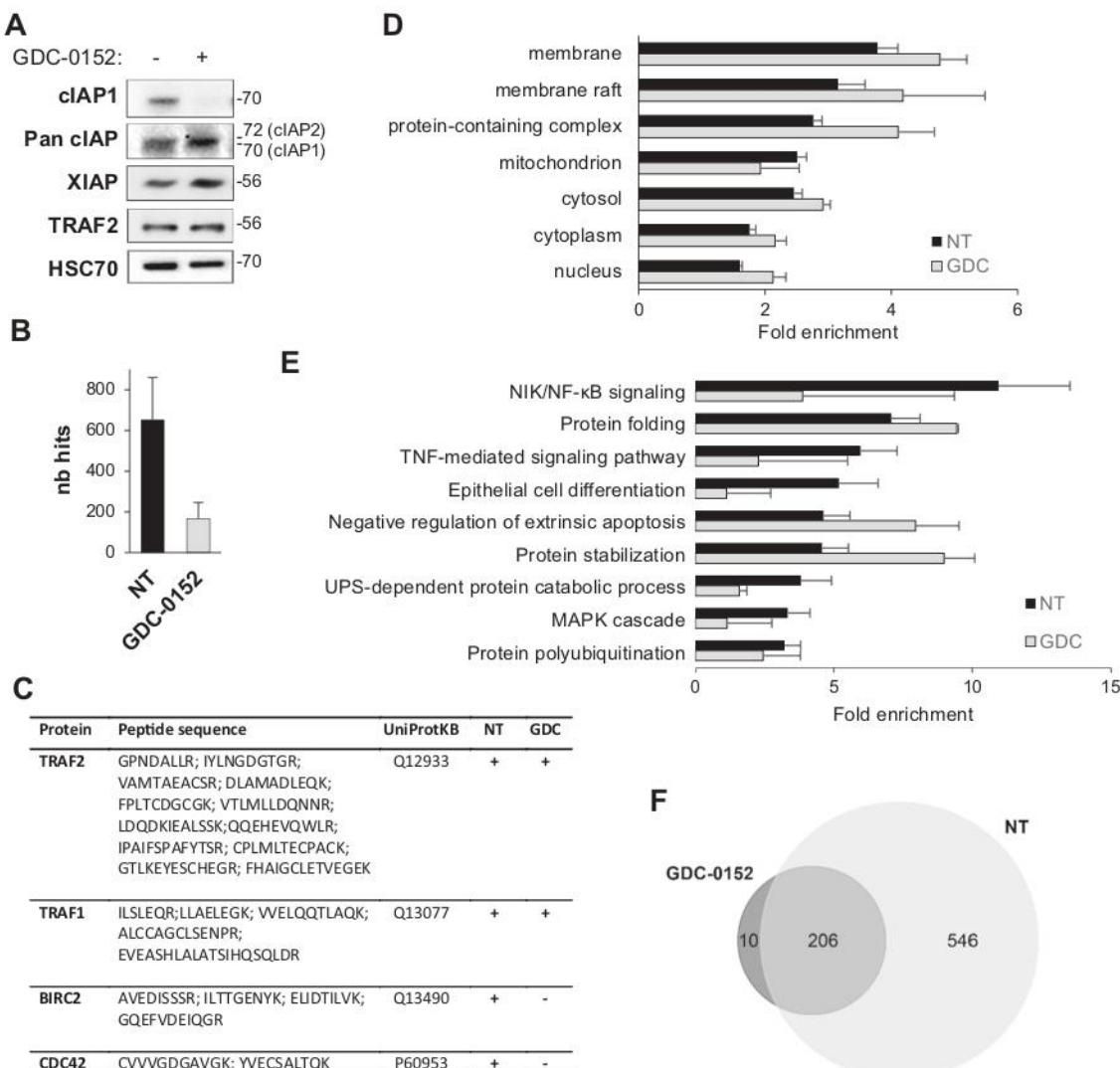
We observed the activation of JAK2 and STAT3 characterized by their phosphorylation at Y1008 and Y705 residue respectively in cIAP1-expressing MEFs but not in cells expressing cIAP1 mutants (Fig. 5A, B). Silencing of TRAF2 decreased cIAP1-mediated STAT3



**Fig. 2** Forced clustering of TRAF2 stimulated tumor growth, independently of clAP1. clAP1, clAP1 $^{\Delta\text{BIR1}}$  or the isolated clAP1-BIR1 domain (iBIR1) were expressed in HRas-V12-transformed DKO MEFs. **A** Immunofluorescence analysis of TRAF2 in DKO, DKO-clAP1, DKO-clAP1 $^{\Delta\text{BIR1}}$  or DKO-iBIR1. Scale bars: 10  $\mu\text{m}$ . **B** Immunofluorescence analysis of TRAF2 and indicated organelle markers in DKO-clAP1. Scale bars: 7  $\mu\text{m}$ . **C** Western blot analysis of clAP1.  $\beta$ -actin was used as loading control. **D** Colonies formed in soft-agar medium. Scale bars: 100  $\mu\text{m}$ . **E** DKO, DKO-clAP1, and DKO-iBIR1 MEFs (500 000) were subcutaneously injected into nude mice. Tumor volume 24 days after injection is represented. Statistical analyses comparing the DKO group and clAP1 or iBIR1-expressing group were performed using the Mann-Whitney test. Mean  $\pm$  SEM,  $n = 12-13$ .

phosphorylation, confirming the importance of TRAF2 in this process (Fig. 5C). We then analyzed the contribution of NF- $\kappa$ B and ERK signaling pathway in STAT3 activation. Inhibition of the NF- $\kappa$ B signaling pathway by Bay-11-7082 prevented STAT3 phosphorylation while inhibition of the MEK/ERK axis by trametinib did not modify it (Fig. 5D), demonstrating a NF- $\kappa$ B-dependent activation of STAT3 pathway. Conversely, the STAT3 inhibitor niclosamide did not modify ERK and weakly decreased I $\kappa$ B- $\alpha$  phosphorylation (Fig. 5D). Trametinib did not interfere with I $\kappa$ B- $\alpha$  phosphorylation and Bay-11-7082 did not modify ERK phosphorylation (Fig. 5D), showing that the 2 pathways were activated independently. JAK2/STAT3 signaling axis can be activated by stimulation of cytokine- or growth factor receptors such as IL-6R or EGFR. Consistent with the activation of NF- $\kappa$ B, clAP1 expression induced upregulation of the NF- $\kappa$ B target gene *IL-6* which is inhibited by the NF- $\kappa$ B inhibitor Bay-11-7082 but not by the MEK inhibitor Trametinib

(Fig. 5E). In contrast, the expression of clAP1 $^{\Delta\text{BIR1}}$  was not able to stimulate *IL-6* expression (Fig. 5E). Inhibition of IL-6 by an anti-IL-6 neutralizing antibody completely blocked STAT3 phosphorylation in clAP1-restored MEFs (Fig. 5F). Altogether, these results demonstrated that the expression of clAP1 stimulated the NF- $\kappa$ B-dependent production of IL-6 that induced an autocrine activation of the JAK2/STAT3 signaling pathway. By analyzing available cancer genome atlas (TCGA) dataset of the national cancer institute (NIH) using the gene expression profiling interactive analysis software (GEPIA) [19], we observed a significant correlation between the clAP1-encoding *BIRC2* and *IL6* gene expression in lung adenocarcinoma (LUAD), breast invasive carcinoma (BRCA) and thyroid carcinoma (THCA) (Fig. 5G). In contrast, no correlation between *TNF* and *BIRC2* expression was detected (Fig. S6). We then investigated the role of clAP1 and TRAF2 in JAK/STAT3 signaling in the lung adenocarcinoma cell line



**Fig. 3 TRAF2 interactome.** A549 cells were incubated for 6 h with vehicle (NT) or 5  $\mu$ M GDC-0152 (GDC). TRAF2 was immunoprecipitated and its interactome was analyzed by ESI-TRAP mass spectrometry. Analysis was performed using the functional enrichment analysis tool (FunRich) using the FunRich (**B, F**) or UniProt (**D, E**) databases. **A** Western blot analysis of clAP1, clAP2, XIAP, and TRAF2. HSC70 was used as loading control. **B**, **F** Number of partners of TRAF2 in untreated (NT) or GDC-0152-treated cells. Mean  $\pm$  SD,  $n = 3$  (NT) or 2 (GDC-0152). **C** Peptides identified by mass spectrometry after TRAF2 immunoprecipitation. Enrichment of TRAF2 partners in subcellular compartments (**D**) and biological processes (**E**). Mean  $\pm$  SD,  $n = 3$  (NT) or 2 (GDC-0152). **F** Venn diagram. One representative experiment is shown.

A549 (Fig. 5H, I). Silencing of clAP1 or TRAF2 inhibited basal JAK2 and STAT3 phosphorylation (Fig. 5H). Similarly, depletion of clAP1 by GDC-0152 inhibited JAK2 and STAT3 phosphorylation in a dose-dependent manner (Fig. 5I).

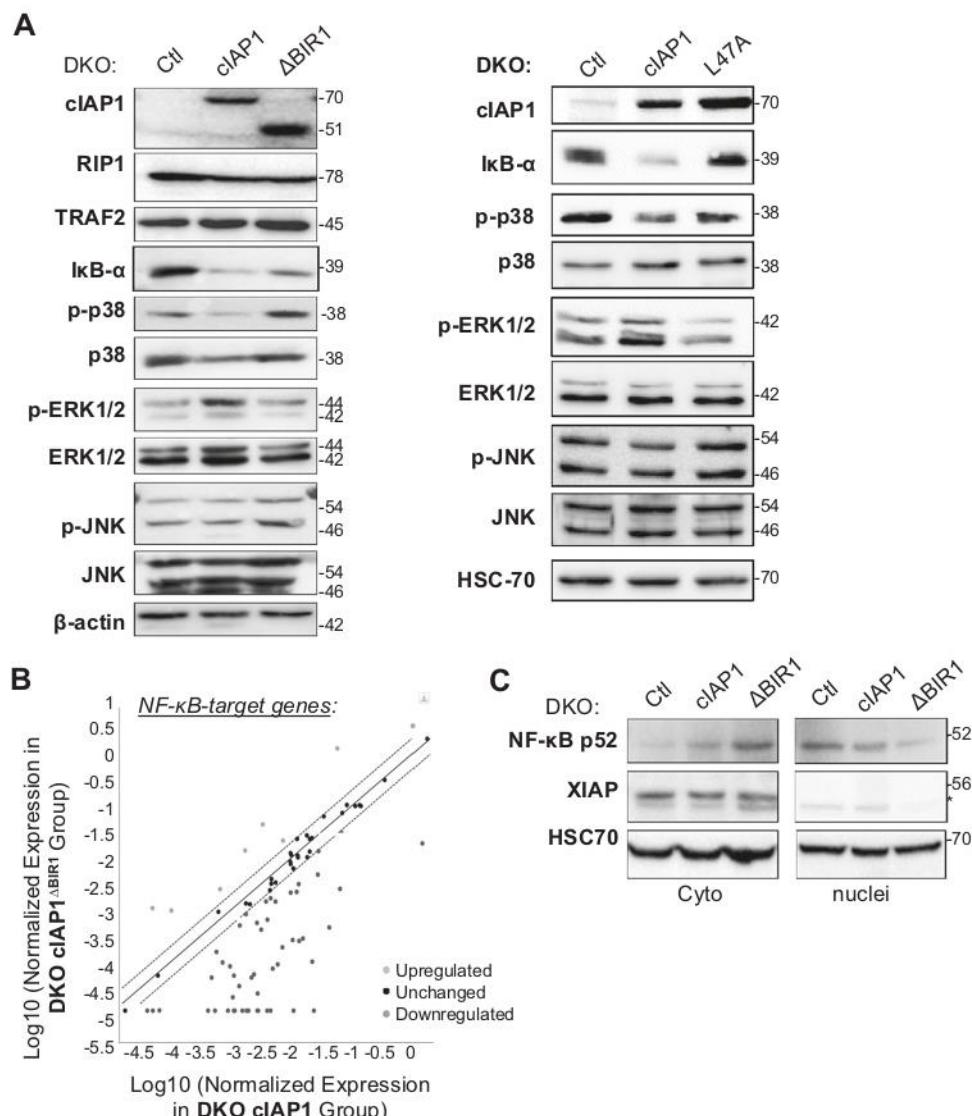
The JAK/STAT3 signaling pathway is involved in clAP1-mediated tumor growth. We then evaluated the contribution of STAT3 and MEK/ERK signaling pathways in clAP1/TRAF2 mediated-tumor growth using the STAT3 inhibitor niclosamide and the MEK inhibitor trametinib. Niclosamide or trametinib were daily injected intraperitoneally when the tumors reached a volume of approximately 100 mm<sup>3</sup>. Niclosamide treatment selectively slowed down the growth of DKO-clAP1 MEFs in mice, neutralizing the growth advantage given by clAP1 expression, whereas it did not modify the growth of clAP1<sup>ΔBIR1</sup> expressing MEFs (Fig. 6A, B). In contrast, trametinib inhibited the growth of both MEFs expressing clAP1 and the ΔBIR1 mutant (Fig. 6C, D), which is consistent with the role of MEK/ERK signaling pathway in the transforming activity of HRas-V12. We then confirmed the importance of STAT3 in the growth/survival of clAP1-expressing MEFs in a clonogenic and

crystal violet assay (Fig. 6E–G). Inhibition of STAT3 by niclosamide abolished the clonogenic advantage of clAP1-reconstituted MEFs (Fig. 6E) and siRNA-mediated-silencing of STAT3 did not affect the survival of DKO but selectively decreased clAP1-expressing DKO MEFs count (Fig. 6G).

## DISCUSSION

TRAF2 serves as an adaptor protein to bring the clAP1 E3-ubiquitin ligase closer to its substrates. It can also stabilize clAP1 protein by blocking its autoubiquitination and degradation [20] and, in some situations, it can activate its E3-ubiquitin ligase activity through K63-linked ubiquitination [21]. Conversely, clAP1 can regulate TRAF2 stability by controlling its ubiquitin-proteasome system (UPS)-mediated degradation [14, 22, 23]. In the present work, we extend our understanding of clAP1's hold over TRAF2 by showing that clAP1 is critical for TRAF2 binding to its protein partners.

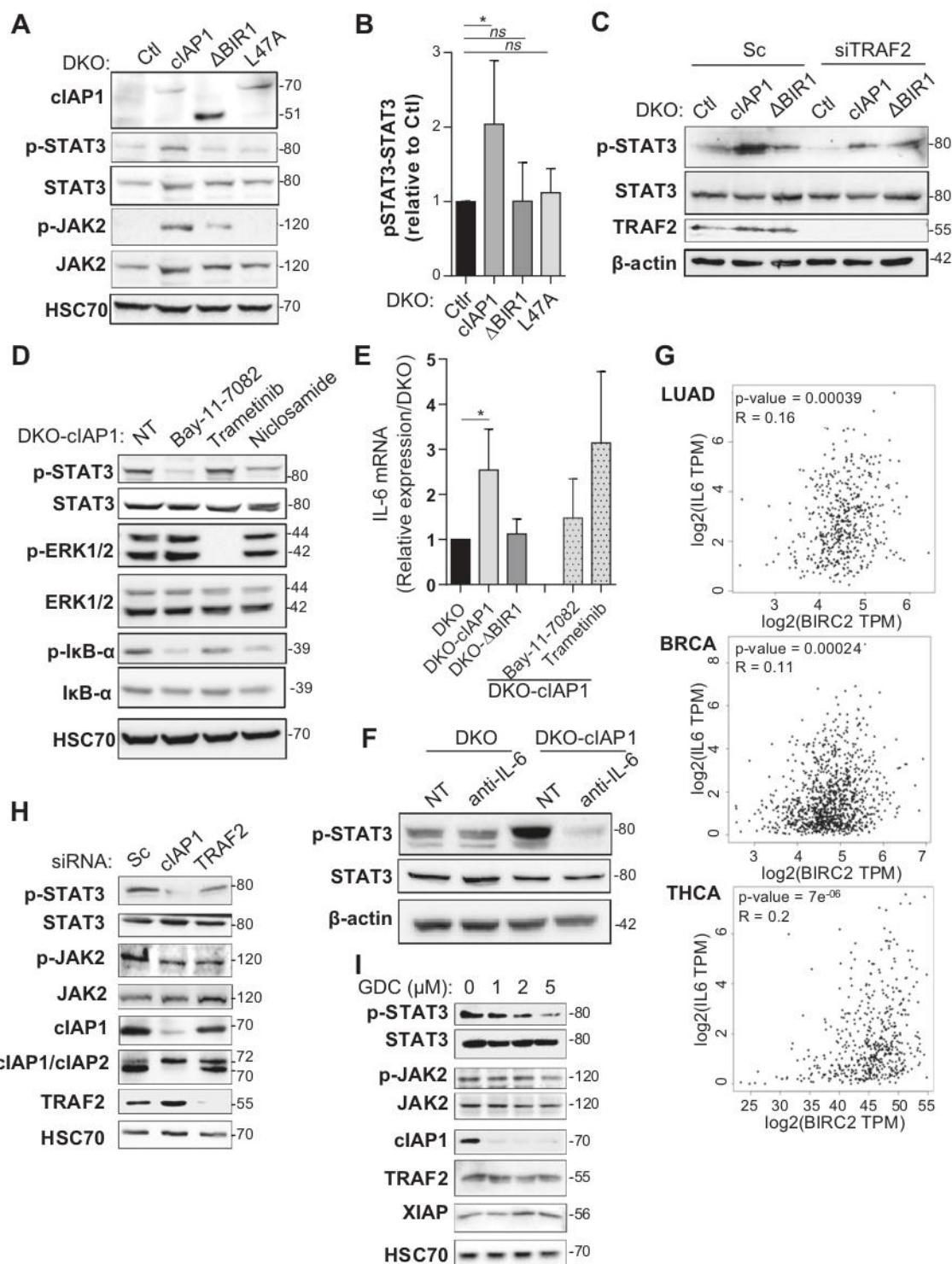
The function of TRAF2 as a molecular adaptor allowing the recruitment of signaling molecules into receptor-associated



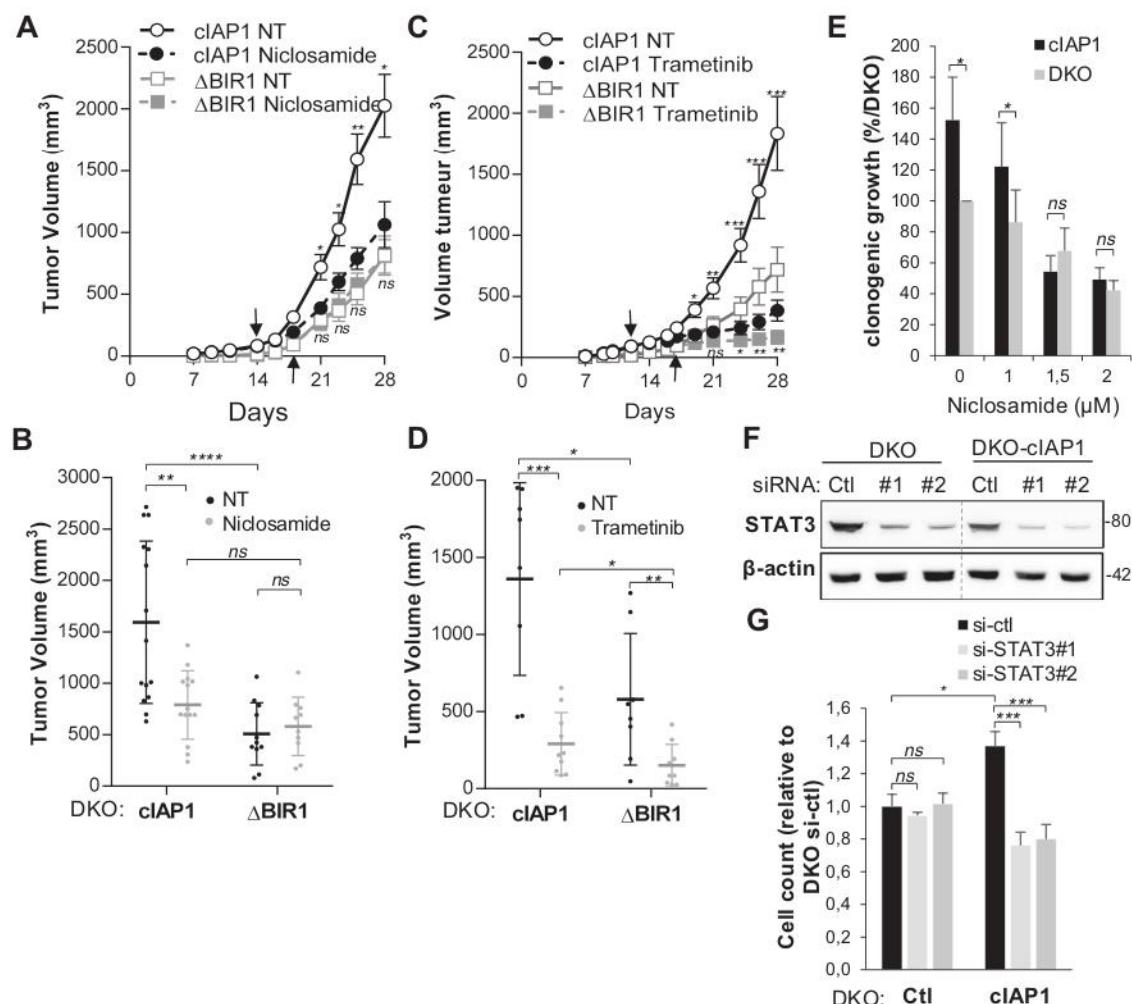
**Fig. 4 TRAF2 binding is essential for the activation of the canonical NF- $\kappa$ B and ERK1/2 signaling pathways.** A Western blot analysis of proteins involved in the canonical NF- $\kappa$ B, p38-MAPK, ERK1/2, and JNK signaling pathways.  $\beta$ -actin or HSC70 were used as loading control. B NF- $\kappa$ B target genes were analyzed in MEF DKO-clAP1 and DKO-clAP1 $^{\Delta BR1}$  by RT-qPCR array (Qiagen NFkB Signaling Pathway RT2 Profiler PCR Array). C Western blot analysis of the NF- $\kappa$ B p52 subunit in cytoplasmic and nuclear-enriched fractions. XIAP was used as cytoplasmic fraction control and HSC70 as a loading control.

signaling complexes has been well reported. However, there is converging evidences pointing at the existence of a cIAP1-TRAF2 complex in the cytoplasm and nucleus of unstimulated cells. Shu et al. demonstrated in 1996 that cIAP1-TRAF2 binding occurs in the cytoplasm and that they are recruited together to TNFR1-associated complex in TNF $\alpha$ -stimulated cells [24]. The TRAF2 protein has a mushroom-like shape. The cap is formed by the C-terminal half of the conserved TRAF domain (called TRAF-C) that mediates binding to receptors, and the stem is formed by the coiled-coiled N-terminal half of the TRAF domain (TRAF-N), the zing fingers and a N-terminal RING domain required for downstream signaling [18, 25]. Whereas the mechanisms of interaction of TRAF2 with receptors have been the subject of numerous studies, the binding of TRAF2 with signaling molecules is much less clear. The trimeric form of TRAF2 binds to activated trimeric receptor [26–28]. By contrast, a TRAF2 trimer interacts with only one cIAP1 molecule [16, 17]. The oligomerization of the amino-terminal half of TRAF2 is also necessary for the recruitment of downstream signaling effectors [18]. The oligomerization site is

located in the coiled-coiled TRAF-N domain [26]. Of interest, cIAP1 binds a motif called CIM (cIAP1/2-interacting motif) found at the N-terminal extremity of the TRAF-N [16]. We may hypothesize that cIAP1 primes TRAF2 for its binding to partners, whether receptors or signaling effectors, by maintaining it in a proficient oligomerized form. Accordingly, we show here that a forced oligomerization of TRAF2 induced by expressing the cIAP1-BIR1 domain is sufficient to engage tumor-promoting signaling pathways. Our proteomic analysis revealed that, in the presence of cIAP1, TRAF2 could bind proteins found in different subcellular compartments and involved in different cellular processes. The large number of partners found in the screen suggest that many proteins could potentially be substrates of the cIAP1-TRAF2 E3-ubiquitine ligase complex. Among the TRAFs, we found TRAF1, which is known to bind TRAF2 to form a TRAF1:(TRAF2)<sub>2</sub> heterotrimer displaying a higher affinity for cIAP2-BIR1 than the TRAF2 homotrimer [17]. Interestingly, depletion of cIAP1 did not affect TRAF2-TRAF1 interaction. Since the analysis has been performed in unstimulated cells, we did not detect receptors in the screen. As expected,



**Fig. 5 clAP1 and TRAF2 are critical for the activation of the JAK/STAT3 signaling pathways.** **A** Western blot analysis of the proteins involved in the JAK/STAT3 signaling pathway in MEF DKO expressing clAP1, clAP1 $\Delta$ BIR<sup>1</sup> or clAP1 $L^{47A}$ . HSC70 is used as loading control. **B** p-STAT3 was quantified using the Image J software. Mann-Whitney statistical analysis, mean  $\pm$  SD of 3 independent experiments is shown. **C** MEFs were transfected with TRAF2-targeting siRNAs. TRAF2 and STAT3 phosphorylation were analyzed by western blot.  $\beta$ -actin was used as loading control. Sc: scramble siRNA. **D** clAP1-expressing DKO MEFs (DKO-clAP1) were treated for 4 h with 2  $\mu$ M Bay-11-7082, 2  $\mu$ M trametinib, or 2  $\mu$ M niclosamide. Western blot analysis of indicated proteins. HSC70 is used as loading control. **E** RT-qPCR analysis of IL-6 mRNA level in MEFs DKO, DKO-clAP1, and DKO-clAP1 $\Delta$ BIR<sup>1</sup> or DKO-clAP1 treated for 4 h with 2  $\mu$ M Bay-11-7082 or 2  $\mu$ M trametinib. Mann Whitney test. Mean  $\pm$  SD,  $n = 3$ . **F** Western blot analysis of the phosphorylation of STAT3 in DKO and DKO-clAP1 MEFs incubated in the presence of neutralizing anti-IL-6 antibody (100 ng/mL) for 24 h. **G** Correlative analysis of the expression of *IL6* and clAP1-encoding *BIRC2* genes in lung adenocarcinoma (LUAD), breast invasive carcinoma (BRCA), and thyroid carcinoma (THCA) using the publicly available TCGA dataset and gene expression profiling interactive analysis (GEPIA) tools. Western blot analysis of the proteins involved in the JAK2/STAT3 signaling pathway in A549 lung carcinoma cells transfected with siRNAs directed against clAP1 or TRAF2 (**H**) or treated for 6 h with the indicated concentration of the smac mimetic GDC-0152 (**I**). HSC70 was used as loading control.



**Fig. 6** STAT3 signaling pathway is required for clAP1-mediated tumor cell growth. DKO-clAP1 or DKO clAP1<sup>ΔBIR</sup> MEFs (750,000) were subcutaneously injected into nude mice. When the tumor reached 100 mm<sup>3</sup> (indicated by the arrow), mice were daily treated by intraperitoneal injection of vehicle (NT group) or 30 mg/Kg niclosamide (**A, C**) or 1 mg/kg trametinib (**B, D**). Tumor size was measured every two days (**A, C**) or 25–26 days after cell challenge (**B, D**). The results of the statistical analyzes comparing the vehicle with niclosamide or trametinib-treated DKO-clAP1 mice groups are indicated above the graphs while those comparing vehicle with niclosamide or trametinib-treated DKO clAP1<sup>ΔBIR</sup> are indicated below. Mann Whitney test, mean ± SEM (**A, C**) or mean ± SD (**B, D**),  $n = 12–14$ . **E** Clonogenic growth of DKO-clAP1 and DKO-clAP1<sup>ΔBIR</sup> MEFs incubated in the presence of vehicle (0) or indicated concentrations of niclosamide. The Wilcoxon test was used for statistical analysis, Mean ± SD,  $n = 3$ . DKO or clAP1-expressing DKO MEFs were transfected with control (Ctl) or STAT3-directed siRNAs (#1, #2). Western blot analysis of STAT3 (**F**) and cell count 72 h after transfection (**G**). The Wilcoxon test was used for statistical analysis, Mean ± SD,  $n = 3$ .

TRAF2 partners included proteins involved in TNFR-mediated signaling pathways such as NF-κB, MAPK or apoptosis regulation. In accordance with the E3-ubiquitine ligase activity of the clAP1/TRAF2 complex, we also found an enrichment of TRAF2 partners involved in ubiquitination-related processes. Interestingly, we observed a strong enrichment of TRAF2 partners among proteins of signaling networks of the ErbB receptors which are activators of the STAT3 axis. Although an interaction of TRAF2 with ErbB receptors has never been observed, a role for TRAF2 in EGF-mediated tumor growth has been reported [29].

We demonstrated that TRAF2 is required for the oncogenic activities of clAP1 in HRas-V12 expressing cells. The expression of clAP1 appeared altered in a number of human tumor samples and its overexpression has been correlated with advanced progressive disease, aggressiveness and poor prognosis or low response to treatment (for review, see [30]). Its oncogenic properties have been clearly demonstrated in murine models. In 2006, Zender et al. demonstrated that the overexpression of clAP1 facilitated the growth of p53<sup>-/-</sup>, c-myc-expressing hepatocarcinoma cells in

immunodeficient recipient mice. Inversely downregulation of clAPs in hepatocarcinoma cells that display a recurrent amplification at the chromosome region containing clAP1, clAP2, and Yap1-encoding genes (9qA1 amplicon) selectively slowed down tumor growth [5]. Similarly, Ma et al. showed that the down-regulation of clAP1 or clAP2 selectively affected the growth rate of 9A1 amplicon-harboring, p53<sup>-/-</sup> osteosarcoma transplanted into nude mice [6]. In 2010, Cheng et al. demonstrated a high level of expression of clAP1 and clAP2 in mammary carcinoma and that the silencing of clAP1 and/or clAP2 resulted in decreased tumor growth in an orthotopic breast transplantation model [7]. The molecular mechanisms driving these oncogenic activities have not been clearly determined and they probably depend on the oncogenic contexts. The various signaling pathways controlled by clAPs may account for their tumorigenic functions. The ability of clAP1 to regulate NF-κBs, a major pro-survival, oncogenic signaling pathway is undeniably of importance in its transforming potential [13, 31, 32]. The c-myc repressor Mad1 is an ubiquitination target of clAP1 [33, 34]. Thus, the oncogenesis-promoting

activity of c-myc can be amplified by clAP1-mediated downregulation of Mad1. In the present work, we highlighted the importance of the interaction clAP1 with its protein partner TRAF2 in HRas-V12-driven tumorigenesis. Indeed, preventing the interaction with TRAF2 by deletion or mutation of the BIR1 domain completely abolished the oncogenic potential of clAP1.

The role of clAP1-TRAF2 in regulating signaling pathways has been extensively analyzed in the context of stimulation of receptors from the TNFR, IL-R, or PRR families (recently reviewed in a special issue of *Frontiers in Immunology* [35]). Although we cannot rule out that some membrane receptors could be activated by tumor- or host-produced soluble factors in an autocrine or paracrine manner, the oligomerization of TRAF2 by clAP1 or isolated clAP1-BIR1 seems sufficient to stimulate tumor-promoting signaling pathways, independently of the stimulation of receptors. Accordingly, Baud et al. demonstrated that the overexpression of TRAF2 or oligomerization of its amino-terminal domains was sufficient to activate downstream signaling pathways [18]. TRAF2 can directly bind, via its N-terminal half that includes the zing fingers and a N-terminal RING domain, several MAP3Ks including the mixed-lineage protein kinase 3 (MLK3) [36, 37] and ASK1 [38, 39] that drive the activation of SAPK/JNK and p38-MAPK axes, and MEKK1 that induces the activation of downstream SAPK/JNK and NF- $\kappa$ B [18, 40]. The ubiquitin chains conjugated by the clAP1/TRAF2 E3-ubiquitin ligase complex (to RIP1 or via a self-ubiquitination process) are scaffolds for the recruitment of TAK1 and IKK $\gamma$  that lead to MAPK and canonical NF- $\kappa$ B activation [41]. Moreover, clAP1 can control the activation of the RAF-MEK-ERK1/2 cascade by ubiquitinating cRAF [42]. In the present work, we observed that the tumor-promoting activity of clAP1/TRAF2 was associated with an activation of the canonical NF- $\kappa$ B and ERK1/2 whereas JNK and p38MAPK signaling pathways were unaffected or inhibited. More investigations will be required to determine the downstream effectors. Expressing clAP1 induced a decreased in the non-canonical activation of NF- $\kappa$ B, in accordance with its capacity to target NIK to UPS-mediated degradation [21, 43]. The deletion of the BIR1 domain amplified the phenomena. Lee et al. identified an IBM (IAP-binding motif) at the N-terminus of NIK protein sequence [43]. The NIK-IBM is recognized by the BIR2 domain of clAP1 and constitutes a substrate recognition signal for clAP1-mediated ubiquitination and degradation [43]. We may hypothesize that the deletion of BIR1 could improve the accessibility to the BIR2 domain leading to an enhanced recruitment and degradation of NIK.

Last, we demonstrate here that clAP1/TRAF2 promotes the activation of the JAK/STAT3 axis. The activation of this signaling pathway results from an NF- $\kappa$ B-dependent production of IL-6 and autocrine activation of IL-6 signaling pathway. The presence of IL-6 in the tumor environment and hyperactivation of the JAK/STAT3 signaling pathway in cancer cells have been found in different kind of tumors [44]. The analysis of TCGA dataset revealed a positive correlation between clAP1-encoding gene and *IL-6* in lung, breast and thyroid carcinoma. The smac mimetic GDC-0152 as well as downregulation of clAP1 or TRAF2 were able to decrease the activation of STAT3 in A549 lung carcinoma cells suggesting that clAP1/TRAF2 could account for the activation of STAT3 in these cells. Interestingly, we show here that inhibition of STAT3 by niclosamide completely abrogated the tumor growth advantage given by expressing clAP1 demonstrating that the activation of the STAT3 axis is required for the tumor-promoting activity of clAP1.

The current model supports that TRAF2 acts solely as an adaptor protein recruiting the clAP1/clAP2 E3-ligase in the receptor-associated complex. Our work demonstrates that (i) oligomerisation of TRAF2 is sufficient to stimulate pro-tumoral signaling pathways, (ii) TRAF2 is a critical regulator of the oncogenic activity of clAP1 and (iii) clAP1 is essential for TRAF2' capacity to bind signaling molecules, independently of receptor activation. The clAP1-encoding *BIRC2* gene as well as *TRAF2* are found recurrently amplified in human epithelial cancers [30, 45]. IAPs constitute

promising target for anticancer therapy and a number of IAP antagonists have been developed and are currently under clinical investigation [30]. Most of them are Smac mimetics that block the anti-apoptotic activity of XIAP and induce the degradation of clAP1 and, in some cases, other members of the IAP family. Considering our results, it could be interesting to develop molecules able to inhibit the oligomerisation of TRAF2 or the clAP1-TRAF2 interaction.

## MATERIALS AND METHODS

### Cell culture and treatments

SV40 immortalized wt, clAP1<sup>-/-</sup> (single Knock out, SKO) and clAP1<sup>-/-</sup>/clAP2<sup>-/-</sup> (double KO, DKO) mouse embryonic fibroblasts (MEFs) (J. Silke & D. Vaux, Melbourne, Australia), A549 human lung carcinoma cell line, HeLa cervical carcinoma cell line and Phoenix-Eco 293 T cells (Invitrogen, Carlsbad, USA) were cultured in DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, Dominique Dutscher, Brumath, France) high glucose medium supplemented with 10% fetal bovine serum (Dominique Dutscher) at 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> environment. MEFs were transformed by HRas-V12 as previously described [11]. MEFs were treated with 1-2  $\mu$ M niclosamide, 2  $\mu$ M Bay-11-7082, 2  $\mu$ M Trametinib (Euromedex, Souffelweyersheim, France) or 100 ng/mL anti-IL-6 neutralizing antibody (Invivogen, San Diego, USA). GDC0152 (Euromedex) was used at 1 to 5  $\mu$ M.

### Plasmid constructs, siRNAs, cell transfection, and viral transduction

Plasmids used were: pMSCV-control, pMSCV-clAP1, pMSCV-clAP1ΔBIR1, pMSCV-clAP1ΔBIR2, pMSCV-clAP1-L47A, pMSCV-iBIR1 (clAP1). Cells were transfected using Jet PEI transfection reagent (Polyplus transfection, Ozyme, France) for plasmids or Lipofectamine® RNAimax (Thermofisher Scientific, Waltham, USA) for siRNAs against human clAP1 (#SI02654442), human TRAF2 (#SI00129619), mouse TRAF2 (#SI01454544) or human STAT3 (#1: SI01435294 and #2: SI01435287) from Qiagen (Hilden, Germany).-Phoenix-Eco 293 T cells used for viral production were transfected using Jet PEI. For the infection of MEFs, retrovirus-containing supernatant was supplemented with 1  $\mu$ g/mL of polybrene (Sigma-Aldrich, St-Louis, USA). Cells were selected with 2.8  $\mu$ g/mL of puromycin.

### In vivo experiments

Nude (NMRI-Foxn1nu/Foxn1nu) mice (Charles River Laboratories, Saint-Germain-Nuelles, France) (female between 6 and 8 weeks old) were housed in pathogen free conditions in zootechny center (certification no. C2146404EA). All studies were approved by the Ethics Committee for Animal Welfare of the University of Burgundy and the French Ministry of Higher Education and Research (APAFIS#5438-201611301622214). For subcutaneous tumors, mice were randomized and inoculated subcutaneously with 500,000 or 750,000 HRas-V12-transformed MEFs. When the tumors reached 100 mm<sup>3</sup>, mice were allocated into experimental groups so that the mean $\pm$  SD was equivalent in each of the groups and daily treated intraperitoneally with niclosamide (30 mg/Kg), trametinib (1 mg/kg) or vehicle. Tumor volume was measured with calipers and calculated as proposed by Laval University (Québec, Canada): (4/3)\*3.14159\*(length/2)<sup>2</sup> \*(width/2)<sup>2</sup>. For artificial metastasis model, HRas-V12-transformed MEFs were injected into the tail vein ( $10^6$ ) in a volume of 100  $\mu$ L. Mice were sacrificed 36 days after intravenous injection of the cells. Lung nodes were counted by macroscopic analysis. The experiments were performed at least twice  $n=6-10$  per group. Statistical analyses were performed using the Mann-Whitney test.

### Cell extracts, subcellular fractionation, immunoprecipitation and Western Blot

Cells were washed in cold 1X DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffer Saline, Dominique Dutscher, Brumath, France) and lysed in RIPA buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.0; 150 mM NaCl; 1% NP-40; 0.5% Sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 1 mM sodium orthovanadate, 1 mM PMSF) supplemented with a proteases inhibitor cocktail (PIC, Sigma-Aldrich, St-Louis, USA) and phosphatase inhibitor cocktail PhosSTOP® (Merck, Darmstadt, Germany). The subcellular fractionation was performed by lysing cells in 10 mM Hepes, 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 1 mM DTT (DiThioThreitol) for 15 min on ice. NP-40 (0.6% final) was added to the lysate which then subjected to centrifugation at 1200 g for 5 min at 4 °C. The supernatant containing the cytoplasmic fraction was collected. The pellet was lysed in

100 µL of 50 mM Tris-HCl pH8.0, 150 mM NaCl, 1%NP-40 for 15 min on ice. The solution was centrifuged at 16,000 g for 15 min at 4 °C and the supernatant containing the nuclear fraction is collected. Proteins were quantified using the Precision Red Advanced Protein Assay ADV02 kit (Cytoskeleton, Denver, USA).

For Immunoprecipitation, cells were lysed in IP buffer (50 mM Tris HCl pH7.4, 150 mM NaCl, 20 mM EDTA, 0.5% NP-40, Protease inhibitor cocktail 1X). Cell lysates were incubated with anti-TRAF2 (#ab126758, Abcam, Cambridge, UK) antibodies overnight at 4 °C. The lysates were then incubated 2 h with G Sepharose beads (Merk-Millipore, Fontenay-sous-bois, France). Proteins were eluted by heating the mix to 95 °C for 10 min in 1X Laemmli buffer (Tris-HCl 150 mM pH 6.8; β-mercaptoethanol 15%; SDS 6%; glycerol 30%; Bromophenol blue). For the Western blot analysis, proteins were separated on SDS-PAGE and electro-transferred onto polyvinylidene difluoride or nitrocellulose membranes (GE Healthcare, Dominique Dutscher, Brumath, France). Blots were probed with the following antibodies: anti-clAP1 (#AF8181, R&D systems, Minneapolis, USA) and anti-pan-clAPs (#MAB3400, R&D systems, Minneapolis, USA), anti-TRAF2 (#ADI-AAP-422, Enzo Life Sciences, Villeurbanne, France), anti-RIP1 (#610459, BD biosciences, USA), anti-IκBα (#4812S), anti-p-IκBα (S32, #2859S), anti-ERK1/2 (#4695T), anti-p-ERK1/2 (Y202/204, #4370T), anti-JNK (#9252T), anti-p-JNK (T183/Y185, #81E11), anti-p38 (#D13E1), anti-p-p38 (T180/Y182, #D3F9), anti-STAT3 (#D3Z2G), anti-p-STAT3 (Y705, #D3A7), anti-JAK2 (#D2E12) and anti-p-JAK2 (Y1008, #D4A8) and anti-p100/p52 NFκB (#4882) from Cell signaling technologies (Danvers, USA), anti-HSC70 (sc-7298, Santa Cruz Biotechnology Inc, Dallas, USA) and anti-β-actin (#MA1-140 Invitrogen, Waltham, USA), Anti-XIAP (AF8221, R&D systems) and anti-Ras (sc-520, Santa cruz Technology Inc). Detection was performed using peroxidase-conjugated secondary antibodies and chemiluminescence detection kit (Clarity™ or Clarity Max™ western ECL substrate, Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France). GST-pull-down assays were performed as previously described [11].

**Immunofluorescence.** Cells were washed in cold 1X DPBS and fixed for 10 min in 4% paraformaldehyde/PBS, permeabilized using 0.1% triton X-100 (10 min), and saturated for 20 min in PBS with 1% bovine serum albumin and 1% of fetal bovine serum. Samples were incubated overnight at 4 °C in PBS-1%BSA with primary antibodies anti-GM130 (#610823, BD Bioscience), anti-Caveolin-1 (#MA3-600, Invitrogen), anti-LAMP-1 (#ab25245, Abcam) or anti-PDI (#3501, Cell Signaling), washed and incubated with secondary antibodies goat anti-rat Alexa568, goat anti-mouse alexa568 or donkey anti-rabbit Alesa568 (Invitrogen) diluted in PBS-1%BSA at room temperature for 1 h. Samples were then incubated with Alexa488 labeled anti-TRAF2 antibody (Abcam ab198971) diluted in PBS-1%BSA overnight at 4 °C. Samples were washed for 10 min three times, then mounted using ProLong™ Gold Antifade Mountant with DAPI (Thermofisher Scientific, Waltham, USA). Sample images were acquired using an Axio Imager 2 using an Apotome.2 module, HXP 120C illumination, Axiocam MRm using a 64×1.4NA objective.

**RNA extraction and RT-qPCR.** Total RNA of MEF DKO expressing or not clAP1 or its mutants were extracted with Trizol reagent (TRizol Reagent®, Invitrogen) according to manufacturer's protocol. Tumors from *in vivo* experiments were crushed in 1 mL of Trizol to extract their RNA. cDNA was produced from 1 µg of RNA with iScript cDNA synthesis kit (Biorad, Hercules, USA). Quantitative real-time PCR was performed with ViiA 7 Real-Time PCR System (Applied Biosystem, ThermoFisher Scientific, Waltham, USA) using Master Mix Applied Biosystems™ PowerUp™ SYBR™ Green (Thermofisher Scientific, Waltham, USA) and the following primers: β-Actin Forward: CGG-TTC-CGAT-GCC-CTG-AGG-CTC-TT, Reverse: CGT-CAC-ACCTCA-TGA-TGG-AAT-TGA; IL-6 (Interleukine 6) Forward: TGA-TGC-ACT-TGC-AGA-AAA-CA, Reverse: ACC-AGA-GGA-AAT-TTT-CAA-TAG-GC.

For the qPCR microarray, cDNA from MEF DKO-clAP1 and MEF DKO-clAP1ΔBIR1 RNA were analyzed using Qiagen NF-κB Signaling Pathway RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array according to manufacturer's protocol.

**Clonogenic assay.** Five thousand MEFs were seeded in soft-agar medium for 3 weeks at 37 °C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. They were treated with 1–2 µM Niclosamide before plating. Colony number and size were analyzed under microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany), and images were taken using AxioVision software.

**Cristal violet assay.** One hundred thousand were plated in 6-wells plate. Seventy-two hours later, cells were fixed and stained with a 0.5% Crystal violet in methanol solution. Crystal violet was eluted with 37% acetic acid,

and the OD at 620 nm was measured with a UVM 340 plate reader (Biochrom, Cambronne, UK).

**Mass-spectrometry.** A549 cells were treated or not with 5 µM of GDC-0152 for 6 h. TRAF2 was immunoprecipitated and eluted. ESI-TRAP mass spectrometry was performed by the CLIPP platform as described previously [46] Data were analyzed with FunRich software, version 3.1.3 (Functional enrichment analysis tool) [47], using the human Uniprot or FunRich database.

## Statistical analysis

The correlation analysis of the clAP1, IL-6, and TNF-α expression in tumor samples was done using the publicly available TCGA dataset using gene expression profiling interactive analysis (GEPIA), using the Pearson Correlation Coefficient. The non-parametric Mann-Whitney test was used for the analysis of tumor growth in animals and RT-qPCR and Wilcoxon test for clonogenic and western blot analyses.

## DATA AVAILABILITY

Figshare <https://doi.org/10.6084/m9.figshare.21399906>.

## REFERENCES

1. Rothe M, Pan MG, Henzel WJ, Ayres TM, Goeddel DV. The TNFR2-TRAF signaling complex contains two novel proteins related to baculoviral inhibitor of apoptosis proteins. *Cell*. 1995;83:1243–52.
2. Hrdinka M, Yabal M. Inhibitor of apoptosis proteins in human health and disease. *Genes Immun*. 2019;20:641–50.
3. Dumetier B, Zadoroznyj A, Dubrez L. IAP-mediated protein ubiquitination in regulating cell signaling. *Cells*. 2020;9:1118.
4. Zadoroznyj A, Dubrez L. Cytoplasmic and nuclear functions of clAP1. *Biomolecules*. 2022;12:322.
5. Zender L, Spector MS, Xue W, Flemming P, Cordon-Cardo C, Silke J, et al. Identification and validation of oncogenes in liver cancer using an integrative oncogenomic approach. *Cell*. 2006;125:1253–67.
6. Ma O, Cai WW, Zender L, Dayaram T, Shen J, Herron AJ, et al. MMP13, Birc2 (clAP1), and Birc3 (clAP2), amplified on chromosome 9, collaborate with p53 deficiency in mouse osteosarcoma progression. *Cancer Res*. 2009;69:2559–67.
7. Cheng L, Zhou Z, Flesken-Nikitin A, Toshkov IA, Wang W, Camps J, et al. Rb inactivation accelerates neoplastic growth and substitutes for recurrent amplification of clAP1, clAP2, and Yap1 in sporadic mammary carcinoma associated with p53 deficiency. *Oncogene*. 2010;29:5700–11.
8. Jin J, Xiao Y, Hu H, Zou Q, Li Y, Gao Y, et al. Proinflammatory TLR signalling is regulated by a TRAF2-dependent proteolysis mechanism in macrophages. *Nat Commun*. 2015;6:5930.
9. Yin Q, Lamothe B, Damay BG, Wu H. Structural basis for the lack of E2 interaction in the RING domain of TRAF2. *Biochemistry*. 2009;48:10558–67.
10. Dhillon B, Aleithan F, Abdul-Sater Z, Abdul-Sater AA. The evolving role of TRAFs in mediating inflammatory responses. *Front Immunol*. 2019;10:104.
11. Marivin A, Berthelet J, Cartier J, Paul C, Gemble S, Morizot A, et al. clAP1 regulates TNF-mediated cdc42 activation and filopodia formation. *Oncogene*. 2014;33:5534–45.
12. Vischioni B, Giaccone G, Span SW, Kruyt FA, Rodriguez JA. Nuclear shuttling and TRAF2-mediated retention in the cytoplasm regulate the subcellular localization of clAP1 and clAP2. *Exp Cell Res*. 2004;298:535–48.
13. Zhou AY, Shen RR, Kim E, Lock YJ, Xu M, Chen ZJ, et al. IKKepsilon-mediated tumorigenesis requires K63-linked polyubiquitinylation by a clAP1/clAP2/TRAF2 E3 ubiquitin ligase complex. *Cell Rep*. 2013;3:724–33.
14. Dupoux A, Cartier J, Cathelin S, Filomenko R, Solary E, Dubrez-Daloz L. clAP1-dependent TRAF2 degradation regulates the differentiation of monocytes into macrophages and their response to CD40 ligand. *Blood*. 2009;113:175–85.
15. Kreckel J, Anany MA, Siegmund D, Wajant H. TRAF2 controls death receptor-induced Caspase-8 processing and facilitates proinflammatory signaling. *Front Immunol*. 2019;10:2024.
16. Mace PD, Smits C, Vaux DL, Silke J, Day CL. Asymmetric recruitment of clAPs by TRAF2. *J Mol Biol*. 2010;400:8–15.
17. Zheng C, Kabaleeswaran V, Wang Y, Cheng G, Wu H. Crystal structures of the TRAF2: clAP2 and the TRAF1: TRAF2: clAP2 complexes: affinity, specificity, and regulation. *Mol Cell*. 2010;38:101–13.
18. Baud V, Liu ZG, Bennett B, Suzuki N, Xia Y, Karin M. Signaling by proinflammatory cytokines: oligomerization of TRAF2 and TRAF6 is sufficient for JNK and IKK activation and target gene induction via an amino-terminal effector domain. *Genes Dev*. 1999;13:1297–308.

19. Tang Z, Li C, Kang B, Gao G, Zhang Z. GEPIA: a web server for cancer and normal gene expression profiling and interactive analyses. *Nucleic Acids Res.* 2017;45:W98–102.
20. Csomos RA, Brady GF, Duckett CS. Enhanced cytoprotective effects of the inhibitor of apoptosis protein cellular IAP1 through stabilization with TRAF2. *J Biol Chem.* 2009;284:20531–9.
21. Vallabhapurapu S, Matsuzawa A, Zhang W, Tseng PH, Keats JJ, Wang H, et al. Nonredundant and complementary functions of TRAF2 and TRAF3 in a ubiquitination cascade that activates NIK-dependent alternative NF-κappaB signaling. *Nat Immunol.* 2008;9:1364–70.
22. Li X, Yang Y, Ashwell JD. TNF-RII and c-IAP1 mediate ubiquitination and degradation of TRAF2. *Nature* 2002;416:345–7.
23. Matsuzawa A, Tseng PH, Vallabhapurapu S, Luo JL, Zhang W, Wang H, et al. Essential cytoplasmic translocation of a cytokine receptor-assembled signaling complex. *Science* 2008;321:663–8.
24. Shu HB, Takeuchi M, Goeddel DV. The tumor necrosis factor receptor 2 signal transducers TRAF2 and c-IAP1 are components of the tumor necrosis factor receptor 1 signaling complex. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996;93:13973–8.
25. Borghi A, Verstrepen L, Beyaert R. TRAF2 multitasking in TNF receptor-induced signaling to NF-κB, MAP kinases and cell death. *Biochem Pharm.* 2016;116:1–10.
26. Ceccarelli A, Di Venere A, Nicolai E, De Luca A, Minicozzi V, Rosato N, et al. TNFR-associated Factor-2 (TRAF2): Not only a trimer. *Biochemistry* 2015;54:6153–61.
27. Ye H, Park YC, Kreishman M, Kieff E, Wu H. The structural basis for the recognition of diverse receptor sequences by TRAF2. *Mol Cell.* 1999;4:321–30.
28. Park HH. Structure of TRAF family: Current understanding of receptor recognition. *Front Immunol.* 2018;9:1999.
29. Peng C, Zhu F, Wen W, Yao K, Li S, Zykova T, et al. Tumor necrosis factor receptor-associated factor family protein 2 is a key mediator of the epidermal growth factor-induced ribosomal S6 kinase 2/cAMP-responsive element-binding protein/Fos protein signaling pathway. *J Biol Chem.* 2012;287:25881–92.
30. Dubrez L, Berthelet J, Glorian V. IAP proteins as targets for drug development in oncology. *OncoTargets Ther.* 2013;9:1285–304.
31. Park MH, Hong JT. Roles of NF-κB in cancer and inflammatory diseases and their therapeutic approaches. *Cells* 2016;5:15.
32. Vu NT, Park MA, Shultz MD, Bulut GB, Ladd AC, Chalfant CE. Caspase-9b interacts directly with cIAP1 to drive agonist-independent activation of NF-κB and lung tumorigenesis. *Cancer Res.* 2016;76:2977–89.
33. Xu L, Zhu J, Hu X, Zhu H, Kim HT, LaBaer J, et al. c-IAP1 cooperates with Myc by acting as a ubiquitin ligase for Mad1. *Mol Cell.* 2007;28:914–22.
34. Li H, Fang Y, Niu C, Cao H, Mi T, Zhu H, et al. Inhibition of cIAP1 as a strategy for targeting c-MYC-driven oncogenic activity. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2018;115:E9317–24.
35. Bishop GA, Abdul-Sater AA, Watts TH. Editorial: TRAF proteins in health and disease. *Front Immunol.* 2019;10:326.
36. Sondarva G, Kundu CN, Mehrotra S, Mishra R, Rangasamy V, Sathyaranayana P, et al. TRAF2-MLK3 interaction is essential for TNF-alpha-induced MLK3 activation. *Cell Res.* 2010;20:89–98.
37. Korchnak AC, Zhan Y, Aguilar MT, Chadee DN. Cytokine-induced activation of mixed lineage kinase 3 requires TRAF2 and TRAF6. *Cell Signal.* 2009;21:1620–5.
38. Zhao Y, Conze DB, Hanover JA, Ashwell JD. Tumor necrosis factor receptor 2 signaling induces selective c-IAP1-dependent ASK1 ubiquitination and terminates mitogen-activated protein kinase signaling. *J Biol Chem.* 2007;282:7777–82.
39. Nishitoh H, Saitoh M, Mochida Y, Takeda K, Nakano H, Rothe M, et al. ASK1 is essential for JNK/SAPK activation by TRAF2. *Mol Cell.* 1998;2:389–95.
40. Chadee DN, Yuasa T, Kyriakis JM. Direct activation of mitogen-activated protein kinase kinase kinase MEKK1 by the Ste20p homologue GCK and the adapter protein TRAF2. *Mol Cell Biol.* 2002;22:737–49.
41. Annibaldi A, Meier P. Checkpoints in TNF-induced cell death: implications in inflammation and cancer. *Trends Mol Med.* 2018;24:49–65.
42. Dogan T, Harms GS, Hekman M, Karreman C, Oberoi TK, Alnemri ES, et al. X-linked and cellular IAPs modulate the stability of C-RAF kinase and cell motility. *Nat Cell Biol.* 2008;10:1447–55.
43. Zamegar BJ, Wang Y, Mahoney DJ, Dempsey PW, Cheung HH, He J, et al. Non-canonical NF-κappaB activation requires coordinated assembly of a regulatory complex of the adaptors cIAP1, cIAP2, TRAF2, and TRAF3 and the kinase NIK. *Nat Immunol.* 2008;9:1371–8.
44. Johnson DE, O'Keefe RA, Grandis JR. Targeting the IL-6/JAK/STAT3 signalling axis in cancer. *Nat Rev Clin Oncol.* 2018;15:234–48.
45. Zhu S, Jin J, Gokhale S, Lu AM, Shan H, Feng J, et al. Genetic alterations of TRAF proteins in human cancers. *Front Immunol.* 2018;9:2111.
46. Didelot C, Lanneau D, Brunet M, Bouchot A, Cartier J, Jacquel A, et al. Interaction of heat-shock protein 90 beta isoform (HSP90 β) with cellular inhibitor of apoptosis 1 (c-IAP1) is required for cell differentiation. *Cell Death Differ.* 2008;15:859–66.
47. Pathan M, Keerthikumar S, Ang CS, Gangoda L, Quek CY, Williamson NA, et al. FunRich: An open access standalone functional enrichment and interaction network analysis tool. *Proteomics* 2015;15:2597–601.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Pauline Maes from the CLIPP proteomic platform, University of Burgundy, Philippe Hammann from the Strasbourg proteomic platform, IBMC, Valérie Saint-Gorgio from zootechny center, University of Burgundy, and Romain Aucagne from the Crigen platform, University of Burgundy. This work was supported by grants from the 'Comités de Côte d'Or et de l'Yonne' of the 'Ligue Contre le Cancer' (LD), La Ligue Nationale contre le Cancer (CG's team), the European Union and the 'Conseil Régional de Bourgogne', a French Government grant managed by the French National Research Agency under the program 'Investissements d'Avenir' with reference ANR-11-LABX-0021, and fellowships from the 'Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche' of France (to BD, AZ, JB and JA), the 'Fondation ARC pour la Recherche sur le Cancer' (to BD). We thank the FEDER for their financial support.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

BD and AZ performed most of the experiments and analyzed the data. JB initiated the project, established the tumor model, and performed some *in vivo* experiments. SC performed immunofluorescence analysis. JA, PB, and FC helped in performing western blots, clonogenicity assays, and *in vivo* experiments. CR and CP brought expertise in *in vivo* model and performed IV injection. CG provided scientific expertise and corrected the paper and LD conceived and supervised the project, conducted the GEPIA analysis, analyzed the data and interpreted the results, wrote the paper with input from all authors.

## COMPETING INTERESTS

The authors declare no competing interests.

## ADDITIONAL INFORMATION

**Supplementary information** The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41388-022-02544-y>.

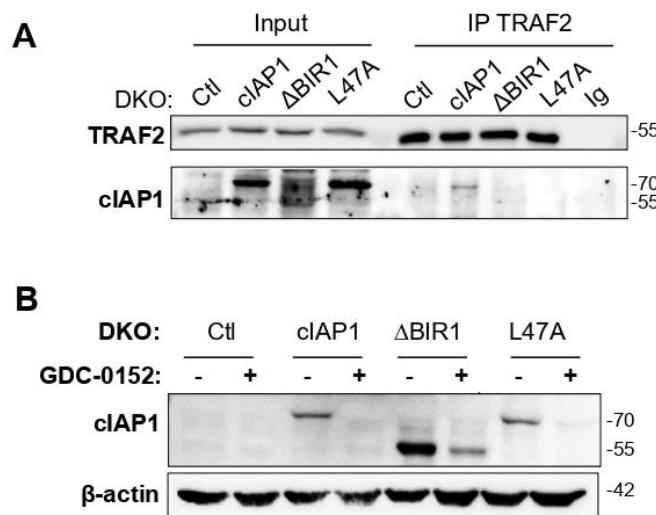
**Correspondence** and requests for materials should be addressed to Laurence Dubrez.

**Reprints and permission information** is available at <http://www.nature.com/reprints>

**Publisher's note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

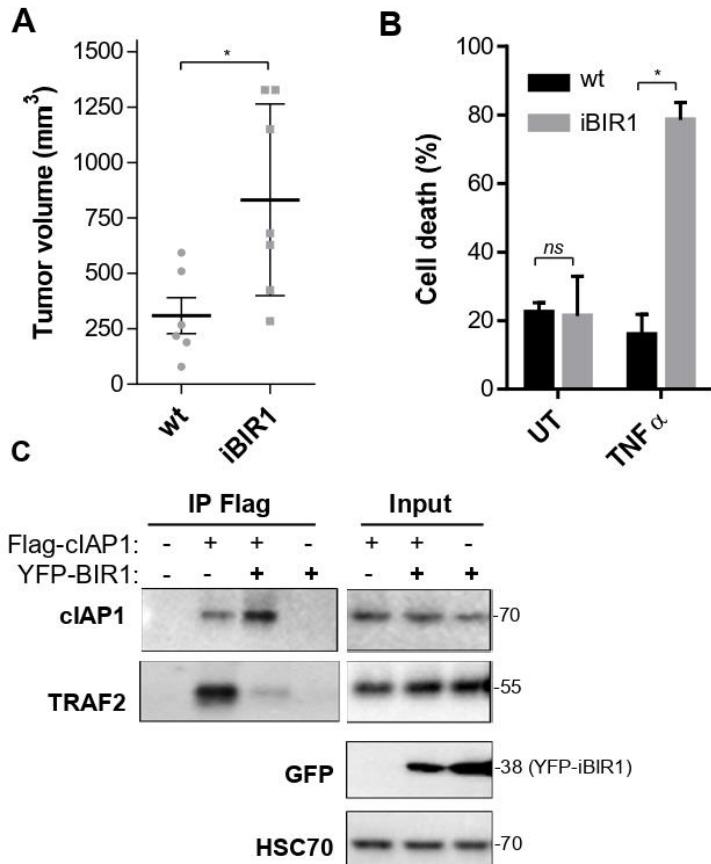
Springer Nature or its licensor (e.g. a society or other partner) holds exclusive rights to this article under a publishing agreement with the author(s) or other rightsholder(s); author self-archiving of the accepted manuscript version of this article is solely governed by the terms of such publishing agreement and applicable law.

## Figure S1



**Figure S1. Deletion or mutation of the BIR1 did not alter E3-ubiquitin ligase activity of clAP1.** **A.** Hras-V12-transformed DKO MEFs were restored with clAP1 or clAP1 mutants. TRAF2 was immunoprecipitated and clAP1 and TRAF2 were analyzed by western blot. **B.** Hras-V12-transformed DKO MEFs expressing or not several clAP1 mutants were incubated in the presence of 5 μM for 24hrs of the smac mimetic GDC-0152. The level of clAP1 and its mutants was analyzed by Western Blot.

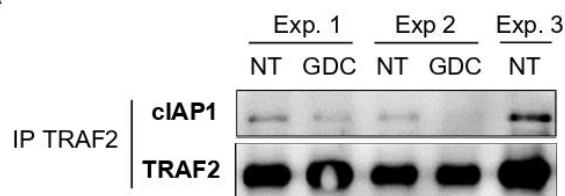
**Figure S2**



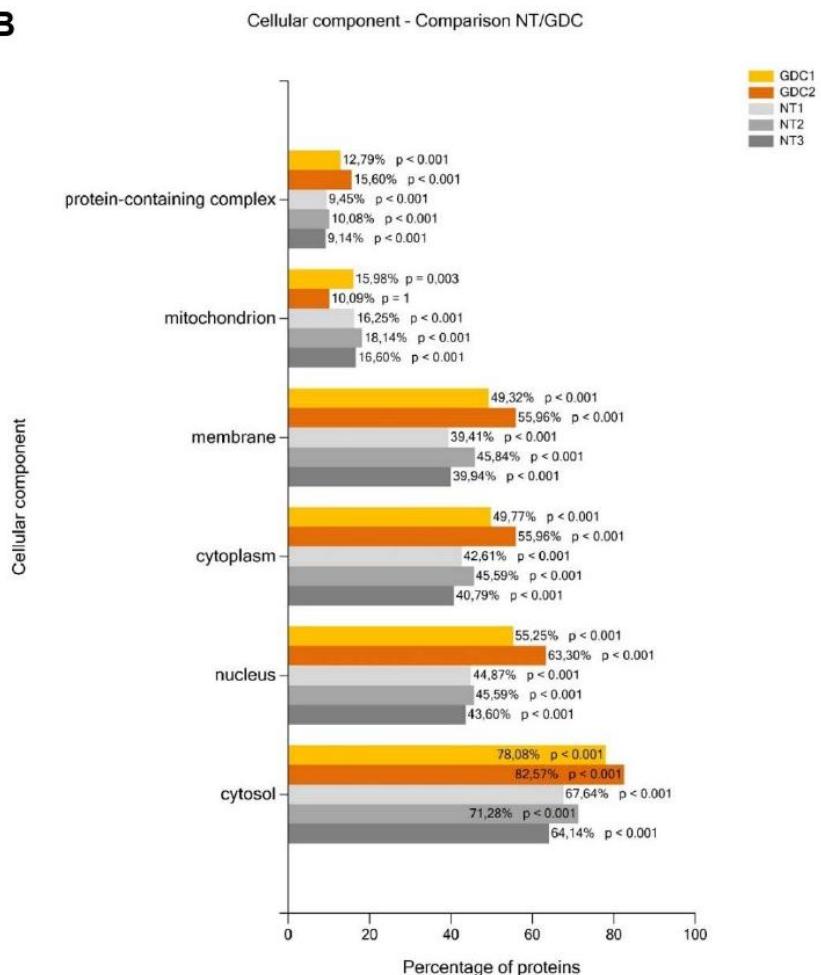
**Figure S2.** Forced clustering of TRAF2 stimulated tumor growth. **A.** 250 000 HRas-V12-transformed MEFs wild-type (wt) expressing or not the isolated BIR1 of cIAP1 (iBIR1) were injected in nude mice. Tumor volume 30 days after injection is represented. Statistical analysis was performed using the Mann Whitney test. Mean +/- SEM, n=8. **B.** MEFs wt expressing or not iBIR1 were treated with 25 ng/ml TNF $\alpha$  for 18 hrs and cell viability was analyzed. The Wilcoxon test was used for the statistical analysis. Mean  $\pm$  SD, n=3. **C.** HeLa cells were either transfected with vector expressing Flag-cIAP1 or co-transfected with vectors expressing Flag-cIAP1 and YFP-iBIR1. Flag-cIAP1 was immunoprecipitated and its interaction with TRAF2 was analyzed by Western Blot.

### Figure S3

**A**

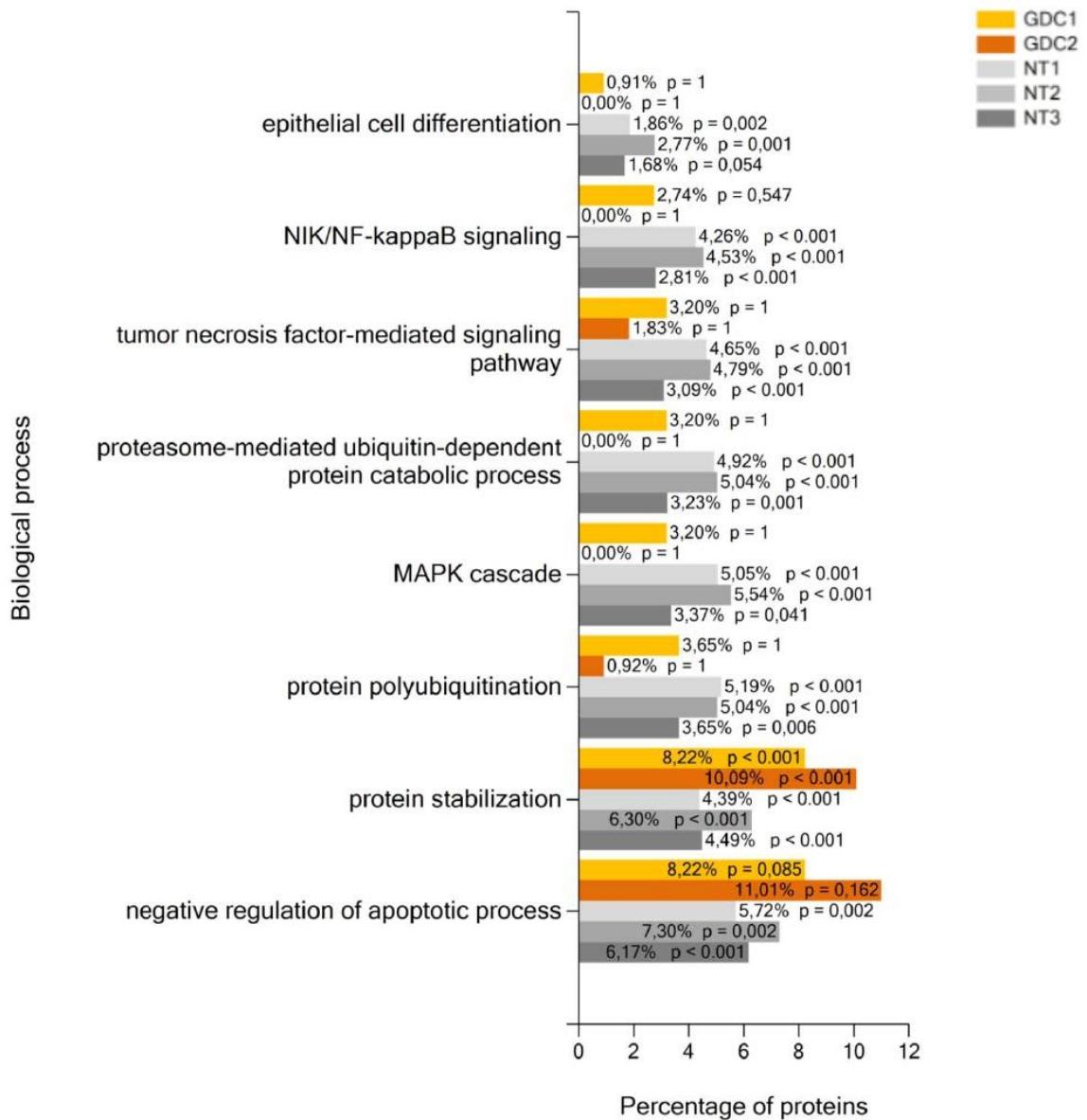


**B**



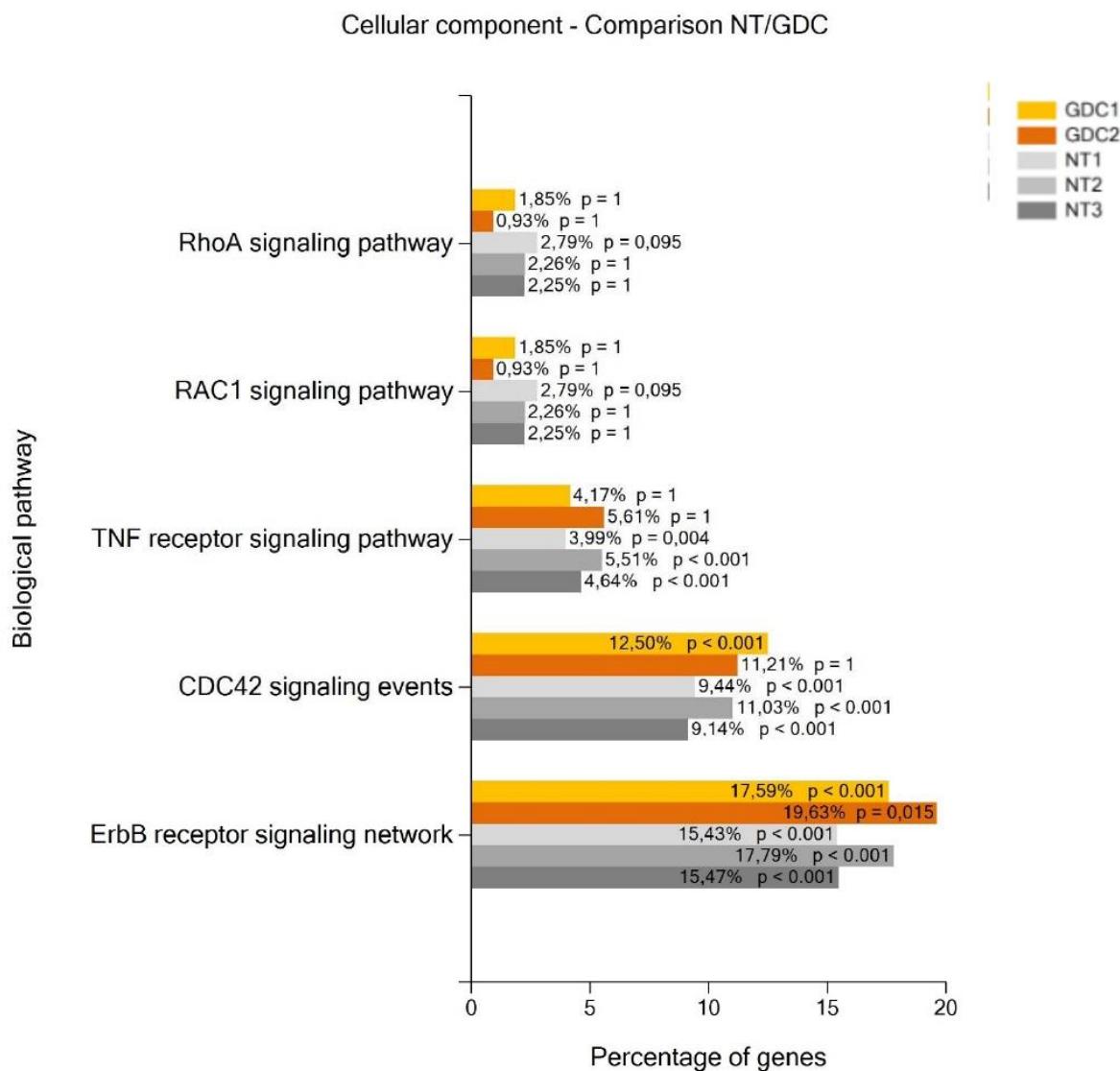
**Figure S3. Influence of cIAP1 on TRAF2 protein interaction profile.** A549 cells were treated with vehicle (NT) or 5  $\mu$ M GDC-0152 (GDC) for 6 hours. TRAF2 was immunoprecipitated and its interactome was analyzed by ESI-TRAP mass spectrometry. A. Western blot analysis of cIAP1 and TRAF2 in immunoprecipitated sample. B. Enrichment analysis of TRAF2 partners in subcellular compartments using the functional enrichment analysis tool (FunRich) and UniProt database. The significant enrichment is shown.

**Figure S4**



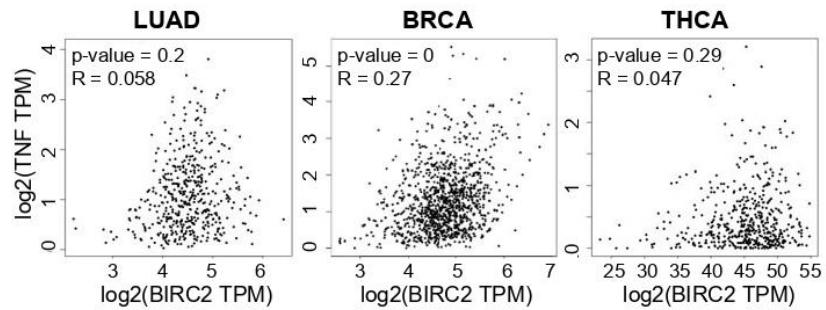
**Figure S4. Influence of cIAP1 on TRAF2 protein interaction profile.** A549 cells were treated with 5µM of GDC-0152 (GDC) or corresponding solvent (NT) for 6 hours. TRAF2 was immunoprecipitated and its interactome was analyzed by ESI-TRAP mass spectrometry. Enrichment analysis of TRAF2 partners in biological processes using the functional enrichment analysis tool (FunRich) and UniProt database. The significant enrichment is shown.

**Figure S5**



**Figure S5. Analysis of the enrichment of TRAF2 partners in ErbB receptor- and RHO-GTPase-mediated signaling pathways.** A549 cells were treated with 5 µM GDC-0152 (GDC) for 6 hours. TRAF2 was immunoprecipitated and its interactome was analyzed by ESI-TRAP mass spectrometry. The analysis was performed using the functional enrichment analysis tool (FunRich) and FunRich database. The significant enrichment is shown. NT: cells treated with vehicle.

## **Figure S6**



**Figure S6.** Correlation analysis between *TNF* and ciAP1-encoding *BIRC2* gene expression in lung adenocarcinoma (LUAD), Breast invasive carcinoma (BRCA) and Thyroid carcinoma (THCA), using the publicly available TCGA dataset using the gene expression profiling interactive analysis (GEPIA (<http://gepia.cancer-pku.cn>)).

## **Supplementary Materials & Methods**

### Cell culture, transfection and treatment:

HeLa cervical carcinoma cell line (Invitrogen, Carlsbad, USA) and HRas-V12-transformed MEFs wt were cultured in DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, Dominique Dutscher, Brumath, France) high glucose medium supplemented with 10% fetal bovine serum (Dominique Dutscher, Brumath, France) at 37°C, 5% CO<sub>2</sub> environment. MEFs wt Hela cells were transfected using Jet PEI transfection reagent (Polyplus transfection, Ozyme, France) with pCR3-FLAG-clAP1, pEYFP-BIR1 vectors. MEFs were treated with 25ng/mL TNFα (R&D systems, Minneapolis, USA).

### In vivo experiments:

HRas-V12-transformed MEFs wt were injected subcutaneously (250 000) in a volume of 100µL in nude (NMRI-Foxn1nu/Foxn1nu) mice (Charles River Laboratories, Saint-Germain-Nuelles, France). Tumor volume was measured with calipers and calculated as proposed by Laval University (Québec, Canada): (4/3)\*3.14159\*(length/2)\*(width/2)<sup>2</sup>. The experiments were performed at least twice n=6-10 per group.

### Flag immunoprecipitation:

For FLAG-clAP1 immunoprecipitation, cell lysates were incubated 2 hours with ANTI-FLAG® M2 Affinity Gel (A2220, Merk-Millipore). Proteins were eluted by heating the mix to 95°C for 10 minutes in 1X Laemmli buffer (Tris-HCl 150 mM pH 6,8 ; β-mercaptoethanol 15 %; SDS 6 %; glycerol 30 %; Bromophenol blue).

## II. Discussion sur les propriétés oncogéniques de cIAP1 et TRAF2

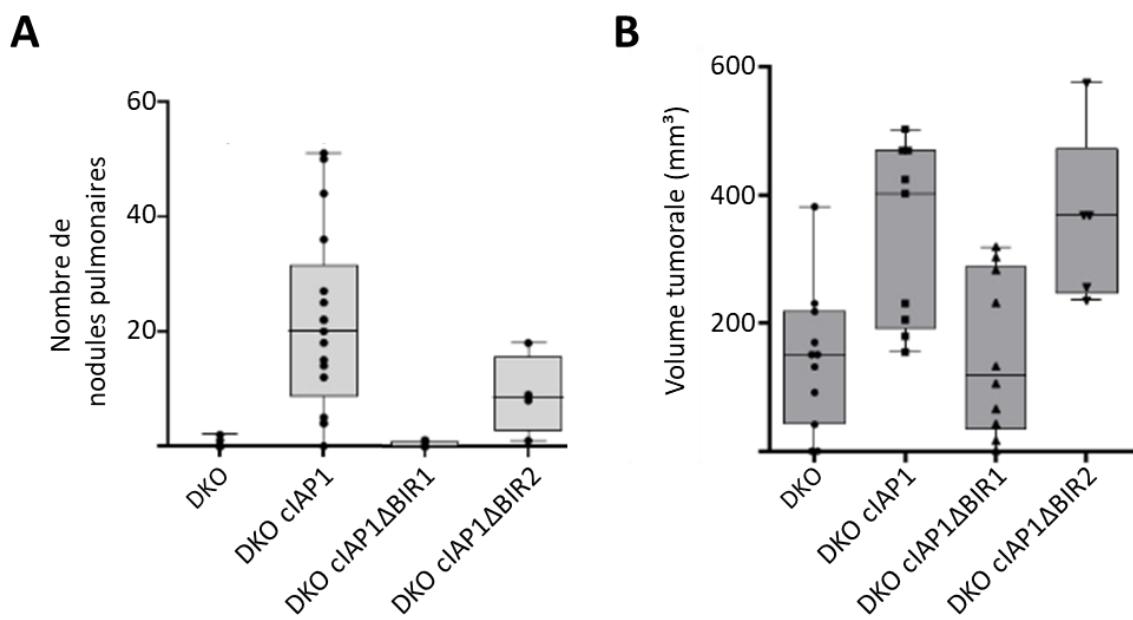
### A. Les mécanismes des propriétés oncogéniques de cIAP1

Nos résultats démontrent pour la première fois un rôle de l'interaction entre cIAP1 et TRAF2 dans les propriétés oncogéniques de cIAP1. En effet, la déplétion de cIAP1 et cIAP2 dans un modèle de MEF diminue la croissance tumorale, alors que la restauration de cIAP1 rétablit celle-ci. En revanche, l'expression d'une protéine cIAP1 incapable d'interagir avec TRAF2 inhibe cet effet. cIAP1 et TRAF2 sont associées dans la régulation de nombreuses voies de signalisation, présentées dans la partie [IV](#) de l'introduction. Leur association est très souvent impliquée dans l'activation de la voie NF-κB, menant à des processus de survie et de prolifération cellulaire. De nombreux cancers présentent une activation constitutive aberrante de NF-κB. De plus, l'implication de NF-κB dans le développement de cette pathologie et dans la résistance aux traitements anti-cancéreux a été largement démontrée (Rasmi, Sakthivel et Guruvayoorappan, 2020). Il n'est donc pas étonnant que le binôme cIAP1/TRAF2 présente une activité oncogénique.

Des propriétés oncogéniques de cIAP1 ont clairement été démontrées chez la souris. En 2006, Zender *et al.* ont associé ces propriétés à une potentielle coopération entre c-Myc et cIAP1. L'analyse de la croissance tumorale d'hépatoblastes p53<sup>-/-</sup> exprimant c-Myc a démontré une diminution de la croissance tumorale lorsque cIAP1 ou YAP sont déplétées par un shARN. À l'inverse, une surexpression de cIAP1 ou YAP accélère la croissance tumorale (Zender *et al.*, 2006). Ces résultats ont été confortés par l'étude de Xu *et al.* Ces derniers ont démontré que cIAP1 pouvait stimuler la prolifération cellulaire dépendante de c-Myc en provoquant l'ubiquitination dégradative de Mad1, un inhibiteur de c-Myc (Xu *et al.*, 2007). D'autres propriétés oncogéniques ont été démontrées dans un modèle de carcinome mammaire présentant un KO conditionnel pour p53 et Rb par l'équipe de Nikitin. Cette équipe a mis en avant la surexpression de cIAP1, cIAP2 et YAP dans ces modèles et a démontré que la déplétion de ces protéines inhibe la croissance tumorale (Cheng *et al.*, 2010). Dans ces différentes études, l'implication de TRAF2 n'a pas été étudiée. Il est donc possible que ce ne soit pas uniquement cIAP1, mais le binôme cIAP1/TRAF2 qui soit impliqué dans ces propriétés oncogéniques. Pour autant, le contexte de ces études est très différent du nôtre. En effet, notre modèle cellulaire a été transformé avec l'oncogène H-Ras V12. Il n'est donc pas possible actuellement d'affirmer un rôle de TRAF2 dans leur observation et il serait donc nécessaire d'étudier le rôle de TRAF2 dans leur modèle d'étude.

Mon équipe a étudié le rôle de cIAP1 sur la RhoGTPase cdc42. Elle a mis en évidence que cIAP1, par son domaine BIR2, peut interagir directement avec cdc42 et moduler son activation (partie [IV.G](#) de l'introduction). De plus, la déplétion de cIAP1 diminue l'activation de cdc42 par H-Ras V12 (Marivin *et al.*, 2014). En revanche, l'expression de ce mutant lors de l'injection de ces

cellules en sous-cutané présente une activité similaire à clAP1 dans la croissance tumorale (Figure 35 B). Cdc42, de par sa capacité à moduler le cytosquelette d'actine et la formation de filopodes, est un régulateur puissant de la migration cellulaire et de l'invasion (Sadok et Marshall, 2014). Dans l'étude publiée en 2014, Arthur Marivin et Jean Berthelet ont démontré que clAP1 contrôlait l'activation de cdc42 induite par l'expression de H-Ras-V12 (Marivin *et al.*, 2014). De plus, ils ont montré un rôle de clAP1 dans l'adhésion de cellules de carcinome et des MEF transformées sur un tapis de cellules endothéliales et leur insertion entre les cellules endothéliales. Notre hypothèse est que la capacité de clAP1 à contrôler le cycle d'activation de cdc42 soit un paramètre important dans les capacités invasives des cellules exprimant clAP1. TRAF2 a été retrouvée dans le complexe clAP1/cdc42. clAP1 lie directement cdc42 alors que TRAF2 est recrutée par clAP1. Dans l'article publié en 2014, TRAF2 a été présentée comme un adaptateur permettant le recrutement de clAP1 dans les complexes membranaires de signalisation et libérant ainsi cdc42 du contrôle de clAP1. Nos résultats pourraient suggérer que TRAF2 pourrait avoir un rôle plus important et pourrait être un partenaire régulateur du cycle d'activation de cdc42.



**Figure 35 : Le domaine BIR2 est nécessaire aux propriétés migratoires de clAP1.** A et B. Des cellules MEF DKO reconstituées ou non avec clAP1, ou des mutants de clAP1 dépourvus de domaine BIR1 (clAP1 $\Delta$ BIR1) ou BIR2 (clAP1 $\Delta$ BIR2), ont été injectées par voie intraveineuse (A) ou sous cutanée (B). Le nombre de nódulos pulmonares (A) et la croissance tumorale (B) ont été analysés 36 jours après injection.

## B. L'agrégation de TRAF2 et ses propriétés oncogéniques

Une agrégation cytoplasmique de TRAF2 a été identifiée en présence de clAP1, mais pas lors de la déplétion de cette dernière ou de l'inhibition de l'interaction entre clAP1 et TRAF2. TRAF2 forme des homotrimères, ou des hétérotrimères avec TRAF1 et 3, stables et fonctionnels (He *et al.*, 2004; Mace *et al.*, 2010). clAP1 est active sous forme de dimère et peut ainsi se lier à deux trimères

de TRAF2 (Mace *et al.*, 2010). Leur interaction a été décrite précisément dans la partie [IV.A](#) de l'introduction. De plus, il a été démontré que cIAP1 peut se lier à TRAF2 dans le cytoplasme sans aucune stimulation préalable (Shu, Takeuchi et Goeddel, 1996). Il n'est donc pas étonnant de détecter une agrégation de TRAF2 en sa présence.

Nos résultats démontrent en revanche que l'expression d'un domaine BIR1 de cIAP1 isolé force l'agrégation de TRAF2 et stimule la croissance tumorale de la même manière que l'expression de cIAP1. TRAF2 a été initialement décrite comme un adaptateur moléculaire, nécessaire pour recruter cIAP1 au niveau de récepteurs dans des complexes protéiques, afin que cIAP1 puisse ubiquitinier ses substrats. Nos résultats montrent donc que le rôle de TRAF2 est plus complexe qu'un simple rôle d'adaptateur et que l'agrégation de TRAF2 pourrait réguler directement différents processus cellulaires. L'équipe de Watanabe a démontré en 2002 que la surexpression de CD30 déclenche le recrutement et l'agrégation de TRAF2 et TRAF5 en absence de stimulation, menant à l'activation de la voie NF-κB (Horie *et al.*, 2002). Son agrégation par le domaine BIR1 pourrait donc jouer un rôle similaire et forcer l'activation de voies de signalisation pro-tumorales. Cette hypothèse est soutenue par l'analyse de l'interactome de TRAF2 en présence ou non de cIAP1 dans les cellules A549. En effet, cette analyse a mis en évidence la perte de plus de 70% de ses partenaires lors de la déplétion de cIAP1. Les récepteurs de la famille du TNFR n'ont pas été détectés, ce qui peut s'expliquer par l'absence de stimulation de nos cellules. Ces résultats nous amènent donc à nous demander si les propriétés oncogéniques de cIAP1 ne seraient finalement pas liées à l'agrégation de TRAF2. cIAP1, par son domaine BIR1, favoriserait la mise en place en place d'une forme active, plus disponible, de TRAF2, qui serait impliquée dans la stimulation de voies de signalisation favorisant des processus de survie et de prolifération cellulaires. Une comparaison de l'interactome du modèle de MEF DKO exprimant le domaine BIR1 isolé avec celui des MEF DKO ou des MEF DKO exprimant cIAP1, confirmerait l'importance de l'agrégation de TRAF2 dans son interaction avec ses partenaires. Il serait alors possible de déterminer les voies de signalisation mises en jeu lors de l'agrégation de TRAF2.

Une analyse de la localisation de TRAF2 dans le modèle de MEF DKO exprimant cIAP1 a démontré une colocalisation de TRAF2 avec la PDI (*Protein Disulfide Isomerase*), un marqueur du réticulum endoplasmique. TRAF2 n'est en revanche pas observée dans les lysosomes et l'appareil de Golgi. Ces observations sont cohérentes avec l'étude de Wu *et al.* en 2005. Ils ont montré que la surexpression de cIAP1 et TRAF2, dans la lignée cellulaire COS-7 (une lignée de cellules *fibroblast-like* rénales de singe), mène à leur colocalisation sous la forme de petits agrégats au niveau du réticulum endoplasmique. cIAP1/TRAF2 colocalisent ainsi avec Ubc6, une enzyme E2 transmembranaire du réticulum endoplasmique, favorisant ainsi l'activité E3 ubiquitine ligase de cIAP1 (Wu *et al.*, 2005). Dans notre modèle, il est donc possible que TRAF2 soit associée avec cIAP1 dans le réticulum endoplasmique, favorisant l'activité E3 ubiquitine ligase de cIAP1 et régulant ainsi son activité cellulaire. Il serait intéressant dans un premier temps de confirmer par

immunofluorescence la colocalisation de TRAF2 avec cIAP1 dans le réticulum endoplasmique. L'utilisation de la ligné DKO exprimant cIAP1ΔBIR1, pourrait ensuite mettre en évidence l'importance du binôme TRAF2/cIAP1 dans la localisation de cIAP1, ce qui suggèrerait un rôle régulateur de TRAF2 sur l'activité E3 ubiquitine ligase de cIAP1.

cIAP1 est une protéine localisée à la fois dans le cytoplasme et le noyau et présente diverses fonctions nucléaires. Mon équipe de recherche a par exemple étudié ces fonctions, et a mis en évidence que cIAP1 lie le facteur de transcription E2F1 et provoque son ubiquitination de type K63, régulant ainsi son activité et donc le cycle cellulaire (Glorian *et al.*, 2017; Allègre *et al.*, 2018). Seo *et al.* ont aussi démontré que cIAP1 pouvait lier CtBP2 au sein du noyau, favorisant la transcription des gènes cibles de CtBP2 (Seo *et al.*, 2020). TRAF2 ne semble pas être détectée dans le noyau dans notre modèle d'étude, suggérant que TRAF2 n'est pas impliquée dans les fonctions nucléaires de cIAP1. Pourtant, TRAF2 a déjà été observée dans le noyau. L'équipe de Bishop a par exemple observé une localisation nucléaire de TRAF2 dans des lymphocytes B, impliquée dans la régulation de CREB (Mambetsariev *et al.*, 2016). De plus, la localisation nucléaire de cIAP1 n'a pas été étudiée dans notre modèle cellulaire. Il n'est donc pas totalement exclu que TRAF2 puisse être impliquée dans les fonctions nucléaires de cIAP1.

## C. Les voies de signalisation régulées par l'interaction entre cIAP1 et TRAF2

### 1. Le rôle des récepteurs dans l'activité de cIAP1/TRAF2

Nos résultats ont démontré une activation des MAPK ERK1/2 et de la voie NF-κB canonique dans notre modèle de MEF DKO exprimant cIAP1 en comparaison des MEF DKO. L'expression du mutant cIAP1ΔBIR1 inhibe cet effet. À l'inverse, l'expression de cIAP1 n'a pas d'effet sur la MAPK JNK et inhibe l'activation de p38. Ces voies de signalisation sont régulées par l'activation de différents récepteurs, comme cela a été présenté dans la partie IV de l'introduction. Alors comment expliquer que la voie canonique de NF-κB et des MAPK ERK1/2 soient activées en présence du binôme cIAP1/TRAF2 et pas les MAPK p38 et JNK ? Nos observations ont été réalisées en absence de stimulation des cellules, suggérant une activation constitutive de ERK1/2 et NF-κB, mais pas de p38 et JNK, dépendante de cIAP1/TRAF2. En revanche, il est important de préciser qu'il n'y a pas eu de privation sérique, il est donc tout à fait possible que les facteurs de croissance présents dans le sérum aient pu favoriser l'activation de ERK1/2 et NF-κB. La présence d'EGF, un facteur de croissance pouvant promouvoir l'activation de ERK1/2 (Wee et Wang, 2017), de NF-κB (Biswas *et al.*, 2000), ainsi que p38 et JNK (Gao, Ulekleiv et Halstensen, 2016), a par exemple été décrite dans ce sérum (Lee *et al.*, 2022). De plus, nos résultats portant sur l'interactome de TRAF2 ont mis en évidence une interaction entre TRAF2 et l'EGFR en présence de cIAP1. cIAP1 et TRAF2 pourraient donc par exemple jouer un rôle dans la signalisation cellulaire médiée par l'EGF, en régulant spécifiquement l'activation des protéines ERK1/2 et NF-κB.

## 2. La régulation des MAPK ERK1/2

La régulation des voies de signalisation des MAPK est un facteur important dans la mise en place d'une réponse adaptée des cellules à une stimulation. Leur activation peut favoriser des processus de croissance et de survie mais aussi des processus de mort cellulaire. Le rôle de cIAP1/TRAFF2 a principalement été démontré dans la régulation de l'activation des MAPK JNK et p38. Cette régulation est en général dépendante du recrutement de cIAP1 et TRAF2 au niveau de complexe de récepteurs, et se fait *via* la régulation de l'activité de TAK1 (Dumétier, Zadoroznyj et Dubrez, 2020). En revanche, la régulation des MAPK ERK1/2 par le binôme cIAP1/TRAFF2 n'a pour l'instant été que très peu décrite. Dogan *et al.* ont démontré que cIAP1 et cIAP2 ainsi que XIAP pouvaient inhiber leur activation en favorisant la dégradation de la MAPKKK C-RAF (Dogan *et al.*, 2008). Nos résultats s'opposent donc aux constatations de Dogan *et al.*, démontrant plutôt un rôle activateur de cIAP1/TRAFF2 sur ERK1/2.

Nos modèles de MEF sont transformés avec l'oncogène H-Ras V12. La transformation de nos modèles cellulaires avec cet oncogène a induit l'activation de ERK1/2 en comparaison de MEF non transformées (résultats obtenus par Jean Berthelet). L'activité de Ras passe par l'activation de la voie RAF/MEK/ERK, de la voie PI3K/Akt/mTOR ainsi que par l'activation de GTPases de la famille Rho telles que cdc42 (Berndt, Hamilton et Sebti, 2011). Il n'est donc pas étonnant d'observer une activation de ERK1/2 dans nos modèles cellulaires. Mais alors comment expliquer que cette activation de ERK1/2 soit plus importante dans notre modèle de MEF DKO exprimant cIAP1 ? Un rôle de cIAP1 dans la régulation de l'activité de H-Ras a déjà été décrit par mon équipe de recherche, notamment, comme cela a été décrit précédemment, cIAP1 permet l'activation de cdc42. Une hypothèse possible serait que le binôme cIAP1/TRAFF2 soit impliqué dans d'autres voies induites par H-Ras et en particulier la voie de signalisation RAF/MEK/ERK, régulant ainsi l'activation de ERK1/2.

Le tramétilinib est un inhibiteur de MEK1 et 2, bloquant ainsi l'activation des ERK1 et 2. Son utilisation dans nos modèles de MEF DKO exprimant cIAP1 ou le mutant cIAP1 $\Delta$ BIR1 inhibe indifféremment la croissance tumorale dans nos deux modèles. La voie MEK/ERK est nécessaire à l'activité oncogénique de HRas-V12 (Berndt, Hamilton et Sebti, 2011), par contre, l'activité promotrice de tumeur du binôme cIAP1/TRAFF2 est indépendante de l'activation des MAPK ERK1/2.

## 3. La voie de signalisation NF- $\kappa$ B canonique

Comme décrit précédemment, la voie de signalisation canonique de NF- $\kappa$ B est active dans le modèle de MEF DKO exprimant cIAP1, mais pas dans les modèles de MEF DKO ou DKO exprimant les mutants de cIAP1 incapables de lier TRAF2. La voie de signalisation canonique de NF- $\kappa$ B joue un rôle crucial dans les mécanismes d'inflammation. La stimulation de nombreux récepteurs, de la famille du TNFR ou des PRR par exemple, mène à son activation. Elle induit l'expression de gènes impliqués dans les processus de survie, de prolifération et de différenciation cellulaire. Les mécanismes de cette voie ont été présentés dans la partie [\*\*IV.B.1\*\*](#) de l'introduction.

cIAP1 et TRAF2 sont impliquées directement dans la régulation de la voie de signalisation NF-κB, et en particulier au niveau du TNFR1. Elles sont recrutées au niveau du TNFR1 dans un complexe protéique, permettant à cIAP1 d'induire l'ubiquitination de RIPK1, provoquant la mise en place de la voie canonique de NF-κB (Dumétier, Zadoroznyj et Dubrez, 2020). Il n'est donc pas étonnant d'observer une activation de cette voie en présence de cIAP1 dans nos modèles. Une activation excessive de cette voie est associée avec un développement tumoral accru, décrit précédemment dans la partie [II.A](#) de la discussion. Il est donc probable que les propriétés oncogéniques du binôme cIAP1/TRAF2 passe par l'activation de la voie NF-κB canonique.

Dans nos observations, aucun récepteur n'a été stimulé. Une hypothèse possible pouvant expliquer ces résultats porte sur l'agrégation de TRAF2. cIAP1 et TRAF2 interagissent ensemble dans le cytoplasme indépendamment de la stimulation de récepteurs (Shu, Takeuchi et Goeddel, 1996). Nos résultats ont démontré la formation d'agrégats de TRAF2 en présence de cIAP1. De plus, l'étude de l'interactome de TRAF2 a mis en évidence l'interaction accrue de TRAF2 avec des acteurs de la voie NF-κB, en présence de cIAP1. Il est donc possible que ces agrégats puissent être suffisants pour induire l'ubiquitination de RIP1 et la formation des plateformes de signalisation, conduisant à l'activation de la voie canonique de NF-κB, malgré l'absence de stimulation des récepteurs, et pourrait ainsi stimuler la croissance tumorale.

#### 4. La voie de signalisation NF-κB non canonique

L'étude de la voie non canonique de NF-κB dans nos modèles de MEF a mis en évidence une activation importante de cette voie lorsque cIAP1 et cIAP2 sont déplétées. De plus, la restauration de cIAP1 inhibe l'activation de cette voie. Ces résultats ne sont pas inattendus. Cette voie est activée principalement par la protéine NIK. En absence de stimulation, cette voie est inhibée par cIAP1 et 2. TRAF3 se lie à NIK et recrute TRAF2 qui permet la liaison de cIAP1 et cIAP2. Cette proximité entre NIK ainsi que cIAP1 et 2 conduit à l'ubiquitination dégradative de NIK par cIAP1 et 2, inhibant ainsi la voie de signalisation non canonique de NF-κB. La stimulation des récepteurs de la famille du TNFR ne possédant pas de domaine de mort tels que le TNFR2, CD40 ou BAFF-R provoque le recrutement du complexe cIAP1-cIAP2-TRAF2-TRAF3 à la membrane, libérant ainsi NIK et menant à l'activation de la voie NF-κB non canonique (Dumétier, Zadoroznyj et Dubrez, 2020).

De manière surprenante, l'expression d'un mutant de cIAP1 n'arborant pas de domaine BIR1 accroît l'inhibition de cette voie de signalisation. En absence du domaine BIR1, cIAP1 ne peut pas s'associer à TRAF2 et ne peut donc pas être recrutée au niveau de NIK afin d'induire sa dégradation. Alors comment expliquer que le mutant de cIAP1 $\Delta$ BIR1 puisse inhiber l'activation de la voie NF-κB non canonique ? Notre hypothèse repose sur les travaux de l'équipe de Wright. Cette dernière a démontré que NIK possédait un motif IBM reconnu par le domaine BIR2 de cIAP1. NIK peut donc directement interagir avec le domaine BIR2 de cIAP1. Ceci stabilise le complexe et est nécessaire

à l'ubiquitination et la dégradation de NIK par clAP1 (Lee *et al.*, 2014). Notre hypothèse est donc qu'en absence du domaine BIR1, le domaine BIR2 de clAP1 est plus facilement accessible pour NIK, favorisant ainsi l'interaction entre clAP1 et NIK et menant à la dégradation de ce dernier, inhibant ainsi la voie non canonique de NF-κB. Il serait donc très intéressant d'inhiber le protéasome afin d'étudier le recrutement de NIK au niveau du mutant clAP1ΔBIR1 afin de confirmer notre hypothèse.

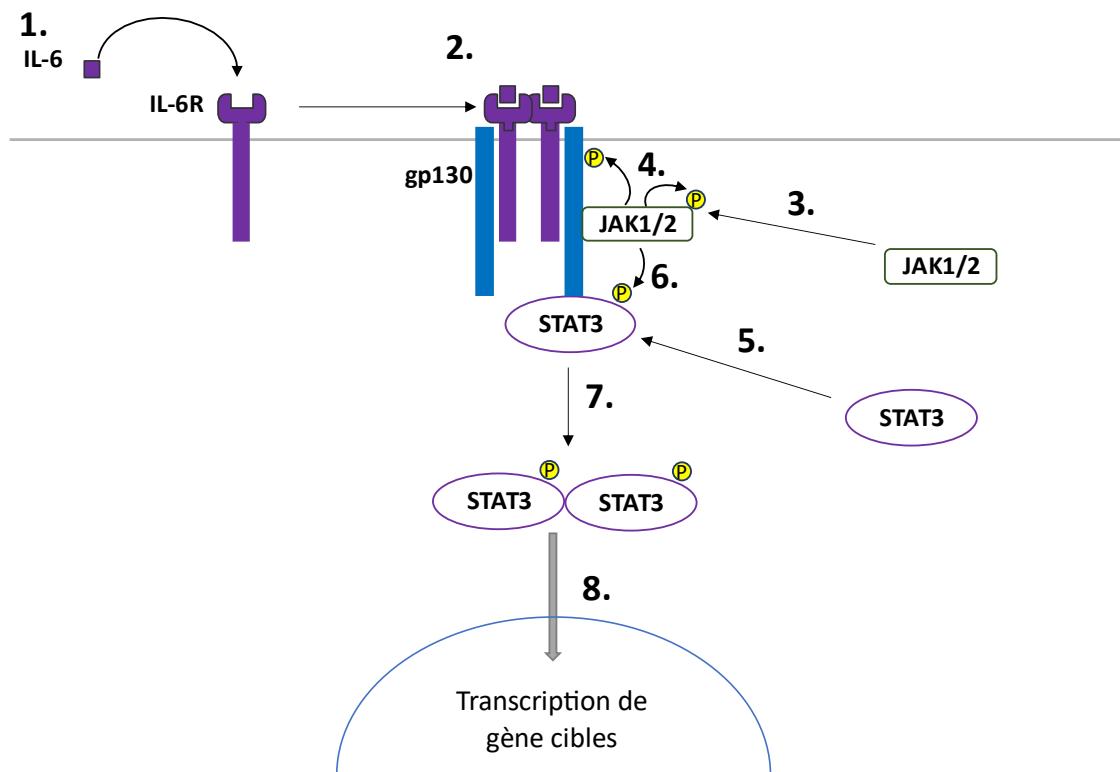
La suractivation de la voie non canonique de NF-κB peut être associée avec un développement tumoral accru comme cela a été démontré dans le myélome multiple (Keats *et al.*, 2007). L'équipe de Fulda a observé en 2006 que le SMAC mimétique BV6, utilisé à des concentrations non toxiques, stimule l'elongation, la migration et l'invasion de cellules de glioblastomes, dépendamment de l'activation de la voie NF-κB non canonique (Tchoghandjian *et al.*, 2013). Gardam *et al.* ont aussi démonté en 2011 que la déplétion de clAP1 et clAP2 provoquait une suractivation de la voie NF-κB non canonique dans des lymphocytes B, favorisant ainsi la survie cellulaire (Gardam *et al.*, 2011). Nous aurions donc pu nous attendre à une croissance tumorale accrue dans notre modèle de MEF DKO. Pourtant, la croissance tumorale de ce modèle est bien plus faible que celle du modèle de MEF DKO exprimant clAP1, suggérant que la voie NF-κB non canonique n'est pas impliquée dans les processus de croissance tumorale de nos modèles.

## 5. L'interaction clAP1/TRAFF régule l'activation de STAT3

Une surexpression des gènes cibles de NF-κB dans notre modèle de MEF DKO exprimant clAP1 a été observée en comparaison des MEF DKO exprimant clAP1ΔBIR1. Ces résultats ne sont pas surprenants, la voie canonique de NF-κB étant plus active dans le modèle de MEF DKO exprimant clAP1. L'activation de cette voie mène à la translocation de NF-κB dans le noyau, afin de promouvoir l'expression de gènes anti-apoptotiques, permettant aux cellules d'échapper aux mécanismes de stress induits par la réponse inflammatoire par exemple. Il est donc fortement probable que l'activité oncogénique du binôme clAP1/TRAFF soit dépendante de la surexpression de ces gènes cibles. NF-κB induit aussi l'expression d'une grande variété de cytokines impliquées dans la réponse immunitaire telles que le TNF $\alpha$  ou l'IL-6. Une surexpression de l'IL-6 a été justement observée dans nos MEF DKO exprimant clAP1 mais pas dans les MEF DKO exprimant le mutant clAP1ΔBIR1. L'inhibition de la voie NF-κB par le BAY-11-7082 inhibe cette surexpression, démontrant l'implication de NF-κB dans la surexpression de l'IL-6. De plus, une corrélation a été observée entre l'expression de clAP1 et l'expression de l'IL-6 dans les cancers du poumon, du sein et de la thyroïde, suggérant un rôle de l'IL-6 dans les propriétés oncogéniques de clAP1/TRAFF.

La voie de signalisation de l'IL-6 passe par l'activation des protéines STAT3 et JAK et favorise l'expression de gènes de survie et de prolifération. Son hyperactivation est retrouvée dans de nombreux cancers et est associée à un mauvais pronostic et à la formation de métastases (Johnson, O'Keefe et Grandis, 2018). La signalisation induite par l'IL-6 est médiée par deux voies

de signalisation différentes : la voie classique et la voie trans. Dans la voie classique, l'IL-6 est reconnue par le récepteur membranaire IL-6R. Le complexe ainsi formé se lie ensuite à la sous-unité gp130 du récepteur à l'IL-6, menant à la formation d'un complexe hétéro-hexamérique, composé de deux molécules d'IL-6, d'IL-6R et de gp130. Dans la voie trans, l'IL-6 ne se lie pas au récepteur membranaire IL-6R mais au récepteur soluble sIL-6R qui s'associe ensuite avec la sous-unité gp130. L'expression de la sous-unité gp130 est ubiquitaire, à l'inverse du récepteur membranaire IL-6R, dont l'expression est beaucoup plus limitée. Le récepteur soluble sIL-6R permet donc à l'ensemble des cellules de répondre à l'IL-6. Les protéines JAK1 et JAK2 sont ensuite recrutées au niveau du gp130 et s'activent par autophosphorylation. Ces deux protéines induisent ensuite la phosphorylation de gp130, permettant le recrutement de STAT3 sur gp130. STAT3 est ensuite phosphorylée par JAK1 et 2, menant à sa dimérisation et à sa translocation dans le noyau provoquant la transcription des gènes cibles de STAT3 (Johnson, O'Keefe et Grandis, 2018; Lokau *et al.*, 2019) (Figure 36).



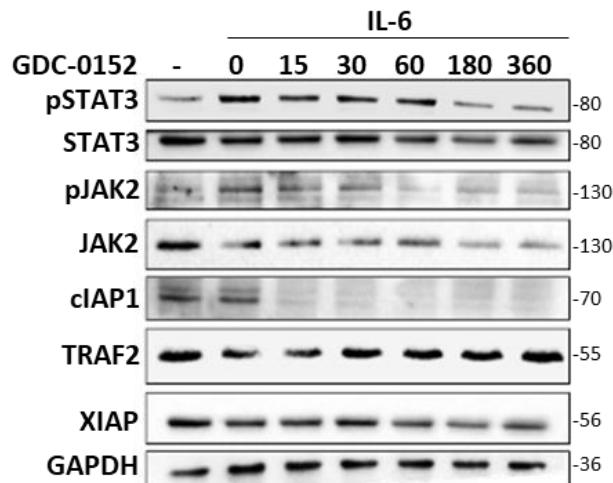
**Figure 36 : La voie de signalisation classique de l'IL-6.** 1. L'IL-6 est reconnu par le récepteur membranaire IL-6R. 2. Ce dernier interagit ensuite avec la sous-unité gp130 afin de former un complexe hétéro-hexamérique composé de deux molécules d'IL-6, de l'IL-6R et de gp130. 3. Les protéines JAK1 et 2 sont recrutées au niveau de gp130. 4. Elles s'activent par autophosphorylation puis induisent la phosphorylation de gp130. 5. Cette dernière peut ainsi recruter STAT3. 6. STAT3 est à son tour activée par phosphorylation par JAK1 et 2. 7. STAT3 peut ainsi se dimériser. 8. Ce dimère est ensuite transloqué dans le noyau afin de provoquer la transcription de gènes cibles.

Dans le modèle de MEF DKO surexprimant cIAP1, l'activation constitutive de STAT3 et de JAK2 est plus importante que dans les modèles DKO et DKO exprimant le mutant cIAP1ΔBIR1. De

la même manière, la déplétion de TRAF2 ou l'inhibition de NF-κB, dans le modèle de MEF DKO exprimant clAP1, inhibe l'activation de STAT3. Le traitement de MEF DKO avec un anticorps neutralisant l'IL-6 n'a aucun effet, alors que sur les MEF DKO exprimant clAP1, il inhibe fortement la phosphorylation de STAT3. Des résultats similaires ont aussi été obtenus dans des A549 dans lesquelles la déplétion de clAP1 ou TRAF2 inhibe l'activation constitutive de STAT3 et JAK2. L'activation de la voie NF-κB canonique dépendante de l'interaction entre clAP1 et TRAF2 provoque donc la synthèse d'IL-6. Cette dernière est sécrétée et active de manière autocrine les voies de signalisation de l'IL-6, provoquant l'activation de JAK2 et de STAT3. Ce système pourrait être impliqué directement dans les propriétés oncogéniques de clAP1.

L'inhibition de STAT3 par le niclosamide diminue la croissance tumorale des MEF DKO clAP1 leur faisant perdre leur avantage prolifératif par rapport aux MEF DKO exprimant le mutant clAP1ΔBIR1. Le niclosamide n'a en revanche aucun effet sur ces dernières. De plus, la déplétion de STAT3 par un siRNA inhibe la croissance des MEF DKO exprimant clAP1 mais n'a aucun effet sur les MEF DKO. Les propriétés oncogéniques de l'interaction entre clAP1 et TRAF2 sont donc bien dépendantes de l'activation de STAT3. De plus, une corrélation a été observée entre l'expression de l'IL-6 et clAP1 dans les tumeurs sous-cutanées, à la suite d'une injection des MEF clAP1 dans notre modèle de xénogreffe (non montré). L'hyperactivation de STAT3 par l'IL-6 a été associée à la formation de métastases et à une croissance tumorale accrue (Johnson, O'Keefe et Grandis, 2018). De plus, l'activation autocrine de la voie IL-6 a été décrite comme un événement impliqué dans les processus de tumorigénèse (Grivennikov et Karin, 2008). Il est donc probable que la régulation de la synthèse d'IL-6 décrite précédemment soit impliquée dans ces processus. L'utilisation d'inhibiteurs de l'IL-6 *in vivo* pourrait permettre de le confirmer.

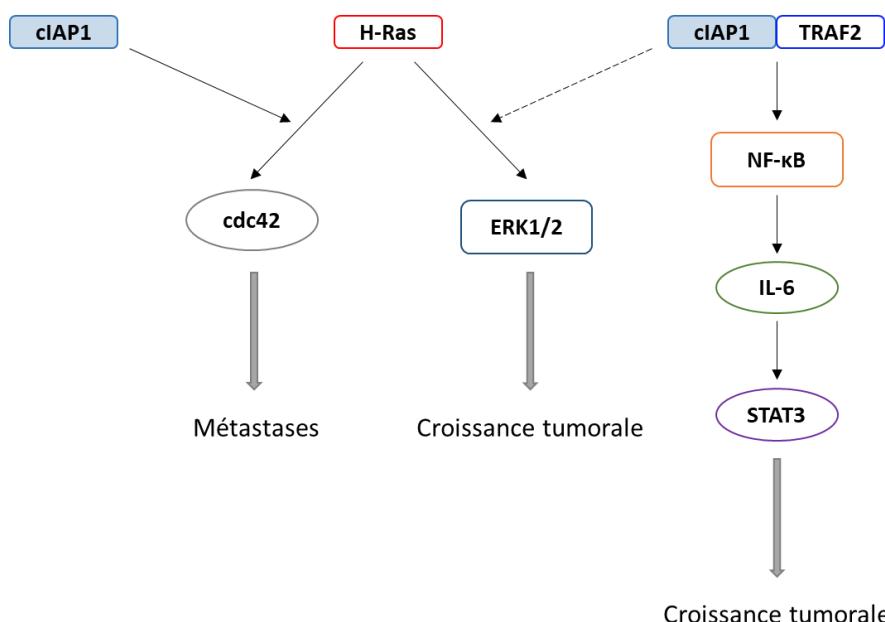
Nous avons observé que le GDC-0152 est capable de bloquer l'activation de STAT3 dans des cellules A549 cultivées en présence d'un excès d'IL-6, suggérant que clAP1 puisse aussi directement contrôler la voie STAT3 indépendamment de la production d'IL-6 (Figure 37). Il n'y a actuellement aucune étude qui a mis en avant un rôle de clAP1 dans cette voie de signalisation. En revanche, l'équipe de So a démontré que TRAF2 pouvait se lier à gp130, afin d'inhiber la phosphorylation activatrice de JAK et bloquer ainsi l'activation de STAT3. Ils n'ont en revanche pas étudié le rôle de clAP1 dans ce processus (Nagashima *et al.*, 2016; Kimura *et al.*, 2018). Notre hypothèse est donc que clAP1, en se liant à TRAF2, empêche le recrutement de TRAF2 sur gp130, levant ainsi l'inhibition de la voie de l'IL-6. L'inhibition de clAP1 libère donc TRAF2, facilitant ainsi son recrutement au niveau du gp130. Afin de confirmer cette hypothèse, il serait intéressant dans un premier temps de confirmer l'implication de clAP1 en utilisant des siRNA ciblant clAP1, plutôt que le GDC-0152. Il pourrait ensuite être intéressant d'effectuer des expériences de PLA (*Proximity Ligation Assay*) entre TRAF2 et gp130 en présence ou non de clAP1.



**Figure 37 : Effet du GDC sur la voie de l'IL-6 dans les cellules A549.** Les cellules A549 ont été traitées avec de l'IL-6 à 25 ng/mL pendant 24h et/ou du GDC0152 à 5 µM de 15 minutes à 6h. Le niveau d'activation de la voie IL-6 a été ensuite analysé par Western Blot. GAPDH a été utilisée comme contrôle de charge.

#### D. Récapitulatif des propriétés oncogéniques du binôme cIAP1/TRAFF2

Les résultats obtenus sur ce projet de recherche ont permis d'étudier précisément les propriétés oncogéniques de cIAP1/TRAF2 dans un modèle de MEF transformées avec l'oncogène H-Ras V12. Un rôle de cIAP1 dans l'activité de cdc42 avait déjà été observé par mon équipe de recherche dans ce modèle. Nous avons ici mis en évidence le rôle du binôme cIAP1/TRAF2 dans l'activation des MAPK ERK1/2 médiée par H-Ras, ainsi que dans l'activation de NF- $\kappa$ B menant à la sécrétion d'IL-6 et l'activation de STAT3. De plus, nos résultats ont démontré pour la première fois l'implication de STAT3 dans les propriétés oncogéniques de cIAP1 (Figure 38).



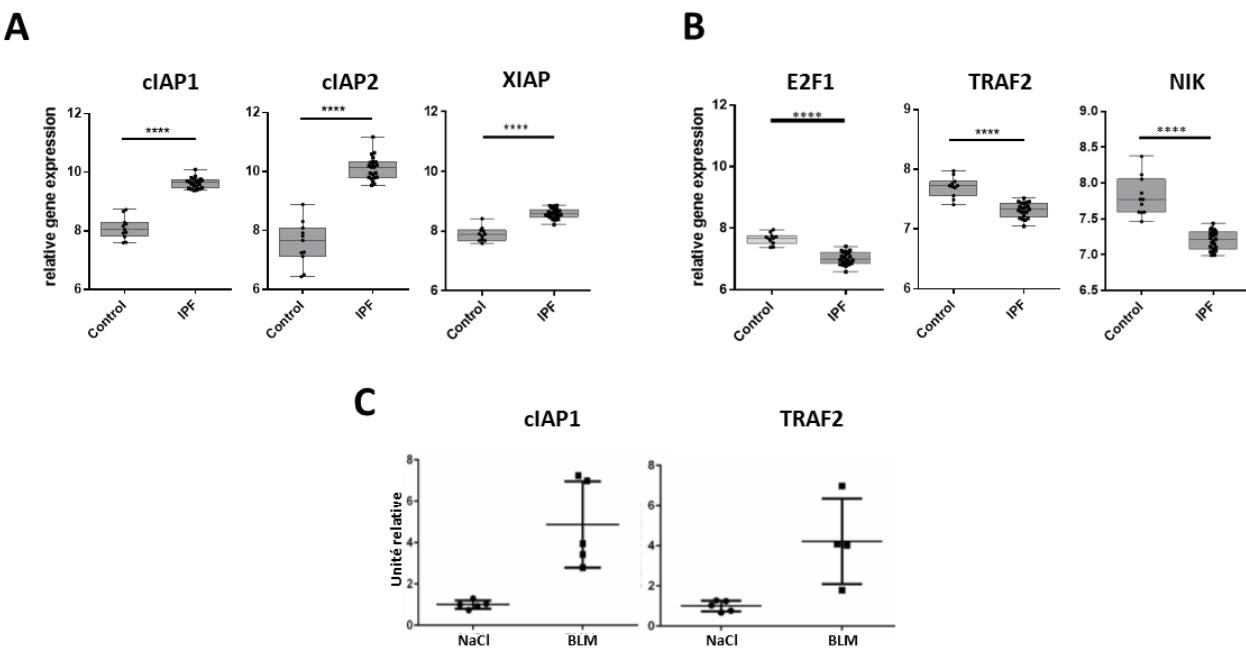
**Figure 38 : Rôle de cIAP1/TRAF2 dans le modèle de MEF transformées avec H-Ras V12. H-Ras stimule l'activation de cdc42 et ERK1/2. La stimulation de cdc42 est dépendante de cIAP1 et stimule la formation de**

*métastases. La stimulation de ERK1/2 est en partie dépendante de cIAP1/TRAFF2 et stimule la croissance tumorale. cIAP1/TRAFF2 stimule la voie canonique de NF- $\kappa$ B, provoquant la production d'IL-6, l'activation de STAT3 et favorisant ainsi la croissance tumorale.*

Par la suite, il serait nécessaire de confirmer l'implication de l'IL-6 dans les propriétés oncogéniques de cIAP1/TRAFF2 dépendantes de STAT3. Nous avons observé une interaction potentielle de TRAF2 avec le récepteur à l'EGF. Il serait important de confirmer cette interaction et d'étudier l'implication de cIAP1/TRAFF2 dans les voies de signalisation médiées par l'EGF. L'agrégation de TRAF2 par le domaine BIR1 stimule la croissance tumorale. Il serait donc nécessaire d'étudier en profondeur les mécanismes cellulaires impliqués. De plus, il serait pertinent d'analyser précisément le rôle de cIAP1 dans les processus d'invasion cellulaire médiés par cdc42. Il pourrait aussi être très intéressant d'étudier le rôle des fonctions nucléaires de cIAP1 dans son activité oncogénique, et d'étudier l'implication de TRAF2 dans ces fonctions nucléaires. Il serait aussi important de déterminer si nos observations sont généralisables à d'autre modèles cellulaires.

### III. Le rôle de cIAP1 et TRAF2 dans la fibrose pulmonaire et la signalisation médiée par le TGF- $\beta$

Une analyse *in silico*, réalisée à partir d'une puce à ADN publique (GSE110147), a démontré une surexpression significative de cIAP1 et 2 ainsi que XIAP dans des poumons de patients atteints de FPI, comparé à des fractions de poumons normaux bordant des poumons malades de patients atteints de cancer du poumon (Figure 39 A). À l'inverse, une diminution significative de l'expression de certains partenaires de cIAP1 est décrite dans les poumons malades (Figure 39 B). Au sein de l'équipe HSP-Pathies, l'équipe du professeur Bonniaud étudie le rôle des protéines de la famille des HSP dans le développement de la fibrose pulmonaire. Elle maîtrise parfaitement le modèle murin de fibrose pulmonaire induite à la bléomycine. L'étude de l'expression de cIAP1 et TRAF2 au sein de ce modèle (Figure 39 C) a confirmé la surexpression de cIAP1 et a mis en avant une surexpression de TRAF2. Du fait de ces résultats et la maîtrise du modèle de fibrose induite par la bléomycine au sein du laboratoire, ma thèse a donc également porté sur l'étude du rôle de cIAP1 et de son interaction avec TRAF2 dans la fibrose pulmonaire.



**Figure 39 : Surexpression de cIAP1 dans des échantillons de poumons fibrosés.** A. Les expressions de cIAP1 et 2 ainsi que XIAP ont été comparées, entre des poumons de patients atteints de FPI et des fractions de poumons normaux bordant des poumons malades de patients atteints de cancer du poumon, à partir de la puce à ADN GSE110147. B. Les expressions de TRAF2, E2F1 et NIK ont aussi été analysées à partir de la même base de données. C. Les expressions de cIAP1 et TRAF2 dans des poumons de souris saines ou ayant développé une fibrose pulmonaire par injection de bléomycine ont été étudiées par RT-qPCR

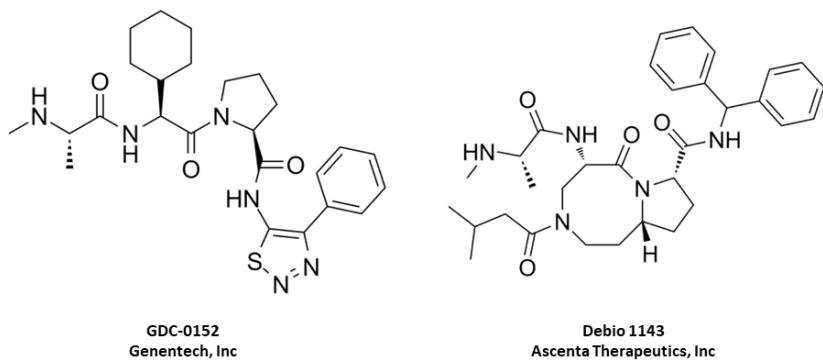
En 2016 dans une étude publiée dans *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, Ashley *et al.* ont mis en avant la surexpression de XIAP ainsi que de cIAP1 et 2 dans le modèle murin de fibrose pulmonaire induite à la bléomycine. Ils ont démontré que l'administration

du SMAC mimétique Debio 1143 inhibe le développement de la fibrose pulmonaire induite à la bléomycine. Ils ont expliqué cet effet par une inhibition de XIAP. Or le Debio 1143 est un SMAC mimétique monovalent possédant une affinité plus forte pour cIAP1 et 2 que XIAP (Figure 40). En effet, il présente un  $K_i$  (constante d'inhibition) pour les domaines BIR3 de cIAP1 et cIAP2 de respectivement 1,9 et 5,1 nM, alors qu'il n'est que de 66,4 nM pour XIAP (Selleck Chemicals, Houston, États-Unis). De plus, il a été démontré qu'il induisait la dégradation de cIAP1 (Liu *et al.*, 2014; Thibault *et al.*, 2018). D'autre part, l'utilisation d'un modèle de souris KO pour XIAP n'a pas eu d'effet sur la fibrose pulmonaire induite à la bléomycine. En revanche, le développement de la fibrose a déclenché une surexpression de cIAP1 et 2 et l'utilisation de Debio 1143 sur ce modèle a inhibé le développement de la maladie. Ces résultats les ont amené à conclure qu'en absence de XIAP, un mécanisme de compensation médié par cIAP1 et 2 était mis en place (Ashley *et al.*, 2016). Pourtant, ces résultats ne présentent aucune preuve d'un rôle de XIAP dans le développement de la fibrose pulmonaire, et tendent plutôt à mettre en évidence l'implication d'autres IAP dans cette pathologie. Il est donc tout à fait possible qu'une autre IAP inhibée par le Debio 1143, telle que cIAP1, soit directement impliquée dans le développement de la maladie. Notre hypothèse est donc que cIAP1 est impliquée dans le développement de la fibrose pulmonaire.

## A. Le GDC-0152 bloque le développement de la fibrose pulmonaire

### 1. Le GDC-0152 inhibe l'apparition de la fibrose pulmonaire *in vivo*

Le premier objectif de mes travaux de thèse a été de valider qu'un SMAC mimétique pouvait bloquer l'apparition de la fibrose pulmonaire, afin de valider le rôle des IAP dans cette dernière. Pour cela, l'effet du GDC-0152 dans l'apparition de la maladie a été étudié dans le modèle murin de fibrose pulmonaire induite à la bléomycine. Le GDC-0152 est un SMAC mimétique monovalent, possédant une forte affinité pour cIAP1 et 2 ainsi que XIAP ( $K_i$  de respectivement 17, 43 et 28 nM pour leur domaine BIR3 (Selleck Chemicals, Houston, États-Unis)) (Figure 37), couramment utilisé par notre équipe de recherche. Son utilisation *in vitro* et *in vivo* est parfaitement maîtrisée par mon équipe et il a donc été choisi pour la suite de ces travaux.



**Figure 40 : Structure du GDC-0152 et du Debio 1143.**

La bléomycine a été injectée par voie intratrachéale à l'ensemble des souris. Elle provoque rapidement une phase inflammatoire durant laquelle différentes cytokines pro-inflammatoires vont être synthétisées, dont le TGF- $\beta$ , et qui vont mener au développement de la fibrose pulmonaire (Khalil et O'Connor, 2008). Cette dernière commence à se développer en général au bout de 7 à 8 jours. À partir du deuxième jour après l'injection de bléomycine, le GDC-0152 ou le tampon de préparation du GDC-0152 (NaCl 0,9% et DMSO) a été injecté à des concentrations de 7,5 ou 15 mg/kg par voie intraveineuse tous les 2 jours jusqu'à l'euthanasie des souris, réalisée le 21<sup>ème</sup> jour (Figure 41 A). Le développement de la fibrose pulmonaire a été analysé de différentes manières. Dans un premier temps, un LBA (Lavage BronchoAlvéolaire) a été réalisé. Ce dernier n'est pas suffisant pour diagnostiquer la pathologie mais la présence de cellules dans le LBA est caractéristique du développement de la fibrose (Pesci *et al.*, 2010). Un comptage cellulaire a été réalisé sur ces prélèvements et de façon très intéressante, le GDC-0152 diminue de manière dose dépendante l'infiltration cellulaire du LBA. L'effet à une concentration de 15 mg/kg est statistiquement significatif. (Figure 41 B).

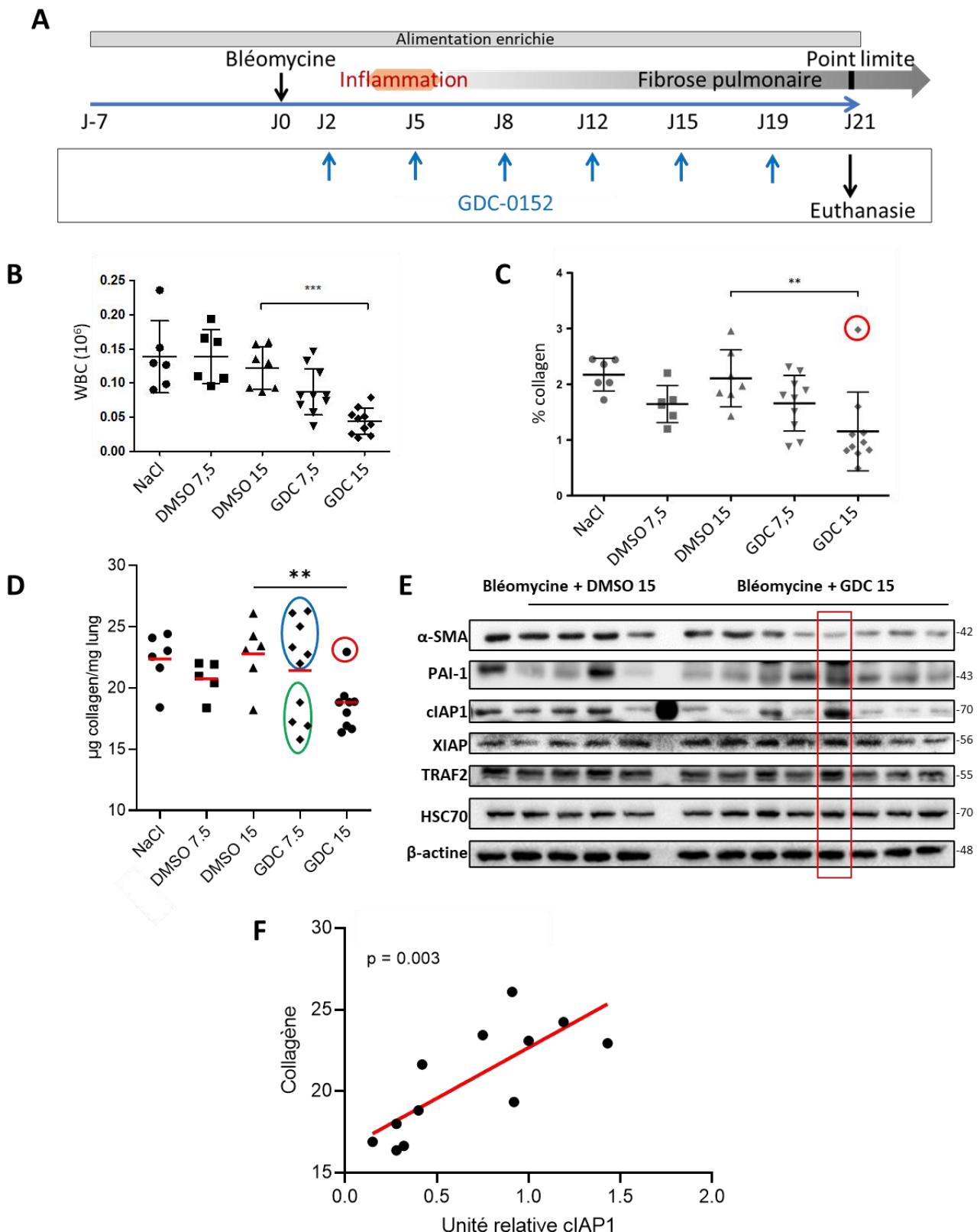
Le dépôt excessif de collagène est un des principaux marqueurs du développement de la fibrose pulmonaire. Un moyen efficace d'évaluer le développement de la maladie est donc de quantifier le collagène présent dans les poumons. Les poumons ont donc été récupérés et le collagène a été dosé de deux manières différentes : par Sircol, un réactif composé entre autres de rouge Sirius permettant la coloration en rouge et la précipitation du collagène, et par une coloration de coupe de poumons au rouge Sirius. Les deux méthodes de dosage montrent une diminution significative du taux de collagène chez les souris traitées au GDC-0152 à 15 mg/kg en comparaison du groupe contrôle. Dans le groupe de souris traitées avec du GDC-0152 à 7,5 mg/kg l'effet est en revanche moins important. Dans ce groupe, deux populations de souris se dessinent : une population répondant au traitement (entourée en vert) et une seconde ne semblant pas du tout y répondre (entourée en bleu) (Figure 41 C et D).

Afin d'étudier plus précisément l'effet du GDC-0152 à 15 mg/kg sur l'apparition de la maladie, la quantité des protéines  $\alpha$ -SMA et PAI-1 a été étudiée par *Western Blot* sur les échantillons

de poumon. PAI-1 est l'un des principaux inhibiteurs de la fibrinolyse. Son expression favorise le développement de la fibrose pulmonaire en facilitant l'accumulation de composants de la matrice extracellulaire dont le collagène. La protéine  $\alpha$ -SMA est, quant à elle, un marqueur cellulaire des myofibroblastes matures, dont la présence persistante et excessive est une des principales causes du développement de la fibrose pulmonaire, provoquant l'accumulation incontrôlée de composants de la matrice extracellulaire, comme cela a été décrit dans la partie [V.G](#) de l'introduction. Ces deux protéines sont donc des marqueurs du développement de la fibrose pulmonaire et sont en général surexprimées durant le développement de cette dernière (Fernandez et Eickelberg, 2012).

Premièrement, le GDC-0152 provoque bien la dégradation de cIAP1 dans la plupart des souris mais n'a pas d'effet sur la quantité de XIAP. Deuxièmement, il diminue fortement la quantité de PAI-1 et surtout d' $\alpha$ -SMA retrouvée chez les souris non traitées. Le GDC-0152 semble donc inhiber la différenciation des cellules pulmonaires en myofibroblastes et pourrait ainsi inhiber l'apparition de la maladie. Une souris n'a pas du tout répondu au GDC-0152 (encadré en rouge). En effet, la quantité de cIAP1 n'est pas diminuée en présence de GDC-0152 (Figure 41 E). De manière très intéressante, cette souris présente un taux très élevé de collagène, détecté par les deux méthodes de dosage (entouré en rouge) (Figure 41 C et D). On observe une corrélation significative entre le taux de cIAP1 et la quantité de collagène, ce qui conforte l'hypothèse que cIAP1 puisse être impliquée dans l'apparition de la maladie (Figure 41 F).

Ces résultats ont permis de confirmer que l'utilisation d'un SMAC mimétique, ici le GDC-0152, diminue fortement l'apparition de la fibrose pulmonaire induite par la bléomycine chez la souris. Malheureusement, lorsque des patients sont diagnostiqués pour une fibrose pulmonaire, cette dernière est déjà développée. Le GDC-0152 a ici été injecté très tôt après l'injection de la bléomycine, donc bien avant le développement de la fibrose pulmonaire. Les résultats obtenus précédemment permettent donc de mettre en avant un effet du GDC-0152 sur l'apparition de la maladie, mais ne sont pas suffisants pour conclure sur un potentiel effet curatif de ce traitement.



**Figure 41 : Le GDC-0152 inhibe l'apparition de la fibrose pulmonaire.** A. De la bléomycine à 1,5 mg/kg a été injectée en intratrachéal à l'ensemble des souris C57BL/6. Deux jours après l'injection de bléomycine, les souris sont divisées en 5 groupes : le premier reçoit en intraveineuse du GDC-0152 à 7,5 mg/kg (GDC 7,5), le second du GDC à 15 mg/kg (GDC 15), le troisième du NaCl à 0,9% (NT) et les deux derniers du NaCl 0,9% combiné à la concentration DMSO utilisée pour le GDC (DMSO 7,5 et DMSO 15). Les injections pour chaque groupe sont réalisées tous les deux jours. Les souris ont été euthanasiées le 21<sup>ème</sup> jour. B. Les cellules

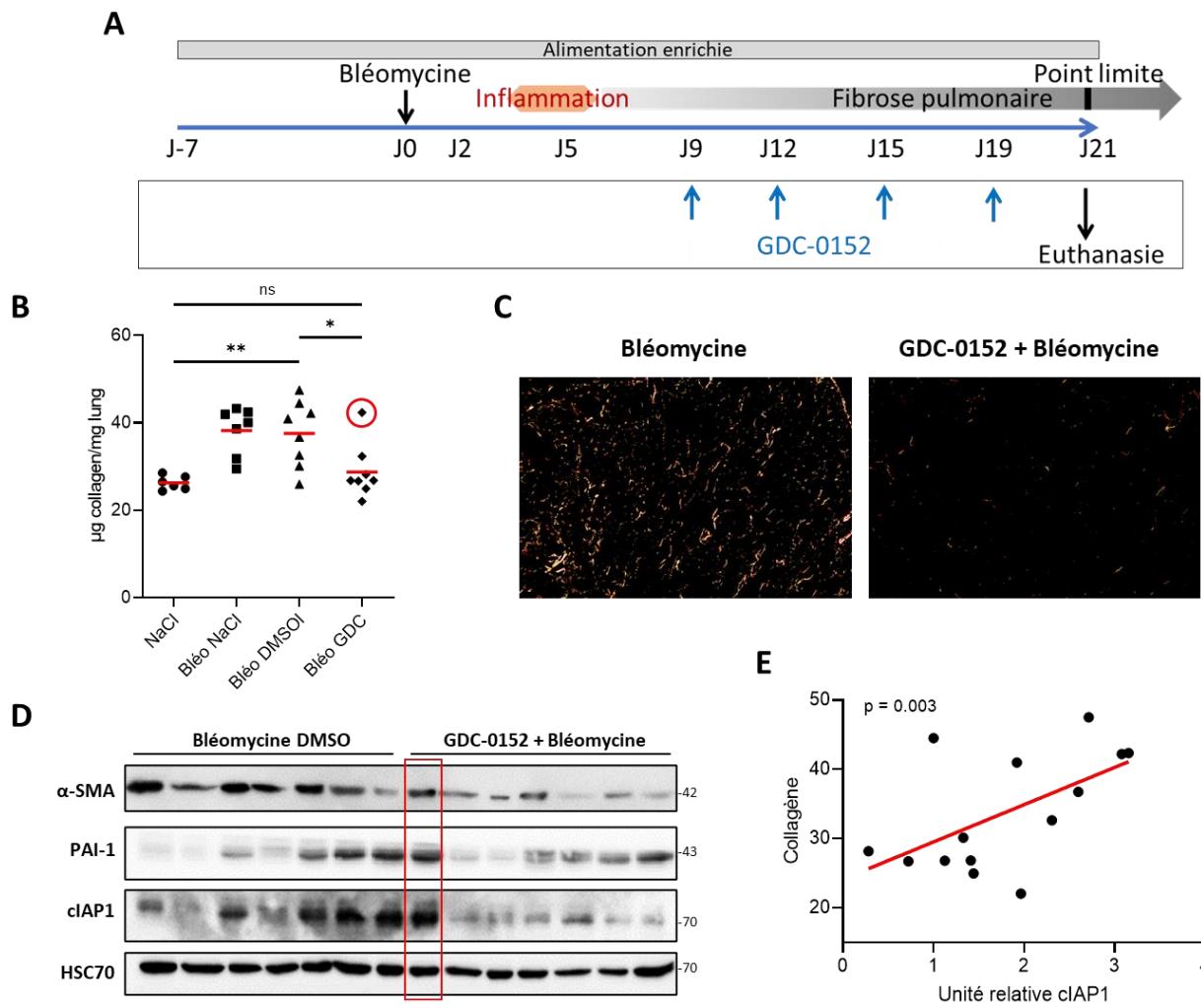
présentes dans les lavages bronchoalvéolaires ont été comptées pour chaque souris. C et D. Le collagène présent dans les poumons des souris a été évalué par Sircol (C) et rouge Sirius (D). E. Certaines protéines de la famille des IAP (*cIAP1*, *cIAP2* et *XIAP*), TRAF2 ainsi que PAI-1 et  $\alpha$ -SMA ont été analysées par Western Blot dans les poumons des souris DMSO 15 et GDC 15. L'HSC70 et la  $\beta$ -actine ont été utilisées comme contrôle de charge. F. Les niveaux relatifs de *cIAP1* et d' $\alpha$ -SMA ont tous les deux été évalués par une analyse densitométrique des Western Blot. Une étude corrélative entre le niveau de *cIAP1* et la quantité de collagène a été ensuite réalisée. Le test de Student a été utilisé pour les analyses statistiques.

## 2. Le GDC-0152 possède un effet curatif sur le développement de la fibrose pulmonaire *in vivo*

Afin d'analyser l'effet thérapeutique du GDC-0152, une nouvelle expérience *in vivo* a été réalisée. Une partie des souris a été injectée avec de la bléomycine, l'autre partie a été utilisée comme contrôle négatif. Le traitement au GDC-0152 a été fixé à 15 mg/kg, correspondant à la dose optimale observée précédemment, et celui-ci a commencé à partir du 9<sup>ème</sup> jour, lorsque la fibrose est déjà installée (Figure 42 A). Au 21<sup>ème</sup> jour, les souris ont été euthanasiées et les poumons ont été récupérés afin de doser le collagène par Sircol et coloration au rouge Sirius. Le dosage au Sircol montre que la bléomycine provoque bien une forte augmentation de la quantité de collagène, liée à un développement de la fibrose pulmonaire. Le GDC-0152 inhibe fortement l'augmentation de la quantité de collagène, et maintient même cette quantité quasiment au niveau du contrôle négatif, excepté pour une souris (entourée en rouge) (Figure 42 B). Ces résultats sont confirmés par la coloration au rouge Sirius. Le marquage est beaucoup plus important chez les souris ayant reçu uniquement l'injection de bléomycine comparé aux souris traitées avec le GDC-0152 (Figure 42 C). Le GDC-0152 présente donc aussi un effet curatif sur le développement de la fibrose pulmonaire.

L'effet du GDC-0152 a aussi été analysé par *Western Blot*. Comme attendu, le GDC-0152 provoque aussi la dégradation de *cIAP1*, excepté pour une souris (entourée en rouge) qui, de manière intéressante, correspond à la souris présentant un fort taux de collagène observé précédemment. Les quantités de PAI-1 et d' $\alpha$ -SMA sont aussi sensiblement diminuées par le GDC-0152, démontrant la capacité de ce dernier à inhiber le développement de la fibrose pulmonaire. Cet effet n'est en revanche pas observé pour la souris présentant un fort taux de *cIAP1* (Figure 42 D). Nous retrouvons une corrélation significative entre le taux de *cIAP1* et la quantité de collagène (Figure 42 E).

Ces résultats prouvent donc que le GDC-0152 présente un effet curatif sur la fibrose pulmonaire et que les IAP jouent un rôle dans le développement de cette dernière.



**Figure 42 : Le GDC-0152 inhibe efficacement le développement de la fibrose pulmonaire.** A. De la bleomycine à 1,5 mg/kg ou du NaCl 0,9 % a été injecté en intratrachéal à des souris C57BL/6. Neuf jours après ces injections, les souris ayant reçu de la bleomycine sont divisées en 3 groupes : le premier reçoit en intraveineuse du GDC-0152 à 15 mg/kg (Bleo GDC), le second du NaCl à 0,9% (Bleo NaCl) et le dernier du NaCl 0,9% combiné à la concentration de DMSO utilisée pour le GDC (Bleo DMSO). Les injections pour chaque groupe sont réalisées tous les deux jours. Les souris ont été euthanasiées le 21<sup>ème</sup> jour. B et C. Le collagène présent dans les poumons des souris a été évalué par Sircol (B) et rouge Sirius (C). D. cIAP1, TRAF2 ainsi que PAI-1 et  $\alpha$ -SMA ont été analysées par Western Blot dans les poumons des souris des groupes Bleo DMSO et Bleo GDC. L'HSC70 a été utilisée comme contrôle de charge. E. Le niveau relatif de cIAP1 a été évalué par une analyse densitométrique des Western Blot. Une étude corrélative entre le niveau de cIAP1 et la quantité de collagène a été ensuite réalisée. Le test de Student a été utilisé pour les analyses statistiques.

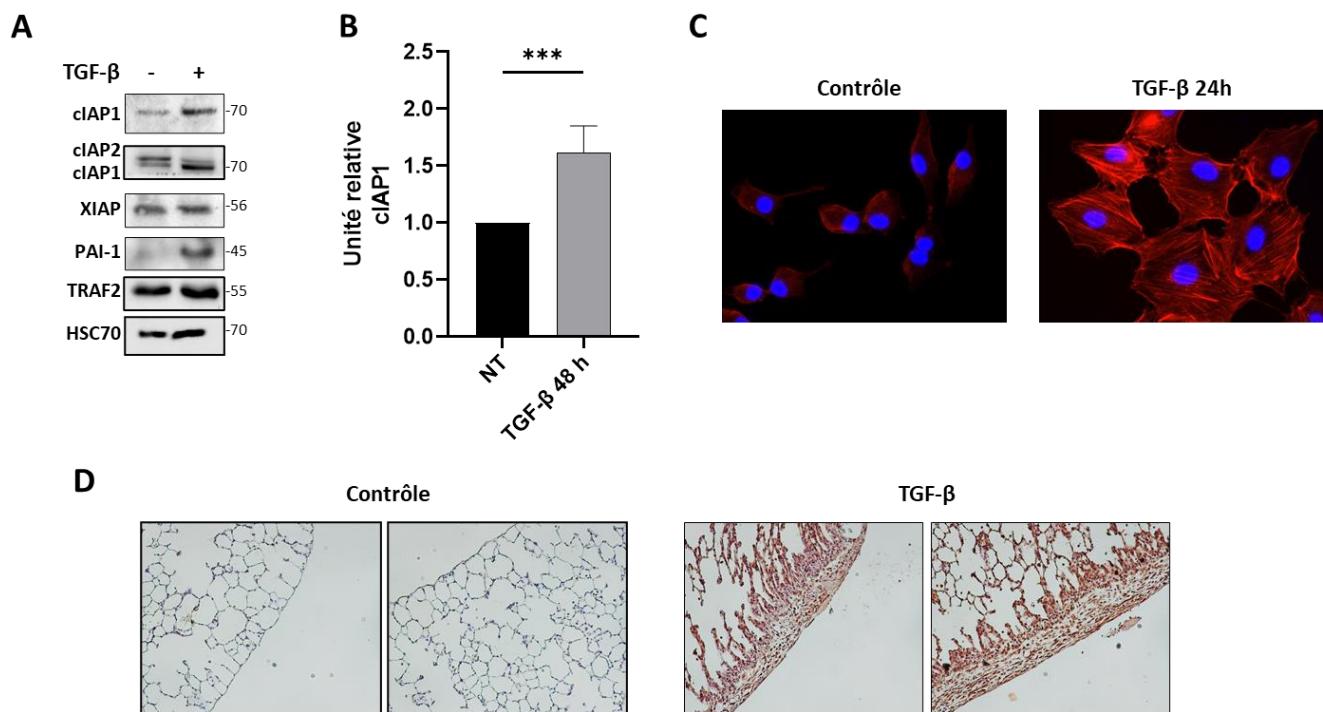
## B. Le TGF- $\beta$ provoque la surexpression de cIAP1

Les données précédentes nous ont poussé à nous demander de quelle manière les IAP, et en particulier cIAP1, affectent le développement de la fibrose pulmonaire. Un des principaux acteurs du développement de cette maladie est le TGF- $\beta$ . Par exemple, les protéines PAI-1 et  $\alpha$ -SMA sont principalement synthétisées en réponse à une stimulation au TGF- $\beta$  (Fernandez et Eickelberg, 2012). Son action dans cette pathologie a été développée dans la partie [V.G](#) de l'introduction. Nous

avons donc émis l'hypothèse que clAP1 pouvait être surexprimée en réponse au TGF- $\beta$  et pourrait ainsi réguler les processus cellulaires induits par ce dernier.

Afin de répondre à l'hypothèse émise précédemment, le premier objectif a été d'analyser l'expression de cIAP1 en réponse au TGF- $\beta$ . Les expressions de certaines IAP en réponse au TGF- $\beta$  ont été étudiées dans les cellules A549 après 24 et 48h de traitement. La lignée cellulaire A549 est une lignée d'adénocarcinome pulmonaire humaine couramment utilisée au sein du laboratoire. Sa réponse au TGF- $\beta$  est parfaitement connue par notre équipe de recherche et elle a donc été choisie pour la réalisation de ce projet. L'apparition de PAI-1 a été utilisée comme contrôle de l'activation des voies de signalisation du TGF- $\beta$ . Une augmentation significative du taux de cIAP1 a été détectée après 48h de traitement mais pas de cIAP2 et XIAP. La quantité de cIAP2 diminue même en réponse au TGF- $\beta$  (Figure 43 A et B). Une surexpression de cIAP1 est aussi observée en réponse au TGF- $\beta$  après 24h de traitement par immunofluorescence (Figure 43 C). Ces résultats ont été confirmés par marquage immunohistochimique de cIAP1, sur des coupes de poumons de souris développant une fibrose pulmonaire induite par une surexpression transitoire de TGF- $\beta$ , fournies par l'équipe du professeur Bonniaud. Les poumons malades présentent une forte surexpression de cIAP1 en comparaison des poumons sains (Figure 43 D).

Ces résultats mettent donc en avant une surexpression de ciAP1 au niveau génique mais aussi protéique, qui n'est pas observé pour les autres IAP, en réponse au TGF- $\beta$ .



**Figure 43 : Le TGF- $\beta$  induit la surexpression de cIAP1.** A. Les expressions de cIAP1, cIAP2, XIAP, PAI-1 et TRAF2 ont été contrôlées par Western Blot dans des cellules A549 traitées ou non avec du TGF- $\beta$  à 5 ng/mL pendant 48h. L'HSC70 a été utilisée comme contrôle de charge. B. Le niveau de cIAP1 a été évalué par une analyse densitométrique des Western Blot ( $n=5$ ). C. La protéine cIAP1 (marquage rouge) a été

analysée par immunofluorescence dans des A549 traitées ou non pendant 24h avec du TGF- $\beta$  à 5 ng/mL. Les noyaux sont colorés au DAPI (bleu). D. Un marquage immunohistochimique de cIAP1 a été réalisé sur des coupes de poumons de souris contrôle ou ayant développé une fibrose pulmonaire par surexpression du TGF- $\beta$  (TGF- $\beta$ ). Le test de Student a été utilisé pour les analyses statistiques.

## C. Le binôme cIAP1/TRAFF2 régule les processus biologiques médiés par le TGF- $\beta$

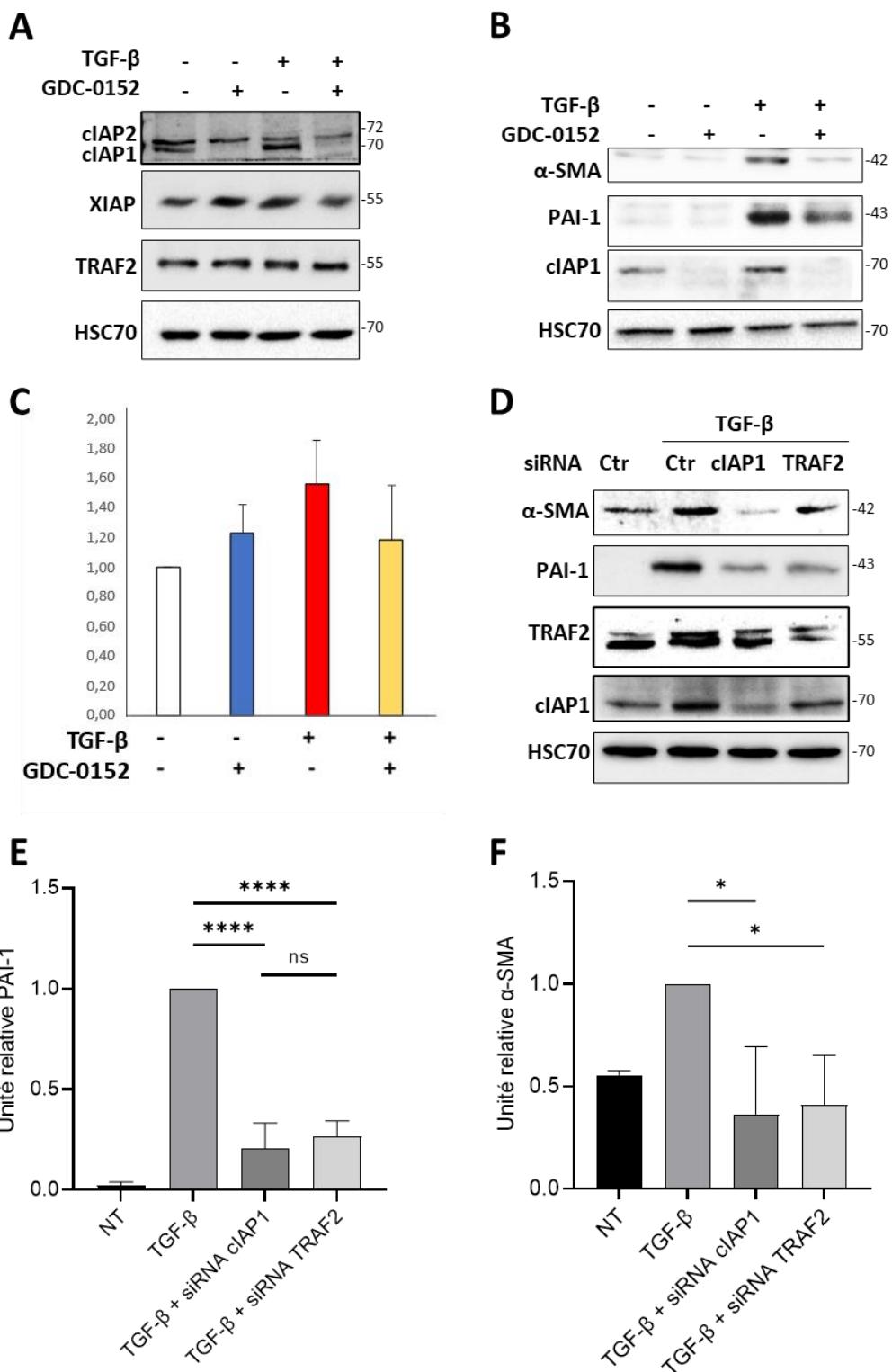
### 1. cIAP1 et TRAF2 régulent l'activité du TGF- $\beta$

Actuellement, aucun article de recherche n'a décrit un rôle de cIAP1 dans les processus cellulaires médiés par le TGF- $\beta$  (présentés dans la partie V de l'introduction). Pourtant, les résultats précédents suggèrent un rôle de cIAP1 dans ceux-là. L'objectif suivant a donc été d'analyser le rôle de cIAP1 dans ces processus cellulaires.

Afin d'étudier cela, le SMAC mimétique GDC-0152 a été utilisé sur les cellules A549. Ce dernier provoque bien la dégradation de cIAP1 mais n'a pas d'effet sur les quantités de cIAP2 et XIAP (Figure 44 A). Après 48h de traitement, la combinaison du GDC-0152 avec le TGF- $\beta$  inhibe l'augmentation des taux de PAI-1 et d' $\alpha$ -SMA observés avec un traitement au TGF- $\beta$  seul (Figure 44 B). De plus, des expériences de migration en « Transwell » ont confirmé l'action du GDC-0152, ce dernier inhibant la migration cellulaire induite par le TGF- $\beta$  (Figure 44 C). Les SMAC mimétiques peuvent se lier à XIAP et inhiber son activité sans induire sa dégradation (Bai, Smith et Wang, 2014). Il était donc nécessaire de confirmer que les effets observés étaient dépendants de cIAP1. Pour cela, les cellules A549 ont été traitées avec un siRNA ciblant cIAP1 suivi d'un traitement au TGF- $\beta$ . De la même manière que le GDC-0152, la perte de cIAP1 provoquée par le siRNA inhibe de manière significative l'accroissement du taux de PAI-1 et d' $\alpha$ -SMA en réponse au TGF- $\beta$  (Figure 44 D, E et F).

TRAFF2 est le partenaire principal de cIAP1, comme cela a été décrit précédemment dans l'introduction. Il était donc pertinent d'analyser le rôle de TRAF2 sur ces processus cellulaires. De façon très intéressante, l'inhibition de TRAF2 par un siRNA inhibe aussi de manière significative l'augmentation de PAI-1 et d' $\alpha$ -SMA. De plus, l'inhibition de TRAF2 diminue aussi le taux de cIAP1, ce qui pourrait s'expliquer par une inhibition de l'activation des voies du TGF- $\beta$ , bloquant ainsi la surexpression de cIAP1 (Figure 44 D, E et F). TRAF2 régule donc aussi les processus cellulaires médiés par le TGF- $\beta$ .

Ces résultats démontrent pour la première fois la capacité de cIAP1 à réguler les processus biologiques médiés par le TGF- $\beta$ . Ils ont de plus mis en avant un rôle de TRAF2 dans l'activité du TGF- $\beta$ . De ce fait, nous avons émis l'hypothèse que cIAP1 régule l'action du TGF- $\beta$  par l'intermédiaire de son interaction avec TRAF2.



**Figure 44 : La déplétion de cIAP1 inhibe les processus cellulaires médiés par le TGF- $\beta$ .** A. Les protéines de la famille des IAP (cIAP1, cIAP2 et XIAP) et TRAF2 ont été analysées par Western Blot dans des cellules A549 traitées ou non pendant 48h avec du TGF- $\beta$  à 5 ng/mL et/ou du GDC-0152 à 5  $\mu$ M. Le GDC-0152 a été ajouté 30 minutes avant le TGF- $\beta$ . B.  $\alpha$ -SMA et PAI-1, deux protéines synthétisées en réponse au TGF- $\beta$ , ont aussi été analysées par Western Blot dans les mêmes conditions que précédemment. C. La migration de cellules A549 traitées pendant 48h avec du GDC-0152 à 5  $\mu$ M et/ou du TGF- $\beta$  à 5 ng/mL a été suivie par Transwell. Le GDC-0152 a été ajouté 30 minutes avant le TGF- $\beta$ . D. L'effet du TGF- $\beta$ , utilisé à 5 ng/mL pendant 48h, sur des cellules A549 dont les expressions de cIAP1 ou TRAF2 ont été inhibées par des siRNA, a été

étudié par Western Blot. Pour l'ensemble des Western Blot, HSC70 a été utilisée comme contrôle de charge. E et F. Les niveaux de PAI-1 et  $\alpha$ -SMA ont été évalués par une analyse densitométrique des Western Blot ( $n=4$  pour PAI-1 et  $n=3$  pour  $\alpha$ -SMA). Le test de Student a été utilisé pour les analyses statistiques.

## 2. L'action de cIAP1 sur les effets du TGF- $\beta$ est dépendante de son interaction avec TRAF2 et de son activité E3 ubiquitine ligase

cIAP1 et TRAF2 régulent ensemble de nombreuses voies de signalisation, comme cela a été présenté dans la partie **IV** de l'introduction. Il ne serait donc pas étonnant que les effets observés précédemment sur les processus cellulaires médiés par le TGF- $\beta$  soient dépendants de leur interaction. Afin de confirmer cette hypothèse, le modèle de MEF immortalisées par l'oncogène H-Ras V12 et DKO pour cIAP1 et cIAP2 et développé précédemment dans notre équipe a été utilisé. Ces dernières ont été traitées 24 et 48h avec du TGF- $\beta$ . Comme attendu, le traitement des MEF WT provoque la synthèse de PAI-1 et  $\alpha$ -SMA dès 24h et cet effet est accru à 48h. L'absence de cIAP1 et cIAP2 dans les MEF DKO inhibe cet effet, confirmant les résultats obtenus sur la lignée cellulaire A549 (Figure 45 A). Dans le but d'analyser le rôle de l'interaction entre cIAP1 et TRAF2 dans ces effets, cIAP1 ou le mutant cIAP1  $\Delta$ BIR1, incapable d'interagir avec TRAF2, ont été surexprimés de façon transitoire dans les MEF DKO suivi d'un traitement de 48h au TGF- $\beta$ . L'expression de cIAP1 rétablit l'augmentation de PAI-1 et  $\alpha$ -SMA en réponse au TGF- $\beta$ , mais la déplétion de son domaine BIR1 et donc de son interaction avec TRAF2 inhibe cet effet (Figure 45 B). Ces résultats ont été confirmés dans les lignées MEF DKO exprimant de façon stable cIAP1 ou les mutants cIAP1 $\Delta$ BIR1 ou cIAP1-L47A, incapables d'interagir avec TRAF2 (Figure 45 C). L'effet de cIAP1 sur les processus cellulaires est donc bien dépendant de son interaction avec TRAF2, confirmant ainsi notre hypothèse.

cIAP1 régule de nombreuses voies de signalisation par son activité E3 ubiquitine ligase comme cela a été décrit dans la partie **IV** de l'introduction. Son action sur les processus cellulaires médiés par le TGF- $\beta$  pourrait donc aussi être dépendante de cette activité. Le rôle de cette dernière a été analysé en exprimant de façon transitoire le mutant de cIAP1 H588A dans le modèle de MEF DKO. Une mutation dans le domaine RING de l'histidine 588 en alanine, responsable de la coordination d'un atome de zinc nécessaire à l'intégrité de la structure, bloque son activité E3 ubiquitine ligase (Yang *et al.*, 2000). De la même manière que le mutant n'arborant pas le domaine BIR1, l'expression du mutant H588A, bloque l'effet de cIAP1 sur PAI-1 et  $\alpha$ -SMA en réponse au TGF- $\beta$  (Figure 45 B).

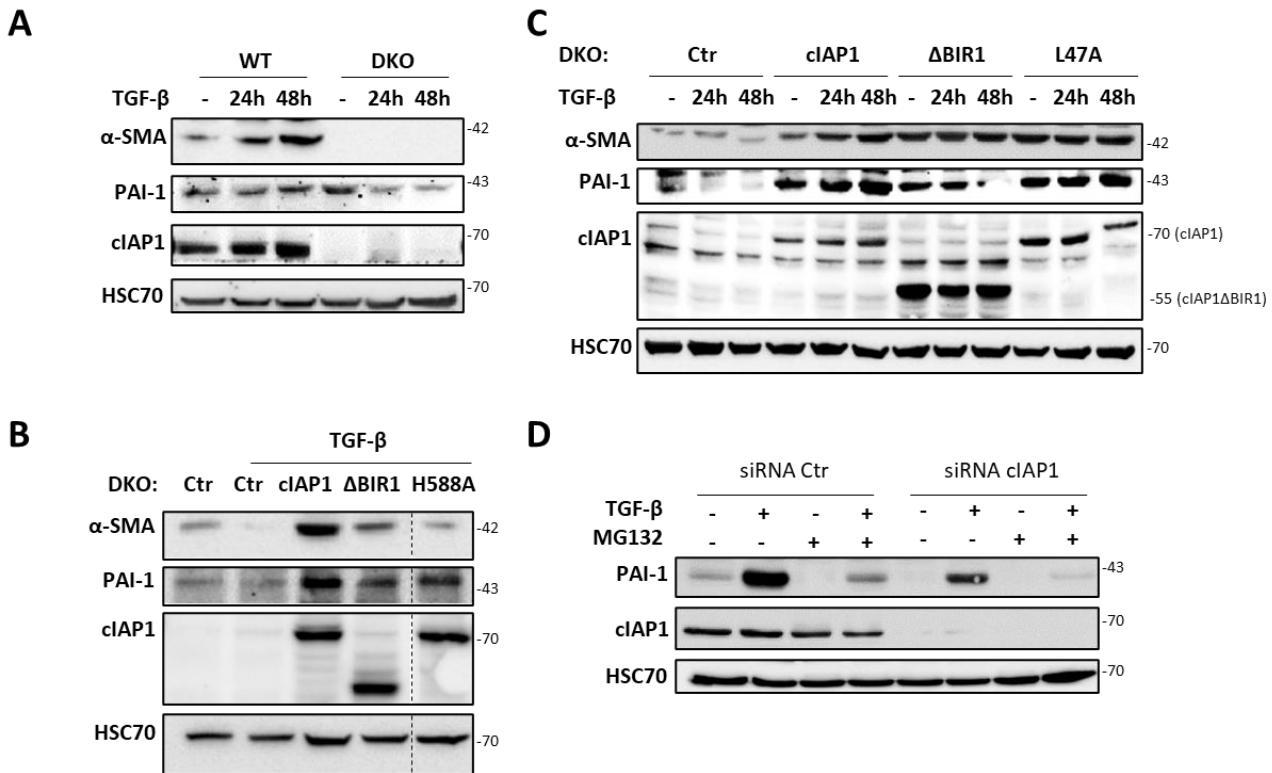
L'action de cIAP1 sur l'activité du TGF- $\beta$  est donc dépendante à la fois de son interaction avec TRAF2 et de son activité E3 ubiquitine ligase.

### **3. Le système ubiquitine/protéasome régule les processus cellulaires médiés par le TGF-β**

Un des principaux systèmes mettant en jeu les processus d'ubiquitination est le système ubiquitine/protéasome. La protéine jouant le rôle d'E3 ligase promeut l'ubiquitination, en général de type K48, de sa cible et promeut ainsi sa dégradation par le protéasome. Ce système a été introduit dans la partie II de l'introduction. Or, les résultats précédents démontrent que l'activité E3 ubiquitine ligase de cIAP1 joue un rôle dans la régulation de la signalisation du TGF-β. Il est donc tout à fait possible que cIAP1 induise l'ubiquitination de certains de ses partenaires et provoque ainsi leur dégradation afin de promouvoir la signalisation du TGF-β. Des cellules A549 ont été transfectées avec un siRNA ciblant cIAP1. Elles ont ensuite été traitées avec du TGF-β et/ou du MG132, un inhibiteur du protéasome, pendant 48h. De la même manière que le siRNA ciblant cIAP1, le MG132 abolit l'augmentation de PAI-1 médiée par le TGF-β mais de manière plus importante que le siRNA. L'effet est même accru lorsque le MG132 est combiné avec le siRNA ciblant cIAP1, démontrant un effet synergique entre les deux traitements. Les résultats obtenus ne permettent pas, en revanche, de déterminer si c'est un effet synergique additif ou potentialisateur (Figure 45 D).

L'inhibition du protéasome bloque les processus cellulaires médiés par le TGF-β. Il est donc tout à fait possible que l'effet de cIAP1 soit dépendant du système ubiquitine/protéasome. Les résultats obtenus ne permettent pas en revanche d'assurer avec certitude un rôle de ce système dans les propriétés de cIAP1. Il serait par exemple nécessaire de surexprimer cIAP1, et démontrer que le MG132 est capable de bloquer l'effet de cette surexpression, afin de confirmer le rôle du système ubiquitine/protéasome dans l'action de cIAP1.

L'ensemble de ces résultats montre donc que le rôle de cIAP1 sur la régulation de l'activité du TGF-β est dépendante de son interaction avec TRAF2 et de son activité E3 ubiquitine ligase.



**Figure 45 : Le rôle de clAP1 sur les processus biologiques médiés par le TGF- $\beta$  est dépendant de son interaction avec TRAF2 et de son activité E3 ubiquitine ligase.** A. Des MEF H-Ras V12 double KO pour clAP1 et clAP2 (DKO) ou non (WT) ont été traitées 24h ou 48h avec du TGF- $\beta$  à 5 ng/mL. L'effet de ce dernier a été analysé par Western Blot. B. L'action du TGF- $\beta$ , utilisé à 5 ng/mL pendant 48h, sur des MEF DKO surexprimant de façon transitoire clAP1 ou des mutants de clAP1 a été analysée par Western Blot. Le mutant  $\Delta$ BIR1 ne peut pas interagir avec TRAF2 et le mutant H588A ne possède pas d'activité E3 ubiquitine ligase. C. La même analyse a été réalisée sur des lignées de MEF DKO exprimant de façon stable clAP1 ou les mutants  $\Delta$ BIR1 et L47A de clAP1. Le mutant L47A possède une mutation bloquant son interaction avec TRAF2. D. L'effet du MG132 à 1  $\mu$ M, un inhibiteur du protéasome, sur les conséquences d'une stimulation au TGF- $\beta$  à 5 ng/mL pendant 48h sur des A549 a été examiné par Western Blot. Ces dernières ont été préalablement transfectées avec un siRNA contrôle ou ciblant clAP1. Le MG132 a été ajouté 30 minutes avant le TGF- $\beta$ . L'HSC70 est utilisée comme contrôle de charge.

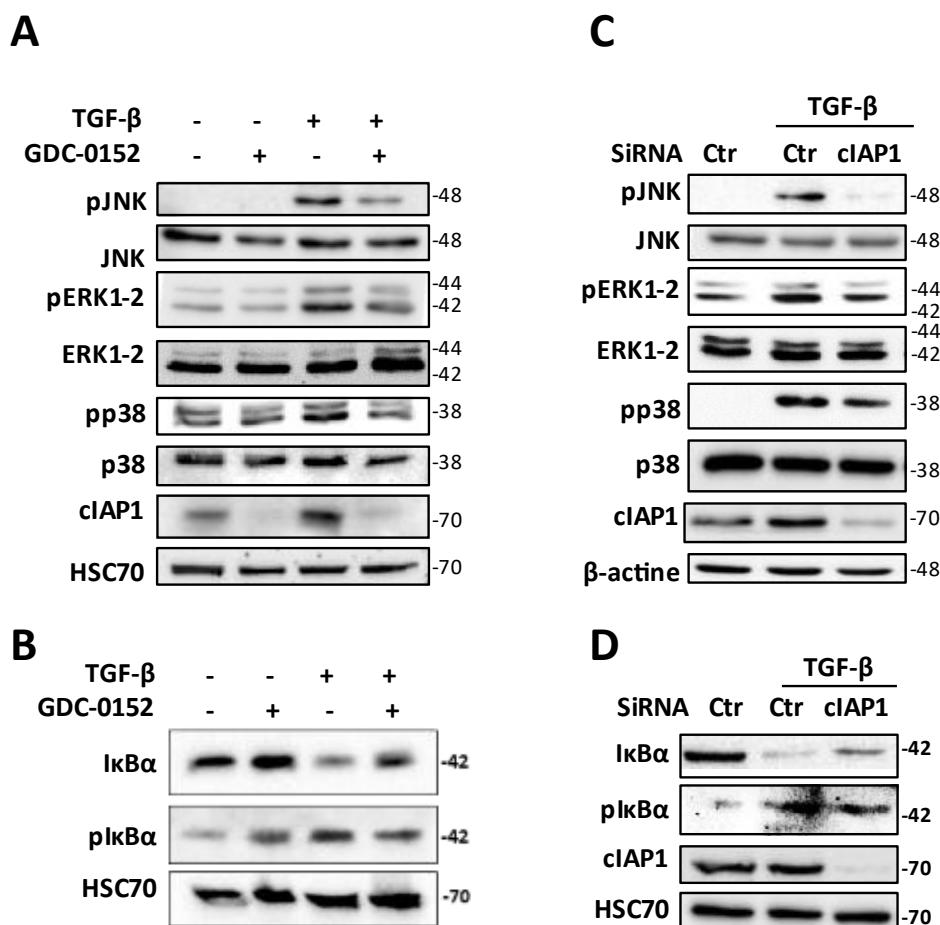
## D. clAP1 régule les voies canoniques et alternatives du TGF- $\beta$

### 1. clAP1 est nécessaire à l'activation des MAPK et NF- $\kappa$ B par le TGF- $\beta$

Le rôle de clAP1 dans la régulation des processus cellulaires médiés par le TGF- $\beta$  a été confirmé précédemment. Ces derniers sont médiés par les voies de signalisation canonique et alternatives du TGF- $\beta$  (partie [V.D](#) de l'introduction). Par exemple, l'expression de PAI-1 et  $\alpha$ -SMA a au départ été associée à la voie de signalisation canonique du TGF- $\beta$  (Dennler *et al.*, 1998; Hu, Wu et Phan, 2003). Or, il a aussi été montré que les voies de signalisation alternatives peuvent induire l'expression de ces protéines (C. Yang *et al.*, 2007; Sebe *et al.*, 2008). Nous avons donc émis l'hypothèse que clAP1 était capable de réguler l'activation de voies de signalisation canonique ou alternatives du TGF- $\beta$ . Pour analyser l'activation des voies alternatives du TGF- $\beta$ , des cellules A549

ont été traitées pendant 48h avec du TGF- $\beta$  et/ou du GDC-0152. Le TGF- $\beta$  induit la phosphorylation activatrice des MAPK ERK1/2, JNK et p38 et cet effet est bloqué par le traitement au GDC-0152 (Figure 46 A). Le TGF- $\beta$  provoque aussi la phosphorylation de I $\kappa$ B $\alpha$ , menant à sa dégradation et à l'activation de NF- $\kappa$ B, et cette action est aussi inhibée par ce traitement (Figure 46 B). Le GDC-0152 est donc capable de bloquer l'activation de certaines voies alternatives de signalisation médiées par le TGF- $\beta$ . Afin de confirmer le rôle de cIAP1 sur cet effet, un siRNA ciblant cIAP1 a été utilisé, suivi d'un traitement au TGF- $\beta$ . La déplétion de cIAP1 par ce siRNA diminue l'activation des MAPK ERK1/2, JNK et p38 en réponse au TGF- $\beta$  (Figure 46 C). De plus, elle bloque aussi l'activation de la voie NF- $\kappa$ B (Figure 46 D).

Ces résultats démontrent donc que cIAP1 est capable de réguler l'activation de plusieurs voies de signalisation alternatives du TGF- $\beta$ .

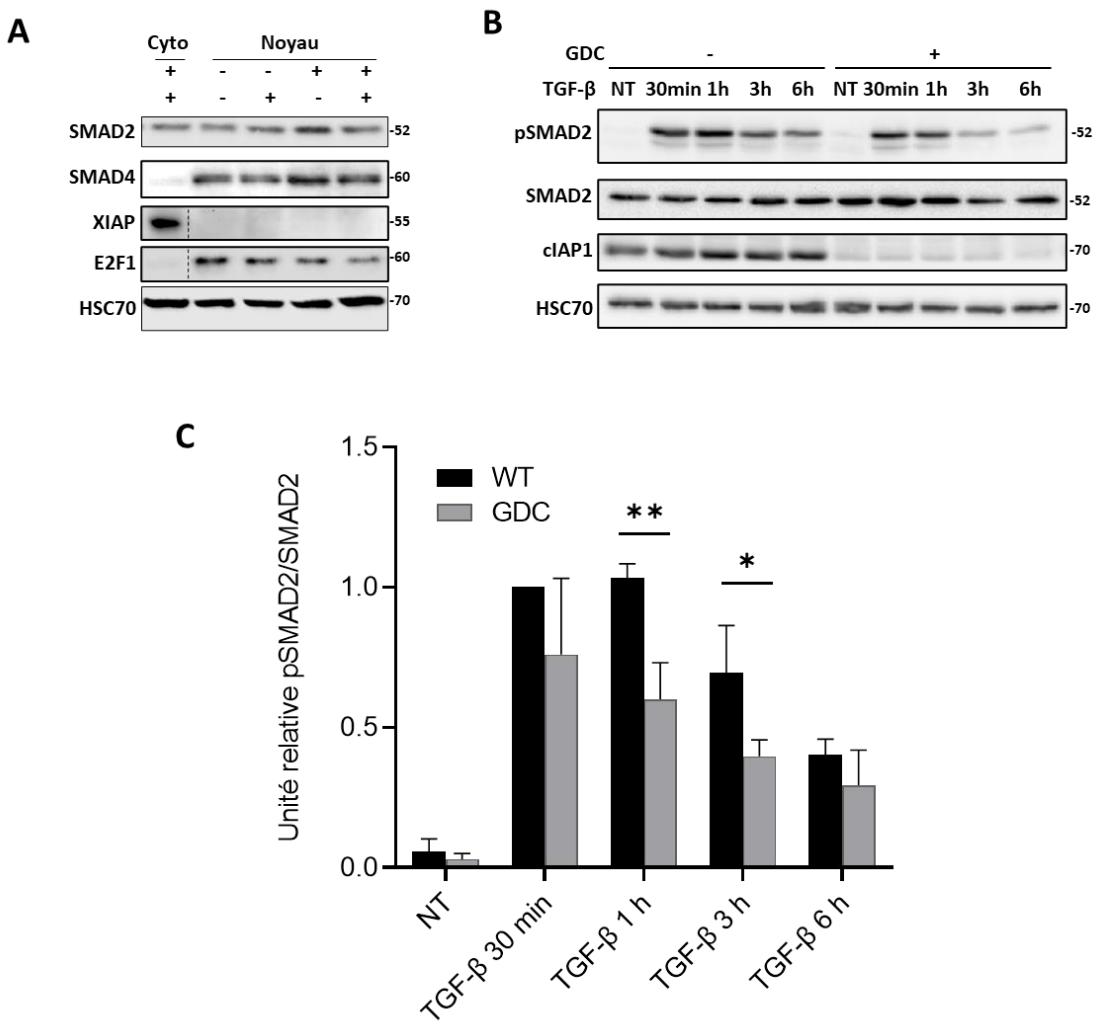


**Figure 46 : cIAP1 régule l'activation des voies alternatives du TGF- $\beta$ .** A et B. L'activation des MAPK (JNK, p38 et ERK1/2) (A) et de NF- $\kappa$ B (B) a été observée par Western Blot dans des cellules A549 traitées avec du TGF- $\beta$  à 5 ng/mL et/ou du GDC-0152 à 5  $\mu$ M pendant 48h. Le GDC-0152 a été ajouté 30 minutes avant le TGF- $\beta$ . C et D. Les mêmes protéines que précédemment ont été étudiées en réponse au TGF- $\beta$  à 5 ng/mL pendant 48h dans des cellules A549 dont l'expression de cIAP1 a été inhibée par un siRNA. L'HSC70 et la  $\beta$ -actine ont été utilisées comme contrôles de charge.

## **2. cIAP1 régule l'activation de la voie canonique du TGF-β**

Afin d'étudier la voie canonique du TGF-β, un fractionnement cytoplasme/noyau a été réalisé sur des cellules A549 traitées ou non au TGF-β et/ou du GDC-0152 pendant 48h. Le traitement au TGF-β accroît la translocation de SMAD2 et 4 dans le noyau. L'ajout du GDC-0152 inhibe en partie cette translocation. cIAP1 semble donc pouvoir aussi réguler la voie canonique du TGF-β (Figure 47 A). Pour confirmer ces résultats, une cinétique courte de TGF-β, allant de 30 minutes et 6h a été réalisée, en présence ou non de GDC-0152. L'activation par phosphorylation de la protéine SMAD2 à la suite d'une stimulation au TGF-β est rapide et est donc plus facilement observable à des temps de traitement courts (Xu, 2006). Le TGF-β provoque une forte augmentation de la phosphorylation de SMAD2 jusqu'à 1h puis diminue jusqu'à 6h. De manière très intéressante, le GDC-0152 ne bloque que très peu l'activation de la protéine SMAD2 à 30 minutes. En revanche, il diminue de manière significative cette activation à 1h et 3h. De plus, l'augmentation de la quantité de cIAP1 en réponse au TGF-β est détectée très tôt, dès 30 minutes, pouvant s'expliquer par une surexpression très rapide de cIAP1 en réponse au TGF-β (Figure 47 B et C). cIAP1 est donc aussi capable de réguler la voie canonique du TGF-β.

L'ensemble de ces résultats démontre donc que cIAP1 régule à la fois la voie de signalisation canonique du TGF-β mais aussi les voies de signalisation alternatives de ce dernier.



**Figure 47 : cIAP1 régule la voie de signalisation canonique du TGF- $\beta$ .** A. Un fractionnement cytoplasme/noyau a été réalisé sur des cellules A549 traitées ou non avec du TGF- $\beta$  à 5 ng/mL et/ou du GDC-0152 à 5  $\mu$ M pendant 48h. La phosphorylation ainsi que la translocation dans le noyau de SMAD2 ont été analysées par Western Blot. E2F1 a été utilisée comme contrôle nucléaire et XIAP comme contrôle cytoplasmique. B. Une cinétique courte de TGF- $\beta$  à 5 ng/mL, allant de 30 minutes à 6h, a été réalisée sur des cellules A549 préalablement traitées ou non avec du GDC-0152. La phosphorylation de SMAD2 a été analysée par Western Blot. L'HSC70 a été utilisée comme contrôle de charge. C. Le ratio pSMAD2/SMAD2 a été quantifié par une analyse densitométrique des Western Blot ( $n=3$ ). Le test de Student a été utilisé pour les analyses statistiques.

## E. cIAP1 interagit avec les récepteurs au TGF- $\beta$ et régule leur quantité à la membrane

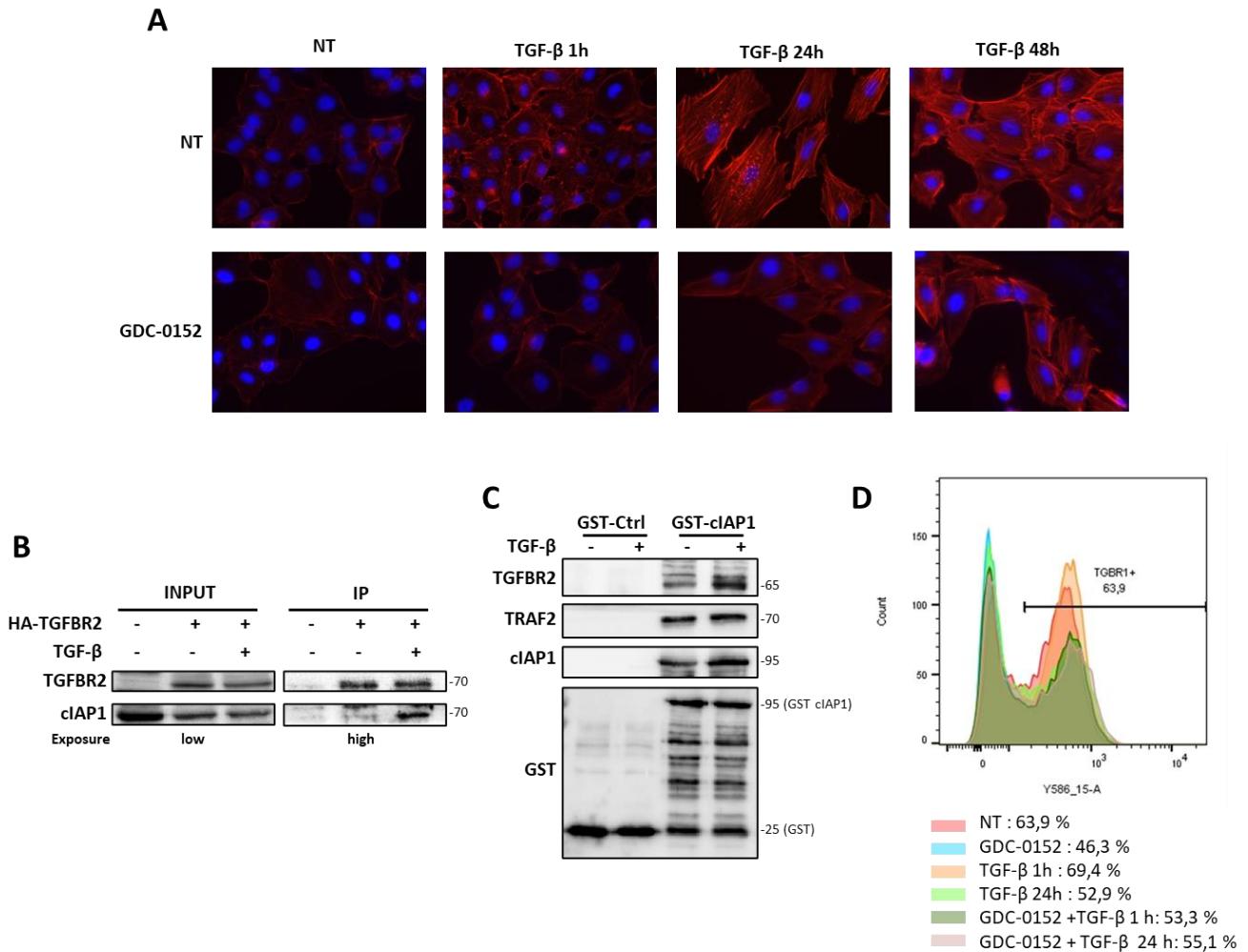
cIAP1 et TRAF2 interagissent avec certains récepteurs de la famille du TNFR ou certains PRR afin de réguler leur signalisation. Ces effets ont été présentés dans la partie **IV** de l'introduction. De plus, les résultats précédents démontrent que cIAP1 est capable de réguler à la fois les voies de signalisation canonique et alternatives du TGF- $\beta$ . De ce fait, nous avons émis l'hypothèse que cIAP1 et TRAF2 étaient capable de réguler l'activité des récepteurs du TGF- $\beta$ . Afin d'étudier cette hypothèse, une immunofluorescence avec un simple marquage de TRAF2 a été réalisée sur des

A549 traitées ou non avec du TGF- $\beta$  pendant 1h, 24h ou 48h en présence ou non de GDC-0152. La stimulation pendant 1h des A549 provoque une accumulation de TRAF2 à la membrane. À 24 et 48h, le marquage de TRAF2 est plus important mais est aussi plus diffus, n'étant pas retrouvé uniquement à la membrane. L'augmentation de la quantité de TRAF2 en réponse au TGF- $\beta$  n'est pas observée en *Western Blot*. Ces résultats peuvent donc s'expliquer par une agrégation de TRAF2 ou un changement de conformation exposant l'épitope reconnu par l'anticorps. Le co-traitement avec le GDC-0152 inhibe complètement ces effets. TRAF2 ne se trouve plus à la membrane après 1h de traitement et le marquage n'est pas accru à 24 et 48h. (Figure 48 A). Ces résultats suggèrent que TRAF2 est rapidement recruté à la membrane plasmique en réponse au TGF- $\beta$  et que cet effet est dépendant de cIAP1.

Afin de démontrer une interaction entre le récepteur TGFBR2 et cIAP1, le récepteur TGFBR2 a été surexprimé de façon transitoire dans des A549, couplé à un tag HA. Ces cellules ont ensuite été traitées ou non avec du TGF- $\beta$  pendant 1h. Une co-immunoprecipitation du tag HA a été réalisée et les présences de cIAP1 et du TGFBR2 ont été analysées par *Western Blot*. Le TGFBR2 n'est quasiment pas détecté dans l'*input*, correspondant aux cellules non transfectées. Cela s'explique probablement par une expression trop faible en comparaison avec les cellules le surexprimant, rendant difficile sa détection en *Western Blot*. En absence de stimulation, cIAP1 n'est pas détectée mais à la suite d'une stimulation d'1h au TGF- $\beta$ , elle est observée après co-immunoprecipitation. cIAP1 semble donc interagir avec le récepteur TGFBR2 après une stimulation au TGF- $\beta$  (Figure 48 B). Afin de confirmer ces résultats, une protéine GST-cIAP1 a été produite et une expérience de *GST pull-down* a été réalisée avec des lysats de A549 traitées ou non au TGF- $\beta$  pendant 1h. Lorsque la protéine cIAP1-GST est incubée avec un lysat cellulaire non traité, le récepteur TGFBR2 n'est quasiment pas détecté. À l'inverse, le taux de TGFBR2 interagissant avec cIAP1 est bien plus important lorsque le GST-cIAP1 est incubé avec le lysat cellulaire traité 1h avec du TGF- $\beta$  (Figure 48 C). cIAP1 interagit donc avec le récepteur TGFBR2 à la suite d'une stimulation au TGF- $\beta$ .

Les résultats précédents ont démontré que cIAP1 interagit avec le TGFBR2 et régule la voie canonique du TGF- $\beta$  1h après stimulation par ce dernier. Une explication plausible pour expliquer ces résultats serait que cIAP1 est recrutée au niveau du TGFBR2 afin de favoriser le recyclage des récepteurs et accroître la réponse au TGF- $\beta$ . Les mécanismes de recyclage des récepteurs ont été développés dans la partie [V.E.1](#) de l'introduction. Le rôle de cIAP1 sur l'adressage du récepteur TGFBR1 à la membrane a donc été analysé par cytométrie en flux. Des A549 ont été traitées ou non avec du TGF- $\beta$  pendant 1 ou 24h en présence ou non de GDC-0152, le récepteur TGFBR1 à la membrane a été marqué et les cellules ont été analysées par cytométrie en flux. Le nombre de cellules exprimant le récepteur à la membrane augmente fortement en réponse au TGF- $\beta$  après 1h mais retourne à un niveau basal après 24h. La combinaison avec le GDC diminue fortement le nombre de cellules positives que ce soit en absence ou après 1h de stimulation (Figure 48 C). cIAP1 régule donc la quantité de récepteurs TGFBR1 à la membrane à l'état basal et en réponse au TGF-

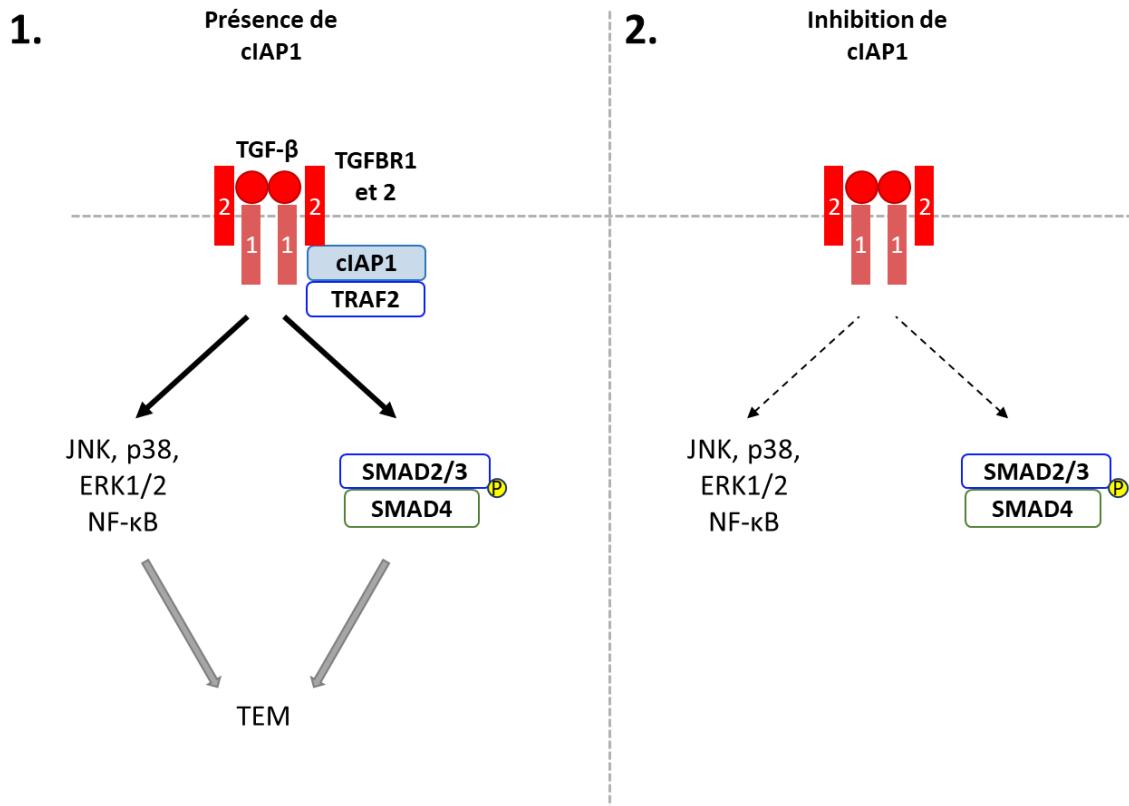
$\beta$ , ce qui pourrait s'expliquer par un rôle de cIAP1 sur le recyclage des récepteurs. cIAP1 est donc capable de se lier au récepteur TGFRB2 et de réguler le taux de TGFRB1 exprimé à la surface de la cellule.



**Figure 48 : cIAP1 interagit avec le récepteur TGFRB2 à la suite d'une stimulation au TGF- $\beta$ . A. Des cellules A549 ont été traitées avec du TGF- $\beta$  à 5 ng/mL et/ou du GDC à 5  $\mu$ M pendant 1h, 24h ou 48h. Le GDC-0152 a été ajouté 30 minutes avant le TGF- $\beta$ . TRAF2 a été analysée par immunofluorescence (rouge). Les noyaux ont été marqués par DAPI (bleu). B. Le récepteur TGFRB2 marqué avec un tag HA a été surexprimé de façon transitoire dans des cellules A549. Ces dernières ont ensuite été stimulées ou non au TGF- $\beta$  pendant 1h à 5 ng/mL. Une immunoprécipitation du tag HA a été réalisée et la présence de cIAP1 a été analysée par Western Blot. C. Des protéine GST-cIAP1 et GST contrôle (GST-ctrl) ont été produites. Un GST pull-down a ensuite été réalisé avec des lysats de A549 non traitées ou traitées 1h avec du TGF- $\beta$ . Le récepteur TGFRB2 a ensuite été détecté par Western Blot. TRAF2 a été utilisée comme contrôle d'interaction avec cIAP1. D. Des A549 ont été prétraitées ou non pendant 30 minutes avec du GDC-0152 suivi d'un traitement de 1h ou 24h avec du TGF- $\beta$ . La proportion de cellules exprimant le récepteur TGFRB1 à la membrane a été analysée.**

Ces travaux ont, dans un premier temps, démontré une surexpression de cIAP1 dans des cas de fibrose pulmonaire. De plus, le SMAC mimétique GDC-0152 présente des effets curatifs sur le développement de la fibrose pulmonaire. Une surexpression de cIAP1 a été observée en réponse au TGF- $\beta$ .

Ces travaux mettent en évidence pour la première fois un rôle de cIAP1, dépendant de son activité E3 ubiquitine ligase et de son interaction avec TRAF2, dans la régulation des voies de signalisation canonique et alternatives du TGF- $\beta$ . cIAP1 peut interagir avec le récepteur TGFBR2 du TGF- $\beta$  et régule le taux de TGFBR1 exprimé à la membrane (Figure 49).



**Figure 49 : cIAP1 régule l'activation des voies de signalisation du TGF- $\beta$ .** 1. La stimulation des récepteurs du TGF- $\beta$  provoque le recrutement de cIAP1 et TRAF2 au niveau du TGFBR2. Ces derniers stimulent l'activation des voies canonique et alternatives du TGF- $\beta$ , menant à différents processus cellulaires tels que des processus de TEM. 2. L'inhibition de cIAP1 conduit à une forte diminution de l'activation de ces voies de signalisation et donc des processus cellulaires impliqués.

Nous avons émis l'hypothèse que cIAP1 régule l'endocytose et le recyclage des récepteurs. Le prochain objectif de ces travaux sera donc de confirmer le rôle de cIAP1 dans ces processus. Une stagiaire de Master 2 Recherche travaille actuellement sur ce sujet. Il est aussi nécessaire de déterminer si l'interaction entre cIAP1 et le TGFBR2 est directe ou indirecte, par exemple par le biais de TRAF2. Il a de plus été déterminé que l'effet de cIAP1 dans la signalisation du TGF- $\beta$  est dépendant de son activité E3 ubiquitine ligase. Il serait donc capital d'approfondir le rôle de cette activité dans la régulation de ces voies.

Pour terminer, les résultats obtenus ont démontré que le GDC-0152 provoque uniquement la dégradation de cIAP1 mais pas des autres IAP. Il peut en revanche se fixer à XIAP et cIAP2 par exemple et inhibiter ainsi leur activité. Il est donc important de confirmer que les résultats obtenus sur le modèle murin de fibrose pulmonaire induite par la bléomycine soient bien liés à cIAP1 et à son interaction avec TRAF2. Il pourrait être très intéressant de développer des inhibiteurs spécifiques

de l'interaction entre cIAP1 et TRAF2. Ils permettraient de cibler spécifiquement cIAP1 sans pour autant inhiber XIAP et cIAP2 comme le font les SMAC mimétiques. Ces inhibiteurs pourraient ainsi être utilisés dans le modèle murin de fibrose pulmonaire induite à la bléomycine afin de confirmer l'importance de cIAP1 et de son interaction avec TRAF2 dans les résultats obtenus. Le développement de ces inhibiteurs est en cours et est réalisé par Manon Paccagnini, une doctorante en première année de thèse présente au sein de l'équipe.

## **IV. Discussion sur le rôle de cIAP1 dans la fibrose pulmonaire et les voies de signalisation médiées par le TGF-β**

### **A. Les IAP dans la fibrose**

L'étude de la puce à ADN GSE110147, et du modèle de fibrose pulmonaire induite à la bléomycine, a démontré une surexpression de cIAP1 dans les poumons de patients atteints de FPI et chez les souris atteintes de fibrose pulmonaire, suggérant un rôle de cIAP1 dans le développement de cette pathologie. Ces observations sont en accord avec les résultats obtenus par l'équipe de Horowitz (Ashley *et al.*, 2016). Cette dernière a décrit une surexpression de cIAP1 dans ce modèle murin. cIAP1 est surexprimée dans de nombreux types de cancers différents et sa surexpression est souvent associée à un mauvais pronostic. Pour autant, la surexpression de cIAP1 n'a pour l'instant pas été que très peu décrite dans d'autres pathologies chez l'Homme.

L'utilisation du SMAC mimétique GDC-0152 sur le modèle de fibrose pulmonaire induit à la bléomycine a inhibé l'apparition de la maladie ainsi que le développement de cette dernière, soutenant l'hypothèse d'un rôle de cIAP1 dans le développement de la fibrose pulmonaire. Les mêmes résultats ont été observés avec un autre SMAC mimétique, le Debio 1147 par Ashley *et al.* Les auteurs ont associé cet effet à un rôle de XIAP. Pourtant, la déplétion de XIAP dans ce modèle d'étude n'avait pas eu d'effet sur le développement de la maladie. Ils ont en revanche détecté une surexpression de cIAP1 et cIAP2 et ont donc conclu que ces dernières compensaient l'absence de XIAP (Ashley *et al.*, 2016). Nos résultats n'excluent pas un rôle de XIAP dans cette pathologie mais suggèrent plutôt un rôle de cIAP1. En effet, le GDC-0152 a provoqué la dégradation de cIAP1 sans moduler le taux de XIAP. Le GDC-0152 est plus affin pour cIAP1 que pour XIAP (17 nM contre 28 nM). De plus, il a été démontré que le GDC-0152 pouvait provoquer la dégradation de XIAP (Tchoghandjian *et al.*, 2016; Campbell *et al.*, 2018), ce que nous n'observons pas ici. Il est donc possible que le GDC-0152 n'ait pas bloqué l'activité de XIAP dans notre étude et que nos observations soient liées à cIAP1. Il sera donc important de confirmer l'implication directe de cIAP1 dans la fibrose pulmonaire. La mise en place d'un modèle murin KO pour cIAP1 ou d'inhibiteurs ciblant uniquement cIAP1 permettront de répondre à cette hypothèse.

cIAP2 est aussi ciblé par les SMAC mimétiques. Il pourrait donc aussi être impliqué dans le développement de la fibrose pulmonaire. Pourtant, son affinité pour le GDC-0152 est encore plus faible (43 nM). De plus, nous n'avons pas réussi à le détecter dans nos poumons, ce qui n'est pas surprenant. En effet, cIAP1 est exprimée dans l'ensemble des tissus humains sans aucune spécificité. À l'inverse, cIAP2 est absente ou très peu exprimée dans la majorité des tissus. Elle est principalement retrouvée dans les tissus lymphoïdes, le système urinaire et l'appareil digestif et est très faiblement exprimée dans les poumons (Zadoroznyj et Dubrez, 2022). Il est donc probable que

l'effet des SMAC mimétiques sur le développement de la fibrose pulmonaire ne soit pas dépendant de cIAP2.

Les effets observés des SMAC mimétiques sur le développement de la fibrose pulmonaire font des IAP de nouvelles cibles intéressantes pour lutter contre le développement de la maladie. Les traitements actuels ne permettent que de ralentir la maladie mais n'induisent pas sa guérison. Il pourrait donc être très intéressant de mettre en place des essais cliniques utilisant les SMAC mimétiques, seuls ou en combinaison avec d'autres traitements, afin d'évaluer leur potentiel thérapeutique sur la fibrose pulmonaire chez l'homme.

## B. Le rôle de cIAP1 et TRAF2 dans l'action du TGF- $\beta$

### 1. L'expression cellulaire des IAP médiée par le TGF- $\beta$

L'équipe de Horowitz a observé une surexpression génique de cIAP1, cIAP2 et XIAP dans des fibroblastes et des fibrocytes murins stimulés au TGF- $\beta$ . Nous avons étudié l'expression des protéines. Nos résultats ont démontré une augmentation de la quantité de cIAP1 en réponse au TGF- $\beta$  mais pas de cIAP2 et XIAP. Une diminution de la quantité de cIAP2 est même observée. Mais alors comment expliquer que la quantité d'XIAP et de cIAP2, pourtant surexprimées au niveau génique en réponse au TGF- $\beta$ , ne varie pas ou diminue ? Mon hypothèse actuelle est basée sur la capacité de cIAP1 à réguler négativement, de façon post-transcriptionnelle, le niveau de cIAP2 mais aussi de XIAP. En effet, cIAP1 est capable d'induire l'ubiquitination de cIAP2 et XIAP menant à leur dégradation par le protéasome (Conze *et al.*, 2005; Silke *et al.*, 2005b). La surexpression de cIAP1 pourrait donc accroître le taux de cIAP2 et XIAP ubiquitiné puis dégradé de cette manière, induisant ainsi une diminution de leur quantité malgré leur surexpression. Cette hypothèse pourrait aussi expliquer les résultats obtenus. Le TGF- $\beta$  est impliqué dans le développement de la fibrose pulmonaire, comme cela a été décrit dans la partie [V.G](#) de l'introduction. Il est donc tout à fait possible que la surexpression de cIAP1 détectée chez les patients et les souris atteintes de fibrose pulmonaire soit provoquée par le TGF- $\beta$ .

### 2. cIAP1 dans les processus cellulaires médiés par le TGF- $\beta$

Nos résultats ont démontré l'importance de cIAP1 dans la régulation des processus cellulaires médiés par le TGF- $\beta$  et en particulier dans la régulation des taux de PAI-1 et d' $\alpha$ -SMA. L'inhibition de cIAP1, par le GDC-0152 ou un siRNA, diminue l'augmentation des taux de PAI-1 et d' $\alpha$ -SMA en réponse au TGF- $\beta$ . PAI-1 ainsi que l' $\alpha$ -SMA sont deux protéines synthétisées en réponse au TGF- $\beta$ . PAI-1 est un membre des protéines inhibitrices des protéases à serine dont le rôle majeur est d'inhiber la fibrinolyse. Elle est capable d'inhiber les protéines uPA (*urokinase-type Plasminogen Activator*) et tPA (*tissue Plasminogen Activator*), bloquant ainsi la conversion du plasminogène en plasmine nécessaire à la lyse de la fibrine. Plusieurs études ont démontré que la déplétion de PAI-1 dans des modèles murins de fibrose pulmonaire induite à la bléomycine inhibe

le développement de la pathologie (Ghosh et Vaughan, 2012). L'équipe de Drew a associé cet effet avec son action sur la lyse de la fibrine. En effet, l'inhibition de l'activité de la plasmine par l'acide tranexamique dans un modèle murin KO pour PAI-1 rétablit le développement de la maladie (Hattori *et al.*, 2000). Senoo *et al.* ont démontré que la déplétion de PAI-1 par des siRNA dans le modèle de fibrose pulmonaire induite à la bléomycine, diminue le développement de la maladie. Ils ont aussi démontré que la déplétion de PAI-1 inhibe les processus de TEM médiés par le TGF-β. Ils ont donc conclu que les effets observés sur le développement de la maladie étaient associés au blocage des processus de TEM médiés par le TGF-β (Senoo *et al.*, 2010). α-SMA est un marqueur des myofibroblastes, dont la présence exacerbée est responsable du développement de la fibrose pulmonaire, comme cela a été décrit dans la partie [V.G](#) de l'introduction. Ces deux protéines sont donc fortement impliquées dans le développement de la fibrose pulmonaire. Il est donc probable que cIAP1 régule le développement de la fibrose pulmonaire par son action sur les processus cellulaires médiés par le TGF-β.

### 3. Le rôle de l'interaction entre cIAP1 et TRAF2

Nos résultats démontrent que le rôle de cIAP1 dans les processus cellulaires médiés par le TGF-β est dépendant de son interaction avec TRAF2. En effet, l'expression de mutants de cIAP1 incapables d'interagir avec TRAF2 inhibe l'effet du TGF-β. De plus, l'inhibition de TRAF2 par un siRNA mime l'effet de la déplétion de cIAP1 dans les cellules A549. Ces résultats ne sont pas surprenants, cIAP1 et TRAF2 étant très souvent associés afin de réguler l'action de différents facteurs tels que le TNFα par exemple. C'est en revanche la première fois qu'un rôle de cIAP1/TRAF2 est décrit dans les processus médiés par le TGF-β. TRAF2 a été principalement décrite comme un adaptateur de cIAP1, comme cela a été présenté dans la partie [IV](#) de l'introduction. Il permet par exemple d'adresser cIAP1 au niveau du récepteur TNFR1 afin que cIAP1 puisse induire l'ubiquitination de RIPK1 et provoquer l'activation de la voie NF-κB. Il serait donc très intéressant de déterminer si TRAF2 joue ici aussi un rôle d'adaptateur pour cIAP1 au niveau du complexe de récepteurs du TGF-β.

Afin d'approfondir le rôle de TRAF2, il serait aussi nécessaire de déterminer si son activité E3 ubiquitine ligase est impliquée dans ces processus. TRAF2 peut en effet induire l'ubiquitination activatrice de type K63 de cIAP1, lors de la stimulation des récepteurs CD40R et BAFF-R, menant à l'ubiquitination dégradative de TRAF3 médiée par cIAP1 et à l'activation de la voie NF-κB non canonique (Vallabhapurapu *et al.*, 2008). Il serait très intéressant de déterminer si TRAF2 pourrait par exemple médier l'activation de cIAP1 par ubiquitination. Un modèle cellulaire exprimant une protéine TRAF2 tronquée de son domaine RING pourrait être utilisé afin de répondre à cette question.

Deux autres protéines de la famille des TRAF, TRAF4 et 6, ont été décrites dans la régulation des processus cellulaires médiés par le TGF-β. Leur rôle a été décrit précisément dans la partie

V.D.2 de l'introduction. De manière intéressante, TRAF6 est retrouvée dans des complexes de signalisation cellulaire associée avec TRAF2 et cIAP1, en particulier au niveau des récepteurs TLR4 et RIG-1, comme décrit dans la partie IV.E de l'introduction. Il est donc possible que les effets observés soient aussi dépendants de TRAF6. cIAP1, TRAF2 et TRAF6 pourraient ainsi appartenir à un complexe protéique situé au niveau des récepteurs du TGF- $\beta$  et réguleraient ainsi les processus cellulaires médiés par le TGF- $\beta$ .

#### 4. L'activité E3 ubiquitine ligase de cIAP1

Le rôle de cIAP1 dans les processus cellulaires médiés par le TGF- $\beta$  est dépendant de son activité E3 ubiquitine ligase. En effet, l'expression d'un mutant de cIAP1 ayant perdu cette activité dans le modèle de MEF DKO inhibe les processus cellulaires médiés par le TGF- $\beta$ , en comparaison des MEF exprimant cIAP1. Le rôle de son activité E3 ligase a été décrit dans de nombreuses voies de signalisation cellulaire, présentées dans la partie IV de l'introduction. Il n'est donc pas surprenant que cette activité soit impliquée dans l'action de cIAP1 sur les processus cellulaires médiés par le TGF- $\beta$ . Un des principaux systèmes mettant en jeu des processus d'ubiquitination est le système ubiquitine/protéasome. cIAP1 peut par exemple induire l'ubiquitination de type K48 de ASK1, TRAF2 et TRAF3 dans les voies de signalisation médiées par le TNFR2, menant à leur dégradation par le protéasome (Zhao *et al.*, 2007; Vallabhapurapu *et al.*, 2008). Nos résultats ont démontré que le protéasome est impliqué dans la régulation de la signalisation médiée par le TGF- $\beta$ . En effet, l'inhibition du protéasome par le MG132 inhibe les processus cellulaires médiés par le TGF- $\beta$ . Ces résultats sont en accord avec les observations de Han *et al.* ainsi que Hosler *et al.* qui ont démontré que la déplétion du protéasome par le MG132 ou la lactacystine inhibait fortement l'activité du TGF- $\beta$  (Hosler, Wang-Su et Wagner, 2006; Han *et al.*, 2019). Pourtant, ces résultats ne sont pas encore suffisants pour conclure que l'action de cIAP1 est dépendante de sa capacité à induire la dégradation de protéines. La déplétion de cIAP1 mime la déplétion du protéasome mais il est tout à fait possible qu'elle soit dépendante de mécanismes différents. En effet, cIAP1 est aussi capable d'induire des processus d'ubiquitination menant à l'activation et à la stabilisation de ses substrats, comme cela a été décrit dans la partie IV de l'introduction. L'analyse des mécanismes d'ubiquitination mis en jeu est donc nécessaire à une meilleure compréhension du rôle de cIAP1. Le rôle du protéasome pourrait par exemple être investigué en surexprimant cIAP1 et en démontrant que l'effet de la surexpression de cIAP1 est bloqué par le MG132.

cIAP1 est recrutée aux niveau de nombreux récepteurs, tels que les TNFR1 et 2 par exemple, présentés dans les parties IV.C et IV.D de l'introduction, et régule leurs voies de signalisation par des processus d'ubiquitination. Dans ces processus, cIAP1 ne cible généralement pas les récepteurs mais plutôt d'autres protéines, elles aussi recrutées au niveau de ces récepteurs. Il apparaît donc peu probable que les mécanismes d'ubiquitination médiés par cIAP1 dans l'activité du TGF- $\beta$  impliquent des processus d'ubiquitination ciblant les récepteurs TGFR1 et 2.

L'hypothèse la plus probable est donc que cIAP1 active et/ou stabilise par ubiquitination certains partenaires de ces récepteurs tels que les SMAD par exemple. À l'inverse, cIAP1 pourrait aussi provoquer l'ubiquitination dégradative de protéines inhibant ces processus. Par exemple, cIAP1 pourrait cibler les protéines SMURF2 et SMAD7, ces dernières inhibant l'activité du TGF-β, comme cela a été décrit dans la partie [V.D](#) de l'introduction. Il pourrait donc être très intéressant de réaliser un ubiquitinylome sur des cellules stimulées au TGF-β, en présence ou en absence de cIAP1, afin de déterminer les protéines ubiquitinées par cIAP1 en réponse au TGF-β.

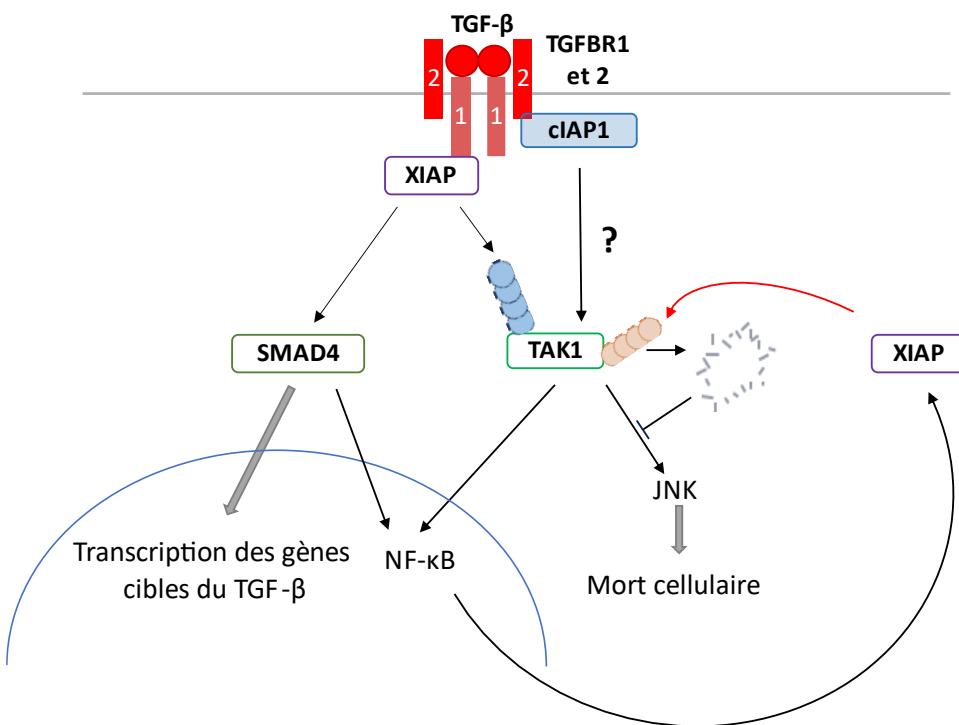
## 5. cIAP1 et les voies de signalisation du TGF-β

Les processus cellulaires médiés par le TGF-β sont induits par différentes voies de signalisation. Ces dernières sont divisées en deux catégories : la voie de signalisation canonique, dépendante des SMAD et les voies de signalisation alternatives. Ces voies ont été présentées dans la partie [V.D](#) de l'introduction. Les résultats obtenus démontrent un rôle de cIAP1 dans les voies de signalisation alternatives du TGF-β. L'utilisation du SMAC mimétique GDC-0152 inhibe l'activation par phosphorylation des MAPK JNK, ERK1/2 et p38 ainsi que l'activation de NF-κB. Le rôle de cIAP1 a été confirmé par un siRNA ciblant cIAP1, dont l'utilisation mime les effets du GDC-0152. Ce n'est pas la première fois que cIAP1 est décrite comme un régulateur de l'activation des MAPK et de NF-κB, comme cela a été décrit précédemment dans la partie [IV](#) de l'introduction. C'est en revanche la première fois qu'un rôle de cIAP1 dans l'activation de ces protéines en réponse au TGF-β est décrit.

Nos résultats ont aussi mis en avant un rôle de cIAP1 dans la régulation de la voie de signalisation canonique du TGF-β. L'inhibition de cIAP1 par le GDC-0152 inhibe la phosphorylation de SMAD2 à partir de 1h après une stimulation des A549 par le TGF-β. Le GDC-0152 inhibe aussi la translocation des SMAD dans le noyau à la suite d'une stimulation au TGF-β. C'est aussi la première fois qu'un rôle de cIAP1 dans la voie de signalisation canonique du TGF-β est décrite.

Parmi les protéines de la famille des IAP, seul XIAP a été décrite comme protéine régulatrice des voies de signalisation médiées par le TGF-β. Reffey *et al.* ont démontré en 2001 que XIAP était associée au TGFBR1. De plus, ils ont aussi observé que la surexpression de XIAP active la transcription des gènes cibles du TGF-β, de NF-κB de manière dépendante de SMAD4, suggérant un rôle de XIAP sur la voie de signalisation canonique du TGF-β (Reffey *et al.*, 2001). L'équipe de Arsura a démontré plus tard que l'activation de NF-κB provoque la surexpression de XIAP. Cette dernière peut ensuite cibler TAK1, afin d'induire son ubiquitination puis sa dégradation par le protéasome, inhibant ainsi l'activation de JNK par TAK1 en réponse au TGF-β. L'inhibition de JNK médiée par XIAP permet de bloquer les processus d'apoptose médiés par le TGF-β, faisant de XIAP une cible potentielle afin de bloquer les propriétés oncogéniques du TGF-β (Kaur *et al.*, 2005). Le rôle de XIAP dans les propriétés oncogéniques du TGF-β a ensuite été développé par Neil *et al.* Ils ont démontré que XIAP pouvait interagir avec le TGFBR1 afin d'ubiquitinier TAK1, favorisant l'interaction de ce dernier avec TAB1 et donc l'activation de la voie NF-κB (Neil, Tian et Schiemann,

2009) (Figure 50). Nos résultats démontrent donc un nouvel axe de recherche mettant en jeu cIAP1 et non XIAP. La capacité de cIAP1 à réguler les voies de signalisation canonique et alternatives du TGF- $\beta$  nous a mené à émettre l'hypothèse d'un rôle direct de cIAP1 sur les récepteurs TGFBR1 et 2, et plus précisément sur leur recyclage. cIAP1 pourrait par exemple favoriser la formation d'endosomes de recyclage ou inhiber la formation d'endosomes tardifs et ainsi favoriser l'activation des voies du TGF- $\beta$ . Il est aussi possible, de la même manière que XIAP, que cIAP1 cible directement d'autres acteurs de ces voies tels que TAK1 et les SMAD. cIAP1 régulerait leur activité par des processus d'ubiquitination, modulant ainsi l'activation des différentes voies de signalisation.



**Figure 50 : Rôle de XIAP dans les voies de signalisation médiées par le TGF- $\beta$ .** XIAP, par l'intermédiaire de SMAD4, stimule la synthèse des gènes cibles du TGF- $\beta$ . XIAP peut aussi stimuler par ubiquitination TAK1, menant à l'activation de NF- $\kappa$ B. Cette dernière induit la synthèse de XIAP, qui en retour provoque l'ubiquitination dégradative de TAK1, inhibant l'activation de JNK et bloquant ainsi les processus de mort cellulaire. cIAP1 pourrait potentiellement réguler l'activité de TAK1.

## 6. cIAP1/TRAFF2 et les récepteurs TGFBR1 et 2

### a) La localisation cellulaire de TRAF2

TRAFF2 semble être détectée par immunofluorescence au niveau de la membrane plasmique à la suite d'une stimulation d'une heure au TGF- $\beta$ . De plus, un traitement de 24 et 48h a accru le marquage de TRAF2 dans l'ensemble de la cellule. Ces effets sont inhibés par la déplétion de cIAP1 par le GDC-0152. Comment expliquer que le marquage de TRAF2 soit plus important alors la quantité de TRAF2 ne varie pas ? Notre hypothèse serait que la stimulation au TGF- $\beta$  induise un changement de conformation de TRAF2, rendant son épitope plus facilement accessible, facilitant ainsi son marquage. Ce changement de conformation pourrait être induit par la formation de trimères de TRAF2, décrit dans la partie [III.B](#) de l'introduction. Une agrégation de TRAF2 pourrait donc avoir

lieu, renforçant ainsi son marquage et expliquant les résultats observés. De plus, il ne serait pas surprenant que TRAF2 puisse interagir avec les récepteurs du TGF- $\beta$ . En effet, TRAF2 est décrite principalement comme un adaptateur moléculaire retrouvé au niveau des récepteurs. Ces informations ont été présentées dans la partie ***III.C*** de l'introduction. Il serait important dans un premier temps de confirmer la localisation de TRAF2 au niveau de la membrane plasmique. Des expériences de co-immunoprecipitation ou de PLA pourront ensuite être réalisées afin de démontrer l'interaction entre TRAF2 et les récepteurs TGFBR1 et TGFBR2.

Nos résultats démontrent aussi que l'inhibition de cIAP1 par le GDC-0152 inhibe les effets du TGF- $\beta$  sur le marquage de TRAF2. Notre projet portant sur les propriétés oncogéniques de cIAP1 a démontré que cIAP1 induisait la formation de *clusters* de TRAF2. Ces résultats sont soutenus par les travaux de Mace *et al.*, qui ont mis en avant la capacité d'un dimère de cIAP1 à se lier à deux trimères de TRAF2 (Mace *et al.*, 2010). En accord avec ces observations, nous avons émis l'hypothèse que cIAP1 provoque l'agrégation de TRAF2 en réponse au TGF- $\beta$ . Cette agrégation pourrait être nécessaire à la régulation des voies de signalisation médiées par le TGF- $\beta$  par cIAP1. Afin de confirmer cette hypothèse, l'analyse par immunofluorescence de la colocalisation de cIAP1 et TRAF2 en réponse au TGF- $\beta$  pourra être réalisée. De plus, les modèles de MEF DKO exprimant un mutant de cIAP1 incapable d'interagir avec TRAF2 permettront de confirmer l'importance de TRAF2 dans nos observations.

### **b) cIAP1 et son interaction avec le TGFBR2**

Des expériences de *GST pull down* et de co-immunoprecipitation ont mis en avant pour la première fois une interaction entre cIAP1 et le récepteur TGFBR2. Cette interaction n'est pas détectée en absence de stimulation mais est observée à la suite d'une stimulation de 1h au TGF- $\beta$ . Il est encore nécessaire de déterminer si cette interaction est directe ou indirecte. cIAP1 est décrite dans de nombreux complexes de récepteurs. Elle est par exemple associée aux récepteurs de la famille du TNFR ou à certains PRR. Ces interactions sont en général indirectes. Ce sont en effet des protéines adaptatrices qui permettent le recrutement de cIAP1 sur ces complexes. L'hypothèse la plus plausible est donc que cIAP1 interagit avec le TGFBR2 de manière indirecte, à l'aide d'une protéine adaptatrice. TRAF2 joue souvent ce rôle de protéine adaptatrice et permet par exemple le recrutement de cIAP1 au niveau du TNFR1 (Dumétier, Zadoroznyj et Dubrez, 2020). De plus, les résultats précédents ont mis en avant l'importance de l'interaction entre cIAP1 et TRAF2 dans le rôle de cIAP1 sur les processus médiés par le TGF- $\beta$ . Il apparaît donc probable que TRAF2 puisse servir de protéine adaptatrice menant au recrutement de cIAP1 au niveau du TGFBR2. La réalisation d'une co-immunoprecipitation ou d'une expérience de PLA, entre cIAP1 et le TGFBR2, sur des cellules A549 traitées avec un siRNA ciblant TRAF2, permettrait de mettre en évidence le rôle d'adaptateur de TRAF2 dans ces processus. Les lignées de MEF DKO exprimant un mutant de cIAP1 incapable d'interagir avec TRAF2 pourront également être utilisées.

## V. Conclusions et perspectives

Mes travaux de thèse ont permis de mettre en évidence de nouvelles fonctions de cIAP1, dépendantes de son interaction avec TRAF2, impliquées dans ses propriétés oncogéniques. Nous avons confirmé dans un premier temps que l'expression de cIAP1 favorisait la croissance tumorale. Nous avons ensuite démontré que cet effet est dépendant de l'interaction entre cIAP1 et TRAF2. De plus, l'agrégation de TRAF2 par le domaine BIR1 de cIAP1 est suffisante pour stimuler la croissance tumorale. De manière intéressante, l'interaction de TRAF2 avec ses partenaires protéiques est dépendante de son interaction avec cIAP1. Cette interaction stimule l'activation des MAPK ERK1/2. Elle induit aussi l'activation de la voie canonique de NF-κB, menant à la production d'IL-6, dont l'activité autocrine stimule l'activation de la voie de signalisation JAK/STAT3. C'est la première fois qu'un rôle de cIAP1 dans l'activation de STAT3 est décrit. Pour terminer, nous avons mis en évidence que les propriétés oncogéniques de l'interaction entre cIAP1 et TRAF2 impliquent l'activation de STAT3, mais pas l'activation de ERK1/2. Ces travaux ont mené à la publication d'un article scientifique intitulé : « *cIAP1/TRAF2 interplay promotes tumor growth through the activation of STAT3* » en 2022 pour lequel je suis co-premier auteur.

Les résultats obtenus durant ma thèse ont aussi mis en évidence l'importance de cIAP1 dans le développement de la fibrose pulmonaire et les voies de signalisations médiées par le TGF-β. cIAP1 est surexprimée chez les patients atteints de FPI ainsi que dans le modèle murin de fibrose pulmonaire induite à la bléomycine. Son inhibition par le SMAC mimétique GDC-0152 inhibe le développement de la maladie dans ce modèle murin. Une surexpression de cIAP1 est aussi détectée lors de la stimulation de cellules A549 par le TGF-β. cIAP1 est impliquée dans la mise en place des processus cellulaires médiés par le TGF-β. Son rôle dans ces processus est dépendant de son activité E3 ubiquitine ligase et de son interaction avec TRAF2. cIAP1 régule les voies de signalisation canonique et alternatives du TGF-β. De plus, il interagit avec le récepteur TGFR2 et régule la quantité de récepteurs TGFR1 à la membrane.

Les prochaines étapes de ces travaux vont porter sur la caractérisation de l'interaction entre cIAP1 et le TGFR2 et son rôle sur l'adressage des récepteurs à la membrane. Il sera nécessaire dans un premier temps de démontrer si l'interaction entre cIAP1 et le TGFR2 est directe ou indirecte. Il pourra ensuite être intéressant d'étudier un potentiel rôle de TRAF2 dans cette interaction. Il sera ensuite primordial de mettre en évidence un potentiel rôle de cIAP1 et TRAF2 dans l'endocytose et le recyclage des récepteurs afin d'expliquer les résultats obtenus précédemment. Pour terminer, il pourra être très pertinent d'étudier plus précisément le rôle de l'activité E3 ubiquitine ligase de cIAP1, afin de déterminer ou non l'implication de processus de dégradation dans son rôle sur la signalisation médiée par le TGF-β. Un ubiquitinylome pourra ensuite être réalisé afin de déterminer les cibles de cIAP1 dans cette voie de signalisation. Ces travaux sont actuellement réalisés par une étudiante de Master 2. Il sera aussi intéressant de développer un

modèle murin KO pour clAP1 afin de confirmer l'importance de clAP1 dans le développement de la fibrose pulmonaire. Des coupes de poumons ont été obtenues à partir de nos précédentes expériences sur le modèle murin de fibrose pulmonaire. Des marquages de clAP1 et des récepteurs au TGF- $\beta$  pourront être réalisés afin de mettre en évidence leur importance dans le développement de la maladie.

Pour terminer, l'objectif final de l'ensemble de ces travaux sera le développement d'inhibiteurs moléculaires spécifiques de clAP1 bloquant son interaction avec TRAF2. Les inhibiteurs actuels de clAP1 sont les SMAC mimétiques. Or, ces derniers ne sont pas spécifiques et ciblent aussi généralement clAP2, XIAP et ML-IAP. De plus, ils induisent une dégradation rapide de clAP1, affectant ainsi tous les processus cellulaires médiés par cette dernière. Ce processus peut aussi entraîner la dégradation des partenaires de clAP1, comme cela a été démontré pour TRAF2. Plusieurs essais cliniques de phase II et III ont été mis en place pour les SMAC mimétiques. Ils sont généralement bien tolérés mais certains essais ont mis en avant des effets secondaires indésirables nécessitant leur arrêt. Le développement de molécules ciblant l'interaction clAP1/TRAF2 pourrait donc être une alternative intéressante aux SMAC mimétiques. Ces molécules inhiberont spécifiquement les propriétés oncogéniques et pro-fibrosantes de clAP1 sans affecter les autres IAP et pourraient diminuer le risque d'effets secondaires. Le développement de ces inhibiteurs est actuellement pris en charge par Manon Paccagnini, une étudiante en thèse au sein de notre équipe.

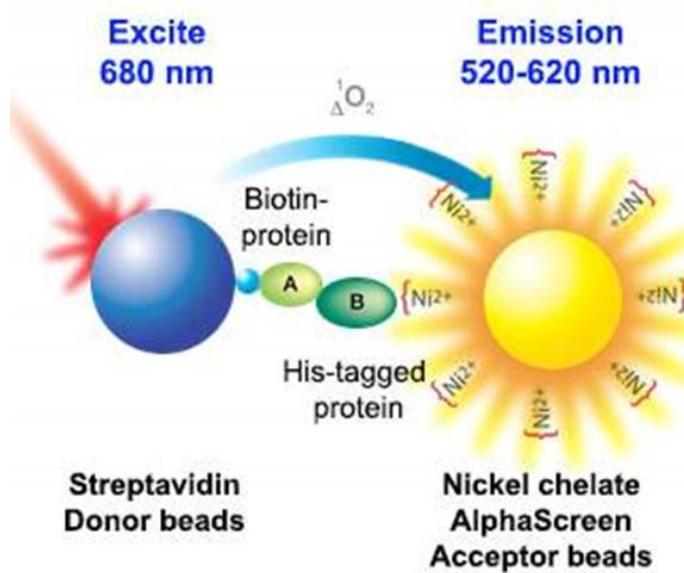
# **ANNEXES**

## I. Résultats annexes : Développement d'inhibiteurs du domaine BIR2 de XIAP

Un projet de recherche développé par Charline Kieffer au sein du CERMN (Centre d'Études et de Recherche sur le Médicament de Normandie) a pour but de cibler le domaine BIR2 de XIAP. Les SMAC mimétiques monovalents ont en général une affinité plus forte pour le domaine BIR3 des IAP (Chang et Cheung, 2020). Leur objectif est donc de développer de nouveaux inhibiteurs spécifiques du domaine BIR2 de XIAP. Cibler ce domaine permettra de bloquer spécifiquement la capacité de XIAP à inhiber les caspases 3 et 7. En effet, le domaine BIR2 de XIAP a été caractérisé comme étant le domaine d'interaction de XIAP avec ces caspases (Abbas et Larisch, 2020). L'inhibition de cette interaction permettra donc la libération des caspases 3 et 7 et favorisera donc les processus d'apoptose. Une chimiothèque a été virtuellement ciblée dépendamment des données disponibles dans la littérature sur la structure du domaine BIR2 de XIAP. Ce criblage a fait ressortir environ 70 molécules pouvant potentiellement se fixer à ce domaine. Le CERMN ne possédait pas le matériel nécessaire au criblage de ces molécules. Une collaboration entre notre équipe et ce laboratoire a donc été initiée afin que nous réalisions le criblage de ces molécules. Afin de réaliser ce projet, il est nécessaire de mettre au point une méthode d'analyse des interactions entre les protéines cibles.

Deux méthodes ont été sélectionnées pour ces projets : l'utilisation de la technique de la thermophorèse grâce au Monolith de NanoTemper ou de la technique AlphaScreen (*Amplified Luminescent Proximity Homogeneous Assay*) grâce à l'EnVision de PerkinElmer. Le premier choix s'est porté sur l'utilisation Monolith de NanoTemper. La termophorèse étudie le mouvement de molécules soumises à un gradient de température. Ce mouvement est dépendant de nombreux facteurs tels que la taille, la masse ou la charge. La fixation des molécules au domaine BIR2 de XIAP modifie leur taille et masse et devrait donc provoquer un changement de déplacement. L'objectif était donc d'utiliser le Monolith de NanoTemper afin d'étudier ces mouvements. Malheureusement, les tests réalisés ne nous ont pas permis d'étudier efficacement ces interactions. Les interactions étaient difficiles à détecter et potentiellement instables, rendant d'autant plus difficile leur analyse. C'est pour cela que la méthode AlphaScreen a finalement été choisie. Cette dernière utilise un système composé de billes donneuses et acceptrices nécessitant l'utilisation de molécules taguées. Une première molécule taguée se lie à la bille donneuse et la seconde, présentant un tag différent, se lie à la bille acceptrice. Si les molécules interagissent entre elles, les billes seront à proximité l'une de l'autre. L'excitation de la bille donneuse (en général par un rayon de 680 nm) provoque la libération d'un doublet d'oxygène qui va stimuler la bille acceptrice, qui en retour va émettre des rayons lumineux (en général d'une longueur d'onde comprise entre 520 et 620 nm). S'il n'y a pas d'interaction, la bille acceptrice ne peut pas capter de doublet d'oxygène et il n'y a donc pas d'émission de lumière.

Pour le projet ciblant le domaine BIR2 de XIAP, il a été choisi d'utiliser un domaine BIR2 tagué avec un *His-tag* (tag Histidine). Il était nécessaire de choisir un partenaire de ce domaine dont l'interaction pouvait potentiellement être inhibée par les molécules. Un peptide AVPI a donc été choisi, couplé à de la biotine. Il a donc été décidé d'utiliser des billes acceptrices nickel chélate, capable de lier le *His-tag*, et des billes donneuses liées à de la streptavidine, capable de fixer la biotine (Figure 51). L'objectif est donc de sélectionner les molécules capables de bloquer l'émission de lumière et donc de bloquer l'interaction entre le domaine BIR2 de XIAP et l'AVPI.

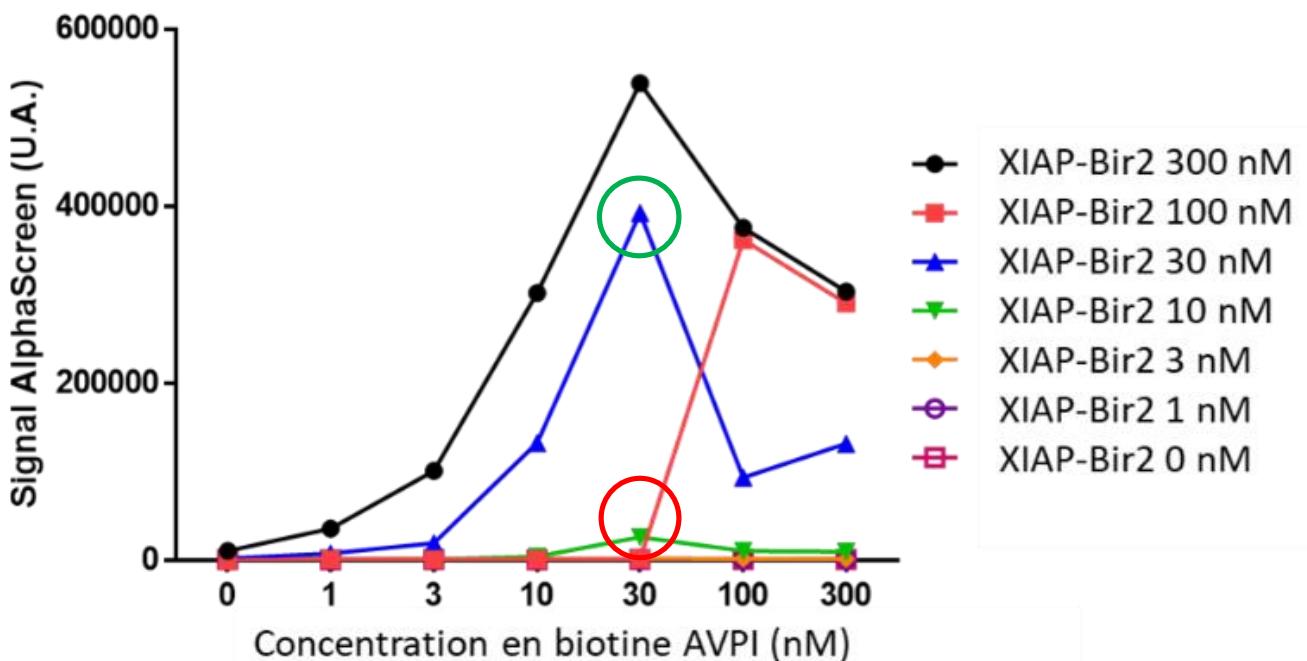


**Figure 51 : Représentation schématique de la technique AlphaScreen.** Schéma provenant du site de PerkinElmer.

### A. L'AlphaScreen permet de détecter l'interaction entre le domaine BIR2 de XIAP et l'AVPI

Des premiers tests d'interaction ont été réalisés afin de vérifier si l'interaction entre le domaine BIR2 de XIAP et l'AVPI était détectable et de mettre au point les concentrations optimales des deux molécules. Les concentrations qui ont été utilisées variaient de 1 nM à 300 nM. Dans un premier temps, l'interaction est détectée par cette méthode à partir d'une concentration de 10 nM du domaine BIR2 de XIAP et 30 nM d'AVPI biotinylée (cercle rouge) mais le signal est très faible et donc difficilement utilisable. Les concentrations optimales des deux molécules, permettant à la fois l'émission d'un signal suffisamment fort pour être étudié et une faible consommation de molécules, sont de 30 nM pour chacune (cercle vert). En effet, le signal émis est suffisamment important pour être étudié et ces concentrations restent suffisamment faibles pour ne pas poser de problème. De façon surprenante, certaines concentrations d'AVPI et de BIR2 égales ou supérieures à 30 nM (par exemple 30 nM de BIR2 de XIAP et 100 nM d'AVPI) ne permettent pas l'émission d'un signal aussi

fort que celui observé à 30 nM de chaque composé. Cela peut s'expliquer par la présence de molécules non fixées aux billes. En effet, le signal observé n'augmente quasiment plus à partir de 30 nM, ce qui pourrait signifier que quasiment l'ensemble des billes interagit avec une molécule. Il est donc tout à fait possible qu'à 100 nM par exemple, certaines molécules ne soient pas fixées aux billes. Si ces dernières interagissent avec un partenaire fixé à une bille, il n'y aura pas d'émission de signal, ce qui pourrait donc expliquer les différences observées (Figure 52).

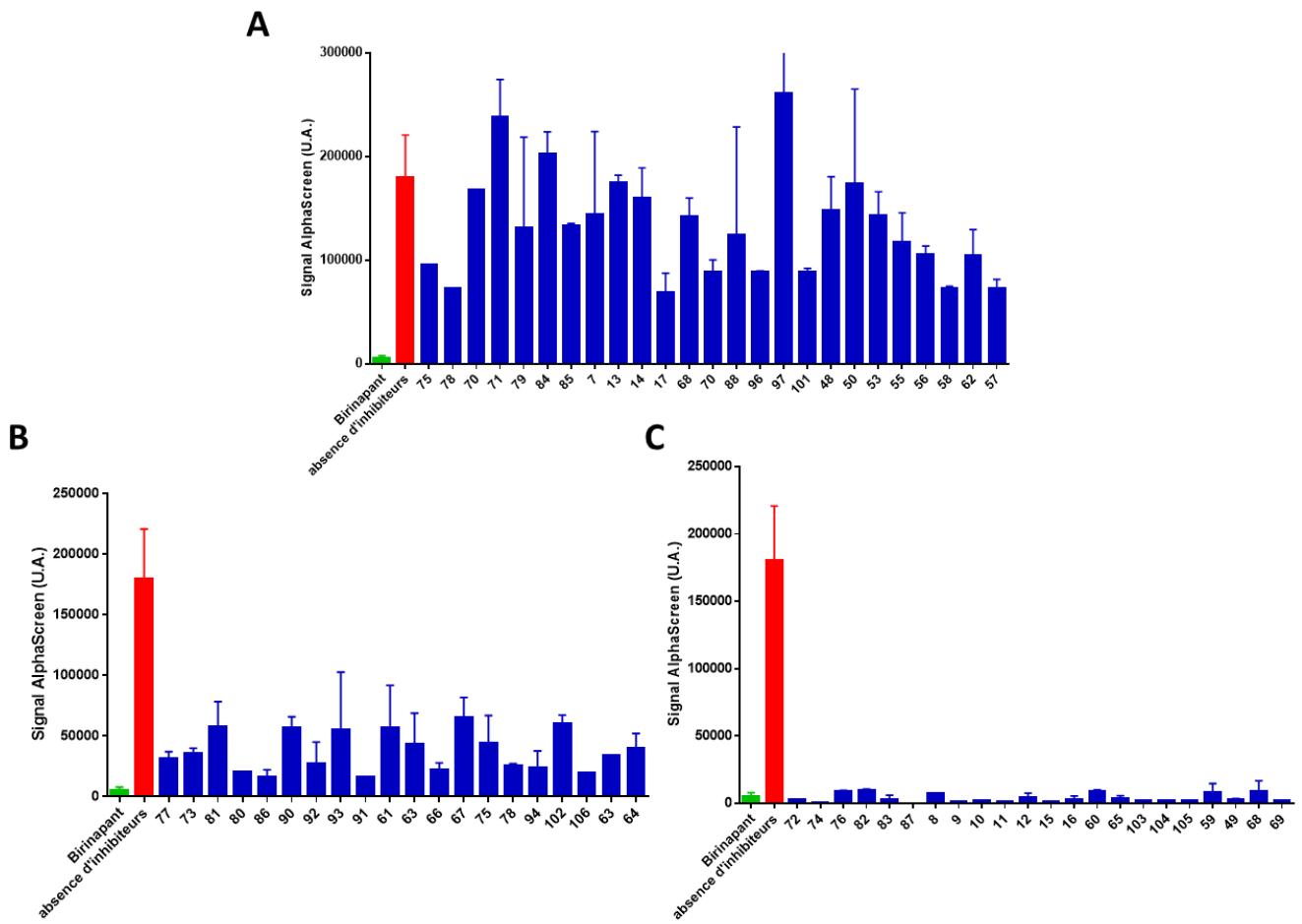


**Figure 52 : Les concentrations optimales du domaine BIR2 de XIAP et de l'AVPI sont de 30 nM.** Des expériences d'AlphaScreen, analysant l'interaction entre un domaine BIR2 tagué avec un His-tag et de l'AVPI biotinylée ont été réalisées. Différentes concentrations du domaine BIR2 de XIAP et d'AVPI ont été testées (de 1 à 300 nM). La concentration optimale a été entourée en vert et la concentration minimale pour détecter l'interaction en rouge.

## B. Le criblage des molécules a permis la sélection de 22 molécules potentiellement inhibitrices de l'interaction

Les expériences réalisées précédemment ont permis de déterminer les concentrations optimales d'AVPI et du domaine BIR2 de XIAP afin de réaliser les expériences de criblage des molécules. Ces concentrations sont donc de 30 nM chacune. Les molécules ont été criblées à une concentration de 500 µM. Elles ont été incubées avec le domaine BIR2 de XIAP avant l'ajout de l'AVPI. Le birinapant, un SMAC mimétique, a été utilisé comme contrôle d'inhibition de l'interaction, ce dernier se fixant sur le domaine BIR2 de XIAP. Sur l'ensemble des molécules testées, 25 ne n'ont aucun effet ou un effet très faible sur l'interaction entre le BIR2 de XIAP et l'AVPI (Figure 53 A). 20 d'entre elles ont un effet important sur cette interaction, mais pas suffisamment pour inhiber complètement l'interaction (Figure 53 B). La concentration de 500 µM étant très élevée, il est nécessaire que la molécule inhibe complètement l'interaction entre les deux partenaires pour être

sélectionnée. Sur l'ensemble des molécules, 22 molécules inhibent complètement l'interaction entre le BIR2 de XIAP et l'AVPI (Figure 53 C). Ces molécules sont donc les candidates inhibitrices idéales et ont donc été sélectionnées pour réaliser les expériences d'effet-dose, permettant d'affiner la sélection des molécules.

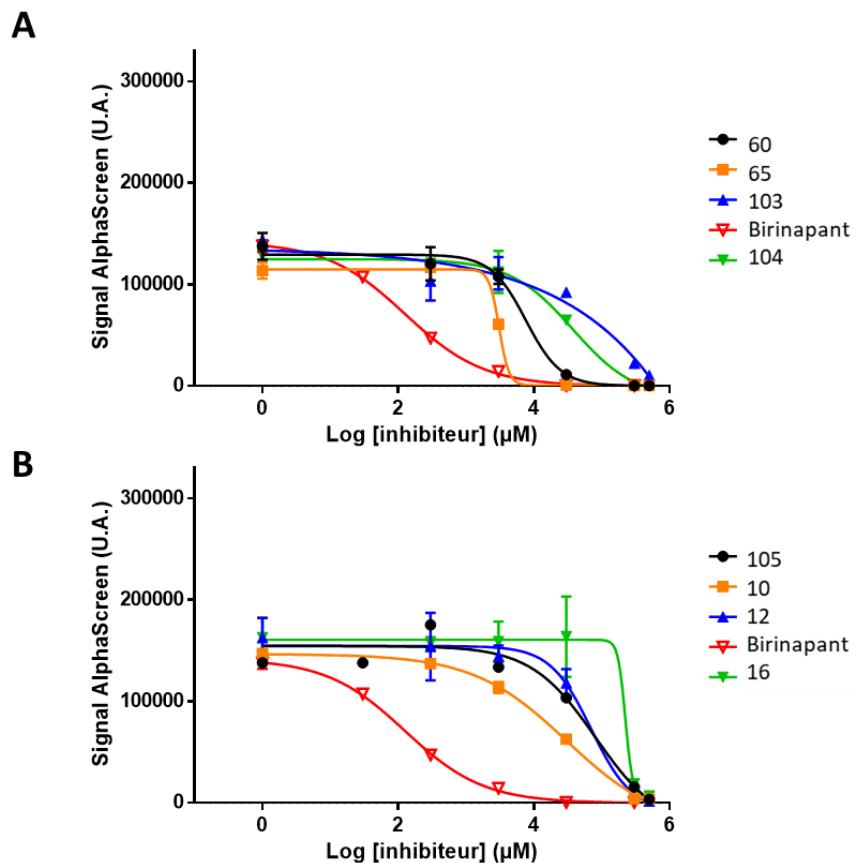


**Figure 53 : Sélection des molécules inhibant efficacement l'interaction entre le domaine BIR2 de XIAP et l'AVPI.** A, B et C. 67 molécules ont été criblées par AlphaScreen afin de déterminer leur capacité à inhiber l'interaction entre le domaine BIR2 de XIAP et l'AVPI. Les molécules ont été utilisées à 500  $\mu$ M alors que le BIR2 et l'AVPI ont été utilisées à 30 nM. Les molécules ont été classées en trois groupes en fonction de leur capacité à inhiber l'interaction : absence ou très faible inhibition (A), inhibition moyenne (B), ou inhibition totale (C). Le birinapant a été utilisé comme contrôle d'inhibition de l'interaction.

### C. 6 molécules inhibent efficacement l'interaction entre le BIR2 de XIAP et l'AVPI

Afin de sélectionner les molécules les plus efficaces pour inhiber l'interaction entre le BIR2 de XIAP et l'AVPI, des expériences d'effet-dose ont été réalisées. Ces dernières permettent de déterminer un  $IC_{50}$  (*half maximal Inhibitory Concentration*) pour chacune des molécules sélectionnées. L' $IC_{50}$  correspond à la concentration nécessaire pour supprimer 50 % des liaisons entre l'AVPI et le BIR2 de XIAP. Il permet donc de sélectionner les molécules les plus efficaces pour inhibiter cette liaison et donc de choisir les meilleurs candidats inhibiteurs. Le birinapant a de nouveau

été utilisé comme contrôle et les concentrations testées étaient comprises entre 500  $\mu\text{M}$  et 300 nM. Ces tests ont été réalisés sur l'ensemble des molécules sélectionnées précédemment mais seulement une partie de ces effets-doses a été présentée ici (Figure 54 A et B). Un  $\text{IC}_{50}$  a donc été déterminé pour chaque molécule. Sur l'ensemble de ces dernières, 6 molécules (9, 10, 15, 59, 60, 65) présentent un  $\text{IC}_{50}$  inférieur à 50  $\mu\text{M}$  et sont donc les candidats inhibiteurs les plus intéressants (Tableau 3).



**Figure 54 : Exemple d'effet-doses réalisés pour les 22 molécules sélectionnées.** Un effet-dose a été réalisé en AlphaScreen pour les 22 molécules sélectionnées précédemment. Les molécules ont été testées à des concentrations de 500  $\mu\text{M}$ , 300  $\mu\text{M}$ , 30  $\mu\text{M}$ , 3  $\mu\text{M}$  et 300 nM. Le domaine BIR2 de XIAP et l'AVPI ont été utilisés à des concentrations de 30 nM. Le birinapant a été utilisé comme contrôle.

**Tableau 3 : Récapitulatif de l'ensemble des  $\text{IC}_{50}$  déterminés pour les 22 molécules sélectionnées.**

Molécule	$\text{IC}_{50}$	Molécule	$\text{IC}_{50}$	Molécule	$\text{IC}_{50}$
Birinapant	0,28	49	57,20	76	211,93
8	154,95	59	<b>33,81</b>	82	97
9	<b>30,52</b>	60	<b>4,20</b>	83	Non déterminé
10	<b>21,34</b>	65	<b>1,93</b>	87	Non déterminé
11	50,93	68	Non déterminé	103	199
12	61,10	69	Non déterminé	104	67,32
15	<b>8,28</b>	72	135,90	105	68,74
16	232,30	74	133,15		

L'ensemble de ces résultats est donc très encourageant. Il a permis de mettre en avant 6 molécules pouvant être de potentiels inhibiteurs efficaces du domaine BIR2 de XIAP. En revanche, l' $IC_{50}$  qui a été déterminé est encore éloigné de celui observé pour le birinapant qui est de 0.283  $\mu M$ . Il est donc nécessaire de modifier chimiquement ces molécules afin d'améliorer leur efficacité. De plus, il est nécessaire de confirmer qu'elles ne peuvent se fixer qu'au domaine BIR2 de XIAP et non pas au domaine BIR3 par exemple. Ces deux domaines sont très proches structurellement, il est donc obligatoire de confirmer la spécificité de ces molécules. La CERMN ayant obtenu la technologie EnVision, un étudiant en thèse de leur équipe a pris la suite du projet.

Le protocole d'étude d'interaction entre protéines développé sur ce projet est utilisé actuellement par la doctorante de l'équipe, Manon Paccagnini, afin de réaliser le criblage et les effets-doses des potentiels inhibiteurs de l'interaction entre cIAP1 et TRAF2.

## **II. Matériel et méthodes**

### **Traitement cellulaire au TGF-β :**

Les différentes lignées de MEF et la lignée A549 sont privées de SVF (Sérum de Veau Fœtal) 24 h après leur ensemencement (passage de 10% de SVF à 1%). Elles sont ensuite traitées avec 5 ng/mL de TGF-β (R&D systems, Minneapolis, États-Unis) de 5 minutes à 48h et du GDC-0152 (Euromedex, Souffelweyersheim, France) à 5 µM, du 5Z-7-Oxozeaenol à 5 µM et/ou du MG132 à 1 µM (Euromedex, Souffelweyersheim, France). Le GDC-0152, le MG132 et le 5Z-7-Oxozeaenol sont ajoutés 30 minutes avant le TGF-β. À la suite de ce traitement, les cellules sont grattées dans du PBS puis les protéines sont extraites dans un tampon RIPA (50 mM Tris-HCl pH 8,0 ; 150 mM NaCl ; 1% NP-40 ; 0.5% Sodium déoxycholate ; 0.1% SDS ; 1 mM sodium orthovanadate, 1 mM PMSF) complété avec des cocktails d'inhibiteurs de phosphatases PhosSTOP™ (Merck, Darmstadt, Allemagne) et de protéases (PIC, Sigma-Aldrich, St-Louis, États-Unis).

### **Puce à ADN :**

La puce à ADN GSE110147 a été réalisée et analysée en 2018 par le laboratoire du professeur Mura (Cecchini *et al.*, 2018).

### **Étude de la fibrose pulmonaire chez l'animal :**

Les souris C57BL/6 (Charles River Laboratories, Saint-Germain-Nuelles, France) sont hébergées dans la zone conventionnelle du site central de la plateforme de zootechnie de l'université de Bourgogne. La nourriture et l'eau sont à disposition *Ad libitum* et l'alimentation est enrichie. Les animaux sont traités en accord avec les directives du Ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur. Toutes les expériences sont approuvées par le comité d'éthique de l'expérimentation animale du grand campus de Dijon. La bléomycine est injectée aux souris par injection intratrachéale à une concentration de 1,5 mg/kg (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, États-Unis). À partir de 2 ou 9 jours après l'injection de bléomycine, le GDC-0152 ou le tampon de préparation de ce dernier (NaCl 0,9% + DMSO) est injecté par intraveineuse à des concentrations de 7,5 et 15 mg/kg tous les deux jours. La bléomycine et le GDC-0152 sont dilués dans du NaCl 0.9%. Les souris sont euthanasiées 21 jours après la première injection de bléomycine par exsanguination au niveau de l'aorte abdominale. Un lavage bronchoalvéolaire est effectué et un comptage des cellules au sein de ce dernier est réalisé. Les poumons sont ensuite récupérés pour différentes analyses.

### **Dosages de collagène :**

Le collagène est évalué par une méthode colorimétrique : le SCA (*Sircol Collagen Assay*). Le SCA est réalisé sur une partie du lobe gauche du poumon de la souris. Le dosage est réalisé en

utilisant le kit Sircol (Biocolor, Carrickfergus, Royaume-Uni) et en suivant les recommandations du fournisseur.

La quantité de collagène est aussi évaluée par une méthode histologique. Une coloration au rouge Sirius, un colorant des fibres de collagène, est effectuée sur des coupes de poumon incluses à la paraffine. La quantification des fibres de collagène à partir de cette coloration est réalisée en suivant la méthode décrite précédemment par l'équipe du professeur Bonniaud (Decologne *et al.*, 2007).

### **Cytométrie en flux :**

Après traitement au TGF- $\beta$  et/ou au GDC-0152, les cellules A549 sont grattées dans du PBS froid. Après lavage, elles sont saturées dans une solution composée de 10% de SVF et 1% d'azide de sodium pendant 10 minutes. Après la saturation, les cellules sont incubées avec l'anticorps primaire anti-TGFBR1 (Sigma-Aldrich, St-Louis, États-Unis), dans une solution de PBS avec 0,5% de BSA pendant 30 minutes suivi de deux lavages et d'une incubation avec l'anticorps secondaire anti-lapin (Invitrogen, Carlsbad, États-Unis) pendant 30 minutes dans cette même solution. Après deux nouveaux lavages, les cellules sont resuspendues dans du PBS et analysées à l'aide du LSРFortessa (BD Biosciences, Franklin Lakes, États-Unis).

### **Criblage et effet-dose par la méthode Alpha Screen :**

La concentration de molécules choisie pour le criblage est de 500  $\mu$ M. Les concentrations choisies pour les effets-doses sont 500  $\mu$ M, 300  $\mu$ M, 30  $\mu$ M, 3  $\mu$ M et 300nM et les concentrations du domaine BIR2 de XIAP (R&D systems, Minneapolis, États-Unis), de l'AVPI biotinylée et des billes donneuses et acceptrices (PerkinElmer, Waltham, États-Unis) sont fixées à 30 nM pour les deux protéines et 10  $\mu$ g/mL pour les billes. L'ensemble des solutions est préparé dans un tampon AlphaScreen (25 mM Hepes ; 100 mM NaCl ; 0,1 % BSA ; 0,05% Tween-20 ; pH de 7,4). Les molécules sont dans un premier temps incubées 1h avec le domaine BIR2 de XIAP à température ambiante dans une plaque à 96 demi-puits (PerkinElmer, Waltham, États-Unis). L'AVPI biotinylée est ensuite ajoutée et incubée 1h à température ambiante. Les billes acceptrices sont par la suite déposées et incubées 1h à l'obscurité à température ambiante, suivies des billes donneuses. Après une dernière heure d'incubation à température ambiante et à l'obscurité, les résultats sont lus sur l'EnVision (PerkinElmer, Waltham, États-Unis) en suivant le programme AlphaScreen.

### **III. Revue : *IAP-mediated protein ubiquitination in regulating cell signaling***

Cette revue, rédigée durant l'année 2020, répertorie les connaissances actuelles sur les membres de la famille des IAP, et en particulier sur leur fonction E3 ubiquitine ligase. Les différents partenaires des IAP ainsi que leur mode d'interaction sont présentés. Les différentes voies de signalisation impliquant les IAP sont développées.

Review

# IAP-Mediated Protein Ubiquitination in Regulating Cell Signaling

Baptiste Dumétier <sup>1,2</sup> , Aymeric Zadoroznyj <sup>1,2</sup> and Laurence Dubrez <sup>1,2,\*</sup> 

<sup>1</sup> Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm), LNC UMR1231, 21000 Dijon, France; Baptiste.Dumetier@u-bourgogne.fr (B.D.); Aymeric.Zadoroznyj@u-bourgogne.fr (A.Z.)

<sup>2</sup> Université de Bourgogne Franche-Comté, LNC UMR1231, 21000 Dijon, France

\* Correspondence: ldubrez@u-bourgogne.fr

Received: 6 April 2020; Accepted: 28 April 2020; Published: 30 April 2020



**Abstract:** Over the last decade, the E3-ubiquitin ligases from IAP (Inhibitor of Apoptosis) family have emerged as potent regulators of immune response. In immune cells, they control signaling pathways driving differentiation and inflammation in response to stimulation of tumor necrosis factor receptor (TNFR) family, pattern-recognition receptors (PRRs), and some cytokine receptors. They are able to control the activity, the cellular fate, or the stability of actors of signaling pathways, acting at different levels from components of receptor-associated multiprotein complexes to signaling effectors and transcription factors, as well as cytoskeleton regulators. Much less is known about ubiquitination substrates involved in non-immune signaling pathways. This review aimed to present IAP ubiquitination substrates and the role of IAP-mediated ubiquitination in regulating signaling pathways.

**Keywords:** IAP; ubiquitination; cell signaling; inflammation

---

## 1. Introduction

IAPs (Inhibitors of Apoptosis) constitute a family of conserved proteins found in a variety of organisms including virus, yeast, fungus, worms, insects, arthropods, fish, and mammals [1–6]. They were discovered in baculovirus in a genetic screen aiming to identify viral proteins able to prevent the death of infected cells [1]. Mammal IAPs share this anti-apoptotic property (for review, see Reference [7]). However, most of them function primarily as cell signaling regulators [8,9]. cIAP1 (cellular IAP1), cIAP2, and XIAP (X-linked IAP) are potent regulators of innate immune response [10]. They control the activation of NF- $\kappa$ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) and MAPK (mitogen activated protein (MAP) kinase) signaling pathways in response to the stimulation of members of the tumor necrosis factor receptor (TNFR) superfamily, pattern-recognition receptors (PRRs), or some cytokine receptors. Their signaling activity is directly related to their ability to promote ubiquitination of key signaling intermediates [11].

Ubiquitination is a post-translational modification initially described as the principal way to regulate the half-life of proteins and to clear defective and misfolded proteins. The Nobel Prize rewarded the discovery of ubiquitin-mediated protein degradation by Aaron Ciechanover, Avram Hershko, and Irvin Rose in 2004. Since then, the increasing interest of researchers for the ubiquitin system has considerably enlarged the spectral of action of this modification, which has ultimately appeared as a very complex system able not only to control the protein turnover but also to ensure spatiotemporal signal transduction and dynamic communication within the cells. Because they can be implemented very quickly, they constitute a remarkable and effective protein-regulating system employed in the first line of defense by cells to cope with changing cellular environment. They largely

contribute to the adaptation of cell behavior to physiological intracellular variations, as well as to intracellular or environmental stresses.

Out of the eight IAPs found in mammals, cIAP1, cIAP2, XIAP, ML-IAP (Melanoma IAP also named livin), and ILP2 (IAP-like protein 2) are component of the ubiquitination machinery by acting as E3-ubiquitine ligases. They can catalyze the conjugation of K6, K11, K27, K48, and K63-linked ubiquitin chains [12–15], as well as mono-ubiquitination [16–19]. They can promote the conjugation of diverse ubiquitin-linked chains on the same substrate leading to variable cellular fate [20]. The conjugation of the ubiquitin-like modifier NEDD8 (neural precursor cell expressed developmentally downregulated protein 8) by IAPs has even been observed [21]. Many IAP-ubiquitination substrates involved in various cellular processes have been reported. Although the role of IAPs in immune response has started to be well characterized, little is known about their function in other signaling pathways (e.g., autophagy, DNA damage response, transcriptional regulation, etc.). This review is an overview of the most documented IAP ubiquitination substrates and the role of IAP-mediated protein modifications in regulating cell signaling.

## 2. The Ubiquitin System

Typically, ubiquitination consists in the covalent conjugation of ubiquitin moieties on a lysine residue from an intracellular protein substrate. Ubiquitin is a 76 amino-acid peptide that contains seven lysine residues (K6, K11, K27, K29, K33, K48, K63) that, just like the amino-terminal Methionine (M1), behave as acceptor residues for ubiquitin moieties. Thus, intracellular proteins can be modified by a single ubiquitin molecule (monoubiquitination) or multimeric ubiquitin chains (polyubiquitination) of variable topologies conferring specific properties to the modified proteins. Moreover, one protein substrate can be modified on several lysine residues, and the location of the modification is also determinant to modulate the properties of the protein [22]. Ubiquitin moieties are specifically recognized by effector proteins harboring linkage-specific ubiquitin-binding modules that engage in downstream events. For example, proteins modified by conjugation of homotypic K48-linked ubiquitin chains are guided toward the proteasome for degradation, homotypic K63-, or the linear homotypic M1-linked ubiquitin chains are signals for the assembly of intracellular multiprotein signaling platforms, while the mono-ubiquitination of cell-surface receptors triggers their internalization and subsequent lysosomal degradation. Recent observations revealing the presence of mixed chains (composed of multiple linkages), branched chains (in which one ubiquitin unit is modified at two or more acceptor sites), or ubiquitination at non-lysine sites in substrate [23] have added a level of complexity to the ubiquitin code [24].

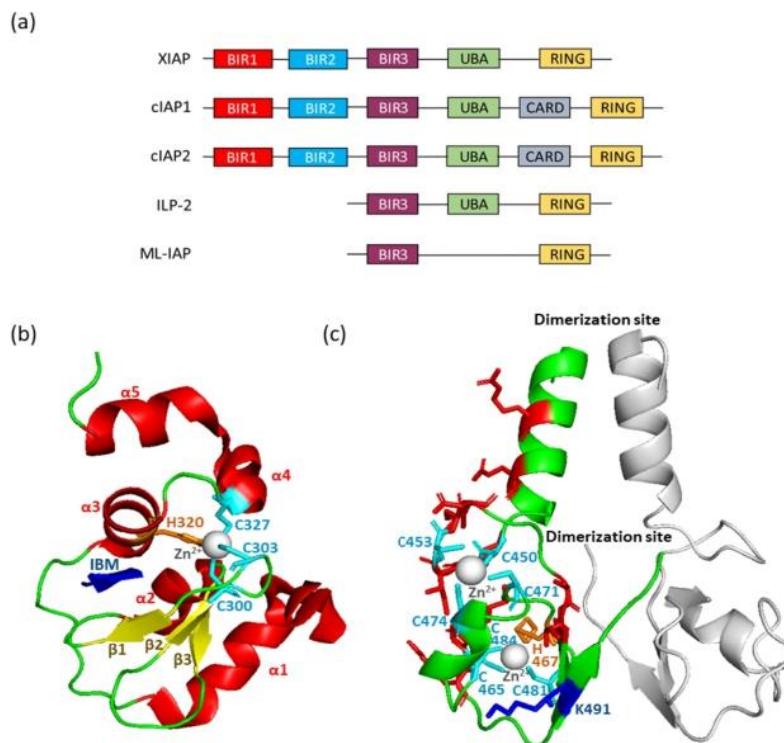
Ubiquitin conjugation is a three-step multi-enzymatic reaction. The first step involves an E1 enzyme that activates, in an ATP-dependent manner, the C-terminus of ubiquitin. Once activated, ubiquitin is transferred to the active cysteine residue of an E2-conjugating enzyme to form an E2-ubiquitin thioester conjugate. E3-ubiquitine ligases promote the ubiquitin transfer from E2s to the substrate [25]. Additional ubiquitins can be tethered to acceptor residues of ubiquitin to form ubiquitin chains. It is generally admitted that E3s support substrate recognition and determine the specific site of the modification, while E2s play a major role in determining the type of ubiquitin chain linkage. However, E3s can also contribute in linkage specificity, particularly in the case of mixed or branched chains, by employing different E2s to elongate the polyubiquitin chain [24–27].

## 3. IAP E3-Ubiquitine Ligases

### 3.1. IAP Structure

IAPs are defined by the presence of one to three specific evolutionary conserved domains named BIR (baculovirus IAP repeat), whose function is protein-protein interaction (Figure 1a,b). cIAP1, cIAP2, and XIAP contain three tandem repeats of BIRs, while ML-IAP and ILP2 display one unique BIR (Figure 1a). These are compact domains composed of approximately 80 amino-acid residues structured

in 3 short  $\beta$ -strands and 4–5  $\alpha$ -helices (Figure 1b). In most of them (except the BIR1 of cIAPs and XIAP), the  $\beta$ -strands and the third  $\alpha$ -helix form a deep hydrophobic groove that specifically anchors a 4 amino-acid linear motif called IBM (IAP binding motif). The main characteristic of IBMs is the presence of an N-terminal alanine or, for a few of them, a serine residue that has to be exposed to fit into the BIR pocket. IBM has been found in numerous mitochondrial proteins [28], including the second mitochondria-derived activator of caspase (Smac) [29,30], for which the IBM is exposed after removing of the N-terminal mitochondrial targeting motif during its proteolytic maturation process. IBM of non-mitochondrial proteins is located just downstream of the initiating methionine removal by methionine aminopeptidases (in the case of the NF-kappa-B (NF- $\kappa$ B)-inducing kinase (NIK) and the checkpoint kinase 1 (chk1) [31,32] or is exposed at the N-terminal extremity of the cleavage product upon caspase- or calpain-mediated processing during apoptosis or reticular stress respectively (in the case of caspase 3, 7, or 9 or the releasing factor eRF3/GSTP) [33–35]. Deciphering the mechanisms of interaction of Smac with the BIRs led to the design of IAP antagonists named Smac mimetics able to bind both the BIR2 and the BIR3 domains (see the reviews in Reference [36,37]). Alternative modes of interaction also exist. The cIAP1-BIR3 can bind protein partners by using unconventional IBMs [38] or another BIR-binding interface [39]. In addition, the BIR1 of cIAP1/2 and XIAP that are unable to anchor IBM bind the signaling adaptor tumor necrosis factor receptor (TNFR)-associated factor 2 (TRAF2) [40,41] and the transforming growth factor-activated kinase 1-binding protein 1 (TAB1) [42], respectively.



**Figure 1.** (a) Structure of Inhibitor of Apoptosis (IAP) E3-ubiquitine ligases. BIR: Baculovirus IAP repeat; UBA: ubiquitin associated; CARD: caspase activation and recruitment domain; RING: really interesting gene. (b) Ribbon diagram of the cIAP1 BIR3 domain in contact with the IAP binding motif (IBM) of caspase 9. The sheets ( $\beta$ ) are shown as yellow ribbons and helices ( $\alpha$ ) as red ribbons.  $\beta$ -strands and the third  $\alpha$ -helix form a deep hydrophobic groove stabilized by zinc atom (grey spheres) that is coordinated by three conserved Cysteine (cyan) and one Histidine (orange) residues. The IBM is represented in blue. (c) Ribbon diagram of an X-linked IAP (XIAP)-RING domain homodimer. The zinc ions are shown as grey spheres, the cysteine residues interacting with zinc as cyan sticks, the histidine as orange sticks, the ubiquitin-interacting site as blue sticks, and the E2-interacting sites as red sticks.

The BIRs serve as ubiquitination substrate binding components. Alternatively, substrates can be recruited through adaptors or intermediates, such as TRAF2, TRAF3 [43–45], the PHD-bromodomain 1 (TRIP-Br1, Sertad1) [15], or the septin-like ARTS (Apoptosis Related protein in transforming growth factor (TGF)-beta signaling pathway) [46].

The E3-ubiquitine ligase activity of cIAP1, cIAP2, XIAP, ML-IAP and ILP2 is supported by the C-terminal RING domain [11] (Figure 1c). RING is the most widespread E3 active domain. It is structured as a zinc finger platform for bringing in close proximity both the ubiquitin-charged E2 and the substrate [47] (Figure 1c). It catalyzes the transfers of ubiquitin moieties from the E2 to a Lysine of the substrate without intermediate conjugation of ubiquitin to E3.

In addition to the BIRs and RING, cIAPs, XIAP, and ILP2 bear a ubiquitin associated (UBA) domain and cIAPs a caspase activation and recruitment domain (CARD) [11]. The CARD regulates the activating dimerization of cIAPs (see below) [48,49], while the UBA is an ubiquitin binding domain allowing the recruitment of IAPs to signaling complex [50,51]. The UBA is also able to bind ubiquitin-charged E2s suggesting that UBA could contribute in the choice of the E2s, therefore determining the type of ubiquitin chain linkage [12,52].

### 3.2. IAP E3-Ubiquitine Ligase Activity

As observed for many RING-finger E3s, a dimerization of IAPs is required for transferring ubiquitin from E2s to the substrate (for review, see Reference [11]). The dimerization interface is located at the extreme C-terminus of the RING (Figure 1c). A crystallographic analysis of a construct encoding the C-part of cIAP1 that includes the BIR3, the RING, and the two intermediate domains, UBA and CARD, revealed that the monomeric cIAP1 adopts a compact inactive closed conformation, in which the RING is sequestered in the heart of the molecule [48]. The monomeric form can bind ubiquitin-charged E2s; however, this binding is not sufficient to promote dimerization [53] nor ubiquitin transfer [54]. The BIR3 and CARD are both critical for maintaining the closed auto-inhibited conformation [49]. Engagement of the BIR3 by synthetic ligands (e.g., Smac mimetics) promotes a cIAP1 conformational modification and RING exposure, resulting in dimerization and subsequent E3-ligase activation, auto-ubiquitination, and degradation [48,54]. A dynamic analysis of cIAP1 conformational change and inter-domain motions suggested that cIAP1 is prime for activation and able to undergo a very rapid activating conformational change upon binding of ligands [54]. When overexpressed in HEK293T cells, cIAPs are unstable proteins because of autoubiquitination and degradation, suggesting their tendency to spontaneously dimerize [55]. Co-expressing the molecular adapter TRAF2 with cIAP1 blocked the cIAP1-auto-ubiquitination process, stabilized the protein [55] and regulated its subcellular localization [56], demonstrating the importance of TRAF2 as regulatory partner of cIAP1. By contrast, the dimeric form of XIAP that does not contain CARD is stable and does not require an activation step [57].

### 3.3. The cIAPs-TRAF2-TRAF3 E3-Ubiquitin Ligase Complex

TRAFs constitute a family of cytoplasmic adaptors involved in signal transduction from a variety of receptors involved in immune response [58]. Just like cIAPs, TRAF1 and 2 were discovery in a biochemical screen aiming to identify cytoplasmic proteins associated with the tumor necrosis factor Receptor 2 (TNFR2) [59]. Since then, 4 other members have been described in mammals, characterized by the structural similarity. They share the presence in protein structure of a specific TRAF domain which function is protein-protein interaction. It binds to receptors by its N-extremity (TRAF-N domain) and to intracellular signaling molecules through its C-extremity (named TRAF-C). The functional form of TRAF proteins is a trimer that binds to trimeric active receptors and connects downstream signaling effectors. Beside this scaffolding function, TRAF2-6 also display an E3-ubiquitin ligase activity thanks to the presence of an N-terminal RING domain [58].

Among TRAFs, TRAF2 can directly bind cIAPs, whereas TRAF1 and TRAF3 can bind cIAPs indirectly via TRAF2. The mechanisms of cIAPs-TRAF2 interaction have been extensively analyzed

and involved the BIR1 domain. Biochemical and structural studies demonstrated that one cIAP2-BIR1 molecule binds TRAF2 in its trimeric functional form [41]. TRAF2 promotes the recruitment of cIAPs into receptors associated signaling complexes, thereby engaging downstream signaling pathways. The concerned receptors are TNFR1, TNFR2, CD40, CD30, and BAFF-R (B-cell activating factor) from the TNFR superfamily, TLR4 (toll-like receptor-4), nucleotide binding-oligomerization domain (NOD)-like receptors (NLRs), retinoic acid-inducible gene I (RIG-I)-like receptors (RLRs), and some cytokine receptors, such as interferon (IFN) receptor [58,60]. Independently of receptor engagement, cIAP1 has been found associated with TRAF2 in unstimulated cells from several linages, including epithelial cells, lymphocytes, macrophages, and murine embryonic fibroblasts (MEF) [43,61,62].

Increasing evidences suggest that cIAP1 and TRAF2 form an E3-ubiquitin ligase complex, in which cIAP1 functions as E3-enzyme, while TRAF2 constitutes an important regulatory subunit. TRAF2 serves as adaptor for bringing cIAP1 to close proximity of the substrates, it can stabilize cIAP1 by blocking auto-ubiquitination process [55], regulates its subcellular localization [56], and also activates its E3-ubiquitine ligase activity through K63-linked ubiquitination [63]. In some situation, TRAF3 takes part in the complex serving as substrate binding component (Table 1).

**Table 1.** IAP ubiquitination substrates.

Cellular Process /Protein Family	Substrate or Partner	IAPs	Interacting Mode	Nature of the Ubiquitination/ Consequences	Ref
Apoptosis	AIF	XIAP	BIR2	Degradative polyubiquitination & Nondegradative polyubiquitination at K255 interfering with AIF DNA binding.	[64,65]
	ARTS	XIAP	BIR3	Degradative polyubiquitination at K3, blocks XIAP inhibition	[66]
	Bcl2	XIAP	Indirect, via ARTS	Degradative ubiquitination favoring cell death	[46]
	Caspase-3 and -7	cIAP2	Direct	Mono-ubiquitination in in vitro assay	[16]
		cIAP1, XIAP	BIR2, IBM-dep.	K48-linked polyubiquitination inhibiting cell death	[67,68]
	Caspase-7	XIAP		Neddylation, inhibition of caspase activity	[21]
	Caspase-8	cIAP1, XIAP		Degradative ubiquitination of component of the Ripoptosome	[69]
	cIAP1/2	cIAP1		Degradative (auto)ubiquitination, required TRAF2	[70,71]
	FAF1	XIAP	BIR1-3	Degradative polyubiquitination, inhibits FAF1-mediated cell death	[72]
Caspase-3 and -7	FLIP <sub>L</sub>	cIAP1, XIAP		Degradative ubiquitination of component of the Ripoptosome. Ubiquitination of FLIP required caspase-8-mediated cleavage.	[69]
	Smac	cIAPs, XIAP	BIR2,3, IBM-dep.	Degradative ubiquitination, blocks XIAP inhibition and inhibits cell death	[73,74]
	XIAP	XIAP		Degradative autoubiquitination	[70]
	Autophagy	p62	XIAP	Direct	Degradative ubiquitination
Copper homeostasis	CCS	XIAP	BIR3	Polyubiquitination at K241, enhances chaperone activity	[76]
	COMMD1	XIAP	BIR3	K48-linked ubiquitination, Increases intracellular copper in cultured cell	[77]
Cytoskeleton regulation	cdc42	XIAP	Direct	Degradative polyubiquitination at K166 Stabilization of RhogDI $\alpha$ -cdc42 interaction.	[78]
		cIAP1	BIR2	Regulation of the TNF $\alpha$ , EGR or Ras-V12-mediated activation	[61]
	Profilin 2	cIAP1	Direct	Degradative polyubiquitination	[79]
	Rac1	XIAP, cIAPs	BIR1-2	Degradative polyubiquitination at K147 Upregulation and activation of Rac1	[80,81]
	RhoA	XIAP	Direct	Regulation of protease-activated receptor-mediated RhoA activation	[82]

**Table 1.** Cont.

Cellular Process /Protein Family	Substrate or Partner	IAPs	Interacting Mode	Nature of the Ubiquitination/ Consequences	Ref
DNA damage response/ cell cycle regulation	Chk1	XIAP	BIR3, IBM-dep.	Positive or negative modulation of the stability, regulated by XAF1	[32,83]
	MRE11	cIAP2	BIRs	Direct or indirect degradative polyubiquitination	[84]
	p21	cIAP1		Direct or indirect modulation of the neddylation leading to degradation	[85]
	Survivin	XIAP	Direct	Degradative ubiquitination, regulated by XAF1	[86]
Inflammation NF-κB	Caspase-1	cIAP1/2	BIR1	K63-linked activating ubiquitination	[87]
	SOCS1	XIAP	BIR1	K63-linked ubiquitination leading to stabilization	[88]
	IKK $\epsilon$	cIAPs /TRAF2		K63-linked ubiquitination at K30, K401, essential of kinase activity.	[44]
	IKK $\gamma$	cIAP1	BIR2-3	K6-polyubiquitination, mono-ubiquitination at K285 and K63-linked polyubiquitination at K277 and K309 leading to NF-κB activation.	[18,19, 89]
	NIK	cIAPs	BIR2 and indirect (TRAF2/3)	K48-linked degradative ubiquitination	[31]
RIPK family	RIPK1	cIAPs	Direct or indirect	K11 and K63-linked ubiquitination leading to LUBAC recruitment and NF-κB activation. Degradative K48-linked polyubiquitination. K63-linked ubiquitination leading to LUBAC and TAK1/TAB1/TAB2 complex recruitment and NF-κB activation in NOD signaling	[12,13, 69,90]
	RIPK2	XIAP	BIR2	Polyubiquitination (diverse ubiquitin chains) in vitro assay	[20]
	RIPK2/3	cIAPs, XIAP		Polyubiquitination (diverse chains) at K51 and K145, in vitro assay.	[14]
	RIPK4	cIAP1	Direct		[14]
Signal transduction	ACs	XIAP	Indirect via TRIP-Br1	K27-linked polyubiquitination at K1047 (AC1) leading to enhanced AC1 endocytosis and degradation	[15]
	Bcl10	cIAP1/2		K63-linked ubiquitination leading to recruitment of LUBAC and IKK complex and NF-κB activation in BCR signaling	[91]
	MEKK2/3	cIAP1, XIAP	BIR1-2	K63-linked ubiquitination that blocks the MEKK2/3-MEK5-ERK5 cascade	[92]
	MEKK2	XIAP	?	K48- and K63-linked ubiquitination, regulation of the bi-phasic NF-κB activation	[93]
	PTEN	XIAP	Direct	Degradative polyubiquitination	[94]
	RAF1	XIAP, cIAPs	BIR1-2	Degradative polyubiquitination	[95]
	TAK1	XIAP	Direct or indirect via TAB1	K63-linked ubiquitination that results in kinase activation/Degradative K48-linked ubiquitination.	[96,97]
TRAF family	TRAF2	cIAP1	BIR1	Degradative and non degradative polyubiquitination. Regulation of receptor complex mediated signaling.	[98,99]
	TRAF3	cIAPs	Indirect, via TRAF2	K48-linked degradative ubiquitination leading to non-canonical NF-κB activation.	[63,100, 101]
	TRAF6	cIAPs	Indirect	K48-linked polyubiquitination. K63-linked ubiquitination. Regulation of receptor complex mediated signaling.	[102]

**Table 1.** Cont.

Cellular Process /Protein Family	Substrate or Partner	IAPs	Interacting Mode	Nature of the Ubiquitination/ Consequences	Ref
Transcriptional program	CHOP	cIAP1	Direct	Degradative ubiquitination, prevents ER-stress mediated apoptosis.	[103]
	CREB	cIAPs	Indirect, via TRAF2/3	K48-linked degradative ubiquitination	[45]
	c-Rel	cIAPs	Indirect, via TRAF2/3	K48-linked ubiquitination	[43]
	E2F1	cIAP1	BIR3	K63-linked ubiquitination at K161/164. Stabilization in S phase of cell cycle or upon genotoxic stress. Binding to chromatin	[104, 105]
	Groucho	XIAP	Direct	Monoubiquitination leading to a decrease of the affinity of Groucho for transcription factor	[17]
	HIF1 $\alpha$	XIAP		K63-linked ubiquitination. Stabilization, nuclear translocation. Binding to chromatin	[106]
	IRF1	cIAP2	Direct	K63-linked ubiquitination leading to transcription factor activation. Regulated by S1P.	[107]
	IRF5	cIAPs	Indirect, via TRAF2/3	K48-linked ubiquitination	[43]
	Mad1	cIAP1	BIR1-3	Degradative ubiquitination. Activation of c-Myc	[108]

ACs (Adenyl cyclase): enzyme generating cAMP; AIF (Apoptosis-inducing factor): regulator of chromatin condensation; ARTS: septin-like mitochondrial protein promoting apoptosis by antagonizing XIAP; Bcl2 (B-cell lymphoma 2): inhibitor of the intrinsic pathway of apoptosis; Bcl10 (B-cell lymphoma 10): adaptor protein in B cell receptor (BCR)-associated complex; BIR (baculovirus IAP repeat); CCS (copper chaperone for superoxide dismutase): responsible for delivery copper to superoxide dismutase; cdc42 (Cell Division Cycle 42): Small GTPase from Rho family regulator of actin cytoskeleton; Chk1 (Checkpoint kinase 1): Serine/Threonine protein kinase that controls the G2/M phase transition in response to DNA damage; CHOP (C/EBP homologous protein): transcription factor activated in response to endoplasmic reticulum stress; cIAP1 (cellular IAP); COMMD1 (Copper metabolism MURR1 domain protein 1): scaffold protein involved in copper homeostasis; CREB (C-AMP Response Element-binding protein): transcription factor involved in immune response; c-Rel: NF- $\kappa$ B subunit; E2F1 (E2 promoter binding factor 1): transcription factor involved in G1-S cell cycle phase transition and in DNA damage response; FAF1: Fas-associated Factor 1, enhances Fas-induced apoptosis; FLIP (FADD-like IL-1 $\beta$ -converting enzyme-inhibitory protein): major antiapoptotic protein; Groucho: repressing cofactor of the CTF/LEF (T-cell factor/lymphoid enhancer factor-1) transcription factor; HIF1 $\alpha$  (Hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ ); IAP (Inhibitor of Apoptosis); IBM (IAP binding motif); IKK (I- $\kappa$ B kinase); IRF1&5 (Interferon (IFN) regulator factor 1&5): transcription factors involved in the induction of IFN, some inflammatory cytokines and genes of inflammation and immune response; Mad1 (Mitotic arrest deficient 1): spindle assembly checkpoint (SAC) regulator, repressor of c-myc; MEKK2/3 (Mitogen-Activated protein kinase 2/3): serine/threonine protein kinase involved in MAP kinase signaling pathway; MRE11 (Meiotic Recombination 11 Homolog): nuclease involved in the homologous recombination (HR) pathway of double strand break repair; NIK (NF- $\kappa$ B-inducing kinase); p21 (also named CIP: CDK-interacting protein 1): cyclin-dependent kinase inhibitor (CKI) that controls the S phase of cell cycle; p62: receptor for protein destined to be degraded by autophagy; Profilin 2: actin cytoskeletal regulator, mediator of synapse architecture; PTEN (phosphatase and tension homolog): regulator of the phosphatidylinositol 3-kinases (PI-3K)/Akt pathway; Rac1: Small GTPase from Rho family regulator of actin cytoskeleton; RAF1: serine/threonine-protein kinase (MAP3K) involved in Ras-RAF-ERK-MEK cascade; RIPK (receptor-interacting kinase); RhoA: Small GTPase from Rho family regulator of actin cytoskeleton; S1P (sphingosine-1-phosphate): bioactive sphingolipid; Smac (second mitochondria-derived activator of caspase): IAP inhibitor; SOCS1 (suppressor of cytokine signaling 1): inhibitor of IFNs and some cytokine signaling pathways; TAK1 (tumor growth factor- $\beta$ -activated kinase 1); TRAF (tumor necrosis factor Receptor (TNFR)-associated factor); XIAP (X-linked IAP).

#### 4. IAP-Mediated Ubiquitination of Caspases and IAP Antagonists and Regulation of Apoptosis

IAPs were first identified in baculovirus by their ability to block apoptosis of infected cells. In insect cells, they are essential for maintaining cell survival. Downregulation or loss of function of the drosophila IAP1 (DIAP1) is sufficient to induce caspase activation and massive apoptotic cell death in early embryo [109,110]. Mutation within the RING domain abolished the ability of DIAP1 to prevent apoptosis, demonstrating the importance of the E3-ubiquitine ligase activity [109,110]. DIAP1 protein exerts its anti-apoptotic function by inhibiting caspases. It can physically interact with both the initiator and effector caspases and promotes their ubiquitination that results in modulating their stability and activity [111,112]. Apoptosis occurrence requires the neutralization of DIAP1 [112]. Genetic analysis of Drosophila mutants displaying default in developmental cell death highlighted the importance of IAP

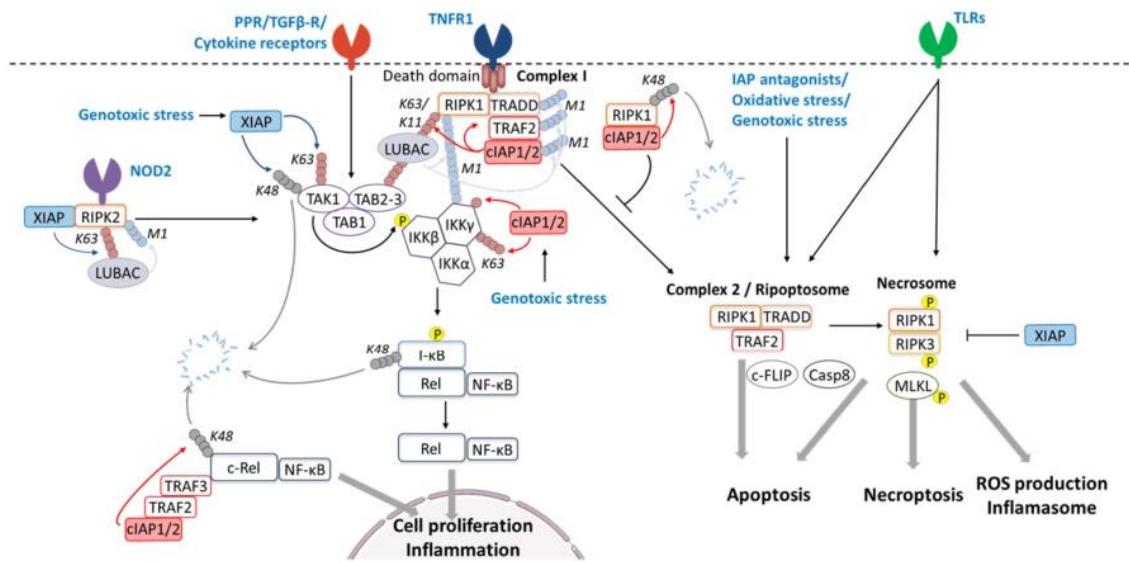
antagonists [111,112]. These proteins share an N-terminal IBM that competes with the IBM of caspases for DIAP1 interaction. Binding of IAP antagonists to DIAP1 triggers DIAP1 auto-ubiquitination and degradation [112].

In mammals, XIAP and cIAPs are also able to bind and promote the ubiquitination of apoptotic caspases *in vitro* [16,21,68]. However, the *in vivo* relevance of this modification is still debated. XIAP is considered as the main direct inhibitor of caspases activity in mammals [113]. It is present in the apoptosome complex, and its binding to initiator caspase-9 is sufficient to prevent the activating dimerization and protease activity of the caspase [114,115]. XIAP can also directly bind and inhibit effector caspases-3 and -7 by hindering the substrate-binding pocket and blocking substrate accessibility [33,34,115–119], independently of ubiquitination process. However, the analysis of thymocytes, embryonic stem cells and fibroblasts from Δ RING mutant-bearing transgenic mice showed an increased caspase activity and an enhanced sensitivity to apoptosis suggesting the physiological requirement of the XIAP E3-ubiquitin ligase activity for caspase-inhibition [118]. Although less critical for apoptosis induction than in *drosophila*, IBM-containing-IAP antagonists also play a significant role in apoptosis regulation in mammals. The best characterized is Smac that can bind to both the BIR2 and BIR3 of cIAP1, cIAP2, XIAP, and ML-IAP in an IBM-dependent manner [120–122]. It is generally admitted that Smac competes with caspases for XIAP interaction, whereby abrogates caspase inhibition, while cIAPs and ML-IAP antagonize Smac-XIAP binding [113,123–125]. Moreover, Smac binding to the BIR domains stimulates cIAP1 E3-ubiquitin ligase activity, autoubiquitination, and degradation [126]. Accordingly, Smac deficiency in mice led to increased level of cIAPs demonstrating the essential role for Smac in controlling the intracellular cIAPs content [127]. In turn, ML-IAP, cIAP1, and XIAP can induce the ubiquitination and degradation of their antagonists [73,128,129].

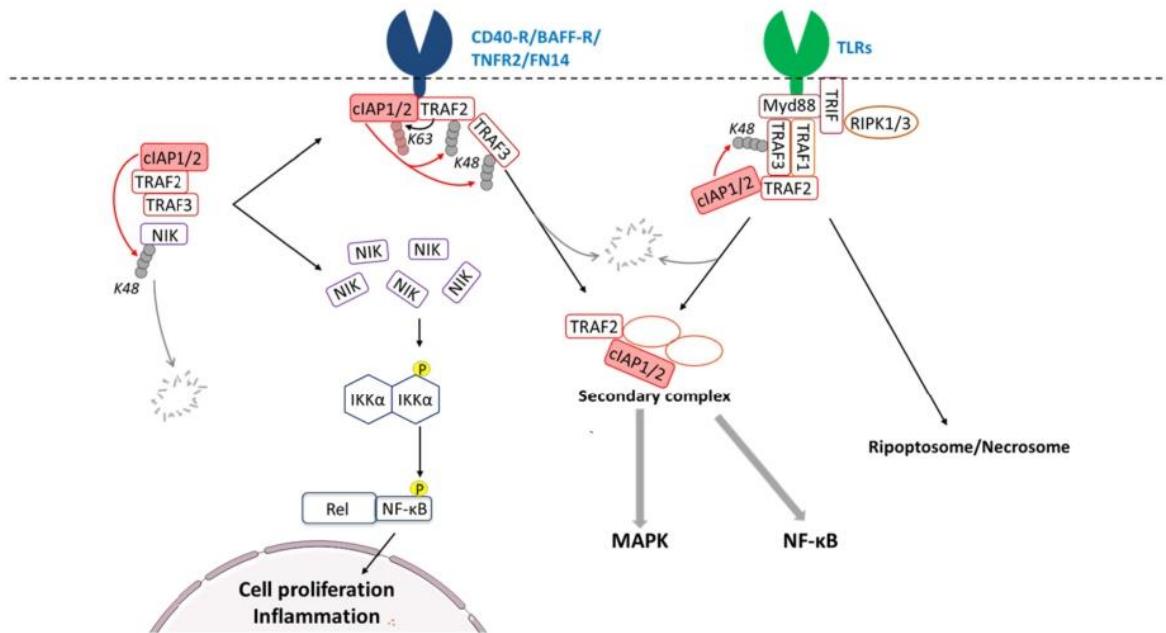
Besides caspases and IAP antagonists, IAPs can also regulate through ubiquitination other regulators of apoptosis (Table 1). For most of them, except for the B cell lymphoma 2 (Bcl-2) [46], IAP-mediated ubiquitination results in inhibiting cell death activity.

## 5. IAP-Mediated Regulation of NF-κB-Signaling

NF-κBs correspond to a family of transcription factors responsible for the expression of several anti-apoptotic genes, cytokines and pro-inflammatory molecules that orchestrate the innate immunity [130]. They are activated upon stimulation of membrane or intracellular receptors, including members of the TNFR superfamily, growth factor receptors, cytokine receptors, and PRRs, as well as in response to environmental or endogenous stress. Two distinct NF-κB activation signaling pathways have been described: the canonical and the non-canonical (Figures 2 and 3). Schematically, the canonical pathway involved the IKK (Inhibitor of κB kinase) complex composed of IKK $\alpha$ , IKK $\beta$ , and IKK $\gamma$  (Figure 2). It is activated by phosphorylation by upstream kinases including the tumor growth factor-β-activated kinase 1 (TAK1), in turn stimulating the UPS (ubiquitin-proteasome system)-mediated degradation of the inhibitor-κB (I-κB) through phosphorylation. This results in the release and translocation of the NF-κB subunits to the nucleus where they promote a specific gene transcription program. The non-canonical pathway is independent of IKK $\beta$  and IKK $\gamma$  (Figure 3). It involves NIK that catalyzes the phosphorylation of IKK $\alpha$  homodimer leading to phosphorylation, processing, and nuclear translocation of the transcription factor [130].



**Figure 2.** Regulation of the TNFR and canonical NF- $\kappa$ B signaling pathways by IAPs. The activation of the tumor necrosis factor receptor 1 (TNFR1) induces the formation of the complex 1 composed of TNFR-associated death domain (TRADD), receptor-interacting kinase 1 (RIPK1), TNFR-associated factor 2 (TRAF2), and cellular inhibitors of apoptosis (cIAP1/2). The latter promote the ubiquitination of RIPK1 (K63 and K11-linked), leading to the recruitment of the linear ubiquitin chain assembly complex (LUBAC). In turn, LUBAC induces the conjugation of linear M1-linked polyubiquitin chains to complex 1 components. The resulting ubiquitin scaffold allows the recruitment of TAK1 (tumor growth factor- $\beta$ -activated kinase 1)/TAB1/TAB2/3 (transforming growth factor-activated kinase 1-binding protein 1, 2, and 3) complex and IKK (Inhibitor of  $\kappa$ B kinase) complex composed of IKK $\alpha$ /IKK $\beta$ /IKK $\gamma$ . TAK1 catalyses the phosphorylation of IKK $\beta$  and the activation of IKK. This leads to the phosphorylation of the Inhibitor of  $\kappa$ B (I- $\kappa$ B), its K48-linked ubiquitination, and proteasomal degradation, resulting in the release and nuclear translocation of NF- $\kappa$ B subunits. Stimulation of PRRs (pattern-recognition receptors), TGF $\beta$ -R (Transforming Growth Factor-beta receptor), cytokine receptors, NOD2 (nucleotide-binding oligomerization domain), or genotoxic stress can engage the canonical NF- $\kappa$ B pathways by stimulating TAK1/TAB1/TAB 2/3 complex. XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis protein) can positively regulate TAK1 activation through K63-linked ubiquitination or negatively through K48-linked ubiquitination and proteasomal degradation. In the case of NOD2 stimulation, XIAP promotes the K63-linked ubiquitination of RIPK2 that results in the recruitment of LUBAC and TAK1 activation. cIAPs can control IKK $\gamma$  by promoting mono- or K63-linked ubiquitination, while the cIAPs/TRAFs E3-ubiquitin ligase complex can regulate c-Rel stability. A complex 2 derived from TNFR1-associated complex 1 or Ripoptosome that contain RIPK1 and RIPK3 can be formed in response to depletion of cIAPs by IAP antagonists, oxidative or genotoxic stresses, or TLRs (toll-like receptors) stimulation. These complexes can lead to apoptosis, necroptosis, or ROS production and inflammasome activation, depending on presence of the regulatory or effector proteins c-FLIP (cellular FLICE-like inhibitory protein), caspase 8 (Casp8), and/or MLKL. cIAPs block complex 2/rioptosome assembly by inhibiting RIPK1 kinase activity and/or by mediating its K48-linked ubiquitination and degradation. Necrosome is negatively controlled by XIAP.



**Figure 3.** Regulation of signaling pathways by cIAP-mediated degradation of TRAF2 and/or TRAF3. In standing state, the cIAPs/TRAF2/3 E3-ubiquitin ligase complex controls the cellular content NIK (NF- $\kappa$ B-inducing kinase) by mediating K43-linked ubiquitination and proteasomal degradation. Stimulation of CD40-R (cluster of differentiation 40 receptor), BAFF-R (B-cell activating factor receptor), TNFR2 (tumor necrosis factor Receptor 2), FN14 (Fibroblast growth factor-inducible 14), or TLRs (toll-like receptors) promotes the recruitment of cIAPs/TRAFs complex to the receptor leading to the accumulation of NIK, phosphorylation of IKK $\alpha$  dimer, and activation of the non-canonical NF- $\kappa$ B pathway. In receptor-associated complex, TRAF2 can stimulate cIAPs via K63-linked ubiquitination. In turn, cIAPs catalyse the K48-linked polyubiquitination of TRAF3 and, in a lower level, TRAF2, causing their degradation and the formation of a secondary complex. Upon TLR stimulation, RIPK1/3 (receptor-interacting kinase 1/3) are also recruited to the receptor complex that can lead to the assembly of Ripoptosome and/or necrosome. Myd88: Myeloid differentiation primary response 88; TRIF: toll-interleukin 1 receptor domain-containing adaptor inducing IFN- $\beta$ .

### 5.1. XIAP-Mediated TAK1 Ubiquitination

TAK1 is a mitogen-activated protein kinase (MAP3K). Besides its function in transducing MAPK signaling, it can participate to NF- $\kappa$ B activation by phosphorylating IKK $\beta$ . It is active when associated to TAK1-binding protein-1 (TAB1) and either TAB2 or TAB3 which share the ability of binding K63-linked ubiquitin chains [131]. Thus, TAK1/TABs complex is recruited to cell signaling platform via binding to K63-linked polyubiquitin scaffold that maintains TAK1 and its substrate in close proximity. TAK1 activation requires a direct K63-linked polyubiquitination. The E3-ubiquitin ligase TRAF6 and XIAP [97,131] can mediate this modification [97,131]. XIAP can directly bind to TAB1 via its BIR1 domain [42,132] and induces K63-linked polyubiquitination that results in TAK1 activation and stabilization of IKK complex [89,97]. The XIAP-mediated TAK1 polyubiquitination is critical for NF- $\kappa$ B activation in response to genotoxic stress [89] and for TGF- $\beta$  (transforming growth factor beta) signaling [97,133]. XIAP is able to directly interact with the TGF- $\beta$  receptor type I [97,133] and BMP (bone morphogenetic proteins) receptors [132], bridging the receptor to TAK-1/TABs complex and allowing the engagement of JNK (c-Jun N-terminal kinase) and NF- $\kappa$ B signaling pathways [133]. XIAP has also been involved in a feed-back loop regulation in TGF- $\beta$  signaling. Indeed, TGF- $\beta$  can induce the expression of the XIAP gene [96,134]. In turn, XIAP mediates the polyubiquitination and degradation of TAK-1, leading to an inhibition of TGF- $\beta$ -induced JNK activation [96].

### 5.2. cIAPs-Mediated Ubiquitination of IKK $\gamma$ and IKK $\epsilon$

IKK $\gamma$  (also known as NEMO for NF- $\kappa$ B essential modulator) is the regulatory subunit of IKK complex. While the catalytic subunits IKK $\alpha$  and  $\beta$  are activated by phosphorylation, IKK $\gamma$  is subjected to multiple post-translational modifications including monoubiquitination, K6-linked, K63-linked, M1-linked, and K63/M1 hybrid polyubiquitination [130]. Genotoxic stress or TNF $\alpha$  induce mono- or K6-linked polyubiquitination of IKK $\gamma$ , respectively, which are inhibited in cIAP1-deficient cells [18,89]. Directed mutagenesis and in vitro assay demonstrated a direct interaction of the N-terminus of IKK $\gamma$  with the cIAP1 BIR2-3 domain [89] and the ability of cIAP1 to conjugate monoubiquitin at Lys285 [18] and polyubiquitin chains at Lys277 and 309 [89] (Figure 3). Of interest, the *molluscum contagiosum* virus (MCV) that infects keratinocytes causing small neoplasms takes advantage of this process. The MCV MC159 protein can compete with cIAP1 for IKK $\gamma$  binding; therefore, it can inhibit K63-linked ubiquitination of IKK $\gamma$  and can suppress NF- $\kappa$ B activation [135].

cIAP1/2 in complex with TRAF2 can also mediate K63-linked ubiquitination of IKK $\epsilon$  (also called IKBKE: inhibitor of nuclear factor  $\kappa$ -B kinase subunit  $\epsilon$ ) [44]. IKK $\epsilon$  is a noncanonical member of the IKK family, a downstream effector of TLR3, RIG-1, and IFN- $\beta$  receptors. It participates in signal transduction leading to the activation of NF- $\kappa$ Bs, IFRs (interferon (IFN) regulatory factors) or STATs (Signal Transducers and Activators of Transcription). The K63-linked ubiquitination at K30 and K401 is essential for its kinase activity and NF- $\kappa$ B activation [136].

### 5.3. cIAP1/2-TRAF2-TRAF3 E3-Ubiquitin Ligase Complex Regulates the Cellular Content of c-Rel

Among NF- $\kappa$ B transcription factors, the c-Rel subunit is required for TLR-induced expression of pro-inflammatory cytokines. It has been associated with inflammatory and autoimmune diseases in c-Rel knockout mouse models. The steady-level of c-Rel and its activation in response to TLR stimulation is enhanced in TRAF2-deficient myeloid cells. TRAF2 mediates UPS-dependent degradation of c-Rel, which depends on the presence of cIAP1s. cIAPs and TRAF2 can complex with c-Rel only in the presence of TRAF3. Thus, cIAPs, TRAF2, and TRAF3 cooperate to regulate the stability of c-Rel [43].

### 5.4. Regulation of the Cellular Content of NIK and the Non-Canonical NF- $\kappa$ B-Activating Signaling Pathway by the cIAP1/2-TRAF2-TRAF3 E3-Ubiquitin Ligase Complex

The development of Smac mimetics that trigger cIAP1 auto-ubiquitination and degradation has revealed the role of this IAP in the regulation of the non-canonical NF- $\kappa$ B-activating signaling pathway [137,138]. In the standing state, the cellular content of NIK is maintained low through sustained UPS-mediated degradation process (Figure 3). Cell exposure to Smac mimetics induced NIK stabilization that resulted in the activation of the non-canonical NF- $\kappa$ B signaling [137,138].

Genetics analysis of primary multiple myelomas that are characterized by a high level of NIK have revealed inactivating mutations in cIAP-encoding genes [139,140], which strengthen the role of cIAPs in the negative regulation of NIK. Although NIK protein contains an N-terminal IBM that can directly bind the BIR2 cIAPs, TRAF2, and TRAF3 are required for regulating NIK protein turnover [63]. The analysis of TRAFs or cIAPs mutant multiple myeloma and cIAPs- or TRAFs-deficient MEFs demonstrated that NIK degradation is ensured by the TRAF3-TRAF2-cIAP1 ubiquitin ligase complex, in which TRAF3 serves as NIK-binding component and recruits cIAPs via TRAF2 [63,141]. The NIK IBM-cIAPs interaction stabilizes the complex and facilitates the cIAP-mediated NIK degradative (K48-linked chains) ubiquitination [31].

## 6. IAP-Mediated Ubiquitination of Receptor-Interacting Kinases (RIPKs)

During the last decade, serine/threonine kinases from receptor-interacting kinase (RIPK) family had emerged as critical determinants of cell fate in response to stimulation of death, interleukin, or pattern-recognition receptors, as well as genotoxic or oxidative stresses, at the crosstalk between differentiation, inflammatory response, and cell death signaling pathways (for review, see

Reference [142]). RIPKs are characterized by the presence of a homologous serine-threonine kinase domain (KD) and at least one additional variable domain required for the recruitment of RIPKs into receptor complexes or signaling platforms through homotypic interaction. Their cellular functions are tightly regulated by post-translational modifications, and ubiquitination constitutes one of the most important mechanism regulating their kinase activity, determining their recruitment into various multiprotein signaling complexes and modulating their ability to engage downstream signaling pathways [143–145]. cIAP1/2 and XIAP are able to catalyze the conjugation of ubiquitin chains of variable topology to RIPK1, 2, 3, and 4, but the *in vivo* significance of these modifications is not completely solved [14].

#### 6.1. *cIAP1/2-Mediated RIPK1 Ubiquitination in Signal Transduction and Ripoptosome Assembly*

RIPK1 is a death domain (DD)-containing protein able to bind members of TNFR superfamily and adapter proteins via DD homotypic interaction. It determines the response of cells to receptor stimulation, controlling the activation of transcriptional response leading to survival, differentiation, and inflammation, as well as the assembly of cell death signaling platforms leading to apoptosis or necroptosis. RIPK1 can also take part to TNFR-independent signaling complexes thanks to the presence of a RIP homotypic interaction motif (RHIM) that mediates homotypic interaction with its closely related kinase RIPK3, TRIF (toll-interleukin 1 receptor domain-containing adaptor inducing IFN- $\beta$ ) that is an adaptor downstream of the pathogen-recognition receptors TLR3 and TLR4 [146] and DAI (DNA-dependent activator of interferon-regulatory factor) involved in the RIG-1 (retinoic acid-inducible gene I) signaling pathway.

The role and mechanisms of regulation of RIPK1 has been extensively studied in TNFR1 signaling pathway and recently very well reviewed [142,147] (Figure 3). Briefly, TNFR1 engagement triggers the binding of RIPK1 along with the adaptor TNFR1-associated death domain protein (TRADD) that allows the recruitment of TRAF2 and cIAP1/2 and the subsequent binding of the linear ubiquitin chain assembly complex (LUBAC). This transient membrane-associated complex referred to complex-I leads to the activation of canonical NF- $\kappa$ B and MAPK that culminate in the expression of genes promoting survival, inflammation, and differentiation. TNFR1 stimulation can also trigger the assembly of RIPK1-containing secondary cytoplasmic complexes referred to as complexes II that ultimately result in apoptotic or necroptotic cell death (Figure 3). While the kinase activity of RIPK1 is required for complexes-II assembly, it is dispensable for its scaffolding function. The ubiquitination of RIPK1 has been shown to be determinant for TNF- $\alpha$ -induced NF- $\kappa$ B activation in some cell lines, such as Jurkat T-cells [20,69,144]. K11 and K63-linked polyubiquitin chains conjugated on the K377 residue of RIPK1 are recognized by the UBD (ubiquitin-binding domain) of the LUBAC subunit HOIP (HOIL1 (interacting protein heme-oxidized IRP2 ubiquitin ligase 1)-interacting protein) and allows the recruitment of LUBAC. In turn, LUBAC added a linear (M1-linked) ubiquitin chain to complex I components. Altogether, K11, K63, M1-linked, and hybrid poly-ubiquitin chains [13,148,149] form a molecular scaffold that allows the recruitment of the trimeric kinase complexes IKK (Inhibitor of  $\kappa$ B kinase composed of IKK1/2/NEMO) and TAB1/TAB2/TAK1 and ultimately results in NF- $\kappa$ B and MAPK activation and gene activation (Figure 2).

cIAP1/2 and XIAP has been shown to promote K11-, K63-, and K43-linked ubiquitination of *in vitro* RIPK1 and in TNF- $\alpha$ -treated cells [13,14,90,149,150]. We cannot rule out that cIAP1/2 could also mediate the conjugation of branched ubiquitin chains. Of interest, constitutive RIPK1 ubiquitination has been detected in several tumor samples including mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma that displays a recurrent t(11;18)(q21; q21) translocation involving cIAP-encoding gene [151]. Exposing cells to Smac mimetics that trigger the degradation of cIAP1 or deletion of cIAPs abrogated TNF- $\alpha$ -dependent ubiquitination of RIPK1 prevented the recruitment of LUBAC, TAK1, and IKK into TNFR1-associated complex I and reduced NF- $\kappa$ B activation [13,149,152]. Although the involvement of RIPK1 in TNFR2 signaling pathway has not been clearly demonstrated, Smac mimetics can also prevent the K63-polyubiquitination of components of TNFR2 signaling complex and inhibit the

subsequent recruitment of LUBAC and activation of canonical NF- $\kappa$ B [153]. On the other hand, double deletion of genes *birc2* and *birc3* (encoding cIAP1 and cIAP2 respectively) or *birc2* and *birc4* (encoding cIAP1 and XIAP respectively) in mice led to embryonic mortality, which is abolished or delayed by deleting RIPK1 suggesting that cIAP1 can also inhibit the pro-cell death function of RIPK1 [154]. Deletion of cIAP1/2 sensitized cells to TNF- $\alpha$ , TRAIL (TNF related apoptosis inducing ligand), or Fas-mediated cell death [137,138,155–158] by promoting the assembly of cytoplasmic RIPK1-containing complex-II [152,159]. Such a cytoplasmic complex, named Ripoptosome, can also be spontaneously formed in cells treated with IAP antagonists or can be assembled in response to microbial infection, genotoxic, or oxidative stress [69,159,160]. In addition to its capacity to assist the scaffolding function of RIPK1, cIAP1 represses its kinase activity and autoactivation required for the assembly of complex II or Ripoptosome [12,161]. The generation of conditional knockin mouse deleted for cIAP2 and expressing cIAP1 mutated in its UBA domain made it possible to distinguish between the cIAP1-mediated RIPK1 ubiquitination required for its scaffolding function and that controlling its kinase activity [12]. These animals developed normally but were highly sensitive to TNF-mediated cell death. UBA mutation did not affect TNF-mediated NF- $\kappa$ B activation but prevented the K48-linked polyubiquitination on several acceptor Lysines of RIPK1 that resulted in sustained activation and accumulation of RIPK1 and enhanced formation of complex-II leading to cell death [12]. Thus, the cIAP1-UBA seems critical in defining the type of ubiquitination and the target lysine residues. This function could be related to its ability to facilitate the recruitment of the E2-ubiquitin conjugating enzyme [52].

To summarize, cIAP1 has the ability to control the scaffolding function of RIPK1 through K11- and K63-linked ubiquitination at K377, as well as its stability and kinase activity required for the cell death-inducing complex II/Ripoptosome assembly, through K48-linked ubiquitination on several ubiquitin-acceptor lysine residues (Figure 2). It constitutes a remarkable flexible checkpoint, able to determine the response to receptor engagement and to regulate the duration of the stimulation by switching the transcriptional response to cell death response or by promoting the ubiquitin-mediated degradation of RIPK1.

## 6.2. Regulation of RIPK3 and Necrosome by IAPs

In death-inducing complex II or Ripoptosome, RIPK1 binds to its closely related kinase RIPK3 through homotypic interaction via the RHIM domain, forming the so-called necrosome complex (Figure 3). Upon toll-like receptor priming by pathogen-associated molecular patterns (PAMPs), the necrosome can be formed in a cIAP-regulated RIPK1-dependent manner or independently of RIPK1 via a direct binding of RIPK3 with the adaptor TRIF [162]. Depending on the presence or not of adaptors and regulatory proteins, such as XIAP, caspase-8, cFLIPs (Cellular FADD-like IL-1 $\beta$ -converting enzyme-inhibitory protein), or MLKL (Mixed lineage kinase domain like pseudokinase), necrosome can lead to apoptosis, necroptosis and even to activation of inflammasome [162–167], leading to interleukin-1 (IL-1) and -18 secretion. Both RIPK3-dependent necrosis and inflammasome activation are negatively regulated by XIAP [163,167,168]. Accordingly, exacerbated pathogen-associated hyper-inflammation has been observed in some patients displaying XIAP deficiency. Moreover, mice lacking cIAP1, cIAP2, and XIAP are predisposed to IL-1-dependent autoantibody-mediated arthritis [166]. Polyubiquitination, including K63-, K48-, and linear-ubiquitination of both RIPK1 and RIPK3, has been detected within the necrosome [20,166]. The exact mechanism and function of this ubiquitination is not clearly determined. It could maintain RIPK1 kinase activity and modulate the assembly of necrosome. Although cIAP1/2 and XIAP are able to bind and catalyze the ubiquitination of in vitro RIPK1 and RIPK3 [14], they have not been involved in such ubiquitination processes [20]. On contrarily, deletion of XIAP in bone marrow-derived dendritic cells resulted in enhanced lipopolysaccharide- and TNF $\alpha$ -mediated necroptosis and inflammation [166]. Deletion of the XIAP-RING domain was sufficient to favor necrosome assembly, suggesting that XIAP functions as E3-ubiquitin ligase in regulating necroptosis. However, the ubiquitination substrates have not been determined [168].

### 6.3. XIAP-Mediated RIPK2 Ubiquitination and Regulation of NOD1/2 Signaling Pathway

RIPK2 protein (also named RIP2, RICK, or CARDIAK) lacks DD and RHIM domains, but it contains a CARD allowing its recruitment to the cytosolic receptors NOD1 and NOD2. NOD receptors participate to the innate immune response by sensing intracellular PAMPs. They recognize bacterial peptidoglycans and, in turn, activate pro-inflammatory and antimicrobial response via NF- $\kappa$ B, ERK2, and JNK intracellular signaling pathways. Similarly, to RIPK1, the polyubiquitination of RIPK2 is critical for the recruitment and the activation of TAK1/TAB1/TAB2 and IKK complexes that drive NF- $\kappa$ B and MAPKs signaling pathways [169,170]. Among the IAP family, cIAP1/2 and XIAP are able to induce ubiquitination of RIPK2 [14]. However, XIAP seems the main determinant of NOD signal transduction. NOD2 signaling occurred normally in bone marrow-derived macrophages from cIAP1/2-compromised mice [169,171], while NOD2-dependent activation of NF- $\kappa$ B and p38MAPK and secretion of proinflammatory cytokines were impaired in XIAP-deficient myeloid cells [169,171–173]. Accordingly, mice deficient in XIAP are highly sensitive to bacteria [174]. A default in NOD1/2-dependent immune signaling had been detected in XLP2 (X-linked lymphoproliferative syndrome type-2) that is an immunodeficiency disease linked to inactivating mutation in the XIAP gene [169]. XIAP can directly interact with RIPK2 via its BIR2 domain and catalyzes the conjugation of K63-linked ubiquitin chains on K209, K410, and K538 residues located in the kinase domain [173,175,176]. As for RIPK1 in the TNF-signaling pathway, IAP-mediated ubiquitination of RIPK2 allows the recruitment of LUBAC, TAB1/TAB2/TAK1, and IKK complexes and ultimately triggers the activation of transcriptional response [175] (Figure 3). Interfering with XIAP-RIPK2 interaction blocked NOD2-mediated RIPK2 ubiquitination and the downstream signaling pathway [175]. A recent study demonstrated that, similarly to RIPK1 in the TNF-signaling pathway, RIPK2 can form secondary cytosolic high molecular weight complexes [176] upon NOD stimulation. These secondary RIPK2-containing complexes depend on RIPK2 kinase activity and are inhibited by XIAP-mediated ubiquitination [176].

## 7. cIAP1-Mediated Degradation of TRAF2/3 as Regulatory Mechanism of Downstream Signaling Pathways

Because TRAF2 is a critical intermediate in signal transduction from receptors, and TRAF3 serves as substrate binding component in the cIAPs/TRAFs E3-ubiquitin ligase complex, the modulation of TRAF2, and/or TRAF3 cellular content constitutes a very efficient mechanism of spatio-temporal regulation of signaling.

The maturation and survival of B cells are controlled by CD40 or BAFF-R-dependent activation of the non-canonical NF- $\kappa$ B signaling pathway. Deletion of both cIAP1 and cIAP2 in mice induced a sustained activation of non-canonical NF- $\kappa$ B and maintained B-cells survival and maturation independently of BAFF-R [177]. CD40 or BAFF-R stimulation leads to the recruitment of TRAF3-TRAF2-cIAP1/2 complex to the receptor. In the membrane-associated complex, TRAF2 promotes the K63-linked ubiquitination and activation of cIAPs. In turn, cIAPs induce K48-linked ubiquitination and degradation of TRAF3 [63] and, to a lesser extent, TRAF2 [100] that results in NIK release and engagement of canonical NF- $\kappa$ B signaling [63] (Figure 3). Other members of TNFR can use such mechanisms for the activation of the noncanonical NF- $\kappa$ B pathway [178]. Upon CD40 stimulation, cIAPs and TRAF2 are translocated from the membrane receptor complex into the cytosol in a cIAP-dependent manner. The cytosolic cIAP1/TRA2 containing-complex promotes MAPK activation [100].

A cytoplasmic translocation and cIAP-mediated TRAF2 degradation have also been observed upon TNFR2 [179] or FN14 (Fibroblast growth factor-inducible 14) [180] stimulation. We demonstrated that differentiation of monocytic cells into macrophages is associated with cIAP1-induced UPS-mediated degradation of TRAF2 [62]. However, the significance of this event is still unclear. It could induce the stabilization of NIK and activation of noncanonical NF- $\kappa$ B and/or could constitute a feedback regulatory mechanism inhibiting canonical NF- $\kappa$ B activation [62,181–183]. Indeed, the activation of

NF- $\kappa$ B in TNFR2-stimulated cells or along the macrophagic differentiation process is transitory, and its downregulation is critical for differentiation achievement. The NF- $\kappa$ B downregulation has been proposed to result from the cIAP1-mediated TRAF2 degradation [62].

The cIAP1-TRAF2-TRAF3 complex is also a potent regulator of TRLs signaling in macrophages [43,101,184,185]. TRAF1 and TRAF3 can directly bind the TRL-associated adaptor MyD88 (Myeloid differentiation primary response 88). They then recruit TRAF2-cIAP1/2 into the receptor-associated complex (Figure 3). RIPK1 and RIPK3 are also present in the complex, recruited via the adaptor TRIF (Figure 3). Depletion of cIAPs by Smac mimetics inhibited TLR2 and TLR4-induced TRAF3-degradation and MAPK signaling but did not affect noncanonical NF- $\kappa$ B [101]. As observed after CD40 stimulation [100], TLR4-associated cIAP-mediated TRAF3-degradation is followed by the cytoplasmic translocation of a secondary large cytoplasmic complex containing, among other signaling molecules, MyD88, TRAF2, and cIAP1/2, which results in canonical NF- $\kappa$ B and MAPK activation [101,185]. In the absence of cIAPs, an XIAP-regulated cytoplasmic Ripoptosome or necrosome can be formed, leading to inflammation and necroptosis [166,167].

## 8. IAP-Mediated Regulation of Transcription Factors

cIAP1 and XIAP indirectly stimulate the activation of the transcription factor Myc and CTF (T-cell factor)/LEF (lymphoid enhancer factor-1) by blocking the recruitment of their respective repressor co-factors Mad1 (Max-dimerization protein-1) and Groucho [17,108]. While cIAP1 promotes the UPS-mediated degradation of Mad1 [108], XIAP catalyzes the mono-ubiquitination of Gro/TLE resulting in a decrease affinity for the transcription factor CTF/Lef. As a consequence, XIAP favors the  $\beta$ -catenin-TCF/Lef complex assembly and the initiation of a Wnt-specific transcriptional program [17].

IAPs have also been involved in the regulation of the transcription factor stability. cIAP1 can catalyze the degradative ubiquitination of C/EBP homologous protein CHOP, a transcription factor activated in response to endoplasmic reticulum stress. Consequently, cIAP1 protects pancreatic  $\beta$ -cells from toxic effect of free fatty acids [103]. As previously described, cIAP/TRAFs complex controls the cellular content of c-Rel [43]. In the same way, cIAP/TRAFs complex can mediate the degradation of IFR5 [43] and CREB (C-AMP Response Element-binding protein) [45]. IFR5 and CREB, as well as c-Rel, are mediators of the immune and inflammatory response. IRFs control the expression of IFN and some pro-inflammatory cytokine genes, and CREB plays a specific function in immune response by interfering with NF- $\kappa$ B and IFN response, promoting survival signals in macrophages and controlling the proliferation, survival, and/or differentiation of T and B lymphocytes [186]. IFR5 and CREB can directly interact with TRAF3, which recruits TRAF2 and cIAP to promote ubiquitination and degradation of the transcription factors [43,45].

A positive regulation of the transcriptional activity of IRF1, HIF1 $\alpha$  (Hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ ), and E2F1 (E2 promoter binding factor 1) by IAP-dependent ubiquitination processes has also been reported [104–106,187,188]. The activating process of IRFs involves post-transcriptional modifications, such as phosphorylation and K63-linked ubiquitination, which engage their dimerization and nuclear translocation. Molecular adaptors from TRAF family, mainly TRAF6, act as E3-ubiquitin ligase mediating this modification. In 2014, Harikumar et al. demonstrated that cIAP2 in complex with the bioactive sphingolipid mediator sphingosine-1-phosphate (S1P) can bind IRF1 and promotes K63-linked ubiquitination. In astrocytes, cIAP2-mediated IRF1 ubiquitination is essential for IL-1-induced IRF1-dependent expression of the chemokines CCL5 (C-C Motif Chemokine Ligand 5) and CXCL10 (C-X-C motif chemokine 10), which are involved in the recruitment of mononuclear cells to the site of inflammation [187]. HIF1 $\alpha$  participates to the adaptive response of cells exposed to stressful conditions. K63-linked ubiquitination is required for HIF1 $\alpha$  nuclear translocation and for its recruitment to target promoters. In 2017, Park et al. demonstrated that XIAP can promote this modification and is essential for the expression of HIF-dependent genes in hypoxia-stressed cells [106]. E2F1, the funding member of E2F family, is activated at the end of the G1 phase of cell cycle and promotes the expression of genes required for DNA replication and G1-S cell cycle phase transition. E2F1 also participates to the DNA

damage response by controlling cell cycle arrest and apoptosis. The activity and turnover of E2F1 are regulated through post-translational modifications and association with co-factors and regulatory proteins [188]. The accumulation of E2F1 in S phase of cell cycle and in response to DNA damaging agents is associated with K63-linked ubiquitination at lysine 161/164 residues [105]. Studies from our group and others demonstrated the ability of IAPs to bind and regulate the transcriptional activity of E2F1 [104,105,189,190]. We showed that cIAP1 overexpression stabilized E2F1 protein expression and modified its ubiquitination profile, increasing the content of E2F1 modified with K11-and K63-linked polyubiquitin chains and decreasing the proportion of K48-ubiquitinated E2F1 [104]. On the other hand, the downregulation of cIAP1 inhibited the accumulation of E2F1 in S-phase-of cell cycle, as well as the one induced by genotoxic stress [105], and completely blocked its capacity to bind chromatin [104]. cIAP1 can bind E2F1 through its BIR3 domain [189] and can promote K63-linked ubiquitination [105]. Thus, IAPs-mediated K63-linked ubiquitination can act as a signal for recruiting E2F1, as well as HIF1 $\alpha$ , to target promoter genes [104–106,188].

## 9. IAP-Mediated Regulation of Rho-GTPases and Cytoskeleton Remodeling

Although sometimes contradictory, numerous studies have reported modifications in the cell shape, cell polarity, or alterations in migratory or invasive behavior of cells after modulation (overexpression or downregulation) of IAP expression in mammal, drosophila, or zebrafish models (for review, see Reference [9]). The ability of IAPs to directly bind members of Rho family support these observations and may explain the divergent results [61,80,82,191].

Rho GTPases are potent regulators of actin cytoskeleton that maintain cell architecture and polarization. They orchestrate the actin remodeling involved in several fundamental cellular processes, including cell adhesion, cell motility, cell migration, cell growth, cell differentiation, and cell death. Rho-GTPases constantly cycle between a cytoplasmic, inactive GDP-bound state, and an active GTP-bound state that is mainly found in membrane-associated compartments. While the inactive forms are stabilized by association with RhoGDIs (RhoGDP dissociation inhibitors), in their active forms, Rho-GTPases are very unstable proteins. They are either recycled in inactive state by action of the GTPases accelerating proteins (GAPs) or ubiquitinated and degraded by the proteasome system. A function for IAP E3-ubiquitin ligases in the regulation of RhoGTPase turnover has been demonstrated [78,80]. XIAP can promote degradative ubiquitination of Rac1 at Lys147 [80] and cdc42 at Lys166 [78] and cIAP1 can induce ubiquitination of Rac1. Accordingly, loss of XIAP increased the cellular content of Rac1 and cdc42 in normal and tumor cell lines, therefore modifying cell morphology and migration [78,80]. On the other hand, IAP antagonists or silencing of XIAP reduced RhoA activation in response to protease-activated receptor [82], deletion of cIAP1 abolished cdc42 activation, and filopodia formation in response to TNF or EGF(Epidermal Growth Factor) [61] and the overexpression of cIAP2 led to the upregulation and activation of Rac1 in regenerating intestinal epithelial cells [81]. All studies agree that IAPs can bind RhoGTPases independently of the activation status [61,78,82,95,191]. We observed that cIAP1 stabilized the interaction of cdc42 with its regulator RhoGDI $\alpha$ , thereby controlling cdc42 homeostasis. Similarly, to RhoGDI $\alpha$  downregulation, cIAP1 depletion sped up the activating cycle and turnover of cdc42, resulting in enhanced filopodia formation in unstimulated cells. On the other hand, cIAP1 functions as an intermediate between membrane receptor and cdc42 activation; therefore, downregulation of cIAP1 completely blocked TNF, EGF, and HRas-V12-mediated cdc42 activation and migration [61]. Thus, as observed in RIP-dependent signaling pathways, IAPs have the ability to negatively or positively regulate RhoGTPase activity and turnover in function of cellular environment and conditions.

## 10. Conclusions

Numerous studies have demonstrated the critical function for IAPs in immune response. IAP-mediated ubiquitination constitutes the foundations of ubiquitin scaffold required for the assembly of multiprotein complexes that engage signaling from several receptors involved in immune response.

IAP-mediated ubiquitination of RIPK1 and RIPK2 in receptor-associated complex has been well documented; however, other adapters could also be IAP ubiquitination targets. For example, cIAPs-mediated ubiquitination of Bcl10 has been shown to be critical for driving BCR-mediated NF- $\kappa$ B activation [91]. Besides receptor complex, IAPs have also the ability to regulate downstream effectors, acting at different levels of signaling, from signaling kinases to transcription factors and cytoskeleton regulators. IAPs participate in signal transduction leading to cell survival, differentiation, motility, migration, and cytokine production. Thanks to their ability to promote different types of ubiquitination on substrates, they are also able to block the signaling pathways either by promoting UPS-dependent degradation of key intermediates or by switching the signal from survival to cell death. Thus, IAPs are able to modulate the strength and kinetics of signaling and to modify the cell response to a specific signal in time and space. They constitute fast and efficient adjustment parameters allowing the adaption of cells to changing conditions. The identification of IAP partners involved in cell cycle regulation, DNA damage response, copper metabolism, or autophagy (Table 1) suggests that IAPs could have more general functions in adaptive response to cellular stress.

Many of the IAP substrates remain to be identified, and the role and mechanisms of IAP-mediated ubiquitination are still misunderstood for many known partners. Determining the type and site of ubiquitination is of importance since it determines the cellular fate of proteins. Further works should be able to benefit from advances in understanding of the ubiquitin biology and from the development of new tools for investigating ubiquitination.

The mechanisms of activation and regulation of IAPs are still an important issue. IAP E3-ubiquitin ligases are active in a dimeric form. Since IAPs are able to form heteromeric complex [192], it could be interesting to determine whether homodimers and heterodimers could have different functions. In most cases, when investigated, the interplay between TRAF2 and cIAP1 was observed. TRAF2 appeared to be a very important regulator of cIAPs [55,56,63]. It has been observed expressed both in the cytoplasmic and nuclear fraction. Whether TRAF2 is dispensable or absolutely required for the E3-ligase activity of IAPs is still an important question to address. Some post-translational modifications of IAPs have been described, but the number of studies remains limited. Upon CD40, BAFF, or TLR4 stimulation, cIAP E3-ubiquitin ligases are activated by TRAF2 or TRAF6-mediated K63-linked ubiquitination [63,101,184]. Oxidation of the Cys308 residue in the BIR3 domain seems sufficient to trigger the dimerization, activation, and auto-ubiquitination of cIAP1 [193]. S-nitrosylation of XIAP at Cys213 within the BIR2 can modulate the anti-apoptosis function of XIAP, while S-nitrosylation of cIAP1 at Cys571 and 574 located in the RING can inhibit its E3-ubiquitin ligase activity [194]. The phosphorylation of XIAP at Ser87 or Ser40 by PKC (protein kinase C) or cdk1/Cyclin B1 complex, respectively, could modulate its stability and anti-apoptotic function [195,196]. The subcellular localization of IAPs seems also of importance. Most IAP substrates are cytoplasmic proteins; however, we have found that cIAP1 can be recruited to some promoters [105,189], and cIAP1/2 and XIAP are able to ubiquitinate transcription factors and modulate their binding to chromatin [104,106,189]. While cIAPs are mostly located in the cytoplasm in immune cells, including lymphocytes and macrophages, we and others detected them in the nucleus of some cancer cells and undifferentiated cells (e.g., hematopoietic stem cells), and cIAP1 undergoes nuclear cytoplasmic translocation along a differentiation program [197–199].

IAPs appeared as pleiotropic proteins with cell type-specific functions. Accordingly, they have been involved in diverse human pathologies, including immune deficiencies, cancers, and inflammatory disorders [200], and IAP antagonists have entered into clinical trials for diverse clinical applications. It will be important to decipher further the specific functions and regulation mechanisms of IAPs in immune or non-immune cell subsets and to determine the impact of IAP antagonists on specific cell populations.

**Author Contributions:** B.D. participated to the writing and construction of the figures, A.Z. constructed the Figures and L.D. conceived and supervised the project, wrote the article with input from all authors. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** Our work is supported by grants from “La Ligue contre le cancer” Comité de la Côte d’Or », the “Conseil Régional de Bourgogne-Franche-Comté”, the French National research Agency, (“Investissements d’Avenir” program ANR-11-LABX-0021), the European Union program FEDER, and fellowships from the “Ministère de l’Enseignement Supérieur et de la Recherche” of France (AZ) and the “Fondation ARC” (BD).

**Acknowledgments:** We apologize to the authors that made contributions to the field but have not been cited due to space limitations. We thank Natalia Bonan-Borges for correcting reading of the manuscript.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Crook, N.E.; Clem, R.J.; Miller, L.K. An apoptosis-inhibiting baculovirus gene with a zinc finger-like motif. *J. Virol.* **1993**, *67*, 2168–2174. [[CrossRef](#)]
2. Inohara, N.; Nunez, G. Genes with homology to mammalian apoptosis regulators identified in zebrafish. *Cell Death Differ.* **2000**, *7*, 509–510. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Owsianowski, E.; Walter, D.; Fahrenkrog, B. Negative regulation of apoptosis in yeast. *Biochim. Biophys. Acta.* **2008**, *1783*, 1303–1310. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Qu, C.; Sun, J.; Xu, Q.; Lv, X.; Yang, W.; Wang, F.; Wang, Y.; Yi, Q.; Jia, Z.; Wang, L.; et al. An inhibitor of apoptosis protein (EsIAP1) from Chinese mitten crab Eriocheir sinensis regulates apoptosis through inhibiting the activity of EsCaspase-3/7-1. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 20421. [[CrossRef](#)]
5. Zhang, L.; Zhong, K.; Lv, R.; Zheng, X.; Zhang, Z.; Zhang, H. The inhibitor of apoptosis protein MoBir1 is involved in the suppression of hydrogen peroxide-induced fungal cell death, reactive oxygen species generation, and pathogenicity of rice blast fungus. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2019**, *103*, 6617–6627. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Chen, P.; Kang, T.T.; Bao, X.Y.; Dong, Z.Q.; Zhu, Y.; Xiao, W.F.; Pan, M.H.; Lu, C. Evolutionary and functional analyses of the interaction between the Bombyx mori inhibitor of apoptosis (IAP) and nucleopolyhedrovirus IAPs. *Insect Sci.* **2019**. [[CrossRef](#)]
7. Berthelet, J.; Dubrez, L. Regulation of Apoptosis by Inhibitors of Apoptosis (IAPs). *Cells* **2013**, *2*, 163–187. [[CrossRef](#)]
8. Kocab, A.J.; Duckett, C.S. Inhibitor of apoptosis proteins as intracellular signaling intermediates. *FEBS J.* **2016**, *283*, 221–231. [[CrossRef](#)]
9. Dubrez, L.; Rajalingam, K. IAPs and cell migration. *Semin. Cell Dev. Biol.* **2015**. [[CrossRef](#)]
10. Sharma, S.; Kaufmann, T.; Biswas, S. Impact of inhibitor of apoptosis proteins on immune modulation and inflammation. *Immunol. Cell Biol.* **2017**, *95*, 236–243. [[CrossRef](#)]
11. Budhidarmo, R.; Day, C.L. IAPs: Modular regulators of cell signalling. *Semin. Cell Dev. Biol.* **2015**, *39*, 80–90. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Annibaldi, A.; Wicky John, S.; Vanden Berghe, T.; Swatek, K.N.; Ruan, J.; Liccardi, G.; Bianchi, K.; Elliott, P.R.; Choi, S.M.; Van Coillie, S.; et al. Ubiquitin-Mediated Regulation of RIPK1 Kinase Activity Independent of IKK and MK2. *Mol. Cell* **2018**, *69*, 566–580.e565. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Dynek, J.N.; Goncharov, T.; Dueber, E.C.; Fedorova, A.V.; Izrael-Tomasevic, A.; Phu, L.; Helgason, E.; Fairbrother, W.J.; Deshayes, K.; Kirkpatrick, D.S.; et al. c-IAP1 and UbcH5 promote K11-linked polyubiquitination of RIP1 in TNF signalling. *EMBO J.* **2010**, *29*, 4198–4209. [[CrossRef](#)]
14. Bertrand, M.J.; Lippens, S.; Staes, A.; Gilbert, B.; Roelandt, R.; De Medts, J.; Gevaert, K.; Declercq, W.; Vandenebeele, P. cIAP1/2 are direct E3 ligases conjugating diverse types of ubiquitin chains to receptor interacting proteins kinases 1 to 4 (RIP1-4). *PLoS ONE* **2011**, *6*, e22356. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Hu, W.; Yu, X.; Liu, Z.; Sun, Y.; Chen, X.; Yang, X.; Li, X.; Lam, W.K.; Duan, Y.; Cao, X.; et al. The complex of TRIP-Br1 and XIAP ubiquitinates and degrades multiple adenylyl cyclase isoforms. *Elife* **2017**, *6*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Huang, H.; Joazeiro, C.A.; Bonfoco, E.; Kamada, S.; Leverson, J.D.; Hunter, T. The inhibitor of apoptosis, cIAP2, functions as a ubiquitin-protein ligase and promotes in vitro monoubiquitination of caspases 3 and 7. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 26661–26664.
17. Hanson, A.J.; Wallace, H.A.; Freeman, T.J.; Beauchamp, R.D.; Lee, L.A.; Lee, E. XIAP monoubiquitylates Groucho/TLE to promote canonical Wnt signaling. *Mol. Cell* **2012**, *45*, 619–628. [[CrossRef](#)]

18. Hinz, M.; Stilmann, M.; Arslan, S.C.; Khanna, K.K.; Dittmar, G.; Scheidereit, C. A cytoplasmic ATM-TRAF6-cIAP1 module links nuclear DNA damage signaling to ubiquitin-mediated NF-kappaB activation. *Mol. Cell* **2010**, *40*, 63–74. [[CrossRef](#)]
19. Tang, E.D.; Wang, C.Y.; Xiong, Y.; Guan, K.L. A role for NF-kappaB essential modifier/IkappaB kinase-gamma (NEMO/IKKgamma) ubiquitination in the activation of the IkappaB kinase complex by tumor necrosis factor-alpha. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 37297–37305. [[CrossRef](#)]
20. Witt, A.; Vucic, D. Diverse ubiquitin linkages regulate RIP kinases-mediated inflammatory and cell death signaling. *Cell Death Differ.* **2017**, *24*, 1160–1171. [[CrossRef](#)]
21. Broemer, M.; Tenev, T.; Rigbolt, K.T.; Hempel, S.; Blagoev, B.; Silke, J.; Ditzel, M.; Meier, P. Systematic in vivo RNAi analysis identifies IAPs as NEDD8-E3 ligases. *Mol. Cell* **2010**, *40*, 810–822. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Mattiroli, F.; Sixma, T.K. Lysine-targeting specificity in ubiquitin and ubiquitin-like modification pathways. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2014**, *21*, 308–316. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. McDowell, G.S.; Philpott, A. Non-canonical ubiquitylation: Mechanisms and consequences. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2013**, *45*, 1833–1842. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Yau, R.; Rape, M. The increasing complexity of the ubiquitin code. *Nat. Cell Biol.* **2016**, *18*, 579–586. [[CrossRef](#)]
25. Zheng, N.; Shabek, N. Ubiquitin Ligases: Structure, Function, and Regulation. *Annu. Rev. Biochem.* **2017**, *86*, 129–157. [[CrossRef](#)]
26. Iwai, K.; Tanaka, K. Ubiquitin chain elongation: An intriguing strategy. *Mol. Cell* **2014**, *56*, 189–191. [[CrossRef](#)]
27. Ohtake, F.; Saeki, Y.; Ishido, S.; Kanno, J.; Tanaka, K. The K48-K63 Branched Ubiquitin Chain Regulates NF-kappaB Signaling. *Mol. Cell* **2016**, *64*, 251–266. [[CrossRef](#)]
28. Verhagen, A.M.; Kratina, T.K.; Hawkins, C.J.; Silke, J.; Ekert, P.G.; Vaux, D.L. Identification of mammalian mitochondrial proteins that interact with IAPs via N-terminal IAP binding motifs. *Cell Death Differ.* **2007**, *14*, 348–357. [[CrossRef](#)]
29. Silke, J.; Verhagen, A.M.; Ekert, P.G.; Vaux, D.L. Sequence as well as functional similarity for DIABLO/Smac and Grim, Reaper and Hid? *Cell Death Differ.* **2000**, *7*, 1275. [[CrossRef](#)]
30. Verhagen, A.M.; Ekert, P.G.; Pakusch, M.; Silke, J.; Connolly, L.M.; Reid, G.E.; Moritz, R.L.; Simpson, R.J.; Vaux, D.L. Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell* **2000**, *102*, 43–53. [[CrossRef](#)]
31. Lee, S.; Challa-Malladi, M.; Bratton, S.B.; Wright, C.W. Nuclear factor- $\kappa$ B-inducing kinase (NIK) contains an amino-terminal inhibitor of apoptosis (IAP)-binding motif (IBM) that potentiates NIK degradation by cellular IAP1 (c-IAP1). *J. Biol. Chem.* **2014**, *289*, 30680–30689. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Galvan, V.; Kurakin, A.V.; Bredesen, D.E. Interaction of checkpoint kinase 1 and the X-linked inhibitor of apoptosis during mitosis. *Fews Lett.* **2004**, *558*, 57–62. [[CrossRef](#)]
33. Srinivasula, S.M.; Hegde, R.; Saleh, A.; Datta, P.; Shiozaki, E.; Chai, J.; Lee, R.A.; Robbins, P.D.; Fernandes-Alnemri, T.; Shi, Y.; et al. A conserved XIAP-interaction motif in caspase-9 and Smac/DIABLO regulates caspase activity and apoptosis. *Nature* **2001**, *410*, 112–116. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Tenev, T.; Zachariou, A.; Wilson, R.; Ditzel, M.; Meier, P. IAPs are functionally non-equivalent and regulate effector caspases through distinct mechanisms. *Nat. Cell Biol.* **2005**, *7*, 70–77. [[CrossRef](#)]
35. Hashimoto, Y.; Inagaki, H.; Hoshino, S. Calpain mediates processing of the translation termination factor eRF3 into the IAP-binding isoform p-eRF3. *Fews Lett.* **2015**, *589*, 2241–2247. [[CrossRef](#)]
36. Dubrez, L.; Berthelet, J.; Glorian, V. IAP proteins as targets for drug development in oncology. *Oncotargets Ther.* **2013**, *9*, 1285–1304. [[CrossRef](#)]
37. Cossu, F.; Milani, M.; Mastrangelo, E.; Lecis, D. Targeting the BIR Domains of Inhibitor of Apoptosis (IAP) Proteins in Cancer Treatment. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* **2019**, *17*, 142–150. [[CrossRef](#)]
38. Kurakin, A.; Bredesen, D.E. An unconventional IAP-binding motif revealed by target-assisted iterative screening (TAIS) of the BIR3-cIAP1 domain. *J. Mol. Recognit.* **2007**, *20*, 39–50. [[CrossRef](#)]
39. Bornstein, B.; Gottfried, Y.; Edison, N.; Shekhtman, A.; Lev, T.; Glaser, F.; Larisch, S. ARTS binds to a distinct domain in XIAP-BIR3 and promotes apoptosis by a mechanism that is different from other IAP-antagonists. *Apoptosis* **2011**, *16*, 869–881. [[CrossRef](#)]
40. Mace, P.D.; Smits, C.; Vaux, D.L.; Silke, J.; Day, C.L. Asymmetric recruitment of cIAPs by TRAF2. *J. Mol. Biol.* **2010**, *400*, 8–15. [[CrossRef](#)]

41. Zheng, C.; Kabaleeswaran, V.; Wang, Y.; Cheng, G.; Wu, H. Crystal structures of the TRAF2: cIAP2 and the TRAF1: TRAF2: cIAP2 complexes: Affinity, specificity, and regulation. *Mol. Cell* **2010**, *38*, 101–113. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Lu, M.; Lin, S.C.; Huang, Y.; Kang, Y.J.; Rich, R.; Lo, Y.C.; Myszka, D.; Han, J.; Wu, H. XIAP induces NF-κappaB activation via the BIR1/TAB1 interaction and BIR1 dimerization. *Mol. Cell* **2007**, *26*, 689–702. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Jin, J.; Xiao, Y.; Hu, H.; Zou, Q.; Li, Y.; Gao, Y.; Ge, W.; Cheng, X.; Sun, S.C. Proinflammatory TLR signalling is regulated by a TRAF2-dependent proteolysis mechanism in macrophages. *Nat. Commun.* **2015**, *6*, 5930. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Zhou, A.Y.; Shen, R.R.; Kim, E.; Lock, Y.J.; Xu, M.; Chen, Z.J.; Hahn, W.C. IKKε-mediated tumorigenesis requires K63-linked polyubiquitination by a cIAP1/cIAP2/TRAF2 E3 ubiquitin ligase complex. *Cell Rep.* **2013**, *3*, 724–733. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Mambetsariev, N.; Lin, W.W.; Stunz, L.L.; Hanson, B.M.; Hildebrand, J.M.; Bishop, G.A. Nuclear TRAF3 is a negative regulator of CREB in B cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2016**, *113*, 1032–1037. [[CrossRef](#)]
46. Edison, N.; Curtz, Y.; Paland, N.; Mamriev, D.; Chorubczyk, N.; Haviv-Reingewertz, T.; Kfir, N.; Morgenstern, D.; Kupervasser, M.; Kagan, J.; et al. Degradation of Bcl-2 by XIAP and ARTS Promotes Apoptosis. *Cell Rep.* **2017**, *21*, 442–454. [[CrossRef](#)]
47. Deshaies, R.J.; Joazeiro, C.A. RING domain E3 ubiquitin ligases. *Annu. Rev. Biochem.* **2009**, *78*, 399–434. [[CrossRef](#)]
48. Dueber, E.C.; Schoeffler, A.J.; Lingel, A.; Elliott, J.M.; Fedorova, A.V.; Giannetti, A.M.; Zobel, K.; Maurer, B.; Varfolomeev, E.; Wu, P.; et al. Antagonists induce a conformational change in cIAP1 that promotes autoubiquitination. *Science* **2011**, *334*, 376–380. [[CrossRef](#)]
49. Lopez, J.; John, S.W.; Tenev, T.; Rautureau, G.J.; Hinds, M.G.; Francalanci, F.; Wilson, R.; Broemer, M.; Santoro, M.M.; Day, C.L.; et al. CARD-mediated autoinhibition of cIAP1's E3 ligase activity suppresses cell proliferation and migration. *Mol. Cell* **2011**, *42*, 569–583. [[CrossRef](#)]
50. Gyrd-Hansen, M.; Darding, M.; Miasari, M.; Santoro, M.M.; Zender, L.; Xue, W.; Tenev, T.; da Fonseca, P.C.; Zvelebil, M.; Bujnicki, J.M.; et al. IAPs contain an evolutionarily conserved ubiquitin-binding domain that regulates NF-κappaB as well as cell survival and oncogenesis. *Nat. Cell Biol.* **2008**, *10*, 1309–1317. [[CrossRef](#)]
51. Blankenship, J.W.; Varfolomeev, E.; Goncharov, T.; Fedorova, A.V.; Kirkpatrick, D.S.; Israel-Tomasevic, A.; Phu, L.; Arnott, D.; Aghajan, M.; Zobel, K.; et al. Ubiquitin binding modulates IAP antagonist-stimulated proteasomal degradation of c-IAP1 and c-IAP2(1). *Biochem. J.* **2009**, *417*, 149–160. [[CrossRef](#)]
52. Budhidarmo, R.; Day, C.L. The ubiquitin-associated domain of cellular inhibitor of apoptosis proteins facilitates ubiquitylation. *J. Biol. Chem.* **2014**, *289*, 25721–25736. [[CrossRef](#)]
53. Feltham, R.; Bettjeman, B.; Budhidarmo, R.; Mace, P.D.; Shirley, S.; Condon, S.M.; Chunduru, S.K.; McKinlay, M.A.; Vaux, D.L.; Silke, J.; et al. Smac mimetics activate the E3 ligase activity of cIAP1 protein by promoting RING domain dimerization. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 17015–17028. [[CrossRef](#)]
54. Phillips, A.H.; Schoeffler, A.J.; Matsui, T.; Weiss, T.M.; Blankenship, J.W.; Zobel, K.; Giannetti, A.M.; Dueber, E.C.; Fairbrother, W.J. Internal motions prime cIAP1 for rapid activation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2014**, *21*, 1068–1074. [[CrossRef](#)]
55. Csomas, R.A.; Brady, G.F.; Duckett, C.S. Enhanced cytoprotective effects of the inhibitor of apoptosis protein cellular IAP1 through stabilization with TRAF2. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 20531–20539. [[CrossRef](#)]
56. Vischioni, B.; Giaccone, G.; Span, S.W.; Kruyt, F.A.; Rodriguez, J.A. Nuclear shuttling and TRAF2-mediated retention in the cytoplasm regulate the subcellular localization of cIAP1 and cIAP2. *Exp. Cell Res.* **2004**, *298*, 535–548. [[CrossRef](#)]
57. Nakatani, Y.; Kleffmann, T.; Linke, K.; Condon, S.M.; Hinds, M.G.; Day, C.L. Regulation of ubiquitin transfer by XIAP, a dimeric RING E3 ligase. *Biochem. J.* **2013**, *450*, 629–638. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Dhillon, B.; Aleithan, F.; Abdul-Sater, Z.; Abdul-Sater, A.A. The Evolving Role of TRAFs in Mediating Inflammatory Responses. *Front. Immunol.* **2019**, *10*, 104. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Rothe, M.; Pan, M.G.; Henzel, W.J.; Ayres, T.M.; Goeddel, D.V. The TNFR2-TRAF signaling complex contains two novel proteins related to baculoviral inhibitor of apoptosis proteins. *Cell* **1995**, *83*, 1243–1252. [[CrossRef](#)]
60. Shi, J.H.; Sun, S.C. Tumor Necrosis Factor Receptor-Associated Factor Regulation of Nuclear Factor κB and Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways. *Front. Immunol.* **2018**, *9*, 1849. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

61. Marvin, A.; Berthelet, J.; Cartier, J.; Paul, C.; Gemble, S.; Morizot, A.; Boireau, W.; Saleh, M.; Bertoglio, J.; Solary, E.; et al. cIAP1 regulates TNF-mediated cdc42 activation and filopodia formation. *Oncogene* **2014**, *33*, 5534–5545. [[CrossRef](#)]
62. Dupoux, A.; Cartier, J.; Cathelin, S.; Filomenko, R.; Solary, E.; Dubrez-Daloz, L. cIAP1-dependent TRAF2 degradation regulates the differentiation of monocytes into macrophages and their response to CD40 ligand. *Blood* **2009**, *113*, 175–185. [[CrossRef](#)]
63. Vallabhlapurapu, S.; Matsuzawa, A.; Zhang, W.; Tseng, P.H.; Keats, J.J.; Wang, H.; Vignali, D.A.; Bergsagel, P.L.; Karin, M. Nonredundant and complementary functions of TRAF2 and TRAF3 in a ubiquitination cascade that activates NIK-dependent alternative NF- $\kappa$ B signaling. *Nat. Immunol.* **2008**, *9*, 1364–1370. [[CrossRef](#)]
64. Wilkinson, J.C.; Wilkinson, A.S.; Galbán, S.; Csomas, R.A.; Duckett, C.S. Apoptosis-inducing factor is a target for ubiquitination through interaction with XIAP. *Mol. Cell Biol.* **2008**, *28*, 237–247. [[CrossRef](#)]
65. Lewis, E.M.; Wilkinson, A.S.; Davis, N.Y.; Horita, D.A.; Wilkinson, J.C. Nondegradative ubiquitination of apoptosis inducing factor (AIF) by X-linked inhibitor of apoptosis at a residue critical for AIF-mediated chromatin degradation. *Biochemistry* **2011**, *50*, 11084–11096. [[CrossRef](#)]
66. Bornstein, B.; Edison, N.; Gottfried, Y.; Lev, T.; Shekhtman, A.; Gonen, H.; Rajalingam, K.; Larisch, S. X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein promotes the degradation of its antagonist, the pro-apoptotic ARTS protein. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2012**, *44*, 489–495. [[CrossRef](#)]
67. Suzuki, Y.; Nakabayashi, Y.; Takahashi, R. Ubiquitin-protein ligase activity of X-linked inhibitor of apoptosis protein promotes proteasomal degradation of caspase-3 and enhances its anti-apoptotic effect in Fas-induced cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 8662–8667. [[CrossRef](#)]
68. Choi, Y.E.; Butterworth, M.; Malladi, S.; Duckett, C.S.; Cohen, G.M.; Bratton, S.B. The E3 ubiquitin ligase cIAP1 binds and ubiquitinates caspase-3 and -7 via unique mechanisms at distinct steps in their processing. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 12772–12782. [[CrossRef](#)]
69. Tenev, T.; Bianchi, K.; Dardignac, M.; Broemer, M.; Langlais, C.; Wallberg, F.; Zachariou, A.; Lopez, J.; MacFarlane, M.; Cain, K.; et al. The Ripoptosome, a signaling platform that assembles in response to genotoxic stress and loss of IAPs. *Mol. Cell* **2011**, *43*, 432–448. [[CrossRef](#)]
70. Yang, Y.; Fang, S.; Jensen, J.P.; Weissman, A.M.; Ashwell, J.D. Ubiquitin protein ligase activity of IAPs and their degradation in proteasomes in response to apoptotic stimuli. *Science* **2000**, *288*, 874–877. [[CrossRef](#)]
71. Dardignac, M.; Feltham, R.; Tenev, T.; Bianchi, K.; Benetatos, C.; Silke, J.; Meier, P. Molecular determinants of Smac mimetic induced degradation of cIAP1 and cIAP2. *Cell Death Differ.* **2011**, *18*, 1376–1386. [[CrossRef](#)]
72. Caballero-López, M.J.; Nieto-Díaz, M.; Yunta, M.; Reigada, D.; Muñoz-Galdeano, T.; Del Águila, Á.; Navarro-Ruiz, R.; Pita-Thomas, W.; Lindholm, D.; Maza, R.M. XIAP Interacts with and Regulates the Activity of FAF1. *Biochim. Biophys. Acta. Mol. Cell Res.* **2017**, *1864*, 1335–1348. [[CrossRef](#)]
73. Hu, S.; Yang, X. Cellular inhibitor of apoptosis 1 and 2 are ubiquitin ligases for the apoptosis inducer Smac/DIABLO. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 10055–10060. [[CrossRef](#)]
74. MacFarlane, M.; Merrison, W.; Bratton, S.B.; Cohen, G.M. Proteasome-mediated degradation of Smac during apoptosis: XIAP promotes Smac ubiquitination in vitro. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 36611–36616. [[CrossRef](#)]
75. Huang, X.; Wang, X.N.; Yuan, X.D.; Wu, W.Y.; Lobie, P.E.; Wu, Z. XIAP facilitates breast and colon carcinoma growth via promotion of p62 depletion through ubiquitination-dependent proteasomal degradation. *Oncogene* **2019**, *38*, 1448–1460. [[CrossRef](#)]
76. Brady, G.F.; Galbán, S.; Liu, X.; Basrur, V.; Gitlin, J.D.; Elenitoba-Johnson, K.S.; Wilson, T.E.; Duckett, C.S. Regulation of the copper chaperone CCS by XIAP-mediated ubiquitination. *Mol. Cell Biol.* **2010**, *30*, 1923–1936. [[CrossRef](#)]
77. Burstein, E.; Ganesh, L.; Dick, R.D.; van De Sluis, B.; Wilkinson, J.C.; Klomp, L.W.; Wijmenga, C.; Brewer, G.J.; Nabel, G.J.; Duckett, C.S. A novel role for XIAP in copper homeostasis through regulation of MURR1. *EMBO J.* **2004**, *23*, 244–254. [[CrossRef](#)]
78. Murali, A.; Shin, J.; Yurugi, H.; Krishnan, A.; Akutsu, M.; Carpy, A.; Macek, B.; Rajalingam, K. Ubiquitin-dependent regulation of Cdc42 by XIAP. *Cell Death Dis.* **2017**, *8*, e2900. [[CrossRef](#)]
79. Jeong, D.H.; Choi, Y.N.; Seo, T.W.; Lee, J.S.; Yoo, S.J. Ubiquitin-proteasome dependent regulation of Profilin2 (Pfn2) by a cellular inhibitor of apoptotic protein 1 (cIAP1). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2018**, *506*, 423–428. [[CrossRef](#)]

80. Oberoi, T.K.; Dogan, T.; Hocking, J.C.; Scholz, R.P.; Mooz, J.; Anderson, C.L.; Karreman, C.; Meyer zu Heringdorf, D.; Schmidt, G.; Ruonala, M.; et al. IAPs regulate the plasticity of cell migration by directly targeting Rac1 for degradation. *EMBO J.* **2012**, *31*, 14–28. [[CrossRef](#)]
81. Seidelin, J.B.; Larsen, S.; Linnemann, D.; Vainer, B.; Coskun, M.; Troelsen, J.T.; Nielsen, O.H. Cellular inhibitor of apoptosis protein 2 controls human colonic epithelial restitution, migration, and Rac1 activation. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **2015**, *308*, G92–G99. [[CrossRef](#)]
82. Hornburger, M.C.; Mayer, B.A.; Leonhardt, S.; Willer, E.A.; Zahler, S.; Beyerle, A.; Rajalingam, K.; Vollmar, A.M.; Furst, R. A novel role for inhibitor of apoptosis (IAP) proteins as regulators of endothelial barrier function by mediating RhoA activation. *Faseb J. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **2014**, *28*, 1938–1946. [[CrossRef](#)]
83. Kim, K.S.; Heo, J.I.; Choi, K.J.; Bae, S. Enhancement of cellular radiation sensitivity through degradation of Chk1 by the XIAP-XAF1 complex. *Cancer Biol.* **2014**, *15*, 1622–1634. [[CrossRef](#)]
84. Nicholson, J.; Jevons, S.J.; Groselj, B.; Ellermann, S.; Konietzny, R.; Kerr, M.; Kessler, B.M.; Kiltie, A.E. E3 Ligase cIAP2 Mediates Downregulation of MRE11 and Radiosensitization in Response to HDAC Inhibition in Bladder Cancer. *Cancer Res.* **2017**, *77*, 3027–3039. [[CrossRef](#)]
85. Chen, S.M.; Lin, T.K.; Tseng, Y.Y.; Tu, C.H.; Lui, T.N.; Huang, S.F.; Hsieh, L.L.; Li, Y.Y. Targeting inhibitors of apoptosis proteins suppresses medulloblastoma cell proliferation via G2/M phase arrest and attenuated neddylation of p21. *Cancer Med.* **2018**, *7*, 3988–4003. [[CrossRef](#)]
86. Arora, V.; Cheung, H.H.; Plenchette, S.; Micali, O.C.; Liston, P.; Korneluk, R.G. Degradation of survivin by the X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP)-XAF1 complex. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 26202–26209. [[CrossRef](#)]
87. Labbé, K.; McIntire, C.R.; Doiron, K.; Leblanc, P.M.; Saleh, M. Cellular inhibitors of apoptosis proteins cIAP1 and cIAP2 are required for efficient caspase-1 activation by the inflammasome. *Immunity* **2011**, *35*, 897–907. [[CrossRef](#)]
88. Hsieh, W.C.; Hsu, T.S.; Chang, Y.J.; Lai, M.Z. IL-6 receptor blockade corrects defects of XIAP-deficient regulatory T cells. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 463. [[CrossRef](#)]
89. Jin, H.S.; Lee, D.H.; Kim, D.H.; Chung, J.H.; Lee, S.J.; Lee, T.H. cIAP1, cIAP2, and XIAP act cooperatively via nonredundant pathways to regulate genotoxic stress-induced nuclear factor- $\kappa$ B activation. *Cancer Res.* **2009**, *69*, 1782–1791. [[CrossRef](#)]
90. Bertrand, M.J.; Milutinovic, S.; Dickson, K.M.; Ho, W.C.; Boudreault, A.; Durkin, J.; Gillard, J.W.; Jaquith, J.B.; Morris, S.J.; Barker, P.A. cIAP1 and cIAP2 facilitate cancer cell survival by functioning as E3 ligases that promote RIP1 ubiquitination. *Mol. Cell* **2008**, *30*, 689–700. [[CrossRef](#)]
91. Yang, Y.; Kelly, P.; Shaffer, A.L.; Schmitz, R.; Yoo, H.M.; Liu, X.; Huang, D.W.; Webster, D.; Young, R.M.; Nakagawa, M.; et al. Target. Non-Proteolytic Protein Ubiquitination Treat. *Diffus. Large B Cell Lymphoma. Cancer Cell* **2016**, *29*, 494–507. [[CrossRef](#)]
92. Takeda, A.N.; Oberoi-Khanuja, T.K.; Glatz, G.; Schulenburg, K.; Scholz, R.P.; Carpy, A.; Macek, B.; Remenyi, A.; Rajalingam, K. Ubiquitin-dependent regulation of MEKK2/3-MEK5-ERK5 signaling module by XIAP and cIAP1. *EMBO J.* **2014**, *33*, 1784–1801. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
93. Winsauer, G.; Resch, U.; Hofer-Warbinek, R.; Schichl, Y.M.; de Martin, R. XIAP regulates bi-phasic NF- $\kappa$ B induction involving physical interaction and ubiquitination of MEKK2. *Cell Signal.* **2008**, *20*, 2107–2112. [[CrossRef](#)]
94. Van Themsche, C.; Leblanc, V.; Parent, S.; Asselin, E. X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) regulates PTEN ubiquitination, content, and compartmentalization. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 20462–20466. [[CrossRef](#)]
95. Dogan, T.; Harms, G.S.; Hekman, M.; Karreman, C.; Oberoi, T.K.; Alnemri, E.S.; Rapp, U.R.; Rajalingam, K. X-linked and cellular IAPs modulate the stability of C-RAF kinase and cell motility. *Nat. Cell Biol.* **2008**, *10*, 1447–1455. [[CrossRef](#)]
96. Kaur, S.; Wang, F.; Venkatraman, M.; Arsura, M. X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) inhibits c-Jun N-terminal kinase 1 (JNK1) activation by transforming growth factor beta1 (TGF- $\beta$ 1) through ubiquitin-mediated proteosomal degradation of the TGF- $\beta$ 1-activated kinase 1 (TAK1). *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 38599–38608. [[CrossRef](#)]
97. Neil, J.R.; Tian, M.; Schiemann, W.P. X-linked inhibitor of apoptosis protein and its E3 ligase activity promote transforming growth factor- $\beta$ -mediated nuclear factor- $\kappa$ B activation during breast cancer progression. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 21209–21217. [[CrossRef](#)]

98. Samuel, T.; Welsh, K.; Lober, T.; Togo, S.H.; Zapata, J.M.; Reed, J.C. Distinct BIR domains of cIAP1 mediate binding to and ubiquitination of tumor necrosis factor receptor-associated factor 2 and second mitochondrial activator of caspases. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 1080–1090. [[CrossRef](#)]
99. Li, X.; Yang, Y.; Ashwell, J.D. TNF-RII and c-IAP1 mediate ubiquitination and degradation of TRAF2. *Nature* **2002**, *416*, 345–347. [[CrossRef](#)]
100. Matsuzawa, A.; Tseng, P.H.; Vallabhapurapu, S.; Luo, J.L.; Zhang, W.; Wang, H.; Vignali, D.A.; Gallagher, E.; Karin, M. Essential cytoplasmic translocation of a cytokine receptor-assembled signaling complex. *Science* **2008**, *321*, 663–668. [[CrossRef](#)]
101. Tseng, P.H.; Matsuzawa, A.; Zhang, W.; Mino, T.; Vignali, D.A.; Karin, M. Different modes of ubiquitination of the adaptor TRAF3 selectively activate the expression of type I interferons and proinflammatory cytokines. *Nat. Immunol.* **2010**, *11*, 70–75. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
102. Mao, A.P.; Li, S.; Zhong, B.; Li, Y.; Yan, J.; Li, Q.; Teng, C.; Shu, H.B. Virus-triggered ubiquitination of TRAF3/6 by cIAP1/2 is essential for induction of interferon-beta (IFN-beta) and cellular antiviral response. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 9470–9476. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
103. Qi, Y.; Xia, P. Cellular inhibitor of apoptosis protein-1 (cIAP1) plays a critical role in beta-cell survival under endoplasmic reticulum stress: Promoting ubiquitination and degradation of C/EBP homologous protein (CHOP). *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 32236–32245. [[CrossRef](#)]
104. Allègre, J.; Cartier, J.; Glorian, V.; Droin, N.; Dumetier, B.; Kayaci, C.; Berthelet, J.; Gemble, S.; Vuillier, C.; Maillet, L.; 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*, e0206253. [[CrossRef](#)]
105. Glorian, V.; Allègre, J.; Berthelet, J.; Dumetier, B.; Boutanquoi, P.M.; Droin, N.; Kayaci, C.; Cartier, J.; Gemble, S.; Marcion, G.; et al. DNA damage and S phase-dependent E2F1 stabilization requires the cIAP1 E3-ubiquitin ligase and is associated with K63-poly-ubiquitination on lysine 161/164 residues. *Cell Death Dis.* **2017**, *8*, e2816. [[CrossRef](#)]
106. Park, C.V.; Ivanova, I.G.; Kenneth, N.S. XIAP upregulates expression of HIF target genes by targeting HIF1 $\alpha$  for Lys63-linked polyubiquitination. *Nucleic Acids Res.* **2017**, *45*, 9336–9347. [[CrossRef](#)]
107. Wang, T.; Wang, J. K63-linked polyubiquitination of IRF1: An essential step in the IL-1 signaling cascade. *Cell Mol. Immunol.* **2014**, *11*, 407–409. [[CrossRef](#)]
108. Xu, L.; Zhu, J.; Hu, X.; Zhu, H.; Kim, H.T.; LaBaer, J.; Goldberg, A.; Yuan, J. c-IAP1 cooperates with Myc by acting as a ubiquitin ligase for Mad1. *Mol. Cell* **2007**, *28*, 914–922. [[CrossRef](#)]
109. Wang, S.L.; Hawkins, C.J.; Yoo, S.J.; Muller, H.A.; Hay, B.A. The Drosophila caspase inhibitor DIAP1 is essential for cell survival and is negatively regulated by HID. *Cell* **1999**, *98*, 453–463. [[CrossRef](#)]
110. Igaki, T.; Yamamoto-Goto, Y.; Tokushige, N.; Kanda, H.; Miura, M. Down-regulation of DIAP1 triggers a novel Drosophila cell death pathway mediated by Dark and DRONC. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 23103–23106. [[CrossRef](#)]
111. Chai, J.; Yan, N.; Huh, J.R.; Wu, J.W.; Li, W.; Hay, B.A.; Shi, Y. Molecular mechanism of Reaper-Grim-Hid-mediated suppression of DIAP1-dependent Dronc ubiquitination. *Nat. Struct. Biol.* **2003**, *10*, 892–898. [[CrossRef](#)]
112. Wilson, R.; Goyal, L.; Ditzel, M.; Zachariou, A.; Baker, D.A.; Agapite, J.; Steller, H.; Meier, P. The DIAP1 RING finger mediates ubiquitination of Dronc and is indispensable for regulating apoptosis. *Nat. Cell Biol.* **2002**, *4*, 445–450. [[CrossRef](#)]
113. Eckelman, B.P.; Salvesen, G.S. The human anti-apoptotic proteins cIAP1 and cIAP2 bind but do not inhibit caspases. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 3254–3260. [[CrossRef](#)]
114. Scott, F.L.; Denault, J.B.; Riedl, S.J.; Shin, H.; Renatus, M.; Salvesen, G.S. XIAP inhibits caspase-3 and -7 using two binding sites: Evolutionarily conserved mechanism of IAPs. *EMBO J.* **2005**, *24*, 645–655. [[CrossRef](#)]
115. Takahashi, R.; Deveraux, Q.; Tamm, I.; Welsh, K.; Assa-Munt, N.; Salvesen, G.S.; Reed, J.C. A single BIR domain of XIAP sufficient for inhibiting caspases. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 7787–7790. [[CrossRef](#)]
116. Chai, J.; Shiozaki, E.; Srinivasula, S.M.; Wu, Q.; Datta, P.; Alnemri, E.S.; Shi, Y. Structural basis of caspase-7 inhibition by XIAP. *Cell* **2001**, *104*, 769–780. [[CrossRef](#)]
117. Riedl, S.J.; Renatus, M.; Schwarzenbacher, R.; Zhou, Q.; Sun, C.; Fesik, S.W.; Liddington, R.C.; Salvesen, G.S. Structural basis for the inhibition of caspase-3 by XIAP. *Cell* **2001**, *104*, 791–800. [[CrossRef](#)]
118. Schile, A.J.; Garcia-Fernandez, M.; Steller, H. Regulation of apoptosis by XIAP ubiquitin-ligase activity. *Genes Dev.* **2008**, *22*, 2256–2266. [[CrossRef](#)]

119. Suzuki, Y.; Nakabayashi, Y.; Nakata, K.; Reed, J.C.; Takahashi, R. X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) inhibits caspase-3 and -7 in distinct modes. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 27058–27063. [[CrossRef](#)]
120. Arnt, C.R.; Chiorean, M.V.; Hellebrant, M.P.; Gores, G.J.; Kaufmann, S.H. Synthetic Smac/DIABLO peptides enhance the effects of chemotherapeutic agents by binding XIAP and cIAP1 in situ. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 44236–44243. [[CrossRef](#)]
121. Wu, G.; Chai, J.; Suber, T.L.; Wu, J.W.; Du, C.; Wang, X.; Shi, Y. Structural basis of IAP recognition by Smac/DIABLO. *Nature* **2000**, *408*, 1008–1012. [[CrossRef](#)]
122. Liu, Z.; Sun, C.; Olejniczak, E.T.; Meadows, R.P.; Betz, S.F.; Oost, T.; Herrmann, J.; Wu, J.C.; Fesik, S.W. Structural basis for binding of Smac/DIABLO to the XIAP BIR3 domain. *Nature* **2000**, *408*, 1004–1008. [[CrossRef](#)]
123. Ekert, P.G.; Silke, J.; Hawkins, C.J.; Verhagen, A.M.; Vaux, D.L. DIABLO promotes apoptosis by removing MIHA/XIAP from processed caspase 9. *J. Cell Biol.* **2001**, *152*, 483–490. [[CrossRef](#)]
124. Huang, Y.; Rich, R.L.; Myszka, D.G.; Wu, H. Requirement of both the second and third BIR domains for the relief of X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP)-mediated caspase inhibition by Smac. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 49517–49522. [[CrossRef](#)]
125. Hui, K.K.; Kanungo, A.K.; Elia, A.J.; Henderson, J.T. Caspase-3 deficiency reveals a physiologic role for Smac/DIABLO in regulating programmed cell death. *Cell Death Differ.* **2011**, *18*, 1780–1790. [[CrossRef](#)]
126. Yang, Q.H.; Du, C. Smac/DIABLO selectively reduces the levels of c-IAP1 and c-IAP2 but not that of XIAP and livin in HeLa cells. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 16963–16970. [[CrossRef](#)]
127. Qiu, W.; Liu, H.; Sebastini, A.; Sun, Q.; Wang, H.; Zhang, L.; Yu, J. An apoptosis-independent role of SMAC in tumor suppression. *Oncogene* **2013**, *32*, 2380–2389. [[CrossRef](#)]
128. Ma, L.; Huang, Y.; Song, Z.; Feng, S.; Tian, X.; Du, W.; Qiu, X.; Heese, K.; Wu, M. Livin promotes Smac/DIABLO degradation by ubiquitin-proteasome pathway. *Cell Death Differ.* **2006**, *13*, 2079–2088. [[CrossRef](#)]
129. Hamacher-Brady, A.; Choe, S.C.; Krijnse-Locker, J.; Brady, N.R. Intramitochondrial recruitment of endolysosomes mediates Smac degradation and constitutes a novel intrinsic apoptosis antagonizing function of XIAP E3 ligase. *Cell Death Differ.* **2014**, *21*, 1862–1876. [[CrossRef](#)]
130. Xia, L.; Tan, S.; Zhou, Y.; Lin, J.; Wang, H.; Oyang, L.; Tian, Y.; Liu, L.; Su, M.; Cao, D.; et al. Role of the NfkB-signaling pathway in cancer. *OncoTargets Ther.* **2018**, *11*, 2063–2073. [[CrossRef](#)]
131. Mukhopadhyay, H.; Lee, N.Y. Multifaceted roles of TAK1 signaling in cancer. *Oncogene* **2019**. [[CrossRef](#)]
132. Yamaguchi, K.; Nagai, S.; Ninomiya-Tsuji, J.; Nishita, M.; Tamai, K.; Irie, K.; Ueno, N.; Nishida, E.; Shibuya, H.; Matsumoto, K. XIAP, a cellular member of the inhibitor of apoptosis protein family, links the receptors to TAB1-TAK1 in the BMP signaling pathway. *EMBO J.* **1999**, *18*, 179–187. [[CrossRef](#)]
133. Birkey Reffey, S.; Wurthner, J.U.; Parks, W.T.; Roberts, A.B.; Duckett, C.S. X-linked inhibitor of apoptosis protein functions as a cofactor in transforming growth factor-beta signaling. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 26542–26549. [[CrossRef](#)]
134. Van Themsche, C.; Chaudhry, P.; Leblanc, V.; Parent, S.; Asselin, E. XIAP gene expression and function is regulated by autocrine and paracrine TGF-beta signaling. *Mol. Cancer* **2010**, *9*, 216. [[CrossRef](#)]
135. Biswas, S.; Shisler, J.L. Molluscum Contagiosum Virus MC159 Abrogates cIAP1-NEMO Interactions and Inhibits NEMO Polyubiquitination. *J. Virol.* **2017**, *91*. [[CrossRef](#)]
136. Yin, M.; Wang, X.; Lu, J. Advances in IKBKE as a potential target for cancer therapy. *Cancer Med.* **2020**, *9*, 247–258. [[CrossRef](#)]
137. Varfolomeev, E.; Blankenship, J.W.; Wayson, S.M.; Fedorova, A.V.; Kayagaki, N.; Garg, P.; Zobel, K.; Dynek, J.N.; Elliott, L.O.; Wallweber, H.J.; et al. IAP antagonists induce autoubiquitination of c-IAPs, NF-kappaB activation, and TNFalpha-dependent apoptosis. *Cell* **2007**, *131*, 669–681. [[CrossRef](#)]
138. Vince, J.E.; Wong, W.W.; Khan, N.; Feltham, R.; Chau, D.; Ahmed, A.U.; Benetatos, C.A.; Chunduru, S.K.; Condon, S.M.; McKinlay, M.; et al. IAP Antagonists Target cIAP1 to Induce TNFalpha-Dependent Apoptosis. *Cell* **2007**, *131*, 682–693. [[CrossRef](#)]
139. Annunziata, C.M.; Davis, R.E.; Demchenko, Y.; Bellamy, W.; Gabrea, A.; Zhan, F.; Lenz, G.; Hanamura, I.; Wright, G.; Xiao, W.; et al. Frequent engagement of the classical and alternative NF-kappaB pathways by diverse genetic abnormalities in multiple myeloma. *Cancer Cell* **2007**, *12*, 115–130. [[CrossRef](#)]
140. Keats, J.J.; Fonseca, R.; Chesi, M.; Schop, R.; Baker, A.; Chng, W.J.; Van Wier, S.; Tiedemann, R.; Shi, C.X.; Sebag, M.; et al. Promiscuous mutations activate the noncanonical NF-kappaB pathway in multiple myeloma. *Cancer Cell* **2007**, *12*, 131–144. [[CrossRef](#)]

141. Zarnegar, B.J.; Wang, Y.; Mahoney, D.J.; Dempsey, P.W.; Cheung, H.H.; He, J.; Shiba, T.; Yang, X.; Yeh, W.C.; Mak, T.W.; et al. Noncanonical NF- $\kappa$ B activation requires coordinated assembly of a regulatory complex of the adaptors cIAP1, cIAP2, TRAF2 and TRAF3 and the kinase NIK. *Nat. Immunol.* **2008**, *9*, 1371–1378. [CrossRef] [PubMed]
142. He, S.; Wang, X. RIP kinases as modulators of inflammation and immunity. *Nat. Immunol.* **2018**, *19*, 912–922. [CrossRef]
143. Hasegawa, M.; Fujimoto, Y.; Lucas, P.C.; Nakano, H.; Fukase, K.; Núñez, G.; Inohara, N. A critical role of RICK/RIP2 polyubiquitination in Nod-induced NF- $\kappa$ B activation. *EMBO J.* **2008**, *27*, 373–383. [CrossRef] [PubMed]
144. Ea, C.K.; Deng, L.; Xia, Z.P.; Pineda, G.; Chen, Z.J. Activation of IKK by TNFalpha requires site-specific ubiquitination of RIP1 and polyubiquitin binding by NEMO. *Mol. Cell* **2006**, *22*, 245–257. [CrossRef]
145. O'Donnell, M.A.; Legarda-Addison, D.; Skountzos, P.; Yeh, W.C.; Ting, A.T. Ubiquitination of RIP1 regulates an NF- $\kappa$ B-independent cell-death switch in TNF signaling. *Curr. Biol.* **2007**, *17*, 418–424. [CrossRef]
146. Cusson-Hermance, N.; Khurana, S.; Lee, T.H.; Fitzgerald, K.A.; Kelliher, M.A. Rip1 mediates the Trif-dependent toll-like receptor 3- and 4-induced NF- $\{\kappa\}$ B activation but does not contribute to interferon regulatory factor 3 activation. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 36560–36566. [CrossRef]
147. Annibaldi, A.; Meier, P. Checkpoints in TNF-Induced Cell Death: Implications in Inflammation and Cancer. *Trends Mol. Med.* **2018**, *24*, 49–65. [CrossRef]
148. Emmerich, C.H.; Bakshi, S.; Kelsall, I.R.; Ortiz-Guerrero, J.; Shapiro, N.; Cohen, P. Lys63/Met1-hybrid ubiquitin chains are commonly formed during the activation of innate immune signalling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2016**, *474*, 452–461. [CrossRef]
149. Varfolomeev, E.; Goncharov, T.; Fedorova, A.V.; Dynek, J.N.; Zobel, K.; Deshayes, K.; Fairbrother, W.J.; Vucic, D. c-IAP1 and c-IAP2 are critical mediators of tumor necrosis factor alpha (TNFalpha)-induced NF- $\kappa$ B activation. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 24295–24299. [CrossRef]
150. Park, S.M.; Yoon, J.B.; Lee, T.H. Receptor interacting protein is ubiquitinated by cellular inhibitor of apoptosis proteins (c-IAP1 and c-IAP2) in vitro. *Fefs Lett.* **2004**, *566*, 151–156. [CrossRef]
151. Rosebeck, S.; Rehman, A.O.; Apel, I.J.; Kohrt, D.; Appert, A.; O'Donnell, M.A.; Ting, A.T.; Du, M.Q.; Baens, M.; Lucas, P.C.; et al. The API2-MALT1 fusion exploits TNFR pathway-associated RIP1 ubiquitination to promote oncogenic NF- $\kappa$ B signaling. *Oncogene* **2014**, *33*, 2520–2530. [CrossRef]
152. de Almagro, M.C.; Goncharov, T.; Newton, K.; Vucic, D. Cellular IAP proteins and LUBAC differentially regulate necrosome-associated RIP1 ubiquitination. *Cell Death Dis.* **2015**, *6*, e1800. [CrossRef] [PubMed]
153. Borghi, A.; Haegman, M.; Fischer, R.; Carpentier, I.; Bertrand, M.J.M.; Libert, C.; Afonina, I.S.; Beyaert, R. The E3 ubiquitin ligases HOIP and cIAP1 are recruited to the TNFR2 signaling complex and mediate TNFR2-induced canonical NF- $\kappa$ B signaling. *Biochem. Pharm.* **2018**, *153*, 292–298. [CrossRef] [PubMed]
154. Moulin, M.; Anderton, H.; Voss, A.K.; Thomas, T.; Wong, W.W.; Bankovacki, A.; Feltham, R.; Chau, D.; Cook, W.D.; Silke, J.; et al. IAPs limit activation of RIP kinases by TNF receptor 1 during development. *EMBO J.* **2012**, *31*, 1679–1691. [CrossRef]
155. Li, L.; Thomas, R.M.; Suzuki, H.; De Brabander, J.K.; Wang, X.; Harran, P.G. A small molecule Smac mimetic potentiates TRAIL- and TNFalpha-mediated cell death. *Science* **2004**, *305*, 1471–1474. [CrossRef]
156. Petersen, S.L.; Wang, L.; Yalcin-Chin, A.; Li, L.; Peyton, M.; Minna, J.; Harran, P.; Wang, X. Autocrine TNFalpha signaling renders human cancer cells susceptible to Smac-mimetic-induced apoptosis. *Cancer Cell* **2007**, *12*, 445–456. [CrossRef]
157. Geserick, P.; Hupe, M.; Moulin, M.; Wong, W.W.; Feoktistova, M.; Kellert, B.; Gollnick, H.; Silke, J.; Leverkus, M. Cellular IAPs inhibit a cryptic CD95-induced cell death by limiting RIP1 kinase recruitment. *J. Cell Biol.* **2009**, *187*, 1037–1054. [CrossRef]
158. Vanlangenakker, N.; Vanden Berghe, T.; Bogaert, P.; Laukens, B.; Zobel, K.; Deshayes, K.; Vucic, D.; Fulda, S.; Vandenebeele, P.; Bertrand, M.J. cIAP1 and TAK1 protect cells from TNF-induced necrosis by preventing RIP1/RIP3-dependent reactive oxygen species production. *Cell Death Differ.* **2011**, *18*, 656–665. [CrossRef]
159. Feoktistova, M.; Geserick, P.; Kellert, B.; Dimitrova, D.P.; Langlais, C.; Hupe, M.; Cain, K.; MacFarlane, M.; Hacker, G.; Leverkus, M. cIAPs block Ripoptosome formation, a RIP1/caspase-8 containing intracellular cell death complex differentially regulated by cFLIP isoforms. *Mol. Cell* **2011**, *43*, 449–463. [CrossRef]

160. Estornes, Y.; Aguilera, M.A.; Dubuisson, C.; De Keyser, J.; Goossens, V.; Kersse, K.; Samali, A.; Vandenabeele, P.; Bertrand, M.J. RIPK1 promotes death receptor-independent caspase-8-mediated apoptosis under unresolved ER stress conditions. *Cell Death Dis.* **2014**, *5*, e1555. [[CrossRef](#)]
161. McComb, S.; Cheung, H.H.; Korneluk, R.G.; Wang, S.; Krishnan, L.; Sad, S. cIAP1 and cIAP2 limit macrophage necroptosis by inhibiting Rip1 and Rip3 activation. *Cell Death Differ.* **2012**, *19*, 1791–1801. [[CrossRef](#)]
162. Kaiser, W.J.; Sridharan, H.; Huang, C.; Mandal, P.; Upton, J.W.; Gough, P.J.; Sehon, C.A.; Marquis, R.W.; Bertin, J.; Mocarski, E.S. Toll-like receptor 3-mediated necrosis via TRIF, RIP3, and MLKL. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 31268–31279. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
163. Vince, J.E.; Wong, W.W.; Gentle, I.; Lawlor, K.E.; Allam, R.; O'Reilly, L.; Mason, K.; Gross, O.; Ma, S.; Guarda, G.; et al. Inhibitor of apoptosis proteins limit RIP3 kinase-dependent interleukin-1 activation. *Immunity* **2012**, *36*, 215–227. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
164. Vanlangenakker, N.; Bertrand, M.J.; Bogaert, P.; Vandenabeele, P.; Vandenberghe, T. TNF-induced necroptosis in L929 cells is tightly regulated by multiple TNFR1 complex I and II members. *Cell Death Dis.* **2011**, *2*, e230. [[CrossRef](#)]
165. Newton, K.; Dugger, D.L.; Wickliffe, K.E.; Kapoor, N.; de Almagro, M.C.; Vucic, D.; Komuves, L.; Ferrando, R.E.; French, D.M.; Webster, J.; et al. Activity of protein kinase RIPK3 determines whether cells die by necroptosis or apoptosis. *Science* **2014**, *343*, 1357–1360. [[CrossRef](#)]
166. Lawlor, K.E.; Khan, N.; Mildenhall, A.; Gerlic, M.; Croker, B.A.; D'Cruz, A.A.; Hall, C.; Kaur Spall, S.; Anderton, H.; Masters, S.L.; et al. RIPK3 promotes cell death and NLRP3 inflammasome activation in the absence of MLKL. *Nat. Commun.* **2015**, *6*, 6282. [[CrossRef](#)]
167. Lawlor, K.E.; Feltham, R.; Yabal, M.; Conos, S.A.; Chen, K.W.; Ziehe, S.; Graß, C.; Zhan, Y.; Nguyen, T.A.; Hall, C.; et al. XIAP Loss Triggers RIPK3- and Caspase-8-Driven IL-1 $\beta$  Activation and Cell Death as a Consequence of TLR-MyD88-Induced cIAP1-TRAF2 Degradation. *Cell Rep.* **2017**, *20*, 668–682. [[CrossRef](#)]
168. Yabal, M.; Müller, N.; Adler, H.; Knies, N.; Groß, C.J.; Damgaard, R.B.; Kanegae, H.; Ringelhan, M.; Kaufmann, T.; Heikenwälder, M.; et al. XIAP restricts TNF- and RIP3-dependent cell death and inflammasome activation. *Cell Rep.* **2014**, *7*, 1796–1808. [[CrossRef](#)]
169. Damgaard, R.B.; Nachbur, U.; Yabal, M.; Wong, W.W.; Fiil, B.K.; Kastirr, M.; Rieser, E.; Rickard, J.A.; Bankovacki, A.; Peschel, C.; et al. The ubiquitin ligase XIAP recruits LUBAC for NOD2 signaling in inflammation and innate immunity. *Mol. Cell* **2012**, *46*, 746–758. [[CrossRef](#)]
170. Hrdinka, M.; Fiil, B.K.; Zucca, M.; Leske, D.; Bagola, K.; Yabal, M.; Elliott, P.R.; Damgaard, R.B.; Komander, D.; Jost, P.J.; et al. CYLD Limits Lys63- and Met1-Linked Ubiquitin at Receptor Complexes to Regulate Innate Immune Signaling. *Cell Rep.* **2016**, *14*, 2846–2858. [[CrossRef](#)]
171. Stafford, C.A.; Lawlor, K.E.; Heim, V.J.; Bankovacki, A.; Bernardini, J.P.; Silke, J.; Nachbur, U. IAPs Regulate Distinct Innate Immune Pathways to Co-ordinate the Response to Bacterial Peptidoglycans. *Cell Rep.* **2018**, *22*, 1496–1508. [[CrossRef](#)]
172. Damgaard, R.B.; Fiil, B.K.; Speckmann, C.; Yabal, M.; zur Stadt, U.; Bekker-Jensen, S.; Jost, P.J.; Ehl, S.; Mailand, N.; Gyrd-Hansen, M. Disease-causing mutations in the XIAP BIR2 domain impair NOD2-dependent immune signalling. *EMBO Mol. Med.* **2013**, *5*, 1278–1295. [[CrossRef](#)]
173. Krieg, A.; Correa, R.G.; Garrison, J.B.; Le Negrate, G.; Welsh, K.; Huang, Z.; Knoefel, W.T.; Reed, J.C. XIAP mediates NOD signaling via interaction with RIP2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 14524–14529. [[CrossRef](#)]
174. Bautler, L.D.; Duckett, C.S.; O'Riordan, M.X. XIAP regulates cytosol-specific innate immunity to Listeria infection. *PLoS Pathog.* **2008**, *4*, e1000142. [[CrossRef](#)]
175. Goncharov, T.; Hedayati, S.; Mulvihill, M.M.; Izrael-Tomasevic, A.; Zobel, K.; Jeet, S.; Fedorova, A.V.; Eidenschenk, C.; DeVoss, J.; Yu, K.; et al. Disruption of XIAP-RIP2 Association Blocks NOD2-Mediated Inflammatory Signaling. *Mol. Cell* **2018**, *69*, 551–565.e557. [[CrossRef](#)]
176. Ellwanger, K.; Briese, S.; Arnold, C.; Kienes, I.; Heim, V.; Nachbur, U.; Kufer, T.A. XIAP controls RIPK2 signaling by preventing its deposition in speck-like structures. *Life Sci. Alliance* **2019**, *2*. [[CrossRef](#)]
177. Gardam, S.; Turner, V.M.; Anderton, H.; Limaye, S.; Basten, A.; Koentgen, F.; Vaux, D.L.; Silke, J.; Brink, R. Deletion of cIAP1 and cIAP2 in murine B lymphocytes constitutively activates cell survival pathways and inactivates the germinal center response. *Blood* **2011**, *117*, 4041–4051. [[CrossRef](#)]

178. Varfolomeev, E.; Goncharov, T.; Maecker, H.; Zobel, K.; Komuves, L.G.; Deshayes, K.; Vucic, D. Cellular inhibitors of apoptosis are global regulators of NF-kappaB and MAPK activation by members of the TNF family of receptors. *Sci. Signal.* **2012**, *5*, ra22. [[CrossRef](#)]
179. Wu, C.J.; Conze, D.B.; Li, X.; Ying, S.X.; Hanover, J.A.; Ashwell, J.D. TNF-alpha induced c-IAP1/TRAFF complex translocation to a Ubc6-containing compartment and TRAF2 ubiquitination. *EMBO J.* **2005**, *24*, 1886–1898. [[CrossRef](#)]
180. Vince, J.E.; Chau, D.; Callus, B.; Wong, W.W.; Hawkins, C.J.; Schneider, P.; McKinlay, M.; Benetatos, C.A.; Condon, S.M.; Chunduru, S.K.; et al. TWEAK-FN14 signaling induces lysosomal degradation of a cIAP1-TRAFF complex to sensitize tumor cells to TNFalpha. *J. Cell Biol.* **2008**, *182*, 171–184. [[CrossRef](#)]
181. Cabal-Hierro, L.; Rodriguez, M.; Artime, N.; Iglesias, J.; Ugarte, L.; Prado, M.A.; Lazo, P.S. TRAF-mediated modulation of NF-kB AND JNK activation by TNFR2. *Cell Signal.* **2014**, *26*, 2658–2666. [[CrossRef](#)]
182. Borghi, A.; Verstrepen, L.; Beyaert, R. TRAF2 multitasking in TNF receptor-induced signaling to NF- $\kappa$ B, MAP kinases and cell death. *Biochem Pharm.* **2016**, *116*, 1–10. [[CrossRef](#)]
183. Feltham, R.; Moulin, M.; Vince, J.E.; Mace, P.D.; Wong, W.W.; Anderton, H.; Day, C.L.; Vaux, D.L.; Silke, J. Tumor necrosis factor (TNF) signaling, but not TWEAK (TNF-like weak inducer of apoptosis)-triggered cIAP1 (cellular inhibitor of apoptosis protein 1) degradation, requires cIAP1 RING dimerization and E2 binding. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 17525–17536. [[CrossRef](#)]
184. Xiao, Y.; Jin, J.; Chang, M.; Chang, J.H.; Hu, H.; Zhou, X.; Brittain, G.C.; Stansberg, C.; Torkildsen, Ø.; Wang, X.; et al. Peli1 promotes microglia-mediated CNS inflammation by regulating Traf3 degradation. *Nat. Med.* **2013**, *19*, 595–602. [[CrossRef](#)]
185. Busca, A.; Konarski, Y.; Gajanayaka, N.; O'Hara, S.; Angel, J.; Kozlowski, M.; Kumar, A. cIAP1/2-TRAFF-SHP-1-Src-MyD88 Complex Regulates Lipopolysaccharide-Induced IL-27 Production through NF- $\kappa$ B Activation in Human Macrophages. *J. Immunol.* **2018**, *200*, 1593–1606. [[CrossRef](#)]
186. Wen, A.Y.; Sakamoto, K.M.; Miller, L.S. The role of the transcription factor CREB in immune function. *J. Immunol.* **2010**, *185*, 6413–6419. [[CrossRef](#)]
187. Harikumar, K.B.; Yester, J.W.; Surace, M.J.; Oyeniran, C.; Price, M.M.; Huang, W.C.; Hait, N.C.; Allegood, J.C.; Yamada, A.; Kong, X.; et al. K63-linked polyubiquitination of transcription factor IRF1 is essential for IL-1-induced production of chemokines CXCL10 and CCL5. *Nat. Immunol.* **2014**, *15*, 231–238. [[CrossRef](#)]
188. Dubrez, L. Regulation of E2F1 Transcription Factor by Ubiquitin Conjugation. *Intj. Mol. Sci.* **2017**, *18*. [[CrossRef](#)]
189. Cartier, J.; Berthelet, J.; Marivin, A.; Gemble, S.; Edmond, V.; Plenckette, S.; Lagrange, B.; Hammann, A.; Dupoux, A.; Delva, L.; et al. Cellular Inhibitor of Apoptosis Protein-1 (cIAP1) Can Regulate E2F1 Transcription Factor-mediated Control of Cyclin Transcription. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 26406–26417. [[CrossRef](#)]
190. Cao, Z.; Li, X.; Li, J.; Luo, W.; Huang, C.; Chen, J. X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) lacking RING domain localizes to the nuclear and promotes cancer cell anchorage-independent growth by targeting the E2F1/Cyclin E axis. *Oncotarget.* **2014**, *5*, 7126–7137. [[CrossRef](#)]
191. Geisbrecht, E.R.; Montell, D.J. A role for Drosophila IAP1-mediated caspase inhibition in Rac-dependent cell migration. *Cell* **2004**, *118*, 111–125. [[CrossRef](#)]
192. Rajalingam, K.; Sharma, M.; Paland, N.; Hurwitz, R.; Thieck, O.; Oswald, M.; Machuy, N.; Rudel, T. IAP-IAP complexes required for apoptosis resistance of *C. trachomatis*-infected cells. *PLoS Pathog.* **2006**, *2*, e114. [[CrossRef](#)]
193. Lee, S.; Lee, J.Y.; Lee, E.W.; Park, S.; Kang, D.H.; Min, C.; Lee, D.J.; Kang, D.; Song, J.; Kwon, J.; et al. Absence of Cytosolic 2-Cys Prx Subtypes I and II Exacerbates TNF- $\alpha$ -Induced Apoptosis via Different Routes. *Cell Rep.* **2019**, *26*, 2194–2211.e2196. [[CrossRef](#)]
194. Romagny, S.; Bouaouiche, S.; Lucchi, G.; Ducoroy, P.; Bertoldo, J.B.; Terenzi, H.; Bettaieb, A.; Plenckette, S. S-Nitrosylation of cIAP1 Switches Cancer Cell Fate from TNF $\alpha$ /TNFR1-Mediated Cell Survival to Cell Death. *Cancer Res.* **2018**, *78*, 1948–1957. [[CrossRef](#)]
195. Kato, K.; Tanaka, T.; Sadik, G.; Baba, M.; Maruyama, D.; Yanagida, K.; Kodama, T.; Morihara, T.; Tagami, S.; Okochi, M.; et al. Protein kinase C stabilizes X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) through phosphorylation at Ser(87) to suppress apoptotic cell death. *Psychogeriatrics* **2011**, *11*, 90–97. [[CrossRef](#)]
196. Hou, Y.; Allan, L.A.; Clarke, P.R. Phosphorylation of XIAP by CDK1-cyclin-B1 controls mitotic cell death. *J. Cell Sci.* **2017**, *130*, 502–511. [[CrossRef](#)]

197. Plenchette, S.; Cathelin, S.; Rebe, C.; Launay, S.; Ladoire, S.; Sordet, O.; Ponnelle, T.; Debili, N.; Phan, T.H.; Padua, R.A.; et al. Translocation of the inhibitor of apoptosis protein c-IAP1 from the nucleus to the Golgi in hematopoietic cells undergoing differentiation: A nuclear export signal-mediated event. *Blood* **2004**, *104*, 2035–2043. [[CrossRef](#)]
198. Didelot, C.; Lanneau, D.; Brunet, M.; Bouchot, A.; Cartier, J.; Jacquel, A.; Ducoroy, P.; Cathelin, S.; Decolongne, N.; Chiosis, G.; et al. Interaction of heat-shock protein 90 beta isoform (HSP90 beta) with cellular inhibitor of apoptosis 1 (c-IAP1) is required for cell differentiation. *Cell Death Differ.* **2008**, *15*, 859–866. [[CrossRef](#)]
199. Che, X.; Yang, D.; Zong, H.; Wang, J.; Li, X.; Chen, F.; Chen, X.; Song, X. Nuclear cIAP1 overexpression is a tumor stage- and grade-independent predictor of poor prognosis in human bladder cancer patients. *Urol. Oncol.* **2012**, *30*, 450–456. [[CrossRef](#)]
200. Hrdinka, M.; Yabal, M. Inhibitor of apoptosis proteins in human health and disease. *Genes Immun.* **2019**, *20*, 641–650. [[CrossRef](#)]



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

#### **IV. Revue : *Cross Kingdom Immunity: The Role of Immune Receptors and Downstream Signaling in Animal and Plant Cell Death***

Cette revue, rédigée durant l'année 2021, recense le rôle des récepteurs de l'immunité dans les processus de mort cellulaire chez l'animal et les plantes. Les différentes voies de signalisation cellulaires stimulées par ces récepteurs sont développées.



# Cross Kingdom Immunity: The Role of Immune Receptors and Downstream Signaling in Animal and Plant Cell Death

Thibault Roudaire<sup>1</sup>, Marie-Claire Héloir<sup>1</sup>, David Wendehenne<sup>1</sup>, Aymeric Zadoroznyj<sup>2,3</sup>, Laurence Dubrez<sup>2,3\*</sup> and Benoit Poinssot<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Agroécologie, Agrosup Dijon, CNRS, INRAE, Univ. Bourgogne, Univ. Bourgogne Franche-Comté, Dijon, France, <sup>2</sup> Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm), LNC UMR1231, Dijon, France, <sup>3</sup> LNC UMR1231, Université de Bourgogne Franche-Comté, Dijon, France

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Martin Heil,

Instituto Politécnico Nacional de México (CINVESTAV), Mexico

### Reviewed by:

Takaki Maekawa,

Max Planck Institute for Plant Breeding Research, Germany

Jonathan P. Rast,

Emory University, United States

### \*Correspondence:

Laurence Dubrez

ldubrez@u-bourgogne.fr

Benoit Poinssot

benoit.poinssot@u-bourgogne.fr

### Specialty section:

This article was submitted to

Molecular Innate Immunity,

a section of the journal

Frontiers in Immunology

Received: 30 September 2020

Accepted: 29 December 2020

Published: 08 March 2021

### Citation:

Roudaire T, Héloir M-C,

Wendehenne D, Zadoroznyj A,

Dubrez L and Poinssot B (2021) Cross

Kingdom Immunity: The Role of

Immune Receptors and

Downstream Signaling in Animal

and Plant Cell Death.

Front. Immunol. 11:612452.

doi: 10.3389/fimmu.2020.612452

Both plants and animals are endowed with sophisticated innate immune systems to combat microbial attack. In these multicellular eukaryotes, innate immunity implies the presence of cell surface receptors and intracellular receptors able to detect danger signal referred as damage-associated molecular patterns (DAMPs) and pathogen-associated molecular patterns (PAMPs). Membrane-associated pattern recognition receptors (PRRs), such as Toll-like receptors (TLRs), C-type lectin receptors (CLRs), receptor-like kinases (RLKs), and receptor-like proteins (RLPs) are employed by these organisms for sensing different invasion patterns before triggering antimicrobial defenses that can be associated with a form of regulated cell death. Intracellularly, animals nucleotide-binding and oligomerization domain (NOD)-like receptors or plants nucleotide-binding domain (NBD)-containing leucine rich repeats (NLRs) immune receptors likely detect effectors injected into the host cell by the pathogen to hijack the immune signaling cascade. Interestingly, during the co-evolution between the hosts and their invaders, key cross-kingdom cell death-signaling macromolecular NLR-complexes have been selected, such as the inflammasome in mammals and the recently discovered resistosome in plants. In both cases, a regulated cell death located at the site of infection constitutes a very effective mean for blocking the pathogen spread and protecting the whole organism from invasion. This review aims to describe the immune mechanisms in animals and plants, mainly focusing on cell death signaling pathways, in order to highlight recent advances that could be used on one side or the other to identify the missing signaling elements between the perception of the invasion pattern by immune receptors, the induction of defenses or the transmission of danger signals to other cells. Although knowledge of plant immunity is less advanced, these organisms have certain advantages allowing easier identification of signaling events, regulators and executors of cell death, which could then be exploited directly for crop protection purposes or by analogy for medical research.

**Keywords:** pattern recognition receptors, Toll-like receptors, NOD-like receptors, pathogen-associated molecular patterns, damage-associated molecular patterns, hypersensitive response, regulated cell death

## INTRODUCTION

Eukaryotic cells have evolved complex defense mechanisms in order to combat microbial challenges and preserve organism integrity. Both plants and animals are endowed with a conserved innate immune system able to neutralize pathogens and to contain the infection. It uses specialized receptors to detect microbial patterns, pathogen-derived compounds, and danger signals and elicits an adapted response. The immune response includes a transcriptional reprogramming, the production of antimicrobial molecules, the activation of a regulated cell death program in infected cells and the release of soluble factors such as cytokines and phytohormones able to signal away from the original infection site and alert the host organism of danger. In plants, a systemic resistance is transiently established to prevent forthcoming microbial assault (1). In addition, vertebrates have evolved an adaptive immune system involving specialized cells able to produce a stronger, specific immune response and ensure a long-term protection.

The activation of cell death processes at the site of pathogen attack constitutes an efficient strategy shared by plants and animals to protect the organism from pathogen invasion by directly destroying the pathogen niche. Cell death can also produce alert signals for neighboring cells through the release of intracellular components that can elicit or amplify the anti-microbial response. During a microbial infection, three types of regulated cell death are classically described in animals for confining pathogen progression: apoptosis, pyroptosis, and necroptosis (2, 3). Apoptosis is defined by specific morphological criteria that include cell shrinkage, condensation of the chromatin and fragmentation of the nucleus, plasma membrane blebbing, and the formation and release of apoptotic bodies that are engulfed through a phagocytosis-like process named efferocytosis. At the molecular level, apoptosis involves a cascade of events that culminates in the activation of specific proteases belonging to the caspase family responsible for cell dismantling (2). Of note, apoptosis is a “silent form” of cell death that does not directly cause inflammatory response because of conserved plasma membrane integrity and efferocytosis. Efferocytosis has even been linked to the resolution of inflammation, required for the clearance of dead cells after infection, reducing the production of inflammatory factors by phagocytes and progressively allowing the restoration of homeostasis (4). On the opposite, pyroptosis and necroptosis are associated with the release of pro-inflammatory molecules allowing the establishment of the adaptive immunity. They both involve pore-forming proteins [gasdermin-D (GSDMD) in pyroptosis and mixed lineage kinase domain-like (MLKL) in necroptosis] that trigger membrane permeabilization and osmotic imbalance leading to cell swelling. Many connections exist between signaling pathways leading to apoptosis, pyroptosis, and necroptosis, and these cell death processes can occur simultaneously.

Recognition of invading microbes by plants can also trigger a specific cell death referred to as the hypersensitive response (HR) which efficiently blocks the spreading of biotrophic pathogens in healthy tissues by limiting their access to plant metabolites (5).

However, the molecular events involved in HR have not yet been completely deciphered. HR-associated cell death is characterized by an early rupture of the plasma membrane associated with some apoptosis-like features such as cytoplasm shrinkage, chromatin condensation, and nucleus disruption (6). These events are associated with plant-specific cell death features including the dismantling of tonoplast and the vacuolar collapse (7). Consequently, the release of active hydrolases and proteases from collapsed vacuoles can trigger autophagy-like processes (8). Thus, HR appeared as a plant regulated necrosis displaying some feature of necroptosis or pyroptosis in animals (5, 9). As observed during necroptosis and pyroptosis, leakage of the cellular content can constitute alert signals for neighboring cells and prepare them to cope with infections. All of these concerted events insure a global and effective defense response.

The theory that innate immune response is elicited by specialized receptors which recognize conserved microbial components referred to as pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) was laid out by Medzhitov and Janeway (10), rewarded by the Nobel Prize in 2011. The first pattern recognition receptor (PRR) was described in plants as a cell surface receptor encoded by the rice gene *Xa21*, which confers resistance to the bacteria *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae* (11). For many years, two major strategies to study the plant innate immunity have existed. The first was based on a genetic approach: certain varieties of a plant species express *R* genes leading to the perception of microbial effectors encoded by avirulence genes (*Avr*) and then generally to the establishment of the HR. This is the basis of the gene-for-gene concept (*R*-*Avr*) described by Flor on flax and then widely used for genetic breeding of crop plants (12). The second used a biochemical approach coupled with pharmacological studies. Several teams have purified microbial-derived compounds, commonly referred to as elicitors (chitin, flagellin, elicitin,  $\beta$ -glucans, ...) able to trigger plant immune responses. They also characterized high-affinity plasma membrane binding sites interacting with elicitors and showing biochemical features of receptors. To combine the results of these two approaches and to get closer to the concept of PAMPs existing in mammals came the concept of PAMP-Triggered Immunity (PTI), that takes into account the recognition of PAMPs by surface receptors, and Effector-Triggered Immunity (ETI), related to the recognition of effectors (pathogen *Avr* gene products) by intracellular receptors (encoded by *R* genes). However, this PTI-ETI concept proposed by Jones and Dangl (13) was a bit controversial because it was too binary (ETI or PTI) and did not reflect all the existing shade of gray levels of plant immune responses, notably during symbiotic interactions. Recently, new models have emerged in the plant innate immunity with the concept of invasion patterns (14) and signs of danger perceived by a complex plant surveillance system that can produce secondary host-derived immunogenic factors termed phytocytokines (15).

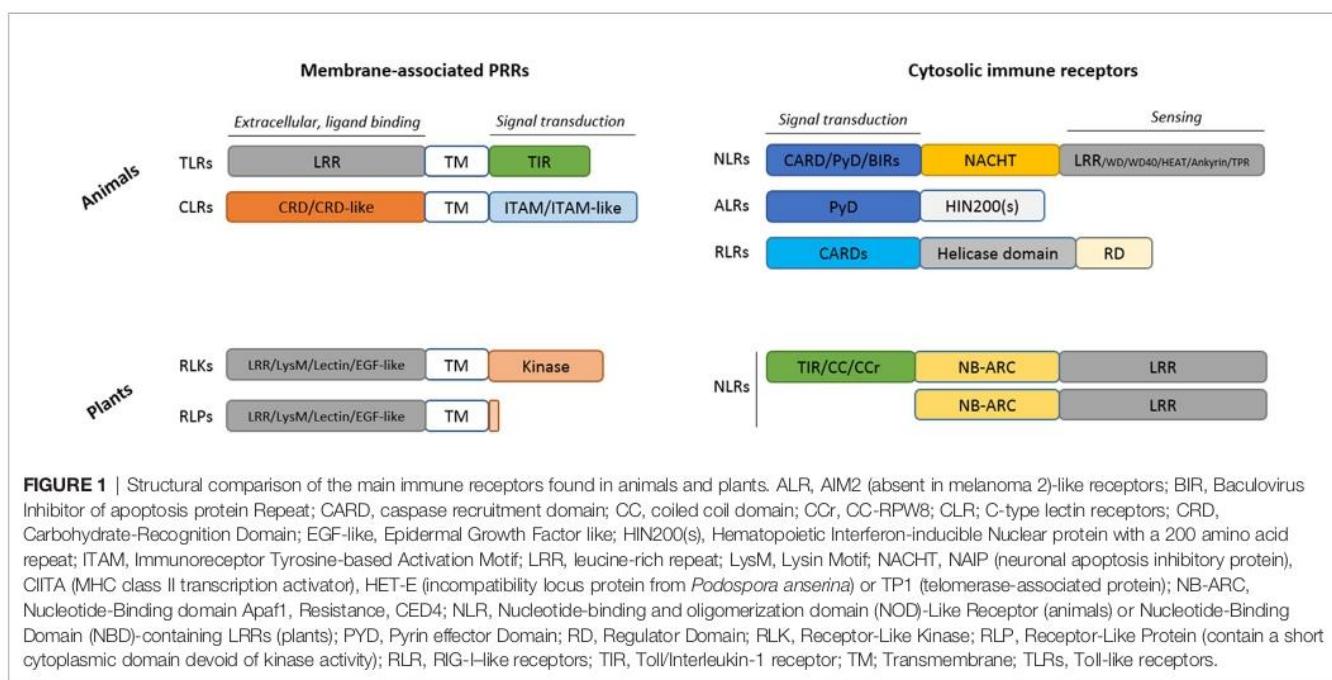
This review aims at highlighting similarities and specificities of the immune responses existing in mammals and plants, mainly focusing on recent advances in the discovery of immune receptors and the involvement of signaling pathways leading to cell death.

## MEMBRANE-ASSOCIATED PRRs

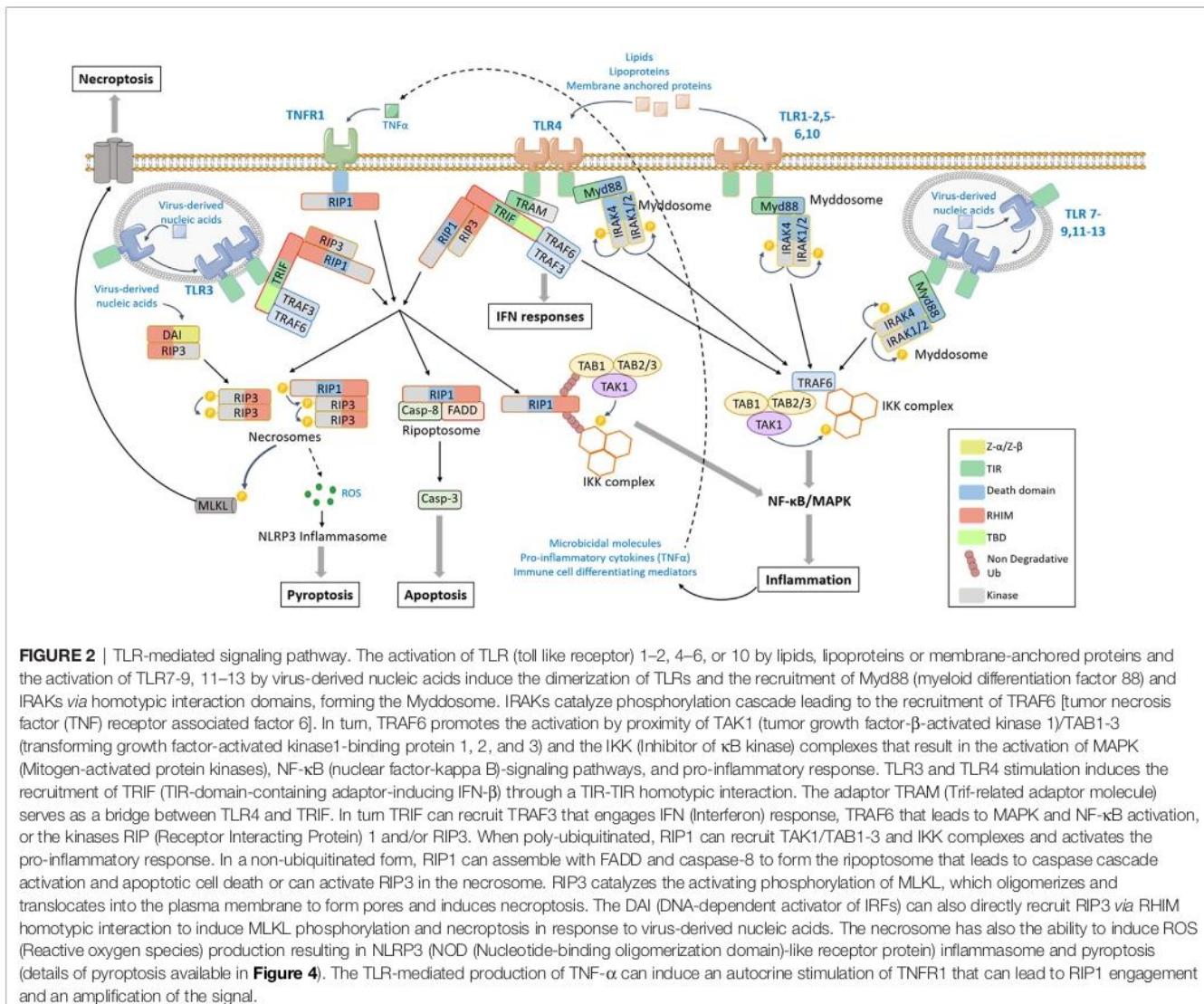
Cells employ a large number of cell surface or endosomal receptors to sense PAMPs and endogenous danger signals referred to as damage-associated molecular patterns (DAMPs) to engage defense responses. In vertebrates, membrane-bound immune receptors belong to the Toll-like receptors (TLRs) family, which are located either at the cell surface or within the endosomal compartment, and C-type lectin receptors (CLRs) located at the cell surface. Plant PRRs are mainly plasma membrane-localized and are divided into two categories: the receptor-like kinases (RLKs) and the receptor-like proteins (RLPs) (**Figure 1**). In both plants and vertebrates, recognition of PAMPs/DAMPs by membrane PRRs primarily activates transcriptional programs that culminate in the production of antimicrobial molecules and in the implementation of an adaptive response of the host to counteract the pathogen attack.

Membrane-bound PRRs are composed of an N-terminal extracellular domain that functions as a ligand recognition and binding domain, a transmembrane intermediate and a C-terminal cytoplasmic signal transducing domain (**Figure 1**). In animals, PAMPs are recognized by tandem copies (16–22) of LRR (leucine-rich repeat) in TLRs and by C-type lectin-like domains in CLRs (23). Thirteen TLR paralogs were described in vertebrates. Cell surface TLRs (TLR1, 2, 4–6, and 10) recognize components of microbial membranes such as lipids, lipoproteins, membrane anchored proteins, or extracellular proteins bound to pathogens such as heat shock proteins (HSP) 60 and 70 while TLRs found within endosomal compartment (TLR3, 7–9, and 11–13) likely sense virus and bacteria-derived nucleic acids or endogenous nucleic acids in some pathological conditions. On the other hand, CLRs are dedicated to the defense against fungal infections (23). CLRs can also sense commensals fungi and thus contribute to maintain homeostasis (24, 25). Molecular

mechanisms of signal transduction in animal cells are well characterized. They involve the presence of conserved modular domains found in receptors, adaptor proteins or signaling effectors and mediate, through homotypic interaction, the assembly of oligomeric signaling platforms favoring the activation by proximity of signaling effectors. In TLRs, the intracytoplasmic signal transduction domain is the conserved Toll/IL-1 receptor (TIR) domain, also found in the adaptor proteins myeloid differentiation factor 88 (MyD88), MyD88 adaptor-like (MAL), TIR-domain-containing adaptor-inducing IFN- $\beta$  (TRIF), TRIF-related adaptor molecule (TRAM), and sterile  $\alpha$ - and armadillo-motif-containing protein (SARM). Ligand binding triggers TLR homo- or hetero-dimerization, conformational change in their intracellular TIR domain and the consecutive recruitment *via* TIR-TIR homotypic interaction of adaptor proteins to form a signaling platform and initiate downstream signaling pathway. TLR stimulation engages MAPKs and/or NF- $\kappa$ B and ultimately promotes inflammatory response that constitutes the first line of defense in mammals and appears critical to maintain homeostasis and tissue integrity. This includes the production of antimicrobial molecules, pro-inflammatory cytokines, and immune cell differentiating mediators responsible for the recruitment and activation of specialized immune cells to the site of infection (**Figure 2**) (16). However, in some situations such as a sustained infection, the presence of pathogens that resist to inflammatory defense or in some pathological conditions [e.g., some cancers, X-linked lymphoproliferative syndrome type 2 (XLP-2)] (17, 18), several TLRs such as TLR3 that recognizes virus-derived double stranded RNAs and RNAs released from damaged cells, and TLR4 that senses LPS from Gram-negative bacteria, can also trigger cell death (19–21). For CLRs, the signal transduction motif is the immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM) or ITAM-like motif that mediates the binding and the activation *via* phosphorylation of the spleen tyrosine kinase (Syk). Generally,



**FIGURE 1** | Structural comparison of the main immune receptors found in animals and plants. ALR, AIM2 (absent in melanoma 2)-like receptors; BIR, Baculovirus Inhibitor of apoptosis protein Repeat; CARD, caspase recruitment domain; CC, coiled coil domain; CCR, CC-RPW8; CLR, C-type lectin receptors; CRD, Carbohydrate-Recognition Domain; EGF-like, Epidermal Growth Factor like; HIN200(s), Hematopoietic Interferon-inducible Nuclear protein with a 200 amino acid repeat; ITAM, Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif; LRR, leucine-rich repeat; LysM, Lysin Motif; NACHT, NAIP (neuronal apoptosis inhibitory protein), CIITA (MHC class II transcription activator), HET-E (incompatibility locus protein from *Podospora anserina*) or TP1 (telomerase-associated protein); NB-ARC, Nucleotide-Binding domain Apaf1, Resistance, CED4; NLR, Nucleotide-binding and oligomerization domain (NOD)-Like Receptor (animals) or Nucleotide-Binding Domain (NBD)-containing LRRs (plants); PYD, Pyrin effector Domain; RD, Regulator Domain; RLK, Receptor-Like Kinase; RLP, Receptor-Like Protein (contain a short cytoplasmic domain devoid of kinase activity); RLR, RIG-I-like receptors; TIR, Toll/Interleukin-1 receptor; TM, Transmembrane; TLRs, Toll-like receptors.

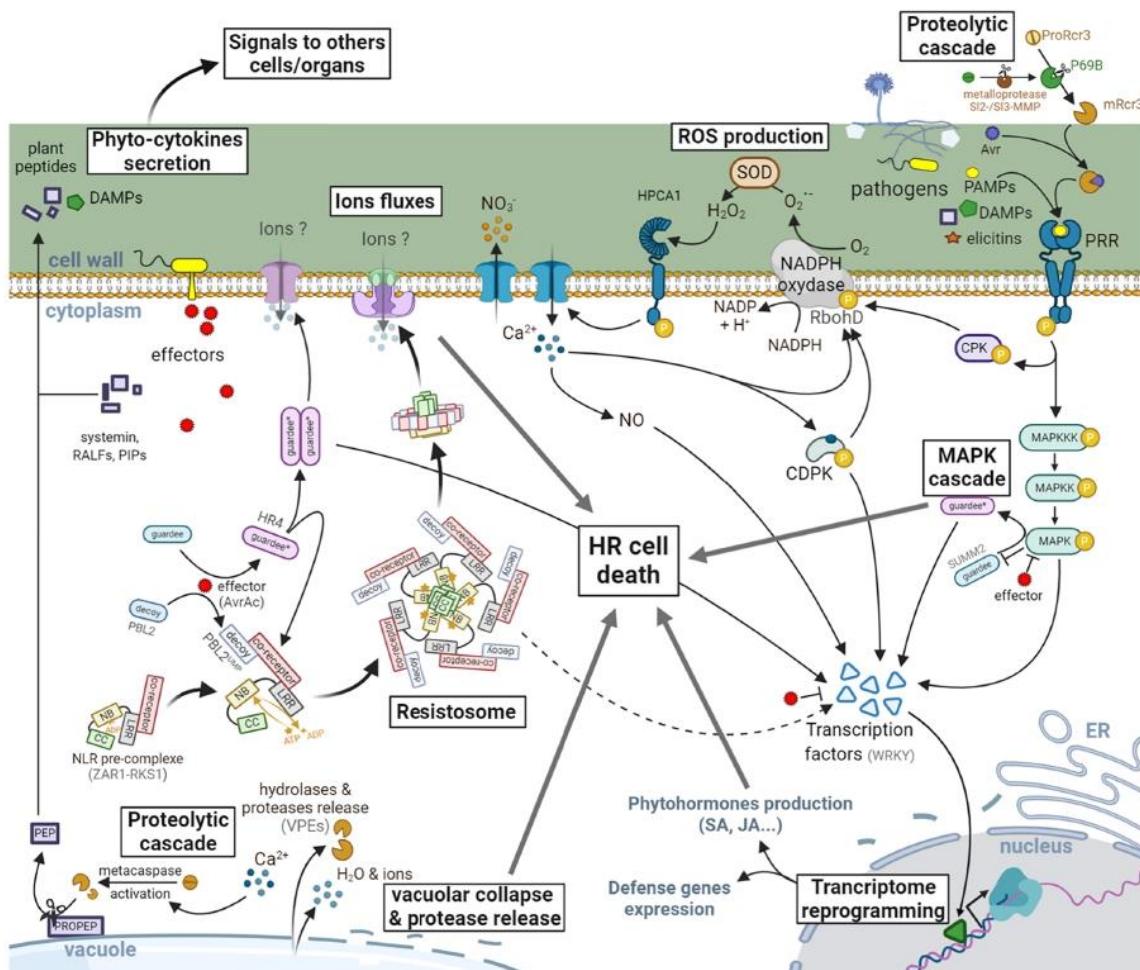


CLR stimulation does not trigger cell death but results in MAPKs, NF- $\kappa$ B, or interferon-regulatory factors (IRFs) activation (23).

By comparison, plants have evolved hundreds of membrane PRRs able to recognize a wide variety of PAMPs such as flagellin, peptidoglycan, chitin, elicitin, polygalacturonase, and xylanase (22, 26) or DAMPs such as fragments of the plant cell wall extracellular matrix (oligogalacturonides from pectins, cellobiose, and cellooligosaccharides from cellulose and xyloglucans from hemicellulose) (27, 28), extracellular ATP, NAD $^{+}$ , or secondary endogenous phytocytokines such as systemin, rapid alkalization factors (RALFs), pathogen-associated molecular pattern-induced peptides (PIPs), and elicitor peptides (PEPs) (15). The diversity of sensed PAMPs is made possible thanks to the presence of different extracellular domains (**Figure 1**). For example, LRRs found in flagellin sensing 2 (FLS2) sense flagellin or its 22-amino acid epitope flg22 (29, 30), whereas Lysin motif (LysM) specifically recognizes chitin oligosaccharides in chitin elicitor receptor kinase 1 (CERK1) associated with LYK4/5 (31–34) or peptidoglycan with lysin-motif proteins LYM1/LYM3

(35). Epidermal growth factor (EGF)-like domain present in the wall-associated kinase 1 (WAK1) senses oligogalacturonides released during the degradation of the plant cell wall by fungal hydrolases (36, 37), whereas the lectin domains present in AtLecRK1.9 (DORN1) and AtLecRK1.8 perceive extracellular ATP and NAD $^{+}$ , respectively (38, 39).

Unlike animal PRRs that require the recruitment of adaptor proteins to transduce signal, plant membrane-associated RLKs are endowed with kinase activity thanks to the presence of a cytoplasmic kinase domain (KD) (**Figure 1**). PAMP-sensing induces oligomerization of RLKs and kinase activation that directly triggers numerous cellular responses (**Figure 3**) such as ion fluxes across the plasma membrane, a burst of reactive oxygen species (ROS), a phosphorylation cascade activating MAPKs, and transcription factors leading to the expression of defense genes which encode enzymes involved in the production of defensive secondary metabolites (e.g., phytoalexins, callose, and lignin that reinforce plant cell wall) (26). Because of their very short cytoplasmic domain (about 24 amino acids) devoid of



**FIGURE 3 |** Signaling events leading to HR in plants. PRRs are activated by the recognition of eliciting molecules resulting from the degradation of plant cells (DAMPs) or released by the pathogens (PAMPs, elicitors, apoplastic avirulence factors: Avr). The signal is then transduced by a cascade of phosphorylation events involving MAPKs, cytoplasmic protein kinases (CPKs), and transcription factors, mainly from the WRKY family. This phosphorylation can also activate the NADPH oxidase RbohD, leading to the production of ROS [ $O_2^-$ ] transformed into hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) by a superoxide dismutase (SOD)]. An influx of intracellular  $Ca^{2+}$ , initiated quickly after perception of  $H_2O_2$  by HPCA1 leads to the production of nitric oxide (NO), as well as the activation of transcription factors via the calcium dependent protein kinases (CDPKs). This is followed by a reprogramming of the transcriptional activity leading to the expression of defense genes involved in the synthesis of phytohormones (SA, JA, ...), the antimicrobial phytoalexins or even the release of hydrolytic enzymes (glucanases, chitinases, ...) from the pathogenesis-related proteins family. In the meantime, effectors secreted by pathogens to counter the plant's defenses can also be directly or indirectly (via the recognition of a modified host-protein) recognized by NLRs. This recognition generally induces a conformational change in the protein (noted here by an asterisk and a color change), allowing the exchange of ADP by an ATP and therefore the activation of the NLR leading in some cases to macromolecular complexes such as the resistosome or to the activation of transcription factors. These larger-scale molecular complexes have been proposed to act via the recruitment of other signaling actors leading to a potentiation of the defenses already in place or by the formation of pores in the plasma membrane. A HR cell death is then observed locally to block the spreading of the pathogen. This will also be associated with the release of DAMPs, phytohormones and phyto-cytokines which will transmit information to neighboring cells and organs to prevent future infections in healthy tissues. Some plant peptides (e.g., PEPs) can be matured by metacaspase-mediated cleavage and released in the apoplast to prime immune responses in neighboring cells, thus enabling the establishment of a local resistance.

kinase activity, RLPs are not able to transduce signal but function as co-receptors heterodimerized with RLKs that finally elicit a similar cascade of immune signaling events. Most of the PAMPs and DAMPs recognized by plant cell surface PRRs are unable to elicit specific plant cell death. Only some proteinaceous elicitors secreted by pathogens in the apoplast can trigger HR in a plant species dependent manner.

## NUCLEOTIDE-BINDING OLIGOMERIZATION DOMAIN (NOD)-LIKE RECEPTORS (NLRs)

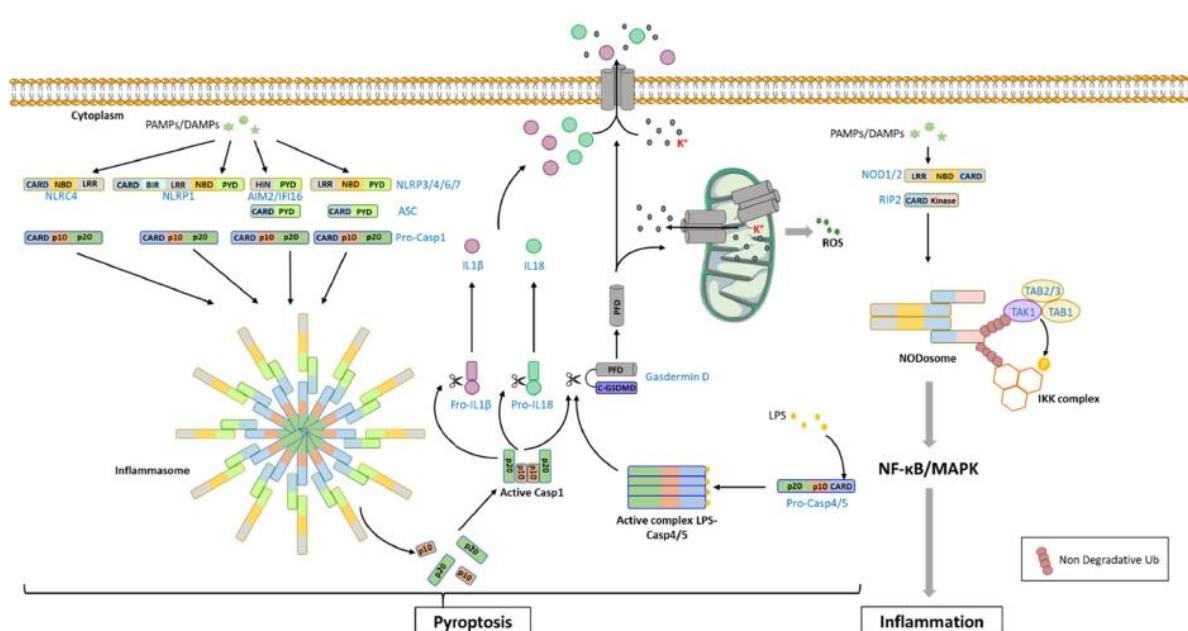
Nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)-like receptors (NLRs), also generalized as nucleotide-binding domain (NBD)-containing LRRs (NB-LRR in plants), are a

class of immune proteins found across both plant and animal kingdoms, with some exceptions in taxa such as Algae, Nematoda, and Drosophila. They were previously classified in plants as R-proteins in the gene-for-gene model. In the animal kingdom, NLRs are the most represented family of cytosolic immune receptors, along with ALRs [AIM2 (absent in melanoma 2)-like receptors] and RLRs (RIG-I-like receptors) (**Figure 1**). ALRs recognize cytosolic DNAs and RLRs sense cytosolic RNAs that include virus nucleic acids as well as endogenous microRNAs (miRNAs) whereas NLRs sense cytosolic PAMPs (e.g., bacteria-secreted toxins, components of bacteria with pore forming activity, internalized LPS, viral proteins) but also markers of intracellular stresses acting as DAMPs such as ATP, uric acids, ROS, metabolic products, or cell-derived peptides that are released by cells in response to endogenous (e.g., ER stress, disruption of ion gradients) or environmental stresses. Stimulation of cytosolic immune receptors can trigger inflammatory response. However, for most of them, the main response is the release of the pro-inflammatory molecules IL-1 $\beta$  and IL-18 and pyroptosis (**Figure 4**). NLR stimulation can also indirectly lead to apoptosis, necroptosis, or activate autophagy process to clear pathogen (40). In plants, NLRs directly or

indirectly detect pathogen-secreted effectors (i.e., virulence proteins) to generally promote HR cell death.

Although NLRs are found in both animals and plants, they seem to result from an independent evolutionary process (41). They are characterized by the presence of a central NBD (also named NOD) that may be originated from a prokaryotic class of AAA<sup>+</sup> ATPases. Both mammals and plants would have selected the NBD for the flexibility of its architecture. It catalyzes the ADP/ATP exchange which promotes the NLR oligomerization and activation. ATP-bound active forms are generally unstable and rapidly recycled into inactive forms or degraded. This mode of activation allows the NLR to quickly react after detection of pathogens and enable to preserve the organism from a costly and useless mobilization of defenses in their absence. Animal NLRs are characterized by a “NACHT” [NAIP (neuronal apoptosis inhibitory protein), CIITA (MHC class II transcription activator), HET-E (incompatibility locus protein from *Podospora anserina*) or TP1 (telomerase-associated protein)] NBD subtype while plants NLRs possess an “ARC” (Apaf1, Resistance, CED4) NBD subtype, also found in some animal adaptor proteins involved in apoptosis such as Apaf-1 (42).

In addition to NBD, LRR is common to both sides. As in animal TLRs, this domain is involved in sensing microbe



**FIGURE 4 |** NLR-mediated signaling pathway in mammals. The recognition of PAMPs/DAMPs [Pathogen-Associated Molecular Patterns/Damage-Associated Molecular Patterns] by NLRs (Nucleotide-binding oligomerization domain)-like receptor proteins: NLRCs, NLRPs) promotes the recruitment of procaspase-1 (Pro-Casp1) through homotypic domain interaction, forming a large cytosolic complex named inflammasome. In some situation, the adaptor ASC (apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD domain) can take part to the complex, bridging the receptor to procaspase-1. The procaspase-1 undergoes auto-activation and processing of its 2 active sub-units (p10 and p20) which assemble into a tetrameric active form. Active caspase-1 catalyzes the cleavage of proIL-18 (proInterleukine-18), proIL-1 $\beta$  (proInterleukine-1 $\beta$ ) into mature cytokines, and gasdermin-D releasing the PFD domain that can oligomerizes and anchors into the membrane to form pores. Processing of gasdermin-D can also be ensured by caspase-4 and caspase-5, which are activated after LPS binding. The gasdermin PFD can also form pores into the mitochondrial membrane that induce K<sup>+</sup> release and ROS production. In addition, pores created in the plasma membrane by PFD also lead to IL1 $\beta$  and IL18 release and to an ion imbalance that finally results in pyroptosis. The recognition of PAMPs/DAMPs by NOD1/2 promotes the formation of the NODosome composed of the sensor and the protein RIP2 (Receptor Interacting Protein 2) through CARD-dependent homotypic interaction. RIP2 can then recruit TAB1/TAB2/3/TAK1 and IKK complexes that engage MAPK and NF-κB signaling pathways leading to the production of pro-inflammatory cytokines.

effectors or modified host-proteins. As an alternative, some animal NLRs own other motif domains with sensing activity such as WD/WD40, HEAT, Ankyrin, or TPR (tetratricopeptide) motifs. LRR domain is widespread among immune receptors of any kinds, probably because of its pre-disposition for forming mismatches thus easily creating diversity and therefore new potential recognition sites, as suggested by Baggs et al. (43). After invasion pattern recognition, LRRs undergo a conformational change allowing NLR switch from an inactive NBD-ADP-bound closed conformation to an active NBD-ATP-bound open conformation and the recruitment of downstream signaling effectors (44, 45). LRR has also the ability to negatively regulate the NBD through intramolecular interactions that prevent its oligomerization (46).

The domains found in the N-term part of the protein are involved in the transduction of downstream signaling (45, 47). In animals, these domains belong to the death-fold superfamily which are homotypic interacting domains also found in adaptor and signaling molecules. The pyrin effector domain (PYD) is the most represented and characterizes the NLRP (NOD-like receptor protein) sub-family of NLRs (also named NALP). The NLRC sub-family contains one or two caspase-activation and recruitment domains (CARD), NLRA the acidic transactivation domain and NLRB the baculoviral inhibitory repeat-like domain (BIR) (**Figure 1**) (40).

In plants, if present, the N-term accessory domain could be of three main types: TIR defining the TIR-NB-LRR (TNLs) group, CC (Coiled-Coil) which defines the CNLs subgroup of NLRs, or CCR (the CC domain subtype with high similarity with the non-NBD-LRR resistance gene RPW8) that characterizes RNLs (48, 49). In addition, different structure variants lacking one or two of the previously described NLR domains can be found (42, 50, 51). Some of these truncated forms, also termed “adapters” or “helpers”, amplify the immune response in plants or could serve as effector baits.

Because of the wide diversity and shorter lifespan of pathogens, different modes of NLR-mediated detection of pathogens have emerged, allowing them to bypass the recognition issue due to their obvious slowly evolution (43, 52). In addition to the classic direct detection of one effector by its related NLR, different ways to activate NLRs have been observed such as the “guard and decoy concept” (42). In this strategy, a decoy protein is in close relation with and constitutively represses the activity of a guard NLR. Effectors or endogenous danger signals mediate decoy modification such as direct cleavage, phosphorylation, acetylation, or uridylation (53–56). These post-translational modifications (PTMs) finally disrupt the inhibition signal allowing the NLR to be fully active (42). In this way, many pathogen effectors can be only detected by monitoring a small number of targets, whether directly involved in defenses (guardee model) or not (decoy model). Moreover, as NLRs are often working by pairs or oligomers, it is not rare to observe an “autoimmune” phenotype, i.e., a constitutive activation of NLRs in the absence of pathogen. This phenotype can result from mutations within the molecule (57, 58) or might also be the consequence of the absence of its related inhibitor, as well as an

inappropriate negative interaction between closely related NLRs (59, 60). This is particularly common in the case of crossed plant populations, where inappropriate allelic combinations generate underdeveloped or self-deteriorating seedlings due to the fitness imbalance between growth and defense (61, 62). This phenomenon, also known as hybrid incompatibility, thus facilitates the natural selection of related units. In connection with this, integration of decoy domains inside the NLR protein may have been selected more easily, as the probability of recombination being more important in genetically distant partners than in linked proteins. This then gives rise to the last NLR activation strategy described by Jones et al. (42), the “integrated decoy” model, exemplified by the RRS1 TLR that contains an integrated WRKY transcription factor domain, target of numerous effectors, or the NLR RGA5 that holds an integrated heavy metal-associated copper binding domain.

## DOWNSTREAM SIGNALING EVENTS LEADING TO CELL DEATH IN ANIMALS

In Animals, although many interplays between cell death signaling pathways exist, pyroptosis is primarily the result of the stimulation of intracellular immune receptors (NLRs and cytosolic DNA sensors) while apoptosis and necroptosis are mainly triggered by membrane-associated TLRs.

### NLR-Induced Pyroptosis

The signaling pathway induced by NLR stimulation has been extensively studied in animals and is about to be well characterized [for review, see (63)]. Sensing of PAMPs or DAMPs by the C-term domain triggers NLRs oligomerization and the recruitment of downstream adaptors or signaling proteins to the N-terminal death fold domain *via* homotypic domain interaction, forming large, cytoplasmic, ring-like multi-protein complexes. The best characterized are known as inflammasomes and result in pyroptosis. However, some NLRs such as NOD1 and NOD2 from the NLRC subfamily are not able to induce the assembly of an inflammasome but of a NODosome that ultimately results in the activation of a transcriptional program through NF- $\kappa$ B and/or MAPK signaling pathways (**Figure 4**) (64–66).

Inflammasome is built by the association of a cytoplasmic immune receptor and the effector pro-caspase 1, a cysteine protease from the caspase family (**Figure 4**). Pro-caspase 1 is composed by a CARD-containing prodomain and two active subunits. Its recruitment into the inflammasome *via* CARD-dependent homotypic interactions induces an activating dimerization and subsequent auto-cleavage of the two active subunits that assemble into the tetramer active form. Once activated, caspase-1 induces the processing of the pro-IL-1 $\beta$  and pro-IL-18 into mature cytokines. Caspase-1 can also catalyze the cleavage and activation of the pore-forming protein gasdermin D. Gasdermin D belongs to the pore-forming protein family gasdermin (GSDM) characterized by the presence of an N-terminal pore-forming domain (PFD).

It is synthetized as a precursor composed of two domains linked by a loop. Caspase-1 cleaves Gasdermin D within the loop, releasing the PFD that oligomerizes and anchors into the inner plasma membrane to form pores. Inflammasome-mediated Gasdermin D activation results in IL-1 $\beta$  and IL-18 release, and ionic imbalance that culminates in cell swelling (67, 68). The cleavage of gasdermin D can also be performed by the human CARD-containing caspase-4 and -5 (mouse caspase-11) that is activated in the so-called non-canonical inflammasome thanks to their ability to directly sense LPS by their CARD domain (69). Interestingly, Gasdermin D is also able to form pores into bacterial and organelle membrane such as mitochondria or endoplasmic reticulum that can result in potassium efflux, calcium mobilization and ROS generation (70).

Among NLRs, NLRP1, -3, -4, -6, -7, and NLRC4 can form inflammasome. Moreover, the cytosolic DNA sensors AIM2 and IFI16 also have the ability to form it (71–73). For NLRP3 and AIM2 that do not contain a CARD domain, the molecular adaptor ASC (apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD domain), that owns both a pyrin and a CARD domain, is recruited as an intermediate bridge to link the sensor to the pro-caspase-1 (Figure 4). ASC adaptor is also observed in the NLRC4 and NLRP1 inflammasomes, stabilizing the interaction between the NLR and the pro-caspase-1 (74). The activation process of NLRP3-inflammasome is the most documented (75). It involves a priming step that can be provided by sensing LPS by TLRs which induces NF- $\kappa$ B-dependent expression of NLRP3 and ASC (76). As the intracellular amount of these proteins have reached a sufficient level, NLRP3-inflammasome activation can be completed by sensing DAMPs (such as ATP) or some PAMPs (viral RNA or proteins, bacterial-derived compounds). Some PTMs such as phosphorylation (77) and de-ubiquitination (78) could also be of importance for the priming step.

## TLR-Mediated Apoptosis and Necroptosis

As described above, TLR-mediated signal transduction involves the assembly of multiprotein signaling platforms thanks to the presence of homotypic interacting domains in the receptors, adaptors and effector proteins (16). Ligand binding triggers TLR homo- or heterodimerization, conformational change in their intracellular TIR domain and the consecutive recruitment *via* TIR-TIR homotypic interaction of adaptor proteins. Schematically, TLR signaling pathways are subdivided into MyD88-dependent and TRIF-dependent signaling. Briefly, MyD88 can bind most of endosomal and cell-surface-TLRs. In turn, it promotes the recruitment of serine/threonine IL-1R-associated kinase (IRAK) family members, *via* homotypic interaction with its C-term death domain (DD), to form a multiprotein complex named Myddosome. IRAK4 catalyzes a phosphorylation reaction that leads to the recruitment of the E3-ubiquitin ligase TRAF6 [tumor necrosis factor receptor (TNFR)-associated factor 6], the subsequent recruitment and activation of TAK1/TAB1/3 and IKK complexes. This signaling platform engages MAPKs and NF- $\kappa$ Bs, and that ultimately leads to the expression of pro-inflammatory cytokines that include TNF $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ ) (16) (Figure 2).

The endosomal TLR3 and the cell surface TLR4 recruit the adaptor TRIF. While TLR3-TRIF binding is direct *via* TIM-mediated homotypic interaction, TLR4 requires the adaptor TRAM that bridges TLR4 to TRIF. TRIF can recruit TRAF3 and/or TRAF6 thanks to the presence of TRAF-binding motifs in the N-terminal part of the protein. TRAF6 promotes subsequent MAPK or NF- $\kappa$ B-dependent transcriptional program while TRAF3 engages the IRF3-activating signaling pathway and the expression of type I IFN genes (16) (Figure 2). In addition to the TIR and TRAF-binding domains, TRIF owns a C-terminal RIP homotypic interaction motif (RHIM) also found in the receptor-interacting kinases (RIPs) RIP1 and RIP3 (79).

The serine/threonine kinase RIP1 has been identified in 1995 because of its capacity of binding death receptors from TNFR superfamily (80). Thus, RIP1-dependent signaling pathway can be activated by TLR3 and TLR4 as described above and also indirectly by the other TLRs *via* the NF- $\kappa$ B-dependent production of TNF $\alpha$  and autocrine stimulation of TNFR1. RIP1 appears as the core component of signaling platforms, at the crossroad between inflammatory response, apoptotic and necroptotic cell death signaling pathways [for review see (81)] (Figure 2). When modified by non-degradative ubiquitin chains, RIP1 constitutes a scaffold for the recruitment of the kinase complexes TAK1/TAB1/TAB2 and IKK that activate MAPK and NF- $\kappa$ B-dependent transcriptional response. In a non-ubiquitinated form, RIP1 promotes the assembly of a secondary cytoplasmic cell death signaling platforms thanks to its kinase activity. Associated with the adaptor FADD (Fas-associated protein with DD) and caspase-8, it promotes caspase-dependent apoptotic cell death *via* the activation of the proteolytic cascade involving the caspase-3 (82). RIP1 can recruit its closely related protein RIP3 *via* their respective RHIM domain and forms a necrosome (Figure 2). Independently of RIP1, RIP3 can also be directly engaged by TLR3 and TLR4 *via* a RHIM-dependent binding to TRIF, and also by the cytosolic DNA sensor DAI from RLR family that owns a RHIM domain (83).

RIP3 is the main effector of necroptosis (84). It is activated by homodimerization and autoproteophosphorylation. RIP3 promotes the activating phosphorylation of MLKL (85). Once activated, MLKL oligomerizes and translocates to the plasma membrane where it interacts with phosphatidylserines and forms pores or cation channels responsible for membrane permeabilization and disruption and cell death (84, 86). Necroptosis has been associated with the production of ROS. Deletion of RIP3 completely blocked ROS production suggesting that this event occurs downstream of necrosome activation (87).

The concept of necroptosis has emerged over the two last decades but its contribution to the control of pathogen infections is still not very well understood. Experimental necroptosis model usually requires an inhibition of apoptotic signaling pathway, suggesting that necroptosis occurred as a secondary event (88). The role of RIPK3-mediated cell death in antiviral response was highlighted by the analysis of mice deficient in RIPK3 that appeared highly susceptible to Influenza A virus or vaccinia virus (87, 89). In the same manner, macrophages or lung epithelial cell death induced by some bacteria (that include *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus*

*marcescens*, or *Streptococcus pneumoniae*) are inhibited by RIPK3 deficiency or necroptosis inhibitors (90–92). Necroptosis could constitute an important defense mechanism against infection with pathogens able to bypass apoptosis induction by expressing anti-apoptotic proteins.

## DOWNSTREAM SIGNALING EVENTS LEADING TO CELL DEATH IN PLANTS

### NLR-Mediated HR

ETI-related HR cell death is frequently associated with early signaling events such as NLR oligomerization, activation of a MAPK cascade, ROS generation, transcriptional reprogramming, and a later accumulation of phytohormones associated to plant immune responses (93, 94). Once the pathogen is detected through the direct recognition of an effector or *via* a modification of a host molecular target, larger immune receptor complexes are built. Recently, an NLR supramolecular structure termed resistosome and showing similarities with the mammalian inflammasomes has been discovered in plants. In this case, the bacterial pathogen *Xanthomonas campestris* injects into the host plant cells the AvrAC effector which uridylates the PBS1-like protein 2 (PBL2) decoy receptor-like cytoplasmic kinase (RLCK). This modification (PBL2<sup>UMP</sup>) triggers its association with the second RLCK resistance-related kinase 1 (RKS1) that interacts with the NLR Hop-Z-activated resistance 1 (ZAR1). This allows the NBD to become active by exchanging its ADP to ATP (95, 96). Subsequent ATP binding triggers the pentamerization of the ZAR1-RKS1-PBL2 resistosome complex (Figure 3). The assembled supramolecular complex forms a funnel-shaped structure with a pore diameter ranging from ~10 to 30 Å. Because of its structural resemblance with the hemolytic pore forming protein fragaceatoxin C and the partial requirement of its association with the plasma membrane for the induction of cell death, Wang and collaborators hypothesized this complex to be pore-forming. The ZAR1 resistosome would thus disrupt the plasma membrane integrity and/or alter the ions homeostasis by acting in a similar manner to the MLKL and gasdermins in mammals (9). Nonetheless, we cannot rule out that the ZAR1 resistosome could also serve as a docking site for others immune actors. Furthermore, some NLRs complexes appear to directly activate the expression of transcription factors, rather than associating with the membrane, to finely tune cell death and immune responses in plants. In that way, the *Arabidopsis thaliana* (Arabidopsis) helper NLR AtNRG1 (N-requirement gene 1) forms a cell death signaling hub when it is associated with the heterodimer formed by the lipase-like protein enhanced disease susceptibility1 (AtEDS1) interacting with the senescence-associated gene101 (AtSAG101) (97–99). However, if AtEDS1 interacts with phytoalexin-deficient 4 (AtPAD4), this molecular complex associates with another helper NLR AtADR1 (accelerated disease resistance 1) to promote the expression of immune genes *via* transcriptional reprogramming (99).

In Arabidopsis, HR cell death pathway is regulated by a MAPK cascade, involving the MAPK kinase kinase MEKK1,

the MAPK kinases MKK1/2, and the MAPK MPK4. Interestingly, the CC-NLR protein SUMM2 (suppressor of *mkk1/2*, 2) has been shown to monitor this MAPK cascade (100). Indeed, the *Arabidopsis* *mekk1*, *mkk1/2*, and *mpk4* mutants or plants in which *MEKK1* has been silenced exhibited spontaneous cell death and constitutive immune responses such as defense gene activation and ROS production (101–106), whereas mutations in SUMM2 suppressed the cell death of *mekk1*, *mkk1/2*, and *mpk4* mutants (100). A screening of *Arabidopsis* T-DNA insertion lines identified SUMM2, MEKK2, and calmodulin-binding receptor-like cytoplasmic kinase 3 (CRCK3) as key regulators of MEKK1 depletion-induced cell death (107). At the opposite, overexpression of CRCK3 induced a SUMM2- and MEKK2-dependent cell death (106). Altogether, these results suggest that a dedicated plant MAPK cascade plays an important role in the HR signaling, which is under the tight control of different regulator proteins.

The onset of HR is also often associated with the production of ROS. Most of the apoplastic ROS generated during plant-pathogen interactions are produced *via* plasma membrane-localized enzymes with homology to the mammalian phagocytes NADPH oxidases (NOXs) and called respiratory burst oxidase homologs (RBOHs) in plants (108). These enzymes generate apoplastic superoxide ions ( $O_2^-$ ) that rapidly dismutate to hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ), a well-known microbicide. Following infection by a bacterial pathogen possessing the avirulence gene *AvrRpm1*, HR is reduced in *Arabidopsis* *AtrbohD* mutant and *AtrbohD/F* double mutant plants, indicating that RBOHs and ROS promote and/or mediate cell death (109). This process requires the concomitant production of nitric oxide (NO; see below). Nevertheless, infection with an avirulent oomycete pathogen in *Arabidopsis* *AtrbohD/F* double mutant plants caused more HR and resistant phenotype even though ROS production was suppressed (109). Similarly, *Arabidopsis* *ncat1* (no catalase activity 1) and *cat2* (catalase 2) mutants, supposed to have an increased  $H_2O_2$  level, surprisingly showed reduced cell death when infected by a bacterial pathogen expressing *AvrRpm1* (110). At the molecular level, the discovery that RBOHD activity is positively and negatively regulated by many PTMs *via* different phosphorylation or ubiquitination events suggests a finely tuned control of the spatio-temporal ROS production during plant-pathogen interaction (111–114). Thus, the connection between ROS and HR still needs clarifications. Interestingly the *Arabidopsis* LRR-RK HCPA1 has been recently shown to perceive extracellular  $H_2O_2$  *via* cysteine oxidation to trigger  $Ca^{2+}$  influx, which then leads to immune responses such as stomatal closure to delay the pathogen penetration through this natural opening in plants (115).

### PRR-Triggered Signaling Events Leading to HR

Apoplastic elicitors which trigger HR are more the exception than the rule. Nevertheless, Avr2/4/5/9 proteins secreted by the fungus *Cladosporium fulvum* induce HR in tomato expressing the corresponding surface RLP Cf-2, Cf-4, Cf-5, or Cf-9, respectively

(116–118). Similarly, fungal endopolygalacturonases secreted by *Botrytis cinerea* trigger plant cell death in a specific Arabidopsis ecotype (Columbia-0) co-expressing the RLPs RBPG1 (responsiveness to *Botrytis cinerea* polygalacturonases1) associated with SOBIR1 (suppressor of BIR1-1) (119). Elicitin proteins secreted by different species of *Phytophthora* can also trigger HR in different solanaceous plants after recognition by the RLP ELR (elicitin response) which forms a molecular receptor complex with the RLK BAK1 (brassinosteroid insensitive 1-associated receptor kinase 1) (120).

Cryptogein produced by *Phytophthora cryptogea* proved to be an efficient biological tool to study the mechanism underlying HR. More precisely, *Phytophthora cryptogea* induces an immune response in tobacco plants characterized by a HR and a transient systemic resistance conferring protection against numerous micro-organisms, including virulent ones (121). Cryptogein secreted by this oomycete is the major inducer of plant immunity and mimics the effects of the oomycete once applied to tobacco plants and cell suspensions (122, 123). Cryptogein is an elicitin protein of 10 kDa that acts as sterol carriers and could supply *Phytophthora* species with sterols, these latter being sterol auxotrophs (124). *In vitro* binding assays provided first evidences that cryptogein is recognized by a putative plasma membrane receptor (125). Even if its molecular identity has not been reported so far, it is plausible to assume that the RLP ELR fulfills this role (120).

The cellular and molecular processes leading to the cryptogein-induced HR have been widely studied, mostly using tobacco cell suspensions. Cells undergoing cell death show a vacuole shrinkage within few hours (126). This vacuole volume loss has been functionally linked to fast and ample nitrate effluxes across the plasma membrane resulting from the activity of anion-permeable channels (126, 127). Accordingly, inhibition of these effluxes, as well as  $\text{Ca}^{2+}$  influxes from the extracellular space, suppressed or delayed cell death (128). A similar result was observed in cryptogein-treated tobacco cells in which the activity of protein kinases, including MAPK, has been suppressed (129). All together, these data highlighted that the machinery leading to cell death is a dynamic process requiring early signaling events. These latter also include the production of NO and ROS. More precisely, cryptogein triggers within minutes the activation of a plasma membrane NADPH oxidase (NtRBOHD) which produces  $\text{O}_2^-$  simultaneously dismutated into  $\text{H}_2\text{O}_2$  through the activity of superoxide dismutases (130). Interestingly, a coordinated action of ROS and NO has been highlighted (131). Indeed, the production of  $\text{H}_2\text{O}_2$  is a prerequisite for NO synthesis and functions as impairment of NtRBOHD expression compromises NO production as well as its involvement in cell death. In turn, NO negatively regulates the level of  $\text{H}_2\text{O}_2$  through the formation of peroxynitrite ( $\text{ONOO}^-$ ) resulting from the chemical combination between NO and  $\text{O}_2^-$ . The formation of  $\text{ONOO}^-$  might mitigate the effects of  $\text{H}_2\text{O}_2$  and provide a mean to control the intensity of cell death. The possibility that NO also mitigates  $\text{H}_2\text{O}_2$  production and the amplitude of HR through the inhibition of NtRBOHD by S-nitrosation, a NO-dependent post-translational protein

modification, has been reported in other plant-pathogens models (132). However, the occurrence of this mechanism in cryptogein-treated cells has not been confirmed (131).

Caspase-like activities have also been detected in plants during HR. If genes encoding true orthologs of caspases (cysteine dependent aspartate-directed proteases) are absent in the plant genomes, many proteases involved in HR have been identified such as metacaspases in the cytosol, vacuolar processing enzymes (VPEs) in the vacuole or saspase, cathepsin B or papain-like cysteine protease (PLCP-like Rcr3 or Pip1) in the apoplast (9). Interestingly, plant metacaspases are lysine- and arginine-specific, whereas caspases found in mammals are aspartate-specific, indicating a different substrate specificity of these plant enzymes. Based on their protein structure, the phylogenetic analysis of plant metacaspases indicated three major clades that can be divided into type I with, or without, a zinc finger motif in the N-terminus region, and type II harboring a linker region between the two subunits of 10 and 20 kDa of the caspase-like regulatory and catalytic domains (133). In Arabidopsis, the type I metacaspase AtMC1 promotes HR during biotic stresses whereas AtMC2 acts antagonistically by inhibiting plant cell death without any different pathogen dissemination in both *atmc1* and *atmc2* mutants (134). The type II metacaspase AtMC4 is a calcium-dependent cysteine protease which cleaves the PROPEP1 phyto-cytokine in order to release PEP1 in the apoplast, itself detected by the PEPR1 PRR in neighboring cells to amplify plant immune responses during the damage-triggered immunity (135). The recent resolution of the AtMC4 crystal structure highlights the inhibitory role of the large linker domain which blocks activation and substrate access to the catalytic domain (136). Concerning VPEs, they have been shown to exhibit similar enzymatic properties as the animal caspase 1 except that they are active in the vacuole (7). They possess an autocatalytic conversion of the inactive proprotein (pVPE) into the mature active mVPE (137). In tobacco plants infected by the tobacco mosaic virus (TMV), caspase-1 inhibitors or VPE gene silencing reduces the caspase-1-like activity associated to the rupture of the vacuolar membrane normally leading to the virus-induced HR (138). During plant immunity, bacterial harpin-induced cell death was compromised in *Nicotiana benthamiana* VPE-silenced plants (139) and inhibitors of caspase-1 delayed the HR cell death normally triggered in tobacco cells by the oomycete elicitor cryptogein (126). In Arabidopsis, a *vpe* null mutant lacking the four VPE genes ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -, and  $\delta$ -*vpe*) was unable to show any VPE or caspase-like 1 activity (140) and  $\gamma$ -*vpe* mutant was more susceptible to viral, bacterial or fungal infection (141). The extracellular proteases Pip1 and Rcr3 also actively participate to the perception of the fungal pathogen *C. fulvum* in tomato. *C. fulvum* secretes Avr2 into the apoplast which associates with Rcr3 and Pip1. The mentioned complexes perceived by Cf-2, a RLP, trigger HR and induce resistance to *C. fulvum* (142). Recently, the first proteolytic cascade has been discovered in plants where the extracellular immune protease proRcr3 is cleaved by the subtilase P69B in mature Rcr3 that interacts with Avr2 before that the molecular complex binds to the Cf-2

RLP (143). Interestingly, this P69B subtilase has been previously shown to be itself the target of the matrix metalloproteinases Sl2-MMP and Sl3-MMP (144, 145), suggesting that these MMP are initiator proteases whereas Rcr3 plays an effector role in this cascade, as shown for intracellular caspases in mammals.

## CELL DEATH REGULATIONS IN MAMMALS AND PLANTS

In host-pathogen interactions, the control of the regulated cell death is crucial for both partners. Host have to adapt their defense responses to contain pathogen development while avoiding their own lethal outcome. At the opposite, pathogens need to modulate the regulated cell death to ensure their infection cycle.

### Cross Regulation Mechanisms Between Immune Signaling Pathways

Organisms need to adapt their response as the infection evolves. Thus, many interplays and cross-regulation mechanisms exist between the different immune cell signaling pathways. The stimulation of one receptor can cause different responses including the activation of transcriptional programs or the engagement of cell death pathways, depending on the nature, the duration and the intensity of the stimuli. These responses can occur simultaneously or successively and cells have the ability to change the response very quickly. In animals, the interplay between TLR and NLR signaling pathways is illustrated by the activation of NLRP3-inflammasome in a two-step process. The first priming step involves the TLR-mediated, NF- $\kappa$ B-dependent expression of *NLRP3*. Then DAMPs or PAMPs can stimulate the NLRP3-inflammasome assembly and pyroptosis (76). Thus, NLRP3-inflammasome-mediated pyroptosis is only activated when the TLR-mediated immune response is not sufficient to neutralize pathogens. As illustrated **Figure 2**, TLR4 is able to trigger NF- $\kappa$ B-dependent pro-inflammatory response, IFN-response, necroptosis, or apoptosis. This implies the presence of accurate regulation mechanisms. In addition to promote the production of microbicidal molecules and pro-inflammatory mediators, TLR-mediated NF- $\kappa$ B activation induces the expression of several survival proteins such as cellular inhibitors of apoptosis (cIAPs) (146). cIAPs act as E3-ubiquitin ligases promoting poly-ubiquitination of RIP1. Therefore, they are required for the TLR-dependent activation of transcriptional programs while they inhibit RIP-dependent apoptotic and necroptotic pathways (18, 147). The presence of a second signal that neutralizes cIAP activity could convert the transcriptional signal to a cell death signal. It is interesting to note that some viruses such as baculovirus express proteins from IAP family (148) that block cell death of infected cells and allow viral propagation. The different cell death signaling pathways are also interconnected and have the ability to regulate each other [for review, see (75)]. Blocking apoptosis signaling pathway is generally a prerequisite for detecting necroptosis because the apoptotic caspase-8 can inhibit the activity of key components of the necroptosis

signaling pathway including RIP1 and RIP3 (84, 88). On the contrary, caspase-8 can activate the NLRP3-inflammasome (149) or directly cleave the caspase-1 leading to pyroptosis (150). Conversely, inflammasomes can connect caspase-8 to induce apoptosis (151). The necroptotic effector RIP3 is also able to cause NLRP3-inflammasome activation and pyroptosis via ROS production (152, 153).

Although less documented, such cross-regulations between immune receptor-mediated signaling pathways probably exist in plants. Mutations or overexpression of some plant immune receptors such as the RLK CERK1, the co-receptor BAK1, its closest homolog BKK1 (BAK1-like 1) or the RLP BIR2 (BAK1-interacting RLK 2) can trigger an enhanced cell death (154–157). This discovery suggests that a plant surveying system probably guards these immune receptors from inhibition by pathogen effectors to trigger HR (9, 158, 159).

### Modulation of Immune Signaling Pathways by Post-Translational Modifications

Molecular mechanisms that dictate the response to immune receptor stimulation are not completely understood and are subject of intense research. Because of their flexibility and speed of implementation, PTMs constitute a remarkable and effective process to modulate the intracellular signaling and to regulate the communication networks between cell transduction pathways.

In mammals, as reported above, the priming step required for the full activation of NLRP3-inflammasome has also been shown to involve some PTMs of NLRP3 such as phosphorylation (77) and de-ubiquitination (78). A nice example is given by RIP proteins (RIP1, RIP2, and RIP3) for which the recruitment into various multiprotein signaling platforms, the kinase activity and the ability to engage downstream signaling pathways is orchestrated by PTMs, mainly ubiquitination and phosphorylation (160). The serine/threonine kinase RIP1 is recruited to the TLR3 and TLR4-associated signaling complex (**Figure 2**) and RIP2 is associated with the cytosolic NLRs NOD1 and NOD2 (161) (**Figure 4**). When polyubiquitinated RIP1 and -2 function as a molecular scaffold. It promotes the recruitment and the activation of the kinase complexes IKK and TAB1/TAB2/TAK1 that promote a pro-survival and pro-inflammatory response (**Figure 2**) (146, 160, 161). On the other hand the non-degradative ubiquitination also completely inhibits RIP1 kinase activity that is essential for the assembly of secondary cytoplasmic cell death signaling platforms leading to apoptosis or necroptosis (18, 160). Of note, some viruses have developed strategies to counteract the death of infected cells by modulating RIP ubiquitination (162).

The plant immune responses are also finely regulated by PTMs of signaling proteins. The ubiquitin-proteasome system (UPS) plays an essential role in plant immunity. Among UPS components, E3 ubiquitin ligases have been particularly studied. Wang et al. (163) showed that the E3 ligase OsPUB15 interacts with the homodimerized PID2K, a transmembrane RLK, which confers rice resistance against *Magnaporthe oryzae*. Interestingly, the authors demonstrated that the overexpression of OsPUB15 led to an enhanced resistance against the pathogen, correlated with up-regulation of some defense genes, excessive accumulation of

ROS and plant cell death, suggesting that ubiquitination of PID2K could favor its activity. However, in this case, the observed lesions were so important that they conducted to the plant death. Another example of the importance of UPS in plant immunity is provided by studies investigating the function of the ATPase cell division cycle 48 (CDC48). CDC48 is a highly conserved chaperone-like protein from yeast to plants and animals [also named VCP (vasolin-containing protein) or p97 in mammals]. This protein catalyzes the disassembly of protein complexes and/or the extraction of ubiquitinated proteins from membranes or chromatin in order to deliver them to the proteasome. Therefore, it plays an important function in UPS and, more generally, proteostasis (164). Investigations of CDC48 function in plant immunity demonstrated that the tobacco CDC48 isoform rapidly accumulates in its hexameric active structure in tobacco cells exposed to cryptogein (165). A screening for its binding partners allowed to the identification of key regulators of the redox status, including cytosolic ascorbate peroxidase (cAPX) a pivotal enzyme for ROS removal (165, 166). In CDC48-overexpressing tobacco cells, the activity of cAPX was impaired, leading to severe decrease in the cell capacity to respond to oxidative stress (167). Accordingly, a faster and pronounced cell death was observed in those cells. Although speculative, the involvement of CDC48 in cell death could also be explained by its ability to promote the degradation of cell death repressors. In animals, several studies have reported a role for its ortholog p97 in viral spreading (poliovirus, herpes simplex virus, cytomegalovirus, or influenza virus) by regulating the cycle of viral replication in infected cells (168). However, the mechanisms and the relationship with immune receptor-induced cell death have not been clearly demonstrated.

Histone deacetylases (HDACs) of type 2 (HD2s) have also been identified as important regulators of the cryptogein-induced HR in tobacco. HD2s design a plant specific family of nuclear histone deacetylases (169). Two HD2s tobacco isoforms, NtHD2a and NtHD2b, were shown to undergo a fast phosphorylation in tobacco cells treated with cryptogein (170). This process was followed by a decrease both at the transcript and protein levels. Interestingly, silencing of *HD2* in cell suspensions or *in planta* led to a faster and amplified cell death manifested by exacerbated HR symptoms. Based on these data, it has been proposed that NtHD2a and NtHD2b act as constitutive negative regulators of HR by modulating the expression or activity of HR regulators or effectors which identities remain to be discovered. In a similar manner, a role for histone deacetylases in the acquisition of cell resistance phenotype has also been observed in mammal macrophages. An upregulation of HDAC8 has been correlated with the acquisition of a resistance phenotype to anthrax lethal toxin (LeTx). HDAC inhibitors sensitized cells to LeTx-induced pyroptosis while inversely upregulation of HDAC8 prevents LeTx-induced cell death (171).

## Regulation of Immune Signaling Pathways by miRNAs

As NLRs are often tightly linked to strong immune process including cell death, these proteins need to be finely tuned to

avoid any deleterious impact on the plant fitness in the absence of pathogen. In accordance, animals and plants possess several regulation processes among which are miRNAs. These regulatory elements function similarly in animals and plants and are in the same way excised from long primary miRNA transcripts by Dicer or Dicer-like enzymes (such as DCL1) before being loaded into an RNA-induced silencing complex (RISC) and to repress the gene by DNA methylation or by cleavage, destabilization or translational inhibition of its messenger RNA (mRNA) (172). These miRNAs are involved in the regulation of different biological processes, and particularly studied in plants in development and defense contexts. In addition to interact with exogenous nucleic acid and defend plant cells against viral pathogens (173), some host miRNAs also target their own transcripts encoding immune receptors such as the NLR proteins (174–177). This is believed to allow them to control their immune reactions in the absence of pathogen and therefore to avoid any unnecessary waste of energy. In addition, since some bacterial and viral pathogens infect their host by blocking its miRNA interference process, the decrease in these miRNAs would also, at the same time, lead to an accumulation of the previously repressed immune receptors, ultimately leading to a potentiation of defenses (174, 176, 178).

## Regulation of Plant Immunity by Phytohormones

Plant immunity is also regulated by a complex network of phytohormones, which integrate signals from biotic and abiotic stresses in order to finely tune the spatio-temporal expression of the different immune responses. Among them, salicylic acid (SA) and jasmonic acid (JA) play major roles and their antagonism is believed to specifically adapt the plant immunity to biotrophic or necrotrophic pathogens, respectively (179). SA has been shown to positively regulate the HR cell death during interaction with biotrophic pathogens whereas JA seems to be more important for the plant resistance against invading necrotrophs or insects. Actually, low level of SA downregulates HR cell death whereas high level of SA triggers plant cell death (180). Moreover, this hormonal balance between SA and JA seems to finely regulate plant cell death locally as SA accumulates into the HR-related cell death zone whereas JA level increases in the surrounding area to act antagonistically with the SA-pathway (181).

## Pathogens Interfere With Cell Death Signaling Pathways to Their Own Benefits

According to their infection cycle, some pathogens also interfere with regulated cell death signaling pathways to their own benefits (182). So, it is generally accepted that viruses and biotrophic pathogens whose survival is fully dependent on the intracellular machinery of host cells can delay or inhibit cell death contrary to necrotrophic ones which take nutrients from dead cells. However, the classification does not always reflect the complexity of the pathogen cycle infection. The strategies used by pathogens to evade host defenses in order to favor their multiplication and spread have been widely studied in animal cells. Many viruses or bacteria deliver anti-apoptotic proteins

**TABLE 1 |** Main signaling pathways driving cell death or transcriptional reprogramming in response to activation of membrane-associated or intracellular immune receptors in animals and plants.

		Animals	Plants
Membrane-associated receptors	Receptors	TLRs, CLRs	RLKs, RLPs
	Signal transduction domain	homotypic interacting domains	kinase domains
	Mechanisms of signal transduction	assembly of multiprotein complexes in which executors are activated by proximity	PRR oligomerization, kinase activation & trans-phosphorylation
	Signaling pathways leading to transcriptional reprogramming	MAPK, NF- $\kappa$ B or IRFs (MyD88, TRIF or RIP1-dependent)	MAPKs and phosphorylation-dependent kinases ROS/NO production $\text{Ca}^{2+}$ influx transcription factors activation Phyto-cytokines secretion
Intracellular receptors	Cell Death	Necroptosis Apoptosis Signaling platforms: Necrosome Ripoptosome Key executors: RIP3, RIP1, pore-forming Caspases cascade MLKL (RIP1 dependent (caspase-8, -3, -7) or independent) associated features: ROS, membrane permeabilisation Silent form of cell death	Hypersensitive Response (HR)* Ions fluxes across the PM Production of NO and ROS Inhibition/degradation of cell death repressors (HD2s...) Proteases activation (metacaspases in the cytosol, VPEs in the vacuole) Phyto-cytokines secretion Chromatin condensation, nucleus disruption, vacuolar collapse
	Receptors	NLRs, RLRs, ALRs	NLRs
	Signal transduction	Homotypic interacting domains	Proteins interaction
	Mechanisms of signaling activation	Assembly of multiprotein complexes in which executors are activated by proximity	Effectors detection (direct) or proteins modification (indirect)
Intracellular receptors	Signaling pathways leading to transcriptional reprogramming	NODosome assembly leading to MAPK & NF- $\kappa$ B	Unknown (direct activation of transcription factors by NLRs or linked to pore-forming structures in the PM?)
	Cell Death	Main: Pyroptose Alternative: Necroptosis	Hypersensitive response (HR)
	Signaling pathways/platforms leading to cell death	Inflammasome	Resistosome, other NLR complexes
	Key executors of cell death	Caspase 1, pore-forming Gasdermin D	Unknown (pore-forming $\text{Ca}^{2+}$ -dependent activation of proteolytic cascade?)
	Associated-features, regulations	IL-1 $\beta$ , IL-18 release, membrane permeabilisation, ionic unbalance, ROS production	ROS & NO production, phytohormones accumulation, membranes permeabilization, release of active proteases and phyto-cytokines

ALR, AIM2 (absent in melanoma 2)-like receptors; AtEDS1, *Arabidopsis thaliana* enhanced disease susceptibility 1; ANRG1, *Arabidopsis thaliana* N-requirement gene 1; AtSAG101, *Arabidopsis thaliana* senescence-associated gene101; CLR, C-type lectin receptors; HD2, Histone deacetylase; HR, Hypersensitive response; IL, Interleukin; IRF, Interferon-regulatory factors; MAPK, Mitogen-activated protein kinase; MLKL, Mixed lineage kinase domain-like; MyD88, myeloid differentiation factor 88; NLR, Nucleotide-binding and oligomerization domain (NOD)-Like Receptor [animals] or Nucleotide-Binding Domain (NBD)-containing LRRs [plants]; NO, Nitric oxide; PLCP, papain-like cysteine proteases; PM, plasma membrane; RLK, Receptor-Like Kinase; RIP, receptor-interacting kinase; RLP, Receptor-Like Protein (contains a short cytoplasmic domain devoid of kinase activity); RLR, RIG-I-like receptors; ROS, Reactive oxygen species; TLRs, Toll-like receptors; TRIF, TIR-domain-containing adaptor-inducing IFN- $\beta$ ; VPE, Vacuolar processing enzyme.

\*HR cell death induced by membrane-associated receptors is an exceptional outcome.

that directly block apoptotic, necroptotic and/or pyroptotic machineries. For example, caspase-1 and/or caspase-8 involved in pyroptosis and apoptosis (**Figures 2 and 4**), respectively, can be directly inhibited by serpin (serine proteinase inhibitor)

homologs encoded by poxvirus, the influenza virus protein NS1, the vaccinia virus protein B15N or effectors molecules secreted by *Pseudomonas aeruginosa* or *Yersinia* spp. (183). The necroptosis executor RIP3 can be sequestered by MLKL

homologs produced by poxviruses (184). RIP1 involved in TLR3 and 4 signaling pathways (**Figure 4**) is also frequently found as a target. Virus or bacteria effectors can modulate the PTM of RIP1 such as phosphorylation or ubiquitination, thereby affecting its kinase activity and its cell death-promoting ability (apoptosis or necroptosis). Thus, the latent membrane protein 1 (LMP1) from Epstein-Barr virus (EBV) and op-IAP produced by baculovirus can promote the poly-ubiquitination of RIP1 (162, 185) and the *Yersinia pestis* effector YopJ/P modulates the phosphorylation status of RIP1 by targeting the kinases TAK1 and IKK or MK2 (186). Pathogens can bypass host defense mechanisms by blocking signaling pathways just downstream of the pathogen recognition-receptor. This is illustrated by the enterohemorrhagic bacteria type 3 that produces a protease that cleaves the RHIM domain owned by RIP1, RIP3, TRIF, the adaptor proteins involved in TLR3 and TRL4-mediated signaling pathways and the cytosolic DNA sensor DAI (187). On the other hand, RHIM-homotypic interaction that mediates the assembly of the necosome, as well as the recruitment of RIPs to sensors (**Figure 4**) can be affected by the presence of viral RHIM-containing proteins such as the proteins ICP6 and ICP10 produced by Herpes simplex virus (188), vaccinia virus innate immune evasion protein E3 (189), or vIRA encoded by the murine cytomegalovirus (190).

What is the situation in plants? Biotrophic or hemibiotrophic phytopathogens have to keep plant cells alive to ensure their infection cycle. In this way, they secrete many effectors which target receptors or key signaling components to suppress host immunity triggered by their own invading patterns (191, 192). As examples, RipAY produced by *Ralstonia solanacearum* inhibits SA-dependent defense responses and HR induced by the effector RipE1 in *Nicotiana benthamiana* (193), and RipAK suppresses catalase activity and HR of *Nicotiana tabacum* (194). *Phytophthora infestans* AVR3a targets the E3 ligase CMG1 and suppresses HR induced by the elicitor INF1 in *Nicotiana benthamiana* (195, 196). In addition, it has been shown that *P. infestans* PexRD2 interacts with the KD of MAPKKc, a positive regulator of cell death, increasing the susceptibility of *Nicotiana benthamiana* to this pathogen (197).

Inversely, necrotrophic phytopathogens favor plant cell death to ensure the infection spreading. For example, the broad host range necrotrophic plant pathogen *Sclerotinia sclerotiorum* secretes oxalic acid (OA) which is considered as a key molecule for its pathogenesis. It has been shown that OA has opposite roles: i) to suppress host oxidative burst and then HR at early state of infection allowing the establishment of the pathogen and ii) to activate plant cell death, via ROS production, facilitating disease development (198, 199). Besides OA secretion, *Sclerotinia sclerotiorum* produces several effectors or toxins inducing plant cell death (200). For some of them, secreted in apoplast such as SsNE1-SsNE5, the death-inducing signal is mediated by the BAK1/SOBIR1 receptor complex (200). The involvement of these RLK was already highlighted for the necrotizing activity of the xylanase BcXYG1 secreted by *Botrytis cinerea* (201). Others would be internalized in host cells as the “effector-like” protein SsSSVP1 which interacts with QCR8, a subunit of plant cytochrome complex in mitochondrial

respiratory chain (202). This leads to the loss of function of QCR8 and to plant cell death induction. Actually, numerous phytopathogens secrete several toxins or effectors to induce cell death. Around 180 apoplastic cell death-inducing proteins (CDIPs) have been identified and for some of them, the associated receptors are known (203, 204). Other toxins are internalized in host cells and interact in some case with NB-LRR (182). Thus, the *Arabidopsis* susceptibility to *Cochliobolus victoriae* is due to the interaction between the secreted toxin victorin with the NB-LRR LOV1. In this case, the pathogen co-opts HR to facilitate its development (205).

A beneficial effect of cell death for pathogens to ensure infection cycle has also been described in mammals. It is well illustrated by the human immunodeficiency virus (HIV) that hijacks the immune surveillance by promoting the pyroptosis of immune cells (CD4<sup>+</sup> lymphocytes) (206).

## CONCLUDING REMARKS

Although number of questions still remain to address, the intense research of the scientific communities on innate immunity in mammals during the three last decades and recent technological advances gave rise to a relative clear scheme of the cell death-signaling pathways activated in response to immune receptors (**Table 1**). By comparison, the understanding of the immune receptor-induced cell death signaling pathways remains incipient in plants although the use of *Arabidopsis* mutants allowed the identification of signaling molecules and regulators of HR (207–209). Up to date, more than 600 RLKs and 100 NLRs have been inventoried but only few have been characterized and many have not even been identified yet. The abundance of immune receptors, the different processes used for their activation as well as the diversity of cellular models make the decoding of cell death signaling pathways very difficult. The generic name HR does not reflect the complexity of signaling pathways and, as in mammals, recognition of PAMPs, DAMPs or effectors does probably not lead to the engagement of one unique cell death response but likely activates different cell death-signaling pathways with specific features and outcomes. The cell death signal also likely depends on the cell type and plant species.

The plant immune response is associated with different biochemical modifications and cellular signals that include MAPK activation, oxidative and nitrosative bursts, calcium fluxes, phytohormones production, protease activation, and transcriptional reprogramming (5). Studies analyzing their involvement in immune receptor-induced cell death reported controversial results and their direct role in transducing cell death signal is still debated. A closer characterization of the spatial and temporal aspects of these cellular events could probably provide a better view of their involvement. By putting animal models into perspective, we can hypothesize that the stimulation of plant membrane PRRs or NLRs have the ability to engage (i) signaling pathways leading to transcriptional reprogramming responsible for phytohormones production

and expression of defense genes, and (ii) a cell death signaling pathway that can culminate into ions imbalance and in the rupture of plasma membrane, both regulated by interplays and cross-regulation mechanisms.

The analysis of plant NLRs structure showed that the signal transduction domains belong to conserved homotypic interacting domain family. This suggests that mechanisms of activation involve the assembly of multiprotein platforms. A range of evidences indeed suggests that plant NLRs form signaling platforms to promote cell death (39, 96–99, 204, 210), as observed for mammals NLRs. The recent works of Wang and colleagues (96, 210) highlighting the presence of a resistosome that can translocate into plasma membrane to probably form pore-like structures provided very important elements into understanding the plant NLR-mediated cell death signaling. It is interesting to note that the lumen of the funnel-shape structure found in the resistosome has negative electrostatic potentials given by two negatively charged glutamic acid residues (96). Such negatively charged glutamate residue is thought to be critical for anion selectivity in several human  $\text{Ca}^{2+}$  voltage-dependent channels (211, 212). It is thus tempting to speculate that this selectivity for cations could be associated with a death process. The similarities between the ZAR1-resistosome and NLR inflammasomes as discussed in the recent review of Xiong et al. (213) suggest that the NLR-mediated cell death signaling pathway could be a conserved process.

While the role and mechanisms of activation of proteases (i.e., caspases-1, -8, and -3) in PRR-induced signaling pathways start to be well characterized in mammals, the activation mechanisms of plant proteases and their importance in the immune-receptor-induced HR remain important questions to address. Indeed, our knowledge about the proteolytic cascades involved in HR cell death is really scarce and fragmentary. Of interest, AtMC4 has been recently shown to be activated by  $\text{Ca}^{2+}$  (136), suggesting a link between calcium influx, metacaspase activation and release of mature phyto cytokines. However, many things remain to discover such as the different proteolytic cascades involved, their initiation and regulation during plant HR.

## FUTURE APPLICATIONS FOR PLANT PROTECTION

In *Arabidopsis*, the screening of vast mutant collections and naturally occurring ecotypes, as well as forward genetic approaches, has led to the successful identification of novel immune receptors involved in HR cell death. In crops, analyzing genomic variations within different cultivars but also the “wild” relative species and their introgression lines allowed to map the Quantitative Trait Loci (QTLs) related to disease resistance. Although QTLs will mostly carry *R*-genes, they may also contain PRR genes (encoding RLKs or RLPs). In a scientific point of view, it is interesting to note that PRRs can be successfully transferred from one plant species to another to provide a novel source of resistance. A very effective

demonstration was achieved in tomato (from the Solanaceae family), where the transfer of the EFR RLK receptor (from the Brassicaceae family) led to a great resistance of plants against a wide range of different bacterial pathogens (214). Different studies also showed that the ectodomain and KDs from distinct PRRs can be combined in order to form chimera receptors with preserved signal transduction. Such a chimeric receptor was built from the chitin-binding ectodomain of OsCEBiP and the KD of Xa21. This chimera receptor was able to initiate HR in rice thus conferring to the plant a highly improved resistance to the fungus *Magnaporthe oryzae*. This strategy thus represents an interest for practical use in disease resistance engineering (215).

Analysis of the polymorphism occurring in plant immune receptors or cell death regulators in different cultivars or species could lead to the identification of more efficient variants. As an alternative to the transgenic approach, conventional breeding can be assisted by the use of molecular markers that help to deliver the desired gene into the crop, pyramiding it with other genes important for the plant resistance such as *R*-genes.

All over, the immune receptor-based breeding, the transfer and creation of novel chimeric PRRs might be applicable as an alternative in agriculture disease and pest management, as a “tailored immune-receptor therapy” that might provide more durable and broader resistance when associated with *R*-genes.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

TR, M-CH, DW, AZ, LD, and BP contributed equally to the writing of this review. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

## FUNDING

TR, M-CH, and BP are financially supported by Agence Nationale de la Recherche (ANR) and Agence Française pour la Biodiversité (AFB) (“ChitoProtect” project, grant # ANR-19-ECOM-0008) and Institut Carnot Plant2Pro (“VitiLYKs” project, grant # C4520). TR, M-CH, DW, AZ, LD, and BP have been supported by the Ministère de l’Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l’Innovation (MESRI). DW is supported by the MESRI, Investissements d’Avenir program, project “Initiatives Science Innovation Territoire Economie en Bourgogne-Franche-Comté” (“Structure, Function and Roles of Nitric Oxide Synthases in Algal Responses to Environmental Stresses (NOISELESS)” project, grant # RA18041.AEC.IS) and the ANR (“Algae-Nitric Oxide Synthases” project, grant # ANR-18-CE20-0022-02). LD is supported by grants from “La Ligue contre le cancer” Comité de la Côte d’Or, the “Conseil Régional de Bourgogne-Franche-Comté”, the ANR, (“Investissements d’Avenir” program, grant # ANR-11-LABX-0021) and the European Union program FEDER.

## REFERENCES

- Klessig DF, Choi HW, Dempsey DA. Systemic Acquired Resistance and Salicylic Acid: Past, Present, and Future. *Mol Plant Microbe Interact* (2018) 31(9):871–88. doi: 10.1094/MPMI-03-18-0067-CR
- Amarante-Mendes GP, Adjeman S, Branco LM, Zanetti LC, Weinlich R, Bortoluci KR. Pattern Recognition Receptors and the Host Cell Death Molecular Machinery. *Front Immunol* (2018) 9:2379. doi: 10.3389/fimmu.2018.02379
- Galluzzi L, Vitale I, Aaronson SA, Abrams JM, Adam D, Agostinis P, et al. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ* (2018) 25:486–541. doi: 10.1038/s41418-018-0102-y
- Doran AC, Yurdagul A Jr., Tabas I. Efferocytosis in health and disease. *Nat Rev Immunol* (2020) 20(4):254–67. doi: 10.1038/s41577-019-0240-6
- Locato V, De Gara L. Programmed Cell Death in Plants: An Overview. *Methods Mol Biol* (2018) 1743:1–8. doi: 10.1007/978-1-4939-7668-3\_1
- Lord CE, Gunawardena AH. Programmed cell death in *C. elegans*, mammals and plants. *Eur J Cell Biol* (2012) 91(8):603–13. doi: 10.1016/j.ejcb.2012.02.002
- Hatsugai N, Yamada K, Goto-Yamada S, Hara-Nishimura I. Vacuolar processing enzyme in plant programmed cell death. *Front Plant Sci* (2015) 6:234. doi: 10.3389/fpls.2015.00234
- Balakireva AV, Zamyanin AA. Cutting Out the Gaps Between Proteases and Programmed Cell Death. *Front Plant Sci* (2019) 10:704. doi: 10.3389/fpls.2019.00704
- Pitsilis E, Phukan UJ, Coll NS. Cell Death in Plant Immunity. *Cold Spring Harb Perspect Biol* (2020) 12(6):a036483. doi: 10.1101/cshperspect.a036483
- Medzhitov R, Janeway CA Jr. Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell* (1997) 91(3):295–8. doi: 10.1016/s0092-8674(00)80412-2
- Song WY, Wang GL, Chen LL, Kim HS, Pi LY, Holsten T, et al. A receptor kinase-like protein encoded by the rice disease resistance gene, Xa21. *Science* (1995) 270(5243):1804–6. doi: 10.1126/science.270.5243.1804
- Flor H. Current status of the gene-for-gene concept. *Annu Rev Phytopathol* (1971) 9:275–96. doi: 10.1146/annurev.py.09.090171.001423
- Jones JDG, Dangl JL. The plant immune system. *Nature* (2006) 444 (7117):323–9. doi: 10.1038/nature05286
- Cook DE, Mesarich CH, Thomma BP. Understanding plant immunity as a surveillance system to detect invasion. *Annu Rev Phytopathol* (2015) 53:541–63. doi: 10.1146/annurev-phyto-080614-120114
- Gust AA, Pruitt R, Nürnberg T. Sensing Danger: Key to Activating Plant Immunity. *Trends Plant Sci* (2017) 22(9):779–91. doi: 10.1016/j.tplants.2017.07.005
- Kawasaki T, Kawai T. Toll-like receptor signaling pathways. *Front Immunol* (2014) 5:461. doi: 10.3389/fimmu.2014.00461
- Salau B, Coste I, Rissoan MC, Lebecque SJ, Renno T. TLR3 can directly trigger apoptosis in human cancer cells. *J Immunol* (2006) 176(8):4894–901. doi: 10.4049/jimmunol.176.8.4894
- Lawlor KE, Feltham R, Yabal M, Conos SA, Chen KW, Ziehe S, et al. XIAP Loss Triggers RIPK3- and Caspase-8-Driven IL-1beta Activation and Cell Death as a Consequence of TLR-MyD88-Induced cIAP1-TRAF2 Degradation. *Cell Rep* (2017) 20(3):668–82. doi: 10.1016/j.celrep.2017.06.073
- Foektistova M, Geserick P, Kellert B, Dimitrova DP, Langlais C, Hupe M, et al. cIAPs block Ripoptosome formation, a RIP1/caspase-8 containing intracellular cell death complex differentially regulated by cFLIP isoforms. *Mol Cell* (2011) 43(3):449–63. doi: 10.1016/j.molcel.2011.06.011
- He S, Liang Y, Shao F, Wang X. Toll-like receptors activate programmed necrosis in macrophages through a receptor-interacting kinase-3-mediated pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* (2011) 108(50):20054–9. doi: 10.1073/pnas.1116302108
- Estornes Y, Toscano F, Virard F, Jacquemin G, Pierrot A, Vanbervliet B, et al. dsRNA induces apoptosis through an atypical death complex associating TLR3 to caspase-8. *Cell Death Differ* (2012) 19(9):1482–94. doi: 10.1038/cdd.2012.22
- Boller T, Felix G. A Renaissance of Elicitors: Perception of Microbe-Associated Molecular Patterns and Danger Signals by Pattern-Recognition Receptors. *Annu Rev Plant Biol* (2009) 60:379–406. doi: 10.1146/annurev.arplant.57.032905.105346
- Speakman EA, Dambuza IM, Salazar F, Brown GD. T Cell Antifungal Immunity and the Role of C-Type Lectin Receptors. *Trends Immunol* (2020) 41(1):61–76. doi: 10.1016/j.it.2019.11.007
- Eriksson M, Johannsen T, von Smolinski D, Gruber AD, Seeger PH, Lepenies B. The C-Type Lectin Receptor SIGNR3 Binds to Fungi Present in Commensal Microbiota and Influences Immune Regulation in Experimental Colitis. *Front Immunol* (2013) 4:196. doi: 10.3389/fimmu.2013.00196
- Martinez-López M, Iborra S, Conde-Garrosa R, Mastrangelo A, Danne C, Mann ER, et al. Microbiota Sensing by Minicle-Syk Axis in Dendritic Cells Regulates Interleukin-17 and -22 Production and Promotes Intestinal Barrier Integrity. *Immunity* (2019) 50(2):446–61.e9. doi: 10.1016/j.jimmuni.2018.12.020
- Albert I, Hua C, Nurnberger T, Pruitt RN, Zhang L. Surface Sensor Systems in Plant Immunity. *Plant Physiol* (2020) 182(4):1582–96. doi: 10.1104/pp.19.01299
- Trouvelot S, Hélio MC, Poinsot B, Gauthier A, Paris F, Guillier C, et al. Carbohydrates in plant immunity and plant protection: roles and potential application as foliar sprays. *Front Plant Sci* (2014) 5:592. doi: 10.3389/fpls.2014.00592
- Claverie J, Balacey S, Lemaitre-Guillier C, Brûlé D, Chiltz A, Granet L, et al. The Cell Wall-Derived Xyloglucan Is a New DAMP Triggering Plant Immunity in *Vitis vinifera* and *Arabidopsis thaliana*. *Front Plant Sci* (2018) 28(9):1725. doi: 10.3389/fpls.2018.01725
- Gomez-Gomez L, Felix G, Boller T. A single locus determines sensitivity to bacterial flagellin in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* (1999) 18(3):277–84. doi: 10.1046/j.1365-313X.1999.00451.x
- Felix G, Duran JD, Volko S, Boller T. Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. *Plant J* (1999) 18 (3):265–76. doi: 10.1046/j.1365-313X.1999.00265.x
- Miya A, Albert P, Shinya T, Desaki Y, Ichimura K, Shirasu K, et al. CERK1, a LysM receptor kinase, is essential for chitin elicitor signaling in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* (2007) 104(49):19613–8. doi: 10.1073/pnas.0705147104
- Shimizu T, Nakano T, Takamizawa D, Desaki Y, Ishii-Minami N, Nishizawa Y, et al. Two LysM receptor molecules, CEBP and OsCERK1, cooperatively regulate chitin elicitor signaling in rice. *Plant J* (2010) 64(2):204–14. doi: 10.1111/j.1365-313X.2010.04324.x
- Cao Y, Liang Y, Tanaka K, Nguyen CT, Jedrzejczak RP, Joachimiak A, et al. The kinase LYK5 is a major chitin receptor in *Arabidopsis* and forms a chitin-induced complex with related kinase CERK1. *Elife* (2014) 3:3766. doi: 10.7554/eLife.03766
- Xue DX, Li CL, Xie ZP, Staehelin C. LYK4 is a component of a tripartite chitin receptor complex in *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot* (2019) 70 (19):5507–16. doi: 10.1093/jxb/erz313
- Willmann R, Lajunen H, Erbs G, Newman M, Kolb D, Tsuda K, et al. *Arabidopsis* lysin-motif proteins LYM1 LYM3 CERK1 mediate bacterial peptidoglycan sensing and immunity to bacterial infection. *Proc Natl Acad Sci USA* (2011) 108(49):19824–9. doi: 10.1073/pnas.1112862108
- Brutus A, Sicilia F, Macone A, Cervone F, De Lorenzo G. A domain swap approach reveals a role of the plant wall-associated kinase 1 (WAK1) as a receptor of oligogalacturonides. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2010) 107 (20):9452–7. doi: 10.1073/pnas.1000675107
- Kelloniemi J, Trouvelot S, Hélio MC, Simon A, Dalmais B, Frettinger P, et al. Analysis of the molecular dialogue between gray mold (*Botrytis cinerea*) and grapevine (*Vitis vinifera*) reveals a clear shift in defense mechanisms during berry ripening. *Mol Plant Microbe Interact* (2015) 28 (11):1167–80. doi: 10.1094/MPMI-02-15-0039-R
- Choi J, Tanaka K, Cao Y, Qi Y, Qiu J, Liang Y, et al. Identification of a plant receptor for extracellular ATP. *Science* (2014) 343(6168):290–4. doi: 10.1126/science.343.6168.290
- Wang C, Zhou M, Zhang X, Yao J, Zhang Y, Mou Z. A lectin receptor kinase as a potential sensor for extracellular nicotinamide adenine dinucleotide in. *Elife* (2017) 19(6):e25474. doi: 10.7554/eLife.25474
- Kim YK, Shin JS, Nahm MH. NOD-Like Receptors in Infection, Immunity, and Diseases. *Yonsei Med J* (2016) 57(1):5–14. doi: 10.3349/ymj.2016.57.1.5

41. Urbach JM, Ausubel FM. The NBS-LRR architectures of plant R-proteins and metazoan NLRs evolved in independent events. *Proc Natl Acad Sci USA* (2017) 114(5):1063–8. doi: 10.1073/pnas.1619730114
42. Jones JD, Vance RE, Dangl JL. Intracellular innate immune surveillance devices in plants and animals. *Science* (2016) 354(6316):aaf6395. doi: 10.1126/science.aaf6395
43. Baggs E, Dagdas G, Krasileva KV. NLR diversity, helpers and integrated domains: making sense of the NLR IDentity. *Curr Opin Plant Biol* (2017) 38:59–67. doi: 10.1016/j.pbi.2017.04.012
44. Bernoux M, Burdett H, Williams SJ, Zhang X, Chen C, Newell K, et al. Comparative Analysis of the Flax Immune Receptors L6 and L7 Suggests an Equilibrium-Based Switch Activation Model. *Plant Cell* (2016) 28(1):146–59. doi: 10.1105/tpc.15.00303
45. Monteiro F, Nishimura MT. Structural, Functional, and Genomic Diversity of Plant NLR Proteins: An Evolved Resource for Rational Engineering of Plant Immunity. *Annu Rev Phytopathol* (2018) 56:243–67. doi: 10.1146/annurev-phyto-080417-045817
46. Hu Z, Yan C, Liu P, Huang Z, Ma R, Zhang C, et al. Crystal structure of NLRC4 reveals its autoinhibition mechanism. *Science* (2013) 341(6142):172–5. doi: 10.1126/science.1236381
47. Cesari S, Kanzaki H, Fujiwara T, Bernoux M, Chalvon V, Kawano Y, et al. The NB-LRR proteins RGA4 and RGA5 interact functionally and physically to confer disease resistance. *EMBO J* (2014) 33(17):1941–59. doi: 10.15252/embj.201487923
48. Shao ZQ, Wang B, Chen JQ. Tracking ancestral lineages and recent expansions of NBS-LRR genes in angiosperms. *Plant Signal Behav* (2016) 11(7):e1197470. doi: 10.1080/15592324.2016.1197470
49. Munch D, Gupta V, Bachmann A, Busch W, Kelly S, Mun T, et al. The Brassicaceae Family Displays Divergent, Shoot-Skewed NLR Resistance Gene Expression. *Plant Physiol* (2018) 176(2):1598–609. doi: 10.1104/pp.17.01606
50. Yue JX, Meyers BC, Chen JQ, Tian D, Yang S. Tracing the origin and evolutionary history of plant nucleotide-binding site-leucine-rich repeat (NBS-LRR) genes. *New Phytol* (2012) 193(4):1049–63. doi: 10.1111/j.1469-8137.2011.04006.x
51. Boutrot F, Segonzac C, Chang K, Qiao H, Ecker J, Zipfel C, et al. Direct transcriptional control of the *Arabidopsis* immune receptor FLS2 by the ethylene-dependent transcription factors EIN3 and EIL1. *Proc Natl Acad Sci USA* (2010) 107(32):14502–7. doi: 10.1073/pnas.1003347107
52. Ausubel FM. Are innate immune signaling pathways in plants and animals conserved? *Nat Immunol* (2005) 6(10):973–9. doi: 10.1038/ni1253
53. DeYoung BJ, Qi D, Kim SH, Burke TP, Innes RW. Activation of a plant nucleotide binding-leucine rich repeat disease resistance protein by a modified self protein. *Cell Microbiol* (2012) 14(7):1071–84. doi: 10.1111/j.1462-5822.2012.01779.x
54. Liu J, Elmore JM, Lin ZJ, Coaker G. A receptor-like cytoplasmic kinase phosphorylates the host target RIN4, leading to the activation of a plant innate immune receptor. *Cell Host Microbe* (2011) 9(2):137–46. doi: 10.1016/j.chom.2011.01.010
55. Le Roux C, Huet G, Jauneau A, Camborde L, Trémousaygue D, Kraut A, et al. A receptor pair with an integrated decoy converts pathogen disabling of transcription factors to immunity. *Cell* (2015) 161(5):1074–88. doi: 10.1016/j.cell.2015.04.025
56. Wang G, Roux B, Feng F, Guy E, Li L, Li N, et al. The Decoy Substrate of a Pathogen Effector and a Pseudokinase Specify Pathogen-Induced Modified-Self Recognition and Immunity in Plants. *Cell Host Microbe* (2015) 18(3):285–95. doi: 10.1016/j.chom.2015.08.004
57. Bendahmane A, Farnham G, Moffett P, Baulcombe DC. Constitutive gain-of-function mutants in a nucleotide binding site-leucine rich repeat protein encoded at the Rx locus of potato. *Plant J* (2002) 32(2):195–204. doi: 10.1046/j.1365-313x.2002.01413.x
58. Tameling WII, Vossen JH, Albrecht M, Lengauer T, Berden JA, Haring MA, et al. Mutations in the NB-ARC domain of I-2 that impair ATP hydrolysis cause autoactivation. *Plant Physiol* (2006) 140(4):1233–45. doi: 10.1104/pp.105.073510
59. Stirnweis D, Milani SD, Brunner S, Herren G, Buchmann G, Peditto D, et al. Suppression among alleles encoding nucleotide-binding-leucine-rich repeat resistance proteins interferes with resistance in F1 hybrid and allele-pyramided wheat plants. *Plant J* (2014) 79(6):893–903. doi: 10.1111/tpj.12592
60. Chae E, Bomblies K, Kim ST, Karelina D, Zaidem M, Ossowski S, et al. Species-wide genetic incompatibility analysis identifies immune genes as hot spots of deleterious epistasis. *Cell* (2014) 159(6):1341–51. doi: 10.1016/j.cell.2014.10.049
61. Alcázar R, von Reth M, Bautista J, Chae E, Weigel D, Koornneef M, et al. Analysis of a plant complex resistance gene locus underlying immune-related hybrid incompatibility and its occurrence in nature. *PloS Genet* (2014) 10(12):e1004848. doi: 10.1371/journal.pgen.1004848
62. Todesco M, Kim ST, Chae E, Bomblies K, Zaidem M, Smith LM, et al. Activation of the *Arabidopsis thaliana* immune system by combinations of common ACD6 alleles. *PloS Genet* (2014) 10(7):e1004459. doi: 10.1371/journal.pgen.1004459
63. Zheng D, Liwinski T, Elinav E. Inflammasome activation and regulation: toward a better understanding of complex mechanisms. *Cell Discovery* (2020) 6:36. doi: 10.1038/s41421-020-0167-x
64. Platnick JM, Muruve DA. NOD-like receptors and inflammasomes: A review of their canonical and non-canonical signaling pathways. *Arch Biochem Biophys* (2019) 670:4–14. doi: 10.1016/j.abb.2019.02.008
65. Damgaard RB, Nachbur U, Yabal M, Wong WW, Fiil BK, Kastirr M, et al. The ubiquitin ligase XIAP recruits LUBAC for NOD2 signaling in inflammation and innate immunity. *Mol Cell* (2012) 46(6):746–58. doi: 10.1016/j.molcel.2012.04.014
66. Hrdinka M, Fiil BK, Zucca M, Leske D, Bagola K, Yabal M, et al. CYLD Limits Lys63- and Met1-Linked Ubiquitin at Receptor Complexes to Regulate Innate Immune Signaling. *Cell Rep* (2016) 14(12):2846–58. doi: 10.1016/j.celrep.2016.02.062
67. Shi J, Zhao Y, Wang K, Shi X, Wang Y, Huang H, et al. Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death. *Nature* (2015) 526(7575):660–5. doi: 10.1038/nature15514
68. Liu X, Zhang Z, Ruan J, Pan Y, Magupalli VG, Wu H, et al. Inflammasome-activated gasdermin D causes pyroptosis by forming membrane pores. *Nature* (2016) 535(7610):153–8. doi: 10.1038/nature18629
69. Vigano E, Diamond CE, Spreafico R, Balachander A, Sobota RM, Mortellaro A. Human caspase-4 and caspase-5 regulate the one-step non-canonical inflammasome activation in monocytes. *Nat Commun* (2015) 6:8761. doi: 10.1038/ncomms9761
70. Wright JA, Bryant CE. The killer protein Gasdermin D. *Cell Death Differ* (2016) 23(12):1897–8. doi: 10.1038/cdd.2016.100
71. Fernandes-Alnemri T, Yu JW, Datta P, Wu J, Alnemri ES. AIM2 activates the inflammasome and cell death in response to cytoplasmic DNA. *Nature* (2009) 458(7237):509–13. doi: 10.1038/nature07710
72. Lu A, Magupalli VG, Ruan J, Yin Q, Atianand MK, Vos MR, et al. Unified polymerization mechanism for the assembly of ASC-dependent inflammasomes. *Cell* (2014) 156(6):1193–206. doi: 10.1016/j.cell.2014.02.008
73. Hormung V, Ablasser A, Charrel-Dennis M, Bauernfeind F, Horvath G, Caffrey DR, et al. AIM2 recognizes cytosolic dsDNA and forms a caspase-1-activating inflammasome with ASC. *Nature* (2009) 458(7237):514–8. doi: 10.1038/nature07725
74. Van Opdenbosch N, Gurung P, Vande Walle L, Fossoul A, Kanneganti TD, Lamkanfi M. Activation of the NLRP1b inflammasome independently of ASC-mediated caspase-1 autoproteolysis and speck formation. *Nat Commun* (2014) 5:3209. doi: 10.1038/ncomms4209
75. Vince JE, Silke J. The intersection of cell death and inflammasome activation. *Cell Mol Life Sci* (2016) 73(11–12):2349–67. doi: 10.1007/s00018-016-2205-2
76. Bauernfeind FG, Horvath G, Stutz A, Alnemri ES, MacDonald K, Speert D, et al. Cutting edge: NF-κB activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression. *J Immunol* (2009) 183(2):787–91. doi: 10.4049/jimmunol.0901363
77. Song N, Liu ZS, Xue W, Bai ZF, Wang QY, Dai J, et al. NLRP3 Phosphorylation Is an Essential Priming Event for Inflammasome Activation. *Mol Cell* (2017) 68(1):185–97. e6. doi: 10.1016/j.molcel.2017.08.017
78. Juliania C, Fernandes-Alnemri T, Kang S, Farias A, Qin F, Alnemri ES. Non-transcriptional priming and deubiquitination regulate NLRP3 inflammasome activation. *J Biol Chem* (2012) 287(43):36617–22. doi: 10.1074/jbc.M112.407130

79. Kaiser WJ, Offermann MK. Apoptosis induced by the toll-like receptor adaptor TRIF is dependent on its receptor interacting protein homotypic interaction motif. *J Immunol* (2005) 174(8):4942–52. doi: 10.4049/jimmunol.174.8.4942
80. Stanger BZ, Leder P, Lee TH, Kim E, Seed B. RIP: a novel protein containing a death domain that interacts with Fas/APO-1 (CD95) in yeast and causes cell death. *Cell* (1995) 81(4):513–23. doi: 10.1016/0092-8674(95)90072-1
81. He S, Wang X. RIP kinases as modulators of inflammation and immunity. *Nat Immunol* (2018) 19(9):912–22. doi: 10.1038/s41590-018-0188-x
82. Berger SB, Kasparskova V, Hoffman S, Swift B, Dare L, Schaeffer M, et al. Cutting Edge: RIP1 kinase activity is dispensable for normal development but is a key regulator of inflammation in SHARPIN-deficient mice. *J Immunol* (2014) 192(12):5476–80. doi: 10.4049/jimmunol.1400499
83. Maelfait J, Liverpool L, Bridgeman A, Ragan KB, Upton JW, Rehwinkel J. Sensing of viral and endogenous RNA by ZBP1/DAI induces necroptosis. *EMBO J* (2017) 36(17):2529–43. doi: 10.15252/embj.201796476
84. Schwarzer R, Laurien L, Pasparakis M. New insights into the regulation of apoptosis, necroptosis, and pyroptosis by receptor interacting protein kinase 1 and caspase-8. *Curr Opin Cell Biol* (2020) 63:186–93. doi: 10.1016/j.ceb.2020.02.004
85. Kaiser WJ, Sridharan H, Huang C, Mandal P, Upton JW, Gough PJ, et al. Toll-like receptor 3-mediated necrosis via TRIF, RIP3, and MLKL. *J Biol Chem* (2013) 288(43):31268–79. doi: 10.1074/jbc.M113.462341
86. Petrie EJ, Sandow JJ, Jacobsen AV, Smith BJ, Griffin MDW, Lucet IS, et al. Conformational switching of the pseudokinase domain promotes human MLKL tetramerization and cell death by necroptosis. *Nat Commun* (2018) 9(1):2422. doi: 10.1038/s41467-018-04714-7
87. Cho YS, Challa S, Moquin D, Genga R, Ray TD, Guildford M, et al. Phosphorylation-driven assembly of the RIP1-RIP3 complex regulates programmed necrosis and virus-induced inflammation. *Cell* (2009) 137(6):1112–23. doi: 10.1016/j.cell.2009.05.037
88. Tenev T, Bianchi K, Dardignac M, Broemer M, Langlais C, Wallberg F, et al. The Ripoptosome, a signaling platform that assembles in response to genotoxic stress and loss of IAPs. *Mol Cell* (2011) 43(3):432–48. doi: 10.1016/j.molcel.2011.06.006
89. Nogusa S, Thapa RJ, Dillon CP, Liedmann S, Oguin TH, Ingram JP, et al. RIPK3 Activates Parallel Pathways of MLKL-Driven Necroptosis and FADD-Mediated Apoptosis to Protect against Influenza A Virus. *Cell Host Microbe* (2016) 20(1):13–24. doi: 10.1016/j.chom.2016.05.011
90. Robinson N, McComb S, Mulligan R, Dudani R, Krishnan L, Sad S. Type I interferon induces necroptosis in macrophages during infection with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Nat Immunol* (2012) 13(10):954–62. doi: 10.1038/ni.2397
91. Kitur K, Parker D, Nieto P, Ahn DS, Cohen TS, Chung S, et al. Toxin-induced necroptosis is a major mechanism of *Staphylococcus aureus* lung damage. *PLoS Pathog* (2015) 11(4):e1004820. doi: 10.1371/journal.ppat.1004820
92. González-Juarbe N, Bradley KM, Shenoy AT, Gilley RP, Reyes LF, Hinojosa CA, et al. Pore-forming toxin-mediated ion dysregulation leads to death receptor-independent necroptosis of lung epithelial cells during bacterial pneumonia. *Cell Death Differ* (2017) 24(5):917–28. doi: 10.1038/cdd.2017.49
93. Coll NS, Epple P, Dangl JL. Programmed cell death in the plant immune system. *Cell Death Differ* (2011) 18(8):1247–56. doi: 10.1038/cdd.2011.37
94. Greenberg JT, Yao N. The role and regulation of programmed cell death in plant-pathogen interactions. *Cell Microbiol* (2004) 6(3):201–11. doi: 10.1111/j.1462-5822.2004.00361.x
95. Wang J, Wang J, Hu M, Wu S, Qi J, Wang G, et al. Ligand-triggered allosteric ADP release primes a plant NLR complex. *Science* (2019) 364(6435):eaav5868. doi: 10.1126/science.aav5868
96. Wang J, Hu M, Wang J, Qi J, Han Z, Wang G, et al. Reconstitution and structure of a plant NLR resistosome conferring immunity. *Science* (2019) 364(6435):eaav5870. doi: 10.1126/science.aav5870
97. Qi T, Seong K, Thomazella DPT, Kim JR, Pham J, Seo E, et al. NRG1 functions downstream of EDS1 to regulate TIR-NLR-mediated plant immunity in. *Proc Natl Acad Sci USA* (2018) 115(46):E10979–87. doi: 10.1073/pnas.1814856115
98. Castel B, Ngou PM, Cevik V, Redkar A, Kim DS, Yang Y, et al. Diverse NLR immune receptors activate defence via the RPW8-NLR NRG1. *New Phytol* (2019) 222(2):966–80. doi: 10.1111/nph.15659
99. Lapin D, Kovacova V, Sun X, Dongus JA, Bhandari D, von Born P, et al. A Coevolved EDS1-SAG101-NRG1 Module Mediates Cell Death Signaling by TIR-Domain Immune Receptors. *Plant Cell* (2019) 31(10):2430–55. doi: 10.1105/tpc.19.00118
100. Zhang Z, Wu Y, Gao M, Zhang J, Kong Q, Liu Y, et al. Disruption of PAMP-induced MAP kinase cascade by a *Pseudomonas syringae* effector activates plant immunity mediated by the NB-LRR protein SUMM2. *Cell Host Microbe* (2012) 11(3):253–63. doi: 10.1016/j.chom.2012.01.015
101. Petersen M, Brodersen P, Naested H, Andreasson E, Lindhart U, Johansen B, et al. Arabidopsis map kinase 4 negatively regulates systemic acquired resistance. *Cell* (2000) 103(7):1111–20. doi: 10.1016/s0092-8674(00)00213-0
102. Ichimura K, Casais C, Peck SC, Shinozaki K, Shirasu K. MEKK1 is required for MPK4 activation and regulates tissue-specific and temperature-dependent cell death in Arabidopsis. *J Biol Chem* (2006) 281(48):36969–76. doi: 10.1074/jbc.M605319200
103. Nakagami H, Soukupová H, Schikora A, Zárský V, Hirt H. A Mitogen-activated protein kinase kinase kinase mediates reactive oxygen species homeostasis in Arabidopsis. *J Biol Chem* (2006) 281(50):38697–704. doi: 10.1074/jbc.M605293200
104. Suarez-Rodriguez MC, Adams-Phillips L, Liu Y, Wang H, Su SH, Jester PJ, et al. MEKK1 is required for flg22-induced MPK4 activation in Arabidopsis plants. *Plant Physiol* (2007) 143(2):661–9. doi: 10.1104/pp.106.091389
105. Gao M, Liu J, Bi D, Zhang Z, Cheng F, Chen S, et al. MEKK1, MKK1/MKK2 and MPK4 function together in a mitogen-activated protein kinase cascade to regulate innate immunity in plants. *Cell Res* (2008) 18(12):1190–8. doi: 10.1038/cr.2008.300
106. Yang Y, Liu J, Yin C, de Souza Vespoli L, Ge D, Huang Y, et al. RNA Interference-Based Screen Reveals Concerted Functions of MEKK2 and CRCK3 in Plant Cell Death Regulation. *Plant Physiol* (2020) 183(1):331–44. doi: 10.1104/pp.19.01555
107. Zhang Z, Liu Y, Huang H, Gao M, Wu D, Kong Q, et al. The NLR protein SUMM2 senses the disruption of an immune signaling MAP kinase cascade via CRCK3. *EMBO Rep* (2017) 18(2):292–302. doi: 10.15252/embr.201642704
108. Torres MA, Jones JDG, Dangl JL. Reactive oxygen species signaling in response to pathogens. *Plant Physiol* (2006) 141(2):373–8. doi: 10.1104/pp.106.079467
109. Torres MA, Dangl JL, Jones JDG. Arabidopsis gp91(phox) homologues AtrobohD and AtrobohF are required for accumulation of reactive oxygen intermediates in the plant defense response. *Proc Natl Acad Sci USA* (2002) 99(1):517–22. doi: 10.1073/pnas.012452499
110. Hackenberg T, Juul T, Auzina A, Gwizdz S, Malolepszy A, Van Der Kelen K, et al. Catalase and NO CATALASE ACTIVITY1 promote autophagy-dependent cell death in Arabidopsis. *Plant Cell* (2013) 25(11):4616–26. doi: 10.1105/tpc.113.117192
111. Boudsocq M, Willmann MR, McCormack M, Lee H, Shan L, He P, et al. Differential innate immune signalling via Ca(2+) sensor protein kinases. *Nature* (2010) 464(7287):418–22. doi: 10.1038/nature08794
112. Kadota Y, Sklenar J, Derbyshire P, Stransfeld L, Asai S, Ntoukakis V, et al. Direct regulation of the NADPH oxidase RBOHD by the PRR-associated kinase BIK1 during plant immunity. *Mol Cell* (2014) 54(1):43–55. doi: 10.1016/j.molcel.2014.02.021
113. Dubiella U, Seybold H, Durian G, Komander E, Lassig R, Witte CP, et al. Calcium-dependent protein kinase/NADPH oxidase activation circuit is required for rapid defense signal propagation. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2013) 110(21):8744–9. doi: 10.1073/pnas.1221294110
114. Lee D, Lal NK, Lin ZD, Ma S, Liu J, Castro B, et al. Regulation of reactive oxygen species during plant immunity through phosphorylation and ubiquitination of RBOHD. *Nat Commun* (2020) 11(1):1838. doi: 10.1038/s41467-020-15601-5
115. Wu F, Chi Y, Jiang Z, Xu Y, Xie L, Huang F, et al. Hydrogen peroxide sensor HPCA1 is an LRR receptor kinase in Arabidopsis. *Nature* (2020) 578(7796):577–81. doi: 10.1038/s41586-020-2032-3
116. Jones DA, Thomas CM, Hammond-Kosack KE, Balint-Kurti PJ, Jones JD. Isolation of the tomato Cf-9 gene for resistance to *Cladosporium fulvum* by transposon tagging. *Science* (1994) 266(5186):789–93. doi: 10.1126/science.7973631

117. Dixon MS, Hatzixanthis K, Jones DA, Harrison K, Jones JD. The tomato Cf-5 disease resistance gene and six homologs show pronounced allelic variation in leucine-rich repeat copy number. *Plant Cell* (1998) 10(11):1915–25. doi: 10.1105/tpc.10.11.1915
118. Thomas CM, Jones DA, Parniske M, Harrison K, Balint-Kurti PJ, Hatzixanthis K, et al. Characterization of the tomato Cf-4 gene for resistance to *Cladosporium fulvum* identifies sequences that determine recognition specificity in Cf-4 and Cf-9. *Plant Cell* (1997) 9(12):2209–24. doi: 10.1105/tpc.9.12.2209
119. Zhang L, Kars I, Essentia B, Liebrand TW, Wagemakers L, Elberse J, et al. Fungal endopolygalacturonases are recognized as microbe-associated molecular patterns by the arabidopsis receptor-like protein RESPONSIVENESS TO BOTRYTIS POLYGALACTURONASES1. *Plant Physiol* (2014) 164(1):352–64. doi: 10.1104/pp.113.230698
120. Du J, Verzaux E, Chaparro-Garcia A, Bijsterbosch G, Keizer LC, Zhou J, et al. Elicitin recognition confers enhanced resistance to Phytophthora infestans in potato. *Nat Plants* (2015) 1(4):15034. doi: 10.1038/nplants.2015.34
121. Ricci P, Bonnet P, Huet JC, Sallantin M, Beauvais-Cante F, Bruneteau M, et al. Structure and activity of proteins from pathogenic fungi Phytophthora eliciting necrosis and acquired resistance in tobacco. *Eur J Biochem* (1989) 183(3):555–63. doi: 10.1111/j.1432-1033.1989.tb21084.x
122. Blein JP, Milat ML, Ricci P. Responses of Cultured Tobacco Cells to Cryptogein, a Proteinaceous Elicitor from *Phytophthora cryptogea*: Possible Plasmalemma Involvement. *Plant Physiol* (1991) 95(2):486–91. doi: 10.1104/pp.95.2.486
123. Keller H, Blein JP, Bonnet P, Ricci P. Physiological and molecular characteristics of elicitin-induced systemic acquired resistance in tobacco. *Plant Physiol* (1996) 110(2):365–76. doi: 10.1104/pp.110.2.365
124. Derevnina L, Dagdas YF, De la Concepcion JC, Bialas A, Kellner R, Petre B, et al. Nine things to know about elicitors. *New Phytol* (2016) 212(4):888–95. doi: 10.1111/nph.14137
125. Wendehenne D, Binet MN, Blein JP, Ricci P, Pugin A. Evidence for specific, high-affinity binding sites for a proteinaceous elicitor in tobacco plasma membrane. *FEBS Lett* (1995) 374(2):203–7. doi: 10.1016/0014-5793(95)01108-q
126. Gauthier A, Lamotte O, Reboutier D, Bouteau F, Pugin A, Wendehenne D. Cryptogein-induced anion effluxes: electrophysiological properties and analysis of the mechanisms through which they contribute to the elicitor-triggered cell death. *Plant Signal Behav* (2007) 2(2):86–95. doi: 10.4161/psb.2.2.4015
127. Wendehenne D, Lamotte O, Frachisse J, Barbier-Brygoo H, Pugin A. Nitrate efflux is an essential component of the cryptogein signaling pathway leading to defense responses and hypersensitive cell death in tobacco. *Plant Cell* (2002) 14(8):1937–51. doi: 10.1105/tpc.002295
128. Lecourieux D, Mazars C, Pauly N, Ranjeva R, Pugin A. Analysis and effects of cytosolic free calcium increases in response to elicitors in Nicotiana plumbaginifolia cells. *Plant Cell* (2002) 14(10):2627–41. doi: 10.1105/tpc.005579
129. Zhang S, Liu Y, Klessig DF. Multiple levels of tobacco WIPK activation during the induction of cell death by fungal elicitors. *Plant J* (2000) 23(3):339–47. doi: 10.1046/j.1365-313x.2000.00780.x
130. Simon-Plas F, Elmaya T, Blein JP. The plasma membrane oxidase NtrbohD is responsible for AOS production in elicited tobacco cells. *Plant J* (2002) 31(2):137–47. doi: 10.1046/j.1365-313x.2002.01342.x
131. Kulik A, Noiroit E, Grandperret V, Bourque S, Fromentin J, Salloignon P, et al. Interplays between nitric oxide and reactive oxygen species in cryptogein signalling. *Plant Cell Environ* (2015) 38(2):331–48. doi: 10.1111/pce.12295
132. Yun BW, Feechan A, Yin M, Saidi NB, Le Bihan T, Yu M, et al. S-nitrosylation of NADPH oxidase regulates cell death in plant immunity. *Nature* (2011) 478(7368):264–8. doi: 10.1038/nature10427
133. Fagundes D, Bohn B, Cabreira C, Leipelt F, Dias N, Bodanese-Zanettini MH, et al. Caspases in plants: metacaspase gene family in plant stress responses. *Funct Integr Genomics* (2015) 15(6):639–49. doi: 10.1007/s10142-015-0459-7
134. Coll NS, Vercammen D, Smidler A, Clover C, Van Breusegem F, Dangl JL, et al. Arabidopsis type I metacaspases control cell death. *Science* (2010) 330(6009):1393–7. doi: 10.1126/science.1194980
135. Hander T, Fernández-Fernández Á, Kumpf RP, Willems P, Schatowitz H, Rombaut D, et al. Damage on plants activates Ca. *Science* (2019) 363(6433): eaar7486. doi: 10.1126/science.aar7486
136. Zhu P, Yu XH, Wang C, Zhang Q, Liu W, McSweeney S, et al. Structural basis for Ca<sup>2+</sup>-dependent activation of a plant metacaspase. *Nat Commun* (2020) 11(1):2249. doi: 10.1038/s41467-020-15830-8
137. Kuroyanagi M, Nishimura M, Hara-Nishimura I. Activation of Arabidopsis vacuolar processing enzyme by self-catalytic removal of an auto-inhibitory domain of the C-terminal propeptide. *Plant Cell Physiol* (2002) 43(2):143–51. doi: 10.1093/pcp/pcf035
138. Hatsugai N, Kuroyanagi M, Yamada K, Meshi T, Tsuda S, Kondo M, et al. A plant vacuolar protease, VPE, mediates virus-induced hypersensitive cell death. *Science* (2004) 305(5685):855–8. doi: 10.1126/science.1099859
139. Zhang H, Dong S, Wang M, Wang W, Song W, Dou X, et al. The role of vacuolar processing enzyme (VPE) from Nicotiana benthamiana in the elicitor-triggered hypersensitive response and stomatal closure. *J Exp Bot* (2010) 61(13):3799–812. doi: 10.1093/jxb/erq189
140. Kuroyanagi M, Yamada K, Hatsugai N, Kondo M, Nishimura M, Hara-Nishimura I. Vacuolar processing enzyme is essential for mycotoxin-induced cell death in Arabidopsis thaliana. *J Biol Chem* (2005) 280(38):32914–20. doi: 10.1074/jbc.M504476200
141. Rojo E, Martin R, Carter C, Zouhar J, Pan S, Plotnikova J, et al. VPEgamma exhibits a caspase-like activity that contributes to defense against pathogens. *Curr Biol* (2004) 14(21):1897–906. doi: 10.1016/j.cub.2004.09.056
142. Shabab M, Shindo T, Gu C, Kaschani F, Pansuriya T, Chinthra R, et al. Fungal effector protein AVR2 targets diversifying defense-related cys proteases of tomato. *Plant Cell* (2008) 20(4):1169–83. doi: 10.1105/tpc.107.056325
143. Paulus JK, Kourelis J, Ramasubramanian S, Homma F, Godson A, Hörger AC, et al. Extracellular proteolytic cascade in tomato activates immune protease Rcr3. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2020) 117(29):17409–17. doi: 10.1073/pnas.1921101117
144. Zimmermann D, Gomez-Barrera JA, Pasule C, Brack-Fridk UB, Sieferer E, Nicholson TM, et al. Cell Death Control by Matrix Metalloproteinases. *Plant Physiol* (2016) 171(2):1456–69. doi: 10.1104/pp.16.00513
145. Li D, Zhang H, Song Q, Wang L, Liu S, Hong Y, et al. Tomato Sl3-MMP, a member of the Matrix metalloproteinase family, is required for disease resistance against *Botrytis cinerea* and *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *BMC Plant Biol* (2015) 15:143. doi: 10.1186/s12870-015-0536-z
146. Dumetier B, Zadoroznyj A, Dubrez L. IAP-Mediated Protein Ubiquitination in Regulating Cell Signaling. *Cells* (2020) 9(5):1118. doi: 10.3390/cells9051118
147. Busca A, Konarski Y, Gajanayaka N, O'Hara S, Angel J, Kozlowski M, et al. cIAP1/2-TRAF2-SHP-1-Src-MyD88 Complex Regulates Lipopolysaccharide-Induced IL-27 Production through NF-kappaB Activation in Human Macrophages. *J Immunol* (2018) 200(5):1593–606. doi: 10.4049/jimmunol.1700199
148. Crook NE, Clem RJ, Miller LK. An apoptosis-inhibiting baculovirus gene with a zinc finger-like motif. *J Virol* (1993) 67(4):2168–74. doi: 10.1128/JVI.67.4.2168-2174.1993
149. Kang S, Fernandes-Alnemri T, Rogers C, Mayes L, Wang Y, Dillon C, et al. Caspase-8 scaffolding function and MLKL regulate NLRP3 inflammasome activation downstream of TLR3. *Nat Commun* (2015) 6:7515. doi: 10.1038/ncomms8515
150. Philip NH, Dillon CP, Snyder AG, Fitzgerald P, Wynosky-Dolfi MA, Zwack EE, et al. Caspase-8 mediates caspase-1 processing and innate immune defense in response to bacterial blockade of NF-kappaB and MAPK signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2014) 111(20):7385–90. doi: 10.1073/pnas.1403252111
151. Lee KH, Kang TB. The Molecular Links between Cell Death and Inflammasome. *Cells* (2019) 8(9):1057. doi: 10.3390/cells8091057
152. Lawlor KE, Khan N, Mildenhall A, Gerlic M, Croker BA, D'Cruz AA, et al. RIPK3 promotes cell death and NLRP3 inflammasome activation in the absence of MLKL. *Nat Commun* (2015) 6:6282. doi: 10.1038/ncomms7282
153. Tschopp J, Schroder K. NLRP3 inflammasome activation: The convergence of multiple signalling pathways on ROS production? *Nat Rev Immunol* (2010) 10(3):210–5. doi: 10.1038/nri2725
154. Kemmerling B, Schwedt A, Rodriguez P, Mazzotta S, Frank M, Qamar SA, et al. The BRI1-associated kinase 1, BAK1, has a brassinolide-independent

- role in plant cell-death control. *Curr Biol* (2007) 17:1116–22. doi: 10.1016/j.cub.2007.05.046
155. Gao M, Wang X, Wang D, Xu F, Ding X, Zhang Z, et al. Regulation of cell death and innate immunity by two receptor-like kinases in Arabidopsis. *Cell Host Microbe* (2009) 6:34–44. doi: 10.1016/j.chom.2009.05.019
156. Petutschig EK, Stolze M, Lipka U, Kopischke M, Horlacher J, Valerius O, et al. A novel Arabidopsis CHITIN ELICITOR RECEPTOR KINASE 1 (CERK1) mutant with enhanced pathogen-induced cell death and altered receptor processing. *New Phytol* (2014) 204(4):955–67. doi: 10.1111/nph.12920
157. Liu Y, Huang X, Li M, He P, Zhang Y. Loss-of-function of Arabidopsis receptor-like kinase BIR1 activates cell death and defense responses mediated by BAK1 and SOBIR1. *New Phytol* (2016) 212(3):637–45. doi: 10.1111/nph.14072
158. Roux M, Schwessinger B, Albrecht C, Chinchilla D, Jones A, Holton N, et al. The Arabidopsis leucine-rich repeat receptor-like kinases BAK1/SERK3 and BKK1/SERK4 are required for innate immunity to hemibiotrophic and biotrophic pathogens. *Plant Cell* (2011) 23(6):2440–55. doi: 10.1101/tpc.111.084301
159. Schwessinger B, Roux M, Kadota Y, Ntoukakis V, Sklenar J, Jones A, et al. Phosphorylation-dependent differential regulation of plant growth, cell death, and innate immunity by the regulatory receptor-like kinase BAK1. *PLoS Genet* (2011) 7(4):e1002046. doi: 10.1371/journal.pgen.1002046
160. Witt A, Vucic D. Diverse ubiquitin linkages regulate RIP kinases-mediated inflammatory and cell death signaling. *Cell Death Differ* (2017) 24(7):1160–71. doi: 10.1038/cdd.2017.33
161. Goncharov T, Hedayati S, Mulvihill MM, Izrael-Tomasevic A, Zobel K, Jeet S, et al. Disruption of XIAP-RIP2 Association Blocks NOD2-Mediated Inflammatory Signaling. *Mol Cell* (2018) 69(4):551–65.e7. doi: 10.1016/j.molcel.2018.01.016
162. Liu X, Li Y, Peng S, Yu X, Li W, Shi F, et al. Epstein-Barr virus encoded latent membrane protein 1 suppresses necroptosis through targeting RIPK1/3 ubiquitination. *Cell Death Dis* (2018) 9(2):53. doi: 10.1038/s41419-017-0081-9
163. Wang J, Qu B, Dou S, Li L, Yin D, Pang Z, et al. The E3 ligase OsPUB15 interacts with the receptor-like kinase PID2 and regulates plant cell death and innate immunity. *BMC Plant Biol* (2015) 15:49. doi: 10.1186/s12870-015-0442-4
164. Bègue H, Jeandroz S, Blanchard C, Wendehenne D, Rosnoble C. Structure and functions of the chaperone-like p97/CDC48 in plants. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* (2017) 1861(1 Pt A):3053–60. doi: 10.1016/j.bbagen.2016.10.001
165. Rosnoble C, Bègue H, Blanchard C, Pichereaux C, Besson-Bard A, Aimé S, et al. Functional characterization of the chaperon-like protein Cdc48 in cryptogein-induced immune response in tobacco. *Plant Cell Environ* (2017) 40(4):491–508. doi: 10.1111/pce.12686
166. Bègue H, Mounier A, Rosnoble C, Wendehenne D. Toward the understanding of the role of CDC48, a major component of the protein quality control, in plant immunity. *Plant Sci* (2019) 279:34–44. doi: 10.1016/j.plantsci.2018.10.029
167. Bègue H, Besson-Bard A, Blanchard C, Winckler P, Bourque S, Nicolas V, et al. The chaperone-like protein CDC48 regulates ascorbate peroxidase in tobacco. *J Exp Bot* (2019) 70(10):2665–81. doi: 10.1093/jxb/erz097
168. Huryn DM, Kornfilt DJP, Wipf P. p97: An Emerging Target for Cancer, Neurodegenerative Diseases, and Viral Infections. *J Med Chem* (2020) 63(5):1892–907. doi: 10.1021/acs.jmedchem.9b01318
169. Bourque S, Jeandroz S, Grandperret V, Lehotai N, Aimé S, Soltis DE, et al. The Evolution of HD2 Proteins in Green Plants. *Trends Plant Sci* (2016) 21(12):1008–16. doi: 10.1016/j.tplants.2016.10.001
170. Bourque S, Dutarte A, Hammoudi V, Blanc S, Dahan J, Jeandroz S, et al. Type-2 histone deacetylases as new regulators of elicitor-induced cell death in plants. *New Phytol* (2011) 192(1):127–39. doi: 10.1111/j.1469-8137.2011.03788.x
171. Ha SD, Han CY, Reid C, Kim SO. HDAC8-mediated epigenetic reprogramming plays a key role in resistance to anthrax lethal toxin-induced pyroptosis in macrophages. *J Immunol* (2014) 193(3):1333–43. doi: 10.4049/jimmunol.1400420
172. Rogers K, Chen X. Biogenesis, Turnover, and Mode of Action of Plant MicroRNAs. *Plant Cell* (2013) 25(7):2383–99. doi: 10.1105/tpc.113.113159
173. Islam W, Noman A, Qasim M, Wang L. Plant Responses to Pathogen Attack: Small RNAs in Focus. *Int J Mol Sci* (2018) 19(2):515. doi: 10.3390/ijms19020515
174. Li F, Pignatta D, Bendix C, Brunkard JO, Cohn MM, Tung J, et al. MicroRNA regulation of plant innate immune receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* (2012) 109(5):1790–5. doi: 10.1073/pnas.1118282109
175. Park JH, Shin C. The role of plant small RNAs in NB-LRR regulation. *Brief Funct Genomics* (2015) 14(4):268–74. doi: 10.1093/bfgp/elv006
176. Cui C, Wang JJ, Zhao JH, Fang YY, He XF, Guo HS, et al. A Brassica miRNA Regulates Plant Growth and Immunity through Distinct Modes of Action. *Mol Plant* (2020) 13(2):231–45. doi: 10.1016/j.molp.2019.11.010
177. Park JH, Shin C. The role of plant small RNAs in NB-LRR regulation. *Brief Funct Genomics* (2015) 14(4):268–74. doi: 10.1093/bfgp/elv006
178. Shivaprasad PV, Chen H-M, Patel K, Bond DM, Santos BACM, Baulcombe DC. A MicroRNA Superfamily Regulates Nucleotide Binding Site-Leucine-Rich Repeats and Other mRNAs. *Plant Cell* (2012) 24(3):859–74. doi: 10.1105/tpc.111.095380
179. Glazebrook J. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu Rev Phytopathol* (2005) 43:205–27. doi: 10.1146/annurev.phyto.43.040204.135923
180. Wu L, Chen H, Curtis C, Fu ZQ. Go in for the kill: How plants deploy effector-triggered immunity to combat pathogens. *Virulence* (2014) 5(7):710–21. doi: 10.4161/viru.29755
181. Betsuyaku S, Katou S, Takebayashi Y, Sakakibara H, Nomura N, Fukuda H. Salicylic Acid and Jasmonic Acid Pathways are Activated in Spatially Different Domains Around the Infection Site During Effector-Triggered Immunity in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell Physiol* (2018) 59(2):439–9. doi: 10.1093/pcp/pcy008
182. Torruño TY, Stergiopoulos I, Coaker G. Plant-Pathogen Effectors: Cellular Probes Interfering with Plant Defenses in Spatial and Temporal Manners. *Annu Rev Phytopathol* (2016) 54(1):419–41. doi: 10.1146/annurev-photon-080615-100204
183. Shrivastava G, Leon-Juarez M, Garcia-Cordero J, Meza-Sanchez DE, Cedillo-Barron L. Inflammasomes and its importance in viral infections. *Immunol Res* (2016) 64(5–6):1101–17. doi: 10.1007/s12026-016-8873-z
184. Petrie EJ, Sandow JJ, Lehmann WII, Liang LY, Coursier D, Young SN, et al. Viral MLKL Homologs Subvert Necrototic Cell Death by Sequestering Cellular RIPK3. *Cell Rep* (2019) 28(13):3309–19.e5. doi: 10.1016/j.celrep.2019.08.055
185. Green MC, Monser KP, Clem RJ. Ubiquitin protein ligase activity of the anti-apoptotic baculovirus protein Op-IAP3. *Virus Res* (2004) 105(1):89–96. doi: 10.1016/j.virusres.2004.04.017
186. Peterson LW, Philip NH, DeLaney A, Wynosky-Dolfi MA, Askof K, Gray F, et al. RIPK1-dependent apoptosis bypasses pathogen blockade of innate signaling to promote immune defense. *J Exp Med* (2017) 214(11):3171–82. doi: 10.1084/jem.20170347
187. Pearson JS, Giogha C, Muhlen S, Nachbur U, Pham CL, Zhang Y, et al. EspL is a bacterial cysteine protease effector that cleaves RHIM proteins to block necroptosis and inflammation. *Nat Microbiol* (2017) 2:16258. doi: 10.1038/nmicrobiol.2016.258
188. Omoto S, Guo H, Talekar GR, Roback L, Kaiser WJ, Mocarski ES. Suppression of RIP3-dependent necroptosis by human cytomegalovirus. *J Biol Chem* (2015) 290(18):11635–48. doi: 10.1074/jbc.M115.646042
189. Koehler H, Cotsmire S, Langland J, Kibler KV, Kalman D, Upton JW, et al. Inhibition of DAI-dependent necroptosis by the Z-DNA binding domain of the vaccinia virus innate immune evasion protein, E3. *Proc Natl Acad Sci USA* (2017) 114(43):11506–11. doi: 10.1073/pnas.1700999114
190. Upton JW, Kaiser WJ, Mocarski ES. DAI/ZBP1/DLM-1 complexes with RIP3 to mediate virus-induced programmed necrosis that is targeted by murine cytomegalovirus vIRA. *Cell Host Microbe* (2012) 11(3):290–7. doi: 10.1016/j.chom.2012.01.016
191. Fawke S, Doumiane M, Schomack S. Oomycete interactions with plants: infection strategies and resistance principles. *Microbiol Mol Biol Rev* (2015) 79(3):263–80. doi: 10.1128/MMBR.00010-15
192. Couto D, Zipfel C. Regulation of pattern recognition receptor signalling in plants. *Nat Rev Immunol* (2016) 16(9):537–52. doi: 10.1038/nri.2016.77
193. Sang Y, Yu W, Zhuang H, Wei Y, Derevina L, Yu G, et al. Intra-strain Elicitation and Suppression of Plant Immunity by Ralstonia solanacearum Type-III Effectors in Nicotiana benthamiana. *Plant Commun* (2020) 1(4):100025. doi: 10.1016/j.xplc.2020.100025

194. Sun Y, Li P, Deng M, Shen D, Dai G, Yao N, et al. The Ralstonia solanacearum effector RipAK suppresses plant hypersensitive response by inhibiting the activity of host catalases. *Cell Microbiol* (2017) 19(8):e12736. doi: 10.1111/cmi.12736
195. Bos JII, Kanneganti TD, Young C, Cakir C, Huitema E, Win J, et al. The C-terminal half of Phytophthora infestans RXLR effector AVR3a is sufficient to trigger R3a-mediated hypersensitivity and suppress INF1-induced cell death in Nicotiana benthamiana. *Plant J* (2006) 48(2):165–76. doi: 10.1111/j.1365-313X.2006.02866.x
196. Bos JII, Armstrong MR, Gilroy EM, Boevink PC, Hein I, Taylor RM, et al. Phytophthora infestans effector AVR3a is essential for virulence and manipulates plant immunity by stabilizing host E3 ligase CMGK1. *Proc Natl Acad Sci USA* (2010) 107(21):9909–14. doi: 10.1073/pnas.0914408107
197. King SR, McLellan H, Boevink PC, Armstrong MR, Bukharova T, Sukarta O, et al. Phytophthora infestans RXLR effector PexRD2 interacts with host MAPKKK e to suppress plant immune signaling. *Plant Cell* (2014) 26(3):1345–59. doi: 10.1105/tpc.113.120055
198. Kabbage M, Williams B, Dickman MB. Cell death control: the interplay of apoptosis and autophagy in the pathogenicity of Sclerotinia sclerotiorum. *PLoS Pathog* (2013) 9(4):e1003287. doi: 10.1371/journal.ppat.1003287
199. Williams B, Kabbage M, Kim HJ, Britt R, Dickman MB. Tipping the balance: Sclerotinia sclerotiorum secreted oxalic acid suppresses host defenses by manipulating the host redox environment. *PLoS Pathog* (2011) 7(6):e1002107. doi: 10.1371/journal.ppat.1002107
200. Seifarghi S, Borhan MH, Wei Y, Ma L, Couto C, Bekkoui D, et al. Receptor-Like Kinases BAK1 and SOBIR1 Are Required for Necrotizing Activity of a Novel Group of. *Front Plant Sci* (2020) 11:1021. doi: 10.3389/fpls.2020.01021
201. Zhu W, Ronen M, Gur Y, Minz-Dub A, Masrati G, Ben-Tal N, et al. BcXYG1, a secreted xyloglucanase from *Botrytis cinerea*, triggers both cell death and plant immune responses. *Plant Physiol* (2017) 175(1):438–56. doi: 10.1104/pp.17.00375
202. Lyu X, Shen C, Fu Y, Xie J, Jiang D, Li G, et al. A Small Secreted Virulence-Related Protein Is Essential for the Necrotrophic Interactions of Sclerotinia sclerotiorum with Its Host Plants. *PLoS Pathog* (2016) 12(2):e1005435. doi: 10.1371/journal.ppat.1005435
203. Li Y, Han Y, Qu M, Chen J, Chen X, Geng X, et al. Apoplastic Cell Death-Inducing Proteins of Filamentous Plant Pathogens: Roles in Plant-Pathogen Interactions. *Front Genet* (2020) 11:661. doi: 10.3389/fgene.2020.00661
204. Li L, Habring A, Wang K, Weigel D. Atypical Resistance Protein RPW8/HR Triggers Oligomerization of the NLR Immune Receptor RPP7 and Autoimmunity. *Cell Host Microbe* (2020) 27(3):405–17.e6. doi: 10.1016/j.chom.2020.01.012
205. Gilbert BM, Wolpert TJ. Characterization of the LOV1-mediated, victorin-induced, cell-death response with virus-induced gene silencing. *Mol Plant Microbe Interact* (2013) 26(8):903–17. doi: 10.1094/MPMI-01-13-0014-R
206. Doitsh G, Greene WC. Dissecting How CD4 T Cells Are Lost During HIV Infection. *Cell Host Microbe* (2016) 19(3):280–91. doi: 10.1016/j.chom.2016.02.012
207. Chakraborty J, Ghosh P, Das S. Autoimmunity in plants. *Planta* (2018) 248(4):751–67. doi: 10.1007/s00425-018-2956-0
208. Bruggeman Q, Raynaud C, Benhamed M, Delarue M. To die or not to die? Lessons from lesion mimic mutants. *Front Plant Sci* (2015) 6:24. doi: 10.3389/fpls.2015.00024
209. Shirano Y, Kachroo P, Shah J, Klessig DF. A gain-of-function mutation in an Arabidopsis Toll Interleukin1 receptor-nucleotide binding site-leucine-rich repeat type R gene triggers defense responses and results in enhanced disease resistance. *Plant Cell* (2002) 14(12):3149–62. doi: 10.1105/tpc.005348
210. Wang J, Chern M, Chen X. Structural dynamics of a plant NLR resistosome: transition from autoinhibition to activation. *Sci China Life Sci* (2020) 63(4):617–9. doi: 10.1007/s11427-019-9536-x
211. Shimomura T, Yonekawa Y, Nagura H, Tateyama M, Fujiyoshi Y, Irie K. A native prokaryotic voltage-dependent calcium channel with a novel selectivity filter sequence. *Elife* (2020) 9:e52828. doi: 10.7554/elife.52828
212. Yu FH, Catterall WA. The VGL-chanome: a protein superfamily specialized for electrical signaling and ionic homeostasis. *Sci STKE* (2004) 2004(253):re15. doi: 10.1126/stke.2532004re15
213. Xiong Y, Han Z, Chai J. Resistosome and inflammasome: platforms mediating innate immunity. *Curr Opin Plant Biol* (2020) 56:47–55. doi: 10.1016/j.pbi.2020.03.010
214. Lacombe S, Rougon-Cardoso A, Sherwood E, Peeters N, Dahlbeck D, van Esse HP, et al. Interfamily transfer of a plant pattern-recognition receptor confers broad-spectrum bacterial resistance. *Nat Biotechnol* (2010) 28(4):365–9. doi: 10.1038/nbt.1613
215. Kishimoto K, Kouzai Y, Kaku H, Shibuya N, Minami E, Nishizawa Y. Perception of the chitin oligosaccharides contributes to disease resistance to blast fungus Magnaporthe oryzae in rice. *Plant J* (2010) 64(2):343–54. doi: 10.1111/j.1365-313X.2010.04328.x

**Conflict of Interest:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2021 Roudaire, Héloïr, Wendehenne, Zadoroznyj, Dubrez and Poinsot. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

## **V. Revue : *Cytoplasmic and Nuclear Functions of cIAP1***

Cette revue, rédigée durant l'année 2022, présente les connaissances actuelles sur la protéine cIAP1. Les fonctions nucléaires et cytoplasmiques de cIAP1, ainsi que les voies de signalisation impliquées sont décrites.



Review

# Cytoplasmic and Nuclear Functions of cIAP1

Aymeric Zadoroznyj <sup>1,2</sup> and Laurence Dubrez <sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup> Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm) Inserm LNC UMR1231, LabEx LipSTIC, 21000 Dijon, France; aymeric\_zadoroznyj@etu.u-bourgogne.fr

<sup>2</sup> Center de Recherche LNC UMR1231, University of Burgundy, 21000 Dijon, France

\* Correspondence: laurence.dubrez@u-bourgogne.fr

**Abstract:** Cellular inhibitor of apoptosis 1 (cIAP1) is a cell signaling regulator of the IAP family. Through its E3-ubiquitin ligase activity, it has the ability to activate intracellular signaling pathways, modify signal transduction pathways by changing protein-protein interaction networks, and stop signal transduction by promoting the degradation of critical components of signaling pathways. Thus, cIAP1 appears to be a potent determinant of the response of cells, enabling their rapid adaptation to changing environmental conditions or intra- or extracellular stresses. It is expressed in almost all tissues, found in the cytoplasm, membrane and/or nucleus of cells. cIAP1 regulates innate immunity by controlling signaling pathways mediated by tumor necrosis factor receptor superfamily (TNFRs), some cytokine receptors and pattern recognition-receptors (PRRs). Although less documented, cIAP1 has also been involved in the regulation of cell migration and in the control of transcriptional programs.

**Keywords:** IAPs; signaling pathways; innate immunity; ubiquitination; TNF $\alpha$ ; NF- $\kappa$ B; cell migration; E2F1



**Citation:** Zadoroznyj, A.; Dubrez, L. Cytoplasmic and Nuclear Functions of cIAP1. *Biomolecules* **2022**, *12*, 322. <https://doi.org/10.3390/biom12020322>

Academic Editor: Stéphen T. Manon

Received: 25 January 2022

Accepted: 14 February 2022

Published: 17 February 2022

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

IAPs (Inhibitors of Apoptosis) form a family of proteins highly conserved during evolution. The named “IAP” was chosen by Lois Miller’s teams, who described a new class of proteins encoded by the *Cydia pomonella granulosis* virus (CpGV) genome and were able to protect infected insect cells from apoptosis to allow viral spread [1]. Since then, based on sequence homologies, IAP homologs have been identified in insects, yeasts, nematodes, fish and mammals. However, although they are able to inhibit or delay cell death when overexpressed, the main cellular function for most of them is not an inhibition of apoptosis. Among the eight described mammal homologs, XIAP (X-linked IAP) [2], cIAP1 (cellular IAP1), cIAP2, ML-IAP (Melanoma IAP) [3] and ILP-2 (IAP-like protein 2) [4] are enzymes of the ubiquitination reaction involved in proteostasis and the regulation of the assembly of intracellular signaling platforms.

XIAP has the greatest ability to inhibit apoptosis by directly interacting with initiator and effector caspases and blocking their activity [5–7]. Upon apoptotic stimuli, XIAP is neutralized by Smac (Second mitochondria derived activator of caspase), which is contained into the mitochondrial intermembrane space and released into the cytosol during the early phase of apoptotic intrinsic pathway [8–10]. Based on these observations, Smac mimetics have been developed in order to counteract the anti-apoptotic activity of IAPs in tumors. However, Smac as well as Smac mimetics are also able to bind and neutralize other IAPs such as cIAP1, cIAP2 and ML-IAP with high affinities [11].

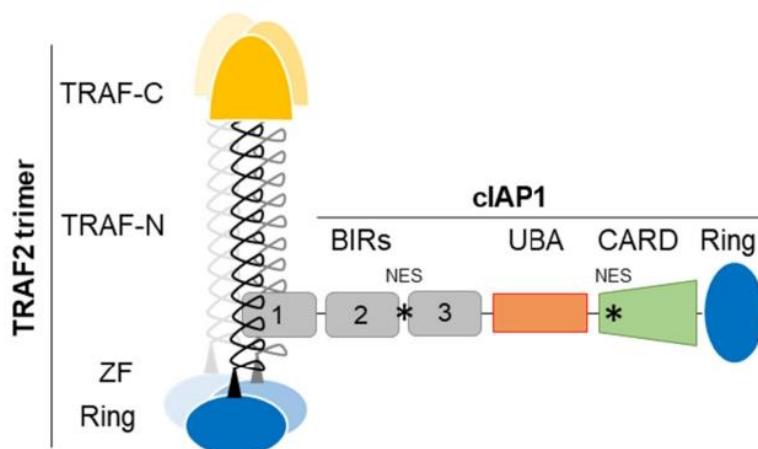
cIAP1 and its paralogous cIAP2 are most studied for their ability to regulate innate immunity and inflammation [12]. By controlling the scaffolding and kinase activities of RIPK1, cIAPs dictate the response of cells to tumor necrosis factor receptor (TNFR) superfamily stimulation [13]. They have also been involved in the control of the inflammatory response mediated by pattern recognition (PRRs) and cytokine receptors [14]. In addition,

cIAP1 can control intracellular signaling pathways that drive cell motility and migration, regulate cell cycle cell proliferation and transcriptional programs [15].

The expression of cIAP1, cIAP2 and XIAP is preferentially induced under stressful conditions such as hypoxia, endoplasmic reticular stress and DNA damage. Regulation can occur at a transcriptional level via HIF-1 $\alpha$ , NF- $\kappa$ B or E2F1-dependent mechanisms [16,17] or at translational level due to the presence of an internal ribosome entry site (IRES)-dependent mechanism of translation initiation [18–20]. Moreover, the stability of cIAPs is regulated by heat shock proteins (HSPs) [21]. Thus, these pleiotropic proteins appeared to act as potent regulators of the adaptive response of cells to a changing environment or in response to environmental or intracellular stresses such as pathogen attack, hypoxic-ischemic injury or DNA damage [22]. Consistent with their role in regulating homeostasis, dysregulations of cIAPs have been observed in cancer, neurodegenerative disorders and inflammatory diseases. Moreover, the oncogenic properties of cIAP1 were clearly demonstrated in mouse models of hepatocarcinoma, osteosarcoma and breast cancer [23–25]. This review aims to analyse the role of cIAP1 and, by comparison, cIAP2 and XIAP in maintaining cellular homeostasis.

## 2. cIAP1 Structure and Molecular Function

The IAP family is defined by its structural feature, i.e., the presence of at least one conserved protein domain named BIR (Baculoviral IAP repeat). cIAP1, cIAP2 and XIAP own three copies of BIRs (Figure 1). These domains have approximatively 70–80 amino-acids organized into three short  $\beta$ -strands and 4–5  $\alpha$ -helices forming a hydrophobic groove with protein-protein interacting properties [26]. The BIR1 of cIAP1/2 binds the signaling adaptor tumor necrosis factor receptor (TNFR)-associated factor 2 (TRAF2) (Figure 1) which regulates the stability, localization and activity of the concerned IAPs and which acts as an intermediate for their recruitment into TNFR-associated signaling complex [27–29]. The BIR2 and 3 of cIAPs and XIAP have the particularity of having a deep hydrophobic pocket, which allows the specific anchoring of a conserved tetrapeptide motif called IBM (IAP binding motif). The best characterized IBM-containing proteins are critical regulators of apoptosis Smac/diablo and HtrA2. cIAPs can also bind some caspases, the DNA damage response and cell cycle regulators chk1, eRF3/GSTP releasing factor and the kinase NIK in an IBM-dependent manner [15].



**Figure 1.** cIAP1-TRAF2 E3-Ubiquitin ligase complex, schematic representation. TRAF-N, TRAF-C, Zinc finger (ZF), RING, BIRs (Baculoviral IAP repeat), UBA (ubiquitin-associated), CARD (caspase recruitment) domains and NES (Nuclear export signal) are represented. cIAP1-TRAF2 interaction involves the cIAP1-BIR1 domain and the N-terminal half of TRAF domain (TRAF-N). Trimeric TRAF2 is recruited to receptor thanks to their TRAF-C domain. Oligomerisation of TRAF2 is also required for the recruitment of downstream signaling molecules. Trimeric TRAF2 can bind one isolated BIR1.

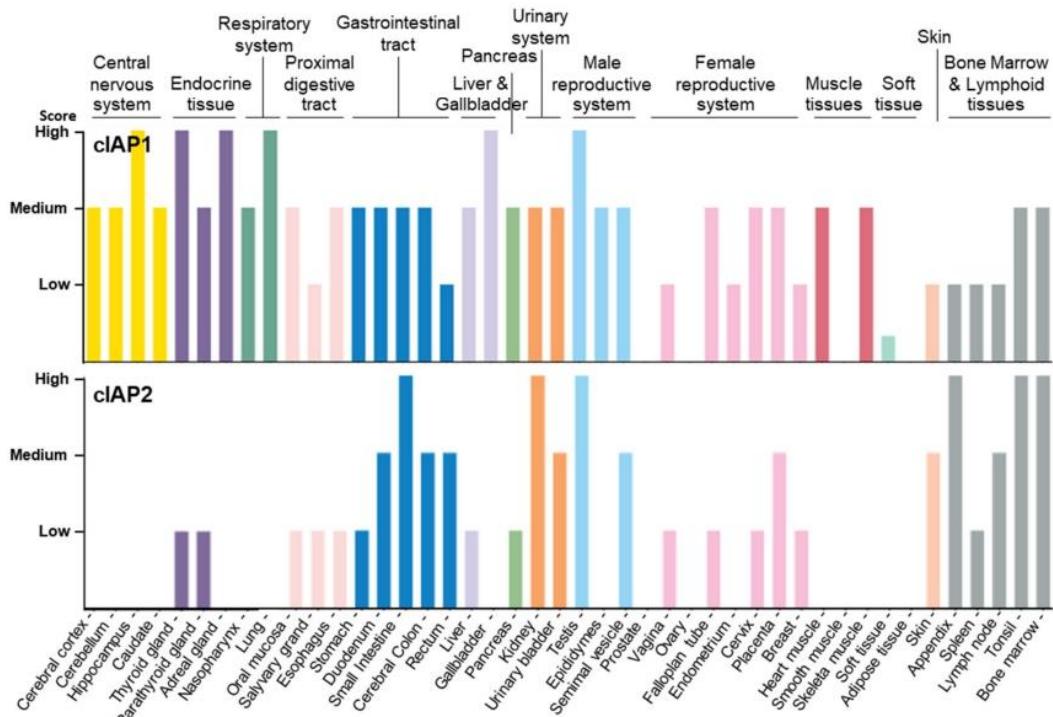
The second domain shared by cIAP1, cIAP2 and XIAP is the conserved Ring that gives them their molecular function. It is the widespread active domain found in E3-ligases of the ubiquitination reaction [30]. This is a 3-step enzymatic reaction that catalyzes the covalent binding of molecules or chains of ubiquitins of different topologies to protein substrates. This post-translational modification modifies the stability, localization, activity or the recruitment of intracellular proteins into signaling platforms, depending of the type of ubiquitin chains conjugated. Ubiquitination uses E1-activating, E2-conjugating and E3-ligase enzymes sequentially. It is generally admitted that the E3 is responsible for the recruitment of substrate proteins whereas the E2 determines the type of ubiquitination. IAPs bind, via the Ring, ubiquitin-charged E2-conjugating enzyme and catalyze the transfer of ubiquitin moieties from the E2 to the protein substrate, specifically recruited thanks to their BIR domains [15]. Like many Ring-containing E3-ligases, IAPs are active in a dimeric form [31,32]. The binding of ligand promotes their conformational change leading to activation [32]. Engagement of Smac mimetic to the BIR3-cIAP1 induces the activating dimerization and auto-ubiquitination of cIAP1 leading to its rapid degradation (within 15 min) [33]. We observed that cIAP1 and TRAF2 need each other to perform their respective activities. Increasing evidences suggests that they form an E3-ubiquitin ligase complex (Figure 1) in which cIAP1 functions as the E3-enzyme while TRAF2 serves as an adaptor for bringing cIAP1 in close proximity to the substrates [34,35]. TRAF2 is also a potent regulator of cIAP1 stability [36,37]. In some situations, TRAF3 that directly binds TRAF2 takes part in the complex, serving as the substrate binding component [34,35,38,39]. In cytokine receptor-mediated signaling pathways, TRAF2, which also harbors a Ring domain (Figure 1) can function as an E3-ligase able to promote K63-linked ubiquitination and activation of cIAP1 [34].

In addition to the BIRs and Ring, cIAPs and XIAP harbor a UBA (ubiquitin-associated) domain whose function is to bind ubiquitins [40,41] (Figure 1). It has been involved in regulating cIAPs-mediated ubiquitination. It participates in the specific recruitment of ubiquitin-charged E2 [42] and therefore in determining the type of ubiquitination [43]. cIAP'UBA has also been involved in the recruitment of cIAPs into signaling platforms and in the binding to TRAF2 [41,43]. Moreover, cIAP1 and cIAP2 have a CARD domain that regulates their activating dimerization and enzymatic activity [44]. At least two functional NES sequences located in the BIR2-BIR3 linker region and in the CARD [45,46] were detected in the cIAP1 sequence.

### 3. Tissue Expression and Subcellular Localisation of cIAP1, cIAP2 and XIAP in Healthy and Tumor Cells

As documented in the human protein atlas (Human Protein Atlas proteinatlas.org) [47,48], cIAP1 is expressed in almost all tissues and cell types tested without specificity (Figure 2, Table 1). In comparison, cIAP2 is absent or less abundant in most tissues, except in the small intestine, kidney and lymphoid tissue. cIAP2 is highly expressed in subsets of immune cells, including B-cells.

cIAP1 has been found in the cytoplasm/membrane and/or nuclear compartments. In bone marrow hematopoietic cells, ovarian follicle cells, pancreas glandular cells, squamous epithelial cells of oral mucosa and cervix, hippocampus glial cells, lung alveolar cells and testis Leydig cells [49], it was exclusively detected in the nucleus (Table 1). In a work published in 2004, we demonstrated that cIAP1 is expressed in the nucleus of hematopoietic stem cells [50], and that its translocation into the cytoplasm is necessary for their differentiation into macrophages or dendritic cells [21,45,50]. Such nuclear export has also been observed during epithelial differentiation [21,50].



**Figure 2.** Tissue distribution of clAP1 and clAP2 proteins Data available from v21.0.proteinatlas.org ([proteinatlas.org/ENSG00000110330-BIRC2/tissue](http://proteinatlas.org/ENSG00000110330-BIRC2/tissue), accessed on 23 January 2022; [proteinatlas.org/ENSG0000023445-BIRC3/tissue](http://proteinatlas.org/ENSG0000023445-BIRC3/tissue), accessed on 23 January 2022).

**Table 1.** Tissue expression and subcellular localization of clAP1, clAP2 and XIAP. Data available from v21.0.proteinatlas.org ([proteinatlas.org/ENSG00000110330-BIRC2/tissue](http://proteinatlas.org/ENSG00000110330-BIRC2/tissue), accessed on 23 January 2022; [proteinatlas.org/ENSG0000023445-BIRC3/tissue](http://proteinatlas.org/ENSG0000023445-BIRC3/tissue); [proteinatlas.org/ENSG00000101966-XIAP/tissue](http://proteinatlas.org/ENSG00000101966-XIAP/tissue), accessed on 23 January 2022) [47,48].

Organ or System	Tissue	Cells	Protein Expression <sup>1</sup> /Subcellular Localization <sup>2</sup>		
			clAP1	clAP2	XIAP
<b>Adipose tissue</b>		Adipocytes	M/CMN	nd	L/CM
<b>Central nervous system</b>	Cerebellum	Cells in granular molecular layer purkinje cells	M/CMN	nd	L/CM
	Cerebral Cortex	Glial and neuronal cells	M/CM or N	nd	L-M/CM
	Hippocampus	Glial cells Neuronal cells	H/N M/CM or N	nd	nd
	Caudate	Glial cells and neuronal cells	M/CM or N	nd	M/CM
<b>Endocrine system</b>	Thyroid gland	Glandular cells	H/N or CM	L/CM	M-H/CM
	Parathyroid Gland	Glandular cells	M/CM or CMN	L/CM	M/CM
<b>Respiratory system</b>	Adrenal Gland	Glandular cells	H/CMN	nd	M-H/CM
	Nasopharynx	Respiratory epithelial cells	M/CM	nd	H/CM
<b>Gastrointestinal tract</b>	Lung	Alveolar cells	H/N	nd	L/CM
	Oral mucosa	Squamous epithelial cells	M/N	L/N	M/CM
	Salivary Gland	Glandular cells	L/CM or CMN	L/N	M-H/CM
	Esophagus	Squamous epithelial cells	M/CM or CMN	L/N	M/CM
	Stomach	Glandular cells	L/N	L/N	M/CM
	Duodenum and Small intestine and colon	Glandular cells	M/CM or CMN	nd	M-H/CM
<b>Liver</b>	Rectum	Glandular cells	L/CM or CMN	-	M-H/CM
		Cholangiocytes and hepatocytes	M/CM	L/CM	L-M/CM

**Table 1.** *Cont.*

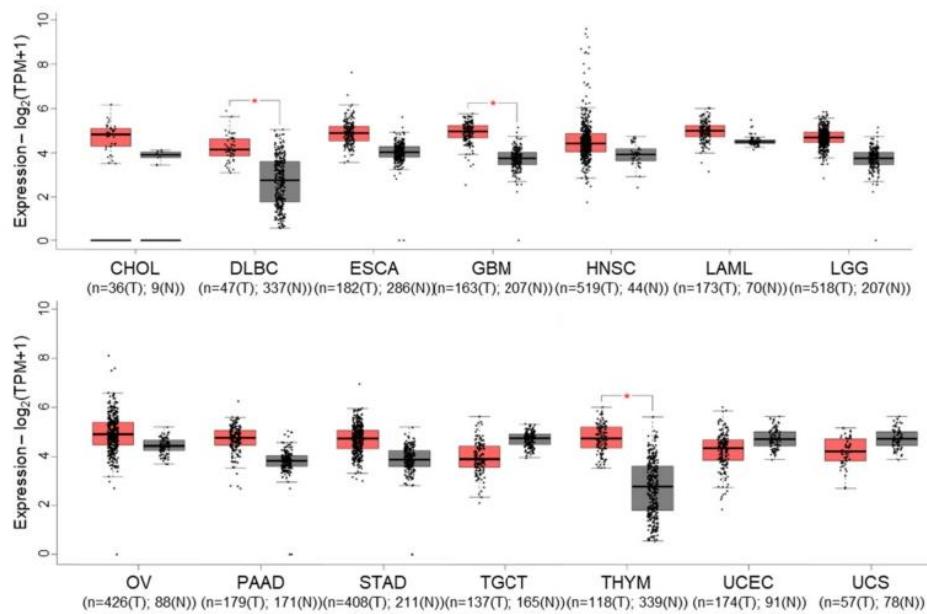
Organ or System	Tissue	Cells	Protein Expression <sup>1</sup> /Subcellular Localization <sup>2</sup>		
			cIAP1	cIAP2	XIAP
Gallbladder		Glandular cells	H/CMN	nd	H/CM
Pancreas		Exocrine glandular cells	M/N	nd	L-M/CM
		Endocrine cells	M/N	L/CM	L-M/CM
Urinary system	Kidney	Glomeruli cells	L-M/CM or N	nd	L-M/CM
		Tubule cells	M/CM or CMN	-	M/CM
	Urinary Bladder	Urothelial cells	M/CMN	M/N	M/CM
Female reproductive system	Vagina	Squamous epithelial cells	L/CM or N	L/N	L/CM
	Fallopian tube	Glandular cells	M/CM	-	M/CM
	Endometrium	Glandular cells	L/CMN	nd	L-M-H/CM
	Cervix	Glandular cells	M/CM or CMN	nd	L-H/CM
		Squamous epithelial cells	L/N	L/N	L-M/CM
	Ovary	Ovarian stromal cells	L/CM or N	nd	L/CM
		Follicle cells	L/N	nd	nd
	Placenta	Trophoblastic cells	M/N or CMN	M/N	L-M/CM
	Breast	Glandular and myoepithelial cells	L/CM	L/N	M/CM
Male reproductive system	Testis	Cells in seminiferous ducts	L/CM	nd	L/CM
		Leydig cells	H/N	L	M-H/CM
	Epididymis	Glandular cells	M/CM or CMN	nd	L-M/CM
	Seminal vesicle	Glandular cells	M/CMN	M/CM	M/CM
	Prostate	Glandular cells	L/CM or N	nd	L-M/CM
Muscle tissues	Heart muscle	Cardiomyocytes	M/CM	nd	M-H/CM
	Smooth muscle	Smooth muscle cells	L/CM	nd	L/CM
	Skeletal muscle	Myocytes	M/CM	nd	L-H/CM
Skin Soft tissue		Keratinocytes and melanocytes	L/CM	nd	L-M/CM
		Fibroblasts	L/CM	nd	L/CM
Bone marrow & Lymphoid tissues	Appendix	Glandular cells and lymphoid tissue	L/CMN	nd	L-M-H/CM
	Spleen	Cells in red pulp	L/CM or N	nd	M/CM
		Cells in white pulp	L/N	L/N	nd
	Lymph node	Germinal and non germinal center cells	L/CM or N	M/N	L-M/CM
	Tonsil	Germinal, non germinal center cells and squamous epithelial cells	M/N	H or M/N	L-M/CM
	Bone marrow	Hematopoietic cells	M/N	H/N	L-M/CM

<sup>1</sup> L: low; M: medium, H: high; nd: not detected. <sup>2</sup> CM: cytoplasm/membrane; CMN: cytoplasm/membrane/nucleus; N: nucleus. Antibodies used for the immunohistochemical analyses: cIAP1: HPA005512, Sigma-Aldrich and CAB020661, Origene; cIAP2: HPA002317 Sigma-Aldrich; XIAP: HPA042428 Sigma-Aldrich and CAB009203, Santa Cruz Biotechnology.

The subcellular localization of cIAP2 is much less documented in the literature, probably because of the low specificity of the available antibodies. The human protein atlas indicates a nuclear expression of cIAP2 in hematopoietic stem cells of bone marrow, spleen and lymph node cells, squamous epithelial cells of the vagina, cervix and oral mucosa, glandular cells from the stomach and salivary gland, and cells from the breast and urinary bladder (Table 1). On the other hand, XIAP has been found only in the cytoplasm/membrane compartment (Table 1). However, a nuclear translocation of XIAP has been observed in cells of the cortical region of the brain of neonatal rat exposed to hypoxic-ischemic brain injury. In the nuclei, XIAP interacts with XAF1 (XIAP-associated factor 1) [51]. The decreased cytoplasmic content of XIAP has been associated with enhanced caspase 3 activity and neuronal death [52]. XIAP has also been found in the nucleus of breast carcinoma cells [53].

Gene expression profiling interactive analysis (GEPIA) [54] revealed that *cIAP1* expression tends to be overexpressed in 11 out of 31 tumors selected in the cancer genome atlas (TCGA), which is significant for diffuse large B-cell lymphoma (DLBC), glioblastoma

multiforme (GBM) and thymoma (THYM) (Figure 3). Nevertheless, it appears to be significantly correlated with overall survival only in lung adenocarcinoma. Conversely, *cIAP1* appeared downregulated in testicular germ cell (TGCT) and uterine cancers (UCEC) (UCS). *cIAP1* and *cIAP2*-encoding genes (named *BIRC2* and *BIRC3*) are very closely located on chromosome locus 11q22.2, a region found amplified (11q21 amplicon) in human medulloblastoma, hepatic, breast, pancreatic, cervical, lung, oral squamous cell and esophageal carcinoma [55]. Conversely, multiple myeloma is associated with inactivating mutations in genes involved in non-canonical NF- $\kappa$ B signaling pathways, which include *cIAP1* and/or *cIAP2*. At the protein level, *cIAP1* expression does not emerge as a cancer prognostic factor in the cancers referenced in the human protein atlas. However, its nuclear expression has been correlated with overall survival, tumor stage or poor patient prognosis in cohorts of 70 cervical cancers [56], 102 bladder cancers [57] and 55 head and neck squamous cell carcinomas [58].



**Figure 3.** Gene expression profile interactive analysis (GEPIA) of *BIRC2* (cIAP1-encoding gene) in tumors (T, red) and normal (N, grey) samples from the cancer genome atlas (TCGA) project. Only results showing a difference in *BIRC2* expression between cancer and normal samples are shown. CHOL: Cholangio carcinoma, DLBC: Lymphoid Neoplasm Diffuse Large B-cell Lymphoma, ESCA: Esophageal carcinoma, GBM: Glioblastoma multiforme, LAML: Acute Myeloid Leukemia, LGG: Brain Lower Grade Glioma, OV: Ovarian serous cystadenocarcinoma, PAAD: Pancreatic adenocarcinoma, STAD: Stomach adenocarcinoma, TGCT: Testicular Germ Cell Tumors, THYM: Testicular Germ Cell Tumors, UCEC: Uterine Corpus Endometrial Carcinoma, UCS: Uterine Carcinosarcoma. The method for differential gene expression analysis is one-way ANOVA, \*  $p < 0.01$ .

#### 4. Cytoplasmic Functions of cIAP1

##### 4.1. Role for *cIAP1* in Regulating Innate Immunity

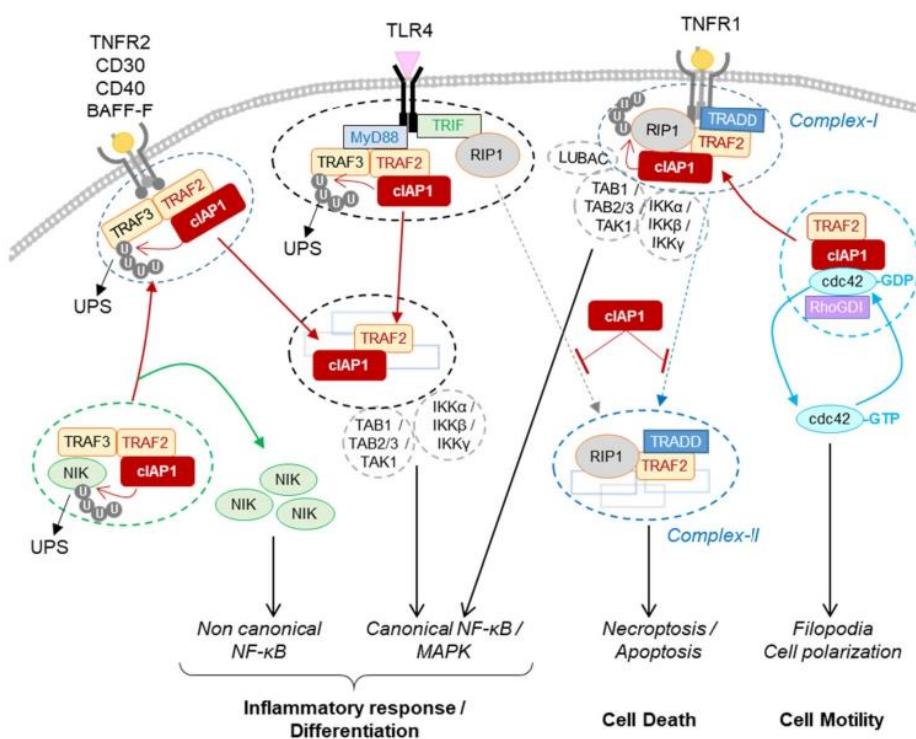
###### 4.1.1. Regulation of TNF $\alpha$ Signaling Pathways in Immune and Non-Immune Cells

The tumor necrosis factor alpha (TNF $\alpha$ ) is the master regulator of tissue homeostasis by coordinating the inflammatory response and regulating the immune system (for review, see [59]). Dysregulated TNFR-signaling pathways or sustained production of TNF $\alpha$  has been involved in the pathogenesis of many chronic inflammatory diseases and anti-TNF $\alpha$  therapy has demonstrated efficiency in the treatment of severe forms of rheumatoid arthritis, Crohn's disease, ulcerative colitis, psoriasis, psoriatic arthritis, ankylosing spondylitis and juvenile idiopathic arthritis. Conversely, neutralizing TNF $\alpha$  can also result in the onset of autoimmune disease supporting its pleiotropic functions in regulating the immune

system [59,60]. It is produced within minutes of injury or stress, mainly by monocytes and macrophages, and it exerts its activity in transmembrane or soluble, secreted forms. TNF $\alpha$  is endowed with multiples functions depending on the cellular and environmental context. Its predominant activity is to trigger the production of pro-inflammatory cytokines and chemokines. It can also stimulate the survival and differentiation of immune cells, promote their recruitment to the site of damage, and enhance the adhesion of endothelial cells. Under specific conditions, survival signals can switch to cell death signals. For example, TNF $\alpha$  can help in killing infected cells in order to contain the infection and ensure tissue integrity; it takes part in the maintenance of peripheral immune tolerance by participating to the deletion of activated T-cells [61]; it can promote the death of irreversibly damaged cells in order to ensure tissue homeostasis [59].

TNF $\alpha$  is recognized by TNFR1 expressed in all human tissues and by TNFR2, whose expression is limited to immune cells, neurons, endothelial cells, cardiomyocytes, and osteoclast precursors. It is generally admitted that TNFR1 can trigger a strong inflammatory response and/or cell death, while TNFR2 induces cell death protection and a moderate inflammation. The response to TNFR1 stimulation is orchestrated by the presence of different checkpoints. The kinase RIP1 is critical in determining the inflammatory response or cell death. It is recruited into the surface receptor-associated intracellular complex via homotypic interaction thanks to the death-domain (DD) exhibited by both the receptor (intracellular side) and RIP1 [62]. In the receptor-associated signaling complex, so-called complex I, RIP1 acts as a scaffold for the recruitment of kinase complexes including TAK1/TAB2/TAB3 and I $\kappa$ B kinase (IKK) complex that promote MAPK and NF- $\kappa$ B-mediated transcriptional programs [63] (Figure 4). This scaffolding function is fully dependent on non-degradative poly-ubiquitination including K11, K63-linked, linear and hybrid-polyubiquitination [64,65]. On the other hand, thanks to its kinase activity, RIP1 can promote the assembly of a secondary cytoplasmic complexes including complex-II, ripoptosome and necrosome that result in apoptotic or necroptotic cell death [66] (Figure 4). Necroptosis is associated with a massive release of cytokines, chemokines and damage-associated molecular patterns (DAMPs) recognized by pattern recognition receptors (PRRs) that trigger the innate immune response [67,68]. The role of TNF $\alpha$  in chronic inflammatory diseases has been explained by its capacity to activate this immunogenic cell death [60].

cIAP1 takes part in this regulation. It constitutes an essential survival factor in intestinal epithelial cells, neutrophils, macrophages and activated T cells, allowing them to resist to TNFR1-mediated cell death when exposed to an acute inflammatory environment [69–73]. Depletion of cIAPs prevents TNF $\alpha$ -mediated NF- $\kappa$ B and MAPK activation and sensitizes cells to TNF $\alpha$ -mediated cell death [74–77]. In mice, deletion of cIAP1 as well as cIAP2 or XIAP did not lead to obvious phenotypic abnormalities. A moderate inflammation in lungs and intestines was observed in cIAP1 $^{-/-}$  KO mice [78]. However, double deletion of cIAP1 and cIAP2 or cIAP1 and XIAP in mice leads to embryonic lethality in TNFR1 and RIP1-dependent manner [75] and the specific depletion of cIAP1, -2 and XIAP in myeloid lineage or keratinocytes causes a severe local inflammation and TNFR1 or RIP1-dependent cell death [71,79,80]. By controlling the stability, scaffold function and kinase activity of RIP1, cIAPs have the ability to control the intensity and duration of the TNFR1-mediated inflammatory response: (i) they activate the scaffold function by promoting the conjugation of K11 and K63-linked poly-ubiquitin chains on components of complex I that include RIP1 [43,81–83]; (ii) they can stop the TNFR1-mediating signaling pathway by the promotion of ubiquitin-dependent degradation of RIP1 [43]; (iii) alternatively, cIAP-mediated ubiquitination of RIP1 represses its kinase activity necessary for the assembly of cell-death-mediated complexes-II [43] and then prevents TNF-mediated cytotoxicity and necroptosis-associated massive inflammation [84] (Figure 4). In addition to controlling the scaffold function, kinase activity and stability of RIP1, cIAP1 can regulate the TNF $\alpha$ -mediated NF- $\kappa$ B activating signalling pathway by the ubiquitination of NEMO/IKK $\gamma$  (NF- $\kappa$ B essential modulator/I $\kappa$ B kinase- $\gamma$ ), the regulatory subunit of IKK complex [85].



**Figure 4.** Regulation of signaling pathways by cIAP1. The cIAP1-TRAF2 E3-Ubiquitin ligase complex regulates the cellular content of NIK by mediating its ubiquitin-proteasome dependent degradation. The recruitment of cIAP1/TRAF2 to TNFR2, CD30, CD40 or BAFF-R releases NIK that in turn stimulates the non-canonical NF-κB signaling pathway. In the TLR4-associated signaling complex, cIAP1 induces the ubiquitination and degradation of TRAF3. cIAP1/TRAF2 forms a secondary cytoplasmic complex leading to NF-κB / MAPK activation. In TNFR1-associated complex, cIAP1 induces the ubiquitination of RIP1 and other components of the complex, resulting in the assembly of the signaling platform driving NF-κB and MAPK activation. cIAP1-mediated ubiquitination of RIP1 inhibits its kinase activity required for the assembly of cytoplasmic RIP-containing platforms leading to apoptotic or necrotic cell death. cIAP1 controls the cycle of activation of cdc42. The recruitment of cIAP1/TRAF2 to TNFR-associated signaling complex releases cdc42 for activation. BAFF-R: B-cell activating factor receptor; CD40-R: Cluster of differentiation 40 receptor, IKK $\alpha$ ,  $\beta$  or  $\gamma$ ; Inhibitor of κB kinase  $\alpha$ ,  $\beta$  or  $\gamma$ ; LUBAC: linear ubiquitin chain assembly complex; Myd88: Myeloid differentiation primary response 88; NIK: NF-κB-inducing kinase; Rho-GDI: Rho-guanine-nucleotide dissociation inhibitors; TAB1, 2 or 3: transforming growth factor-activated kinase1-binding protein 1, 2, and 3; TAK1:tumor growth factor-β-activated kinase 1; TLR 4: toll-like receptor 4; TNFR2: tumor necrosis factor Receptor 2, TRADD: TNFR-associated death domain; TRIF: toll-interleukin 1 receptor domain-containing adaptor inducing IFN-β.

TNFR2 plays a role in promoting the differentiation and stabilization of regulatory T cells, and mutation in TNFR2 has been involved in the pathogenesis of several autoimmune diseases [60]. In endothelial cells, it participates in tissue regeneration. Since the TNFR2 protein does not harbor DD (death-domain), it cannot recruit RIP1, but it can directly bind the molecular adaptors TRAF2 and TRAF3. TRAF2 recruits cIAP1 into the TNFR2-associated signaling complex. As observed in the TNFR1-associated signaling complex, cIAP1 can promote K63-linked polyubiquitinat in at the TNFR2-signaling complex [86], resulting in the recruitment and activation of kinase complexes that drive MAPK and canonical NF-κB. However, TNFR2 stimulation likely leads to cIAPs-dependent canonical NF-κB activation [86] (see below).

#### 4.1.2. Regulation of the Non-Canonical NF- $\kappa$ B Signaling Pathway in Immune Cells, Osteoclasts and Endothelial Cells

The best characterized substrate of the cIAP1/TRAFF E3-ubiquitin ligase complex is NF- $\kappa$ B-inducing kinase (NIK), an essential mediator of the non-canonical NF- $\kappa$ B signaling pathway [34,87,88].

The non-canonical NF- $\kappa$ B signaling pathway is characterized by inducible processing of the p100 subunit in active p52 which, when heterodimerized with RelB, acts as a transcription factor. The processing of p100 is triggered following its phosphorylation by the IKK $\alpha$  homodimer, itself activated by NIK [89]. cIAP1 regulates the NF- $\kappa$ B alternative pathway by controlling the cellular content of NIK. In the resting condition, NIK is recruited to the cIAP1/TRAFF complex via TRAF3. The complex is stabilized by direct binding of NIK with the BIR2 domain of cIAP1 in IBM-dependent manner [34,38,88]. cIAP1 promotes the ubiquitin-mediated proteasomal degradation of NIK, turning off the non-canonical NF- $\kappa$ B signaling pathway [34,87,88] (Figure 4). Stimulation of TNFR2, CD30, CD40, BAFF-R (B-cell-activating factor) or FN14 leads to the recruitment of TRAF2/TRAFF/cIAP1 complex to membrane-associated signaling complex [37,90–93]. TRAF2 induced cIAP1 activation via K63-linked ubiquitination. In turn, cIAP1 catalyzes K43-linked ubiquitination of TRAF2/3 and their degradation by the proteasome system, resulting in upregulation of NIK and activation of non-canonical NF- $\kappa$ B signaling [34].

Non-canonical NF- $\kappa$ B signaling is essential for the activation, survival and differentiation of immune cells such as B-cells, macrophages and dendritic cells. Deletion of cIAP1 and cIAP2 in mice maintained B-cells survival and maturation independent of BAFF-R stimulation [91], and can account for B-cell transformation [94–96]. We demonstrated that cIAP1-mediated degradation of TRAF2 is essential for the full activity of macrophages in response to CD40 stimulation [45]. IAP antagonists can also favor osteoclasts differentiation in a NIK-dependent manner, supporting the critical role of the non-canonical NF- $\kappa$ B signaling pathway in osteoclastogenesis [97].

#### 4.1.3. Regulation of PRR Signaling Pathways

The presence of pathogens in an organism is sensed by cell surface and intracellular receptors able to recognize a wide variety of pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) and danger signals (DAMPs). Among them, the cell surface membrane TLR4, which recognizes bacteria lipopolysaccharides (LPS) can elicit distinct signaling pathways leading to either pro-inflammatory or interferon response. TLR4 engagement induces the recruitment of several cytoplasmic adaptor proteins thanks to the presence, in both the receptors and adaptors, of a homotypic interacting domain. The adaptor MyD88 (myeloid differentiation factor 88) has been involved in NF- $\kappa$ B and MAPK-dependent production of pro-inflammatory cytokines, whereas the adaptor TRIF (TIR-domain-containing adaptor-inducing IFN- $\beta$ ) is required for the IFN response. The cIAP1/TRAFF E3-ubiquitin ligase complex is a potent determinant of the response to TLR4 stimulation. MyD-88 can directly recruit the adaptor TRAF3 which can bind the TRAF2/cIAP1 complex. In the MyD88-containing TLR4 complex (so-called Myddosome), the cIAP1/TRAFF E3-ubiquitin ligase complex induces the ubiquitination and degradation of TRAF3, which results in the assembly of a secondary cytoplasmic signaling platform containing TRAF2/cIAP1, TAK1/TAB1-3 and IKK complexes leading to the activation of MAPK (Mitogen-activated protein kinases) and NF- $\kappa$ B (nuclear factor-kappa B)-signaling pathways [98–100] (Figure 4). Depletion of TRAF3 can also turn-off the IFN response that is involved in the TRAF6/TRAFF complex.

In some situations, such as a sustained infection, the presence of pathogens resistant to inflammatory defense, or in some pathological conditions, TLR4, just like TLR3, which senses virus-derived nucleic acids, can also trigger RIP1-dependent cell death through a direct binding of RIP1 to the adaptor TRIF. cIAP1 constitutes a powerful survival factor in infected cells by preventing the assembly of ripoptosome and necrosome as explained above (4.1.1) [68,80].

Supporting the role of IAPs in controlling the strength and duration of the inflammatory response, Jin et al. showed that the cIAP1/TRAF2 complex can limit inflammation by promoting the ubiquitin-proteasome dependent degradation of c-Rel and IRF5 (interferon-responsive factor 5), two critical transcription factors involved in TLR-mediated NF- $\kappa$ B-dependent inflammatory and IFN response respectively. Depletion of TRAF2 in macrophages promoted colitis characterized by enhanced leukocyte infiltration in colon, mucosal damage and pro-inflammatory cytokines production in an animal model [35].

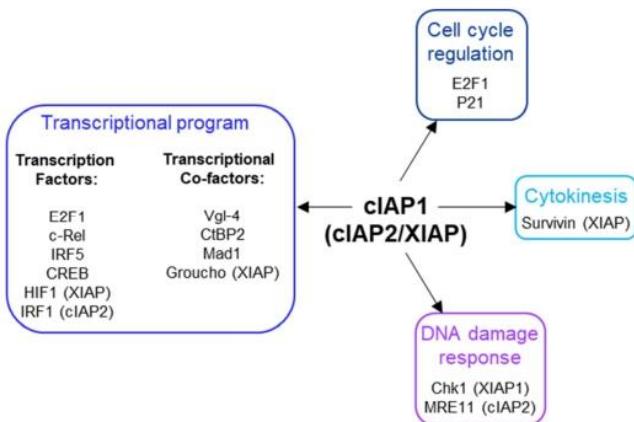
#### 4.2. Role for cIAP1 in Cell Motility and Migration

Cell shape and cell motility are controlled by small GTPases of the Rho family. These proteins are critical regulators of the dynamic reorganization of the actin cytoskeleton [101–103]. They control cell architecture, focal adhesion complexes and local contraction by promoting the generation of stress fibers or membrane protrusions such as lamellipodia or filopodia [104]. They switch between a cytoplasmic, inactive GDP-bound state and a membrane-associated, active GTP-bound state, providing energy required for cytoskeleton rearrangement. RhoGTPase activation is mediated by guanine-nucleotide exchange factors (GEFs), which catalyze the transfer of GDP-bound to GTP-bound forms. Once activated, RhoGTPases are either recycled in inactive state by the action of GTPase-activation proteins (GAPs) or subjected to UPS-mediated degradation. The activation cycle of Rho GTPase is controlled by molecular chaperones such as guanine-nucleotide dissociation inhibitors (GDIs) which stabilize Rho GTPases in their cytosolic inactive state [104]. A relationship between IAPs and RhoGTPases was suggested in 2004 in a study showing that drosophila DIAP1 can interact with Rac1 and compensate for the migration defect triggered by the expression of a dominant negative form of this GTPase [105]. In mammals, in vitro assays have demonstrated that cIAP1, cIAP2 and XIAP are able to directly interact with the three most studied RhoGTPases [106–109] RhoA, Rac1 and cdc42, which promote lamellipodia, stress fibers or filopodia, respectively. In a study analysing the influence of cIAP1 on cell shape and migration, we demonstrated that cIAP1 can directly bind cdc42. It stabilizes cdc42 in its GDP-, inactive-state by promoting its association with its molecular chaperone RhoGDI. Deletion of cIAP1 deregulated the activation cycle of cdc42 by promoting its activation and then degradation [106]. Accordingly, cIAP1<sup>-/-</sup> fibroblasts display an enhanced ability to migrate and exhibit filopodia. TNF $\alpha$  has the ability to induce cdc42 activation and actin reorganisation [102,103]. Upon TNF $\alpha$  stimulation, cIAP1 is recruited to the membrane receptor-associated complex, releasing cdc42 and promoting its activation [106] (Figure 4). The ubiquitination of cdc42 by cIAP1 has not been demonstrated; however, the ability of XIAP to ubiquitinate cdc42 and of XIAP and cIAP1 to ubiquitinate Rac1 has been observed [107,110]. Single or combined deletion of cIAP1, cIAP2 or XIAP differently affects cell shape, actin distribution and migratory capacity. They appear to have specific and distinct activity on each of the Rho proteins, suggesting that IAPs could regulate the spatiotemporal and sequential activation of Rho proteins [111]. Additional analysis will be required to decipher the regulation of the Rho proteins by IAPs.

#### 5. Nuclear Functions of cIAP1

cIAP1 is a nuclear shuttling protein. Its nuclear expression has been correlated with the proliferative capacity of the cells. cIAP1 is excluded from the nucleus in cells undergoing differentiation [50]. Nuclear export is supported by the nuclear transport receptor Crm1 (chromosome region maintenance 1), which specifically recognizes leucine-rich nuclear export sequences (NES). Two NES were detected in the cIAP1 protein sequence. The first is located in the linked region between the BIR2 and the BIR3 [46] and the second in the CARD domain (Figure 1) [50]. These NES sequences are not conserved in cIAP2. Since cIAP1, as well as the cIAP2 and XIAP proteins do not contain NLS, an important issue is to understand the mechanisms of their nuclear accumulation. They could bind NLS-containing proteins. In the nucleus of B-cell, cIAP1 is complexed with TRAF2 and TRAF3, the latter containing a functional NLS in its TRAF-C domain [39]. Overexpression

of the transcription cofactor Vestigial-like 4 (Vgl-4) have been shown to promote the nuclear translocation of cIAP2 [112], and the overexpression of the XIAP, cIAP1 and cIAP2-binding protein XAF1 (XIAP-associated factor 1) [113] triggered the nuclear retention of XIAP [51]. Intracellular protein movements are likely accompanied by post-translational modifications. Modifications of cIAP1 by ubiquitination, phosphorylation, S-nitrosylation and oxidation have been reported [114–116], but their roles in its subcellular distribution have not been investigated. Although cIAP1 has been found in cell nuclei in many tissues (Table 1), its nuclear functions remain poorly documented (Figure 5).



**Figure 5.** Nuclear partners of cIAP1, cIAP2 and XIAP.

### 5.1. Regulation of Cytokinesis

In 2005, Samuel et al. showed that overexpression of cIAP1 increased the proportion of cells in the G2-M phase of the cell cycle and of polyploid cells, suggesting that cIAP1 could affect chromosome segregation. cIAP1 was observed in the midbody structures at the telophase where it colocalizes with Survivin. The binding of XIAP with survivin has also been reported [113]. Survivin is the smallest IAP member involved in chromosome segregation and cytokinesis [117]. Much work remains to be done to understand the role played by cIAP1 and XIAP in the regulation of cytokinesis.

### 5.2. Regulation of Transcriptional Program

We demonstrated that cIAP1 engages with chromatin. Different transcription factors are ubiquitination substrates of cIAP1. In 2011, the research of nuclear partners of cIAP1 revealed its binding with the transcription factor E2F1 [118]. This involves the cIAP1-BIR3 domain [17]. We demonstrated that cIAP1 and E2F1 are recruited together to the promoter of E2F-target genes [118]. Nuclear cIAP1 can promote K11- and K63-linked ubiquitination of E2F1 [17] and stabilize its protein expression. cIAP1-mediated K63-ubiquitination at Lysine 161/164 residues of E2F1 is required for its accumulation and transcriptional activation in the S phase of the cell cycle and in response to DNA damage [119]. Deletion of cIAP1 completely abrogated the binding of E2F1 onto DNA [17], suggesting that ubiquitin chains could act as a signal for the recruitment of the transcription factor to DNA. However, the underlying molecular mechanisms are not known. Of interest, the Lysine 161/164 residues are located in the DNA-binding domain of E2F1. The activation of the hypoxia inducible factor HIF1 that is responsible for adapting the transcriptional program in response to hypoxia is also controlled by K63-linked ubiquitination. In 2017, Park et al. demonstrated that XIAP can promote this modification, which results in the nuclear accumulation of the HIF1 $\alpha$  subunit and the expression of the HIF1-responsive gene [120]. The ability of cIAP2 to stimulate the transcriptional program via non-degrading ubiquitination has also been reported. In 2014, Harikumar et al. demonstrated that IL-1 stimulation triggers the cIAP2-mediated K63-linked ubiquitination of IRF1-(interferon-regulatory factor1) resulting in activation and subsequent expression of IRF1-target genes. IL-1 induced the assembly

of a signaling complex containing cIAP2, the adaptor TRAF6, the sphingosine kinase SphK1 and IRF-1. In the complex, SphK1 activation induced the local production of the bioactive lipid S1P (Sphingosine-1-Phosphate) which acts as a cofactor for cIAP2 E3 ligase activity [121]. The nuclear expression of cIAP2 and XIAP does not seem required for the modification of IRF1 or HIF1 $\alpha$ .

As mentioned above, cIAP1/TRAF2 E3-ubiquitine ligase complex is able to promote ubiquitination and degradation of the transcription factors c-Rel and IRF5 [35] and also the cAMP response element binding protein CREB [39]. The degradation of CREB in B-cells occurs in the nucleus and involves TRAF3, which bridges CREB to the E3-ubiquitine ligase complex [39]. Interestingly, CD40L stimulation in neurons has been observed to induce the translocation of TRAF2/TRAF3 complex into the nucleus where it can bind the NF- $\kappa$ B promoter element and act as a transcriptional regulator [122]. The presence of cIAPs in the complex was not analyzed.

cIAP1 can also indirectly modulate the activity of transcription factors c-myc by promoting the UPS-mediated degradation of its repressor Mad1 (Max dimerization protein 1) [123]. The authors suggest that cIAP1 could cooperate with c-myc to drive tumorigenesis. Since Mad1 is exclusively expressed in the nucleus, this is consistent with the nuclear localization of cIAP1 in the nucleus of tumor cells. Recently, a novel strategy for specifically inhibiting the E3-ubiquitine ligase activity of cIAP1 has been developed. Contrarily to the Smac mimetics which, by inducing a short pulse of cIAP1 activation prior to its degradation, destabilize Mad1 and thus promote c-myc activation, these novel compounds promote c-myc degradation [124].

cIAP1 is also able to bind the transcriptional cofactors Vestigial-like 4 (Vgl-4) [112]; and cIAP1, cIAP2 and XIAP can bind and modulate the stability of C-terminal binding protein 2 (CtBP2) [125].

In the nucleus, XIAP was detected associated to TCF/Lef transcriptional complexes whose expression is controlled by  $\beta$ -catenin.  $\beta$ -catenin moves the Groucho (Gro)/TLE transcriptional repressor and recruits a coactivator complex to enable TCF/Lef expression. When bound to TCF/Lef, XIAP can promote the monoubiquitination of GRO/TLE, which facilitates its detachment from TCF/Lef and favors the activation of the transcriptional program [126].

### 5.3. Cell Cycle Regulation

In addition to E2F1 that is essential for G1-S phase transition, the cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitor p21 is a potential substrate of cIAP1. p21 is well known for its ability to arrest cell cycle progression in G1/S and G2/M transition by inhibiting CDK4/6/cyclin D and CDK2/Cyclin E complexes, respectively. Its half-life is regulated by post-translational modifications that included phosphorylation, ubiquitination and neddylation [127]. cIAP1 and cIAP2 can interact with p21. Downregulation of cIAP1 but not cIAP2 upregulated p21; however, it did not modify the ubiquitination profile of p21 but it did modify that of neddylation. The capacity of cIAP1 to directly induce ubiquitination or neddylation of p21 was not determined [128]. The subcellular localization of the cIAP-p21 interaction was not determined, however, because p21 is likely expressed in the nucleus; the capacity of cIAP1 to regulate p21 is consistent with its nuclear localization.

### 5.4. DNA Damage Response

A shRNA-based screening of ubiquitination-associated genes involved in DNA repair highlighted BIRC2 (cIAP1-encoding gene) and BIRC3 (cIAP2-encoding gene), the downregulation of which modulated chk1 activation [129]. Chk1 is a well known DNA damage sensor, preventing progression of cells into the cell cycle by promoting G2 arrest. Its protein sequence contains an IBM located just upstream of the initiator Methionine [130]. The ability of XIAP and also cIAP1 to interact with chk1 has been confirmed [130]. In the presence of XAF1, XIAP can promote chk1 degradation [131].

A role for cIAP2 in DNA damage response was also shown by Nicholson et al. in 2017 [132]. cIAP2 can complex with MRE11, a nuclease involved in homologous recombination (HR) and microhomology-mediated end-joining (MMEJ) repair pathways. cIAP2 was identified as an E3-ubiquitin ligase able to regulate the MRE11 protein level in cells exposed to HDAC (Histone deacetylase) inhibitors [132].

## 6. Conclusions

cIAP1 mainly exerts its activity by controlling the cell fate of its protein partners. Thanks to their ability to promote the conjugation of ubiquitin chains of different types, they can modulate the stability, localization and/or the activity of intracellular proteins and can change the composition of signaling platforms by modifying the intermolecular binding affinities. Thus, IAPs have the ability to control the implementation of signaling pathways and their regulations in time and space. To date, more than 30 cIAP substrates have been identified (recently reviewed in [15]). A database search for proteins containing IBM-like sequences found many proteins with different cellular functions [133], greatly expanding the number of potential IAP-binding partners. The identified IAP substrates are involved in various cellular processes essential for maintaining cell homeostasis (innate immune response, DNA damage response, cell cycle regulation). For most of them, the type and site of ubiquitination have not been determined. However, this is an important issue to address since they determine the cellular fate of the substrate [43].

The ultimate function of IAPs is to allow cells to adapt to their changing environment, to help implement an appropriate response to combat endogenous or exogenous stress or microbial aggression, and to restore homeostasis. Although loss of cIAP1 in mice has been associated with locale inflammation in lung, intestines or skin [78,79], deletion or mutation of the BIRC2/3 gene has not been associated with chronic inflammatory disease but has with cancer development. More in-depth studies of the implication of cIAPs in these pathologies deserve to be carried out. Most studies have focused on analyzing the role of cIAPs in innate immunity and in regulating cell surface receptor signaling pathways. However, consistent with their nuclear expression in cells in many tissues, their functions in the nucleus, in particular as a transcriptional regulator, may have been underestimated.

The expression of cIAP1 is ubiquitous and its regulation mechanisms are still poorly understood. The last observations suggest that cIAP1 and TRAF2 require each other and form an E3-ubiquitin ligase complex. cIAP1 E3-ligase activity is stimulated by K63-linked ubiquitination that can be mediated by TRAF2 or TRAF6 [34,98]. The stability of cIAP1 can be controlled by phosphorylation [114], and its regulation by S-nitrosylation and oxidation processes have also been reported [115,116]. One important issue to address concerns the mechanisms of regulation of the subcellular localization of cIAP1.

Smac mimetics designed to block XIAP anti-apoptotic activity are also potent inhibitors of cIAP1 by promoting its proteasome-mediated degradation. They have been developed as anticancer agents. However, because of the ability of cIAP1 to regulate RIP1 activities, numerous preclinical studies are exploring their potential in the treatment of inflammatory and infectious diseases.

**Author Contributions:** The authors contributed equally to this work. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** Our work is supported by grants from “La Ligue contre le cancer” Comité de la Côte d’Or or the “Conseil Régional de Bourgogne-Franche-Comté”, the French National research Agency, (“Investissements d’Avenir” program ANR-11-LABX-0021), the European Union program FEDER, and fellowships from the “Ministère de l’Enseignement Supérieur et de la Recherche” of France (AZ).

**Data Availability Statement:** We use the human protein atlas (Human Protein Atlas proteinatlas.org), Gene expression profiling interactive analysis (GEPIA) (<http://gepia.cancer-pku.cn/>, accessed on 23 January 2022) and the cancer genome atlas (TCGA) to analyze the cellular and tissue distribution of IAPs.

**Conflicts of Interest:** The authors declare that they have no conflict of interest.

## References

- Crook, N.E.; Clem, R.J.; Miller, L.K. An apoptosis-inhibiting baculovirus gene with a zinc finger-like motif. *J. Virol.* **1993**, *67*, 2168–2174. [CrossRef] [PubMed]
- Liston, P.; Roy, N.; Tamai, K.; Lefebvre, C.; Baird, S.; Cherton-Horvat, G.; Farahani, R.; McLean, M.; Ikeda, J.E.; MacKenzie, A.; et al. Suppression of apoptosis in mammalian cells by NAIP and a related family of IAP genes. *Nature* **1996**, *379*, 349–353. [CrossRef] [PubMed]
- Vucic, D.; Stennicke, H.R.; Pisabarro, M.T.; Salvesen, G.S.; Dixit, V.M. ML-IAP, a novel inhibitor of apoptosis that is preferentially expressed in human melanomas. *Curr. Biol.* **2000**, *10*, 1359–1366. [CrossRef]
- Vucic, D.; Kaiser, W.J.; Harvey, A.J.; Miller, L.K. Inhibition of reaper-induced apoptosis by interaction with inhibitor of apoptosis proteins (IAPs). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 10183–10188. [CrossRef] [PubMed]
- Deveraux, Q.L.; Takahashi, R.; Salvesen, G.S.; Reed, J.C. X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. *Nature* **1997**, *388*, 300–304. [CrossRef]
- Takahashi, R.; Deveraux, Q.; Tamm, I.; Welsh, K.; Assa-Munt, N.; Salvesen, G.S.; Reed, J.C. A single BIR domain of XIAP sufficient for inhibiting caspases. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 7787–7790. [CrossRef]
- Chai, J.; Shiozaki, E.; Srinivasula, S.M.; Wu, Q.; Datta, P.; Alnemri, E.S.; Shi, Y. Structural basis of caspase-7 inhibition by XIAP. *Cell* **2001**, *104*, 769–780. [CrossRef]
- Chai, J.; Du, C.; Wu, J.W.; Kyin, S.; Wang, X.; Shi, Y. Structural and biochemical basis of apoptotic activation by Smac/DIABLO. *Nature* **2000**, *406*, 855–862. [CrossRef]
- Hegde, R.; Srinivasula, S.M.; Zhang, Z.; Wassell, R.; Mukattash, R.; Cilenti, L.; DuBois, G.; Lazebnik, Y.; Zervos, A.S.; Fernandes-Alnemri, T.; et al. Identification of Omi/HtrA2 as a mitochondrial apoptotic serine protease that disrupts inhibitor of apoptosis protein-caspase interaction. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 432–438. [CrossRef]
- Verhagen, A.M.; Silke, J.; Ekert, P.G.; Pakusch, M.; Kaufmann, H.; Connolly, L.M.; Day, C.L.; Tikoo, A.; Burke, R.; Wrobel, C.; et al. HtrA2 promotes cell death through its serine protease activity and its ability to antagonize inhibitor of apoptosis proteins. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 445–454. [CrossRef]
- Morrish, E.; Brumatti, G.; Silke, J. Future Therapeutic Directions for Smac-Mimetics. *Cells* **2020**, *9*, 406. [CrossRef] [PubMed]
- Uren, A.G.; Pakusch, M.; Hawkins, C.J.; Puls, K.L.; Vaux, D.L. Cloning and expression of apoptosis inhibitory protein homologs that function to inhibit apoptosis and/or bind tumor necrosis factor receptor-associated factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 4974–4978. [CrossRef]
- Peltzer, N.; Dardign, M.; Walczak, H. Holding RIPK1 on the Ubiquitin Leash in TNFR1 Signaling. *Trends Cell Biol.* **2016**, *26*, 445–461. [CrossRef]
- Estornes, Y.; Bertrand, M.J. IAPs, regulators of innate immunity and inflammation. *Semin. Cell Dev. Biol.* **2015**, *39*, 106–114. [CrossRef] [PubMed]
- Demetier, B.; Zadoroznyj, A.; Dubrez, L. IAP-Mediated Protein Ubiquitination in Regulating Cell Signaling. *Cells* **2020**, *9*, 1118. [CrossRef] [PubMed]
- Wang, D.; Berglund, A.E.; Kenchappa, R.S.; MacAulay, R.J.; Mulé, J.J.; Etame, A.B. BIRC3 is a biomarker of mesenchymal habitat of glioblastoma, and a mediator of survival adaptation in hypoxia-driven glioblastoma habitats. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 9350. [CrossRef] [PubMed]
- Allègre, J.; Cartier, J.; Glorian, V.; Droin, N.; Demetier, B.; Kayaci, C.; Berthelet, J.; Gemble, S.; Vuillier, C.; Maillet, L.; 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*, e0206253. [CrossRef]
- Warnakulasuriyarakchchi, D.; Cerquozzi, S.; Cheung, H.H.; Holcik, M. Translational induction of the inhibitor of apoptosis protein HIAP2 during endoplasmic reticulum stress attenuates cell death and is mediated via an inducible internal ribosome entry site element. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 17148–17157. [CrossRef]
- Riley, A.; Jordan, L.E.; Holcik, M. Distinct 5' UTRs regulate XIAP expression under normal growth conditions and during cellular stress. *Nucleic Acids Res.* **2010**, *38*, 4665–4674. [CrossRef]
- Van Eden, M.E.; Byrd, M.P.; Sherrill, K.W.; Lloyd, R.E. Translation of cellular inhibitor of apoptosis protein 1 (c-IAP1) mRNA is IRES mediated and regulated during cell stress. *RNA* **2004**, *10*, 469–481. [CrossRef]
- Didelot, C.; Lanneau, D.; Brunet, M.; Bouchot, A.; Cartier, J.; Jacquel, A.; Ducoroy, P.; Cathelin, S.; Decologne, N.; Chiosis, G.; et al. Interaction of heat-shock protein 90 beta isoform (HSP90 beta) with cellular inhibitor of apoptosis 1 (c-IAP1) is required for cell differentiation. *Cell Death Differ.* **2008**, *15*, 859–866. [CrossRef] [PubMed]
- Marivin, A.; Berthelet, J.; Plenckette, S.; Dubrez, L. The Inhibitor of Apoptosis (IAPs) in Adaptive Response to Cellular Stress. *Cells* **2012**, *1*, 711–737. [CrossRef] [PubMed]
- Zender, L.; Spector, M.S.; Xue, W.; Flemming, P.; Cordon-Cardo, C.; Silke, J.; Fan, S.T.; Luk, J.M.; Wigler, M.; Hannon, G.J.; et al. Identification and validation of oncogenes in liver cancer using an integrative oncogenomic approach. *Cell* **2006**, *125*, 1253–1267. [CrossRef] [PubMed]
- Ma, O.; Cai, W.W.; Zender, L.; Dayaram, T.; Shen, J.; Herron, A.J.; Lowe, S.W.; Man, T.K.; Lau, C.C.; Donehower, L.A. MMP13, Birc2 (cIAP1), and Birc3 (cIAP2), amplified on chromosome 9, collaborate with p53 deficiency in mouse osteosarcoma progression. *Cancer Res.* **2009**, *69*, 2559–2567. [CrossRef] [PubMed]

25. Cheng, L.; Zhou, Z.; Flesken-Nikitin, A.; Toshkov, I.A.; Wang, W.; Camps, J.; Ried, T.; Nikitin, A.Y. Rb inactivation accelerates neoplastic growth and substitutes for recurrent amplification of cIAP1, cIAP2 and Yap1 in sporadic mammary carcinoma associated with p53 deficiency. *Oncogene* **2010**, *29*, 5700–5711. [CrossRef] [PubMed]
26. Budhidarmo, R.; Day, C.L. IAPs: Modular regulators of cell signalling. *Semin. Cell Dev. Biol.* **2015**, *39*, 80–90. [CrossRef] [PubMed]
27. Samuel, T.; Welsh, K.; Lober, T.; Togo, S.H.; Zapata, J.M.; Reed, J.C. Distinct BIR domains of cIAP1 mediate binding to and ubiquitination of tumor necrosis factor receptor-associated factor 2 and second mitochondrial activator of caspases. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 1080–1090. [CrossRef]
28. Zheng, C.; Kabaleeswaran, V.; Wang, Y.; Cheng, G.; Wu, H. Crystal structures of the TRAF2: cIAP2 and the TRAF1: TRAF2: cIAP2 complexes: Affinity, specificity, and regulation. *Mol. Cell* **2010**, *38*, 101–113. [CrossRef]
29. Mace, P.D.; Smits, C.; Vaux, D.L.; Silke, J.; Day, C.L. Asymmetric recruitment of cIAPs by TRAF2. *J. Mol. Biol.* **2010**, *400*, 8–15. [CrossRef]
30. Zheng, N.; Shabek, N. Ubiquitin Ligases: Structure, Function, and Regulation. *Annu. Rev. Biochem.* **2017**, *86*, 129–157. [CrossRef]
31. Nakatani, Y.; Kleffmann, T.; Linke, K.; Condon, S.M.; Hinds, M.G.; Day, C.L. Regulation of ubiquitin transfer by XIAP, a dimeric RING E3 ligase. *Biochem. J.* **2013**, *450*, 629–638. [CrossRef] [PubMed]
32. Phillips, A.H.; Schoeffler, A.J.; Matsui, T.; Weiss, T.M.; Blankenship, J.W.; Zobel, K.; Giannetti, A.M.; Dueber, E.C.; Fairbrother, W.J. Internal motions prime cIAP1 for rapid activation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2014**, *21*, 1068–1074. [CrossRef] [PubMed]
33. Dueber, E.C.; Schoeffler, A.J.; Lingel, A.; Elliott, J.M.; Fedorova, A.V.; Giannetti, A.M.; Zobel, K.; Maurer, B.; Varfolomeev, E.; Wu, P.; et al. Antagonists induce a conformational change in cIAP1 that promotes autoubiquitination. *Science* **2011**, *334*, 376–380. [CrossRef]
34. Vallabhapurapu, S.; Matsuzawa, A.; Zhang, W.; Tseng, P.H.; Keats, J.J.; Wang, H.; Vignali, D.A.; Bergsagel, P.L.; Karin, M. Nonredundant and complementary functions of TRAF2 and TRAF3 in a ubiquitination cascade that activates NIK-dependent alternative NF- $\kappa$ B signaling. *Nat. Immunol.* **2008**, *9*, 1364–1370. [CrossRef] [PubMed]
35. Jin, J.; Xiao, Y.; Hu, H.; Zou, Q.; Li, Y.; Gao, Y.; Ge, W.; Cheng, X.; Sun, S.C. Proinflammatory TLR signalling is regulated by a TRAF2-dependent proteolysis mechanism in macrophages. *Nat. Commun.* **2015**, *6*, 5930. [CrossRef] [PubMed]
36. Csomas, R.A.; Brady, G.F.; Duckett, C.S. Enhanced cytoprotective effects of the inhibitor of apoptosis protein cellular IAP1 through stabilization with TRAF2. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 20531–20539. [CrossRef] [PubMed]
37. Csomas, R.A.; Wright, C.W.; Galban, S.; Oetjen, K.A.; Duckett, C.S. Two distinct signalling cascades target the NF- $\kappa$ B regulatory factor c-IAP1 for degradation. *Biochem. J.* **2009**, *420*, 83–91. [CrossRef]
38. Lee, S.; Challa-Malladi, M.; Bratton, S.B.; Wright, C.W. Nuclear factor- $\kappa$ B-inducing kinase (NIK) contains an amino-terminal inhibitor of apoptosis (IAP)-binding motif (IBM) that potentiates NIK degradation by cellular IAP1 (c-IAP1). *J. Biol. Chem.* **2014**, *289*, 30680–30689. [CrossRef]
39. Mambetsariev, N.; Lin, W.W.; Stunz, L.L.; Hanson, B.M.; Hildebrand, J.M.; Bishop, G.A. Nuclear TRAF3 is a negative regulator of CREB in B cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2016**, *113*, 1032–1037. [CrossRef]
40. Blankenship, J.W.; Varfolomeev, E.; Goncharov, T.; Fedorova, A.V.; Kirkpatrick, D.S.; Izrael-Tomasevic, A.; Phu, L.; Arnott, D.; Aghajan, M.; Zobel, K.; et al. Ubiquitin binding modulates IAP antagonist-stimulated proteasomal degradation of c-IAP1 and c-IAP2(1). *Biochem. J.* **2009**, *417*, 149–160. [CrossRef]
41. Gyrd-Hansen, M.; Dardig, M.; Miasari, M.; Santoro, M.M.; Zender, L.; Xue, W.; Tenev, T.; da Fonseca, P.C.; Zvelebil, M.; Bujnicki, J.M.; et al. IAPs contain an evolutionarily conserved ubiquitin-binding domain that regulates NF- $\kappa$ B as well as cell survival and oncogenesis. *Nat. Cell Biol.* **2008**, *10*, 1309–1317. [CrossRef] [PubMed]
42. Budhidarmo, R.; Day, C.L. The ubiquitin-associated domain of cellular inhibitor of apoptosis proteins facilitates ubiquitylation. *J. Biol. Chem.* **2014**, *289*, 25721–25736. [CrossRef] [PubMed]
43. Annibaldi, A.; Wicky John, S.; Vanden Berghe, T.; Swatek, K.N.; Ruan, J.; Liccardi, G.; Bianchi, K.; Elliott, P.R.; Choi, S.M.; Van Coillie, S.; et al. Ubiquitin-Mediated Regulation of RIPK1 Kinase Activity Independent of IKK and MK2. *Mol. Cell* **2018**, *69*, 566–580.e565. [CrossRef] [PubMed]
44. Lopez, J.; John, S.W.; Tenev, T.; Rautureau, G.J.; Hinds, M.G.; Francalanci, F.; Wilson, R.; Broemer, M.; Santoro, M.M.; Day, C.L.; et al. CARD-mediated autoinhibition of cIAP1's E3 ligase activity suppresses cell proliferation and migration. *Mol. Cell* **2011**, *42*, 569–583. [CrossRef] [PubMed]
45. Dupoux, A.; Cartier, J.; Cathelin, S.; Filomenko, R.; Solary, E.; Dubrez-Daloz, L. cIAP1-dependent TRAF2 degradation regulates the differentiation of monocytes into macrophages and their response to CD40 ligand. *Blood* **2009**, *113*, 175–185. [CrossRef]
46. Vischioni, B.; Giaccone, G.; Span, S.W.; Krugt, F.A.; Rodriguez, J.A. Nuclear shuttling and TRAF2-mediated retention in the cytoplasm regulate the subcellular localization of cIAP1 and cIAP2. *Exp. Cell Res.* **2004**, *298*, 535–548. [CrossRef]
47. Uhlén, M.; Fagerberg, L.; Hallström, B.M.; Lindskog, C.; Oksvold, P.; Mardinoglu, A.; Sivertsson, Å.; Kampf, C.; Sjöstedt, E.; Asplund, A.; et al. Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. *Science* **2015**, *347*, 1260419. [CrossRef]
48. Thul, P.J.; Åkesson, L.; Wiklund, M.; Mahdessian, D.; Geladaki, A.; Ait Blal, H.; Alm, T.; Asplund, A.; Björk, L.; Breckels, L.M.; et al. A subcellular map of the human proteome. *Science* **2017**, *356*, 3321. [CrossRef]
49. Wang, Y.; Suominen, J.S.; Parvinen, M.; Rivero-Muller, A.; Kiiveri, S.; Heikinheimo, M.; Robbins, I.; Toppari, J. The regulated expression of c-IAP1 and c-IAP2 during the rat seminiferous epithelial cycle plays a role in the protection of germ cells from Fas-mediated apoptosis. *Mol. Cell Endocrinol.* **2005**, *245*, 111–120. [CrossRef]

50. Plenchette, S.; Cathelin, S.; Rebe, C.; Launay, S.; Ladoire, S.; Sordet, O.; Ponnelle, T.; Debili, N.; Phan, T.H.; Padua, R.A.; et al. Translocation of the inhibitor of apoptosis protein c-IAP1 from the nucleus to the Golgi in hematopoietic cells undergoing differentiation: A nuclear export signal-mediated event. *Blood* **2004**, *104*, 2035–2043. [[CrossRef](#)]
51. Liston, P.; Fong, W.G.; Kelly, N.L.; Toji, S.; Miyazaki, T.; Conte, D.; Tamai, K.; Craig, C.G.; McBurney, M.W.; Korneluk, R.G. Identification of XAF1 as an antagonist of XIAP anti-Caspase activity. *Nat. Cell Biol.* **2001**, *3*, 128–133. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Russell, J.C.; Whiting, H.; Szulfit, N.; Hossain, M.A. Nuclear translocation of X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) determines cell fate after hypoxia ischemia in neonatal brain. *J. Neurochem.* **2008**, *106*, 1357–1370. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Zhang, Y.; Zhu, J.; Tang, Y.; Li, F.; Zhou, H.; Peng, B.; Zhou, C.; Fu, R. X-linked inhibitor of apoptosis positive nuclear labeling: A new independent prognostic biomarker of breast invasive ductal carcinoma. *Diagn. Pathol.* **2011**, *6*, 49. [[CrossRef](#)]
54. Tang, Z.; Li, C.; Kang, B.; Gao, G.; Zhang, Z. GEPIA: A web server for cancer and normal gene expression profiling and interactive analyses. *Nucleic Acids Res.* **2017**, *45*, W98–W102. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Dubrez, L.; Berthelet, J.; Glorian, V. IAP proteins as targets for drug development in oncology. *OncoTargets Ther.* **2013**, *9*, 1285–1304. [[CrossRef](#)]
56. Imoto, I.; Tsuda, H.; Hirasawa, A.; Miura, M.; Sakamoto, M.; Hirohashi, S.; Inazawa, J. Expression of cIAP1, a target for 11q22 amplification, correlates with resistance of cervical cancers to radiotherapy. *Cancer Res.* **2002**, *62*, 4860–4866.
57. Che, X.; Yang, D.; Zong, H.; Wang, J.; Li, X.; Chen, F.; Chen, X.; Song, X. Nuclear cIAP1 overexpression is a tumor stage- and grade-independent predictor of poor prognosis in human bladder cancer patients. *Urol. Oncol.* **2012**, *30*, 450–456. [[CrossRef](#)]
58. Tanimoto, T.; Tsuda, H.; Imazeki, N.; Ohno, Y.; Imoto, I.; Inazawa, J.; Matsubara, O. Nuclear expression of cIAP-1, an apoptosis inhibiting protein, predicts lymph node metastasis and poor patient prognosis in head and neck squamous cell carcinomas. *Cancer Lett.* **2005**, *224*, 141–151. [[CrossRef](#)]
59. Holbrook, J.; Lara-Reyna, S.; Jarosz-Griffiths, H.; McDermott, M. Tumour necrosis factor signalling in health and disease. *F1000Res* **2019**, *8*. [[CrossRef](#)]
60. Tseng, W.Y.; Huang, Y.S.; Lin, H.H.; Luo, S.F.; McCann, F.; McNamee, K.; Clanchy, F.; Williams, R. TNFR signalling and its clinical implications. *Cytokine* **2018**, *101*, 19–25. [[CrossRef](#)]
61. Zhang, M.; Wang, J.; Jia, L.; Huang, J.; He, C.; Hu, F.; Yuan, L.; Wang, G.; Yu, M.; Li, Z. Transmembrane TNF- $\alpha$  promotes activation-induced cell death by forward and reverse signaling. *Oncotarget* **2017**, *8*, 63799–63812. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. He, S.; Wang, X. RIP kinases as modulators of inflammation and immunity. *Nat. Immunol.* **2018**, *19*, 912–922. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Annibaldi, A.; Meier, P. Checkpoints in TNF-Induced Cell Death: Implications in Inflammation and Cancer. *Trends Mol. Med.* **2018**, *24*, 49–65. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Emmerich, C.H.; Bakshi, S.; Kelsall, I.R.; Ortiz-Guerrero, J.; Shapiro, N.; Cohen, P. Lys63/Met1-hybrid ubiquitin chains are commonly formed during the activation of innate immune signalling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2016**, *474*, 452–461. [[CrossRef](#)]
65. Witt, A.; Vucic, D. Diverse ubiquitin linkages regulate RIP kinases-mediated inflammatory and cell death signaling. *Cell Death Differ.* **2017**, *24*, 1160–1171. [[CrossRef](#)]
66. Schwarzer, R.; Laurien, L.; Pasparakis, M. New insights into the regulation of apoptosis, necroptosis, and pyroptosis by receptor interacting protein kinase 1 and caspase-8. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2020**, *63*, 186–193. [[CrossRef](#)]
67. Frank, D.; Vince, J.E. Pyroptosis versus necroptosis: Similarities, differences, and crosstalk. *Cell Death Differ.* **2019**, *26*, 99–114. [[CrossRef](#)]
68. Lawlor, K.E.; Khan, N.; Mildenhall, A.; Gerlic, M.; Croker, B.A.; D'Cruz, A.A.; Hall, C.; Kaur Spall, S.; Anderton, H.; Masters, S.L.; et al. RIPK3 promotes cell death and NLRP3 inflammasome activation in the absence of MLKL. *Nat. Commun.* **2015**, *6*, 6282. [[CrossRef](#)]
69. Chen, K.W.; Lawlor, K.E.; von Pein, J.B.; Boucher, D.; Gerlic, M.; Croker, B.A.; Bezbradica, J.S.; Vince, J.E.; Schroder, K. Cutting Edge: Blockade of Inhibitor of Apoptosis Proteins Sensitizes Neutrophils to TNF- but Not Lipopolysaccharide-Mediated Cell Death and IL-1 $\beta$  Secretion. *J. Immunol.* **2018**, *200*, 3341–3346. [[CrossRef](#)]
70. Grabinger, T.; Bode, K.J.; Demgenski, J.; Seitz, C.; Delgado, M.E.; Kostadinova, F.; Reinhold, C.; Etemadi, N.; Wilhelm, S.; Schweinlin, M.; et al. Inhibitor of Apoptosis Protein-1 Regulates Tumor Necrosis Factor-Mediated Destruction of Intestinal Epithelial Cells. *Gastroenterology* **2017**, *152*, 867–879. [[CrossRef](#)]
71. Wong, W.W.; Vince, J.E.; Lalaoui, N.; Lawlor, K.E.; Chau, D.; Bankovacki, A.; Anderton, H.; Metcalf, D.; O'Reilly, L.; Jost, P.J.; et al. cIAPs and XIAP regulate myelopoiesis through cytokine production in an RIPK1- and RIPK3-dependent manner. *Blood* **2014**, *123*, 2562–2572. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Liu, H.; Liao, R.; He, K.; Zhu, X.; Li, P.; Gong, J. The SMAC mimetic birinapant attenuates lipopolysaccharide-induced liver injury by inhibiting the tumor necrosis factor receptor-associated factor 3 degradation in Kupffer cells. *Immunol. Lett.* **2017**, *185*, 79–83. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Gentle, I.E.; Moelter, I.; Lechler, N.; Bambach, S.; Vucikuja, S.; Häcker, G.; Aichele, P. Inhibitors of apoptosis proteins (IAPs) are required for effective T-cell expansion/survival during antiviral immunity in mice. *Blood* **2014**, *123*, 659–668. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Varfolomeev, E.; Goncharov, T.; Fedorova, A.V.; Dynek, J.N.; Zobel, K.; Deshayes, K.; Fairbrother, W.J.; Vucic, D. c-IAP1 and c-IAP2 are critical mediators of tumor necrosis factor alpha (TNFalpha)-induced NF-kappaB activation. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 24295–24299. [[CrossRef](#)]

75. Moulin, M.; Anderton, H.; Voss, A.K.; Thomas, T.; Wong, W.W.; Bankovacki, A.; Feltham, R.; Chau, D.; Cook, W.D.; Silke, J.; et al. IAPs limit activation of RIP kinases by TNF receptor 1 during development. *EMBO J.* **2012**, *31*, 1679–1691. [[CrossRef](#)]
76. Feoktistova, M.; Geserick, P.; Kellert, B.; Dimitrova, D.P.; Langlais, C.; Hupe, M.; Cain, K.; MacFarlane, M.; Hacker, G.; Leverkus, M. cIAPs block Ripoptosome formation, a RIP1/caspase-8 containing intracellular cell death complex differentially regulated by cFLIP isoforms. *Mol. Cell* **2011**, *43*, 449–463. [[CrossRef](#)]
77. Moen, I.N.; Westhrin, M.; Håland, E.; Haug, M.; Nonstad, U.; Klaharn, M.; Standal, T.; Starheim, K.K. Smac-mimetics reduce numbers and viability of human osteoclasts. *Cell Death Discov.* **2021**, *7*, 36. [[CrossRef](#)]
78. Zhang, J.; Webster, J.D.; Dugger, D.L.; Goncharov, T.; Roose-Girma, M.; Hung, J.; Kwon, Y.C.; Vucic, D.; Newton, K.; Dixit, V.M. Ubiquitin Ligases cIAP1 and cIAP2 Limit Cell Death to Prevent Inflammation. *Cell Rep.* **2019**, *27*, 2679–2689.e2673. [[CrossRef](#)]
79. Anderton, H.; Rickard, J.A.; Varigos, G.A.; Lalaoui, N.; Silke, J. Inhibitor of Apoptosis Proteins (IAPs) Limit RIPK1-Mediated Skin Inflammation. *J. Investig. Dermatol.* **2017**, *137*, 2371–2379. [[CrossRef](#)]
80. Lawlor, K.E.; Feltham, R.; Yabal, M.; Conos, S.A.; Chen, K.W.; Ziehe, S.; Graß, C.; Zhan, Y.; Nguyen, T.A.; Hall, C.; et al. XIAP Loss Triggers RIPK3- and Caspase-8-Driven IL-1 $\beta$  Activation and Cell Death as a Consequence of TLR-MyD88-Induced cIAP1-TRAF2 Degradation. *Cell Rep.* **2017**, *20*, 668–682. [[CrossRef](#)]
81. Ea, C.K.; Deng, L.; Xia, Z.P.; Pineda, G.; Chen, Z.J. Activation of IKK by TNFalpha requires site-specific ubiquitination of RIP1 and polyubiquitin binding by NEMO. *Mol. Cell* **2006**, *22*, 245–257. [[CrossRef](#)]
82. O'Donnell, M.A.; Legarda-Addison, D.; Skountzos, P.; Yeh, W.C.; Ting, A.T. Ubiquitination of RIP1 regulates an NF-kappaB-independent cell-death switch in TNF signaling. *Curr. Biol.* **2007**, *17*, 418–424. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Dynek, J.N.; Goncharov, T.; Dueber, E.C.; Fedorova, A.V.; Izrael-Tomasevic, A.; Phu, L.; Helgason, E.; Fairbrother, W.J.; Deshayes, K.; Kirkpatrick, D.S.; et al. c-IAP1 and UbcH5 promote K11-linked polyubiquitination of RIP1 in TNF signalling. *EMBO J.* **2010**, *29*, 4198–4209. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Vince, J.E.; Wong, W.W.; Gentle, I.; Lawlor, K.E.; Allam, R.; O'Reilly, L.; Mason, K.; Gross, O.; Ma, S.; Guarda, G.; et al. Inhibitor of apoptosis proteins limit RIP3 kinase-dependent interleukin-1 activation. *Immunity* **2012**, *36*, 215–227. [[CrossRef](#)]
85. Tang, E.D.; Wang, C.Y.; Xiong, Y.; Guan, K.L. A role for NF-kappaB essential modifier/IkappaB kinase-gamma (NEMO/IKKgamma) ubiquitination in the activation of the IkappaB kinase complex by tumor necrosis factor-alpha. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 37297–37305. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
86. Borghi, A.; Haegman, M.; Fischer, R.; Carpentier, I.; Bertrand, M.J.M.; Libert, C.; Afonina, I.S.; Beyaert, R. The E3 ubiquitin ligases HOIP and cIAP1 are recruited to the TNFR2 signaling complex and mediate TNFR2-induced canonical NF- $\kappa$ B signaling. *Biochem. Pharm.* **2018**, *153*, 292–298. [[CrossRef](#)]
87. Varfolomeev, E.; Blankenship, J.W.; Wayson, S.M.; Fedorova, A.V.; Kayagaki, N.; Garg, P.; Zobel, K.; Dynek, J.N.; Elliott, L.O.; Wallweber, H.J.; et al. IAP antagonists induce autoubiquitination of c-IAPs, NF-kappaB activation, and TNFalpha-dependent apoptosis. *Cell* **2007**, *131*, 669–681. [[CrossRef](#)]
88. Zarngar, B.J.; Wang, Y.; Mahoney, D.J.; Dempsey, P.W.; Cheung, H.H.; He, J.; Shiba, T.; Yang, X.; Yeh, W.C.; Mak, T.W.; et al. Noncanonical NF-kappaB activation requires coordinated assembly of a regulatory complex of the adaptors cIAP1, cIAP2, TRAF2 and TRAF3 and the kinase NIK. *Nat. Immunol.* **2008**, *9*, 1371–1378. [[CrossRef](#)]
89. Sun, S.C. Non-canonical NF- $\kappa$ B signaling pathway. *Cell Res.* **2011**, *21*, 71–85. [[CrossRef](#)]
90. Matsuzawa, A.; Tseng, P.H.; Vallabhapurapu, S.; Luo, J.L.; Zhang, W.; Wang, H.; Vignali, D.A.; Gallagher, E.; Karin, M. Essential cytoplasmic translocation of a cytokine receptor-assembled signaling complex. *Science* **2008**, *321*, 663–668. [[CrossRef](#)]
91. Gardam, S.; Turner, V.M.; Anderton, H.; Limaye, S.; Basten, A.; Koentgen, F.; Vaux, D.L.; Silke, J.; Brink, R. Deletion of cIAP1 and cIAP2 in murine B lymphocytes constitutively activates cell survival pathways and inactivates the germinal center response. *Blood* **2011**, *117*, 4041–4051. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
92. Varfolomeev, E.; Goncharov, T.; Maecker, H.; Zobel, K.; Komuves, L.G.; Deshayes, K.; Vucic, D. Cellular inhibitors of apoptosis are global regulators of NF-kappaB and MAPK activation by members of the TNF family of receptors. *Sci. Signal.* **2012**, *5*, ra22. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
93. Vince, J.E.; Chau, D.; Callus, B.; Wong, W.W.; Hawkins, C.J.; Schneider, P.; McKinlay, M.; Benetatos, C.A.; Condon, S.M.; Chunduru, S.K.; et al. TWEAK-FN14 signaling induces lysosomal degradation of a cIAP1-TRAF2 complex to sensitize tumor cells to TNFalpha. *J. Cell Biol.* **2008**, *182*, 171–184. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
94. Hatem, J.; Schrank-Hacker, A.M.; Watt, C.D.; Morrisette, J.J.; Rubin, A.I.; Kim, E.J.; Nasta, S.D.; Wasik, M.A.; Bogusz, A.M. Marginal zone lymphoma-derived interfollicular diffuse large B-cell lymphoma harboring 20q12 chromosomal deletion and missense mutation of BIRC3 gene: A case report. *Diagn. Pathol.* **2016**, *11*, 137. [[CrossRef](#)]
95. Rosebeck, S.; Lim, M.S.; Elenitoba-Johnson, K.S.; McAllister-Lucas, L.M.; Lucas, P.C. API2-MALT1 oncoprotein promotes lymphomagenesis via unique program of substrate ubiquitination and proteolysis. *World J. Biol. Chem.* **2016**, *7*, 128–137. [[CrossRef](#)]
96. Matthews, G.M.; de Matos Simoes, R.; Dhimolea, E.; Sheffer, M.; Gandolfi, S.; Dashevsky, O.; Sorrell, J.D.; Mitsiades, C.S. NF- $\kappa$ B dysregulation in multiple myeloma. *Semin. Cancer Biol.* **2016**, *39*, 68–76. [[CrossRef](#)]
97. Yang, C.; Davis, J.L.; Zeng, R.; Vora, P.; Su, X.; Collins, L.I.; Vangveravong, S.; Mach, R.H.; Piwnica-Worms, D.; Weilbaecher, K.N.; et al. Antagonism of inhibitor of apoptosis proteins increases bone metastasis via unexpected osteoclast activation. *Cancer Discov.* **2013**, *3*, 212–223. [[CrossRef](#)]

98. Tseng, P.H.; Matsuzawa, A.; Zhang, W.; Mino, T.; Vignali, D.A.; Karin, M. Different modes of ubiquitination of the adaptor TRAF3 selectively activate the expression of type I interferons and proinflammatory cytokines. *Nat. Immunol.* **2010**, *11*, 70–75. [CrossRef]
99. Xiao, Y.; Jin, J.; Chang, M.; Chang, J.H.; Hu, H.; Zhou, X.; Brittain, G.C.; Stansberg, C.; Torkildsen, Ø.; Wang, X.; et al. Pelil promotes microglia-mediated CNS inflammation by regulating Traf3 degradation. *Nat. Med.* **2013**, *19*, 595–602. [CrossRef]
100. Busca, A.; Konarski, Y.; Gajananayaka, N.; O’Hara, S.; Angel, J.; Kozlowski, M.; Kumar, A. cIAP1/2-TRAF2-SHP-1-Src-MyD88 Complex Regulates Lipopolysaccharide-Induced IL-27 Production through NF-κB Activation in Human Macrophages. *J. Immunol.* **2018**, *200*, 1593–1606. [CrossRef]
101. Mathew, S.J.; Haubert, D.; Kronke, M.; Leptin, M. Looking beyond death: A morphogenetic role for the TNF signalling pathway. *J. Cell Sci.* **2009**, *122*, 1939–1946. [CrossRef] [PubMed]
102. Peppelenbosch, M.; Boone, E.; Jones, G.E.; van Deventer, S.J.; Haegeman, G.; Fiers, W.; Grootenhuis, J.; Ridley, A.J. Multiple signal transduction pathways regulate TNF-induced actin reorganization in macrophages: Inhibition of Cdc42-mediated filopodium formation by TNF. *J. Immunol.* **1999**, *162*, 837–845. [PubMed]
103. Puls, A.; Eliopoulos, A.G.; Nobes, C.D.; Bridges, T.; Young, L.S.; Hall, A. Activation of the small GTPase Cdc42 by the inflammatory cytokines TNF(α) and IL-1, and by the Epstein-Barr virus transforming protein LMP1. *J. Cell Sci.* **1999**, *112 Pt 17*, 2983–2992. [CrossRef]
104. Murali, A.; Rajalingam, K. Small Rho GTPases in the control of cell shape and mobility. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* **2014**, *71*, 1703–1721. [CrossRef] [PubMed]
105. Geisbrecht, E.R.; Montell, D.J. A role for Drosophila IAP1-mediated caspase inhibition in Rac-dependent cell migration. *Cell* **2004**, *118*, 111–125. [CrossRef] [PubMed]
106. Marivin, A.; Berthelet, J.; Cartier, J.; Paul, C.; Gemble, S.; Morizot, A.; Boireau, W.; Saleh, M.; Bertoglio, J.; Solary, E.; et al. cIAP1 regulates TNF-mediated cdc42 activation and filopodia formation. *Oncogene* **2014**, *33*, 5534–5545. [CrossRef]
107. Oberoi, T.K.; Dogan, T.; Hocking, J.C.; Scholz, R.P.; Mooz, J.; Anderson, C.L.; Karreman, C.; Meyer Zu Heringdorf, D.; Schmidt, G.; Ruonala, M.; et al. IAPs regulate the plasticity of cell migration by directly targeting Rac1 for degradation. *EMBO J.* **2011**, *31*, 14–28. [CrossRef]
108. Oberoi-Khanuja, T.K.; Rajalingam, K. Ubiquitination of Rac1 by inhibitors of apoptosis (IAPs). *Methods Mol. Biol.* **2014**, *1120*, 43–54. [CrossRef]
109. Hornburger, M.C.; Mayer, B.A.; Leonhardt, S.; Willer, E.A.; Zahler, S.; Beyerle, A.; Rajalingam, K.; Vollmar, A.M.; Furst, R. A novel role for inhibitor of apoptosis (IAP) proteins as regulators of endothelial barrier function by mediating RhoA activation. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **2014**, *28*, 1938–1946. [CrossRef]
110. Murali, A.; Shin, J.; Yurugi, H.; Krishnan, A.; Akutsu, M.; Carpy, A.; Macek, B.; Rajalingam, K. Ubiquitin-dependent regulation of Cdc42 by XIAP. *Cell Death Dis.* **2017**, *8*, e2900. [CrossRef]
111. Dubrez, L.; Rajalingam, K. IAPs and cell migration. *Semin. Cell Dev. Biol.* **2015**, *39*, 124–131. [CrossRef] [PubMed]
112. Jin, H.S.; Park, H.S.; Shin, J.H.; Kim, D.H.; Jun, S.H.; Lee, C.J.; Lee, T.H. A novel inhibitor of apoptosis protein (IAP)-interacting protein, Vestigial-like (Vgl)-4, counteracts apoptosis-inhibitory function of IAPs by nuclear sequestration. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2011**, *412*, 454–459. [CrossRef] [PubMed]
113. Arora, V.; Cheung, H.H.; Plenchette, S.; Micali, O.C.; Liston, P.; Korneluk, R.G. Degradation of survivin by the X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP)-XAF1 complex. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 26202–26209. [CrossRef] [PubMed]
114. He, W.; Wang, Q.; Srinivasan, B.; Xu, J.; Padilla, M.T.; Li, Z.; Wang, X.; Liu, Y.; Gou, X.; Shen, H.M.; et al. A JNK-mediated autophagy pathway that triggers c-IAP degradation and necroptosis for anticancer chemotherapy. *Oncogene* **2014**, *33*, 3004–3013. [CrossRef]
115. Lee, S.; Lee, J.Y.; Lee, E.W.; Park, S.; Kang, D.H.; Min, C.; Lee, D.J.; Kang, D.; Song, J.; Kwon, J.; et al. Absence of Cytosolic 2-Cys Prx Subtypes I and II Exacerbates TNF-α-Induced Apoptosis via Different Routes. *Cell Rep.* **2019**, *26*, 2194–2211.e2196. [CrossRef]
116. Romagny, S.; Bouaouiche, S.; Lucchi, G.; Ducoroy, P.; Bertoldo, J.B.; Terenzi, H.; Bettaieb, A.; Plenchette, S. S-Nitrosylation of cIAP1 Switches Cancer Cell Fate from TNFα/TNFR1-Mediated Cell Survival to Cell Death. *Cancer Res.* **2018**, *78*, 1948–1957. [CrossRef]
117. Samuel, T.; Okada, K.; Hyer, M.; Welsh, K.; Zapata, J.M.; Reed, J.C. cIAP1 Localizes to the nuclear compartment and modulates the cell cycle. *Cancer Res.* **2005**, *65*, 210–218.
118. Cartier, J.; Berthelet, J.; Marivin, A.; Gemble, S.; Edmond, V.; Plenchette, S.; Lagrange, B.; Hammann, A.; Dupoux, A.; Delva, L.; et al. Cellular Inhibitor of Apoptosis Protein-1 (cIAP1) Can Regulate E2F1 Transcription Factor-mediated Control of Cyclin Transcription. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 26406–26417. [CrossRef]
119. Glorian, V.; Allègre, J.; Berthelet, J.; Dumetier, B.; Boutanquoi, P.M.; Droin, N.; Kayaci, C.; Cartier, J.; Gemble, S.; Marcion, G.; et al. DNA damage and S phase-dependent E2F1 stabilization requires the cIAP1 E3-ubiquitin ligase and is associated with K63-poly-ubiquitination on lysine 161/164 residues. *Cell Death Dis.* **2017**, *8*, e2816. [CrossRef]
120. Park, C.V.; Ivanova, I.G.; Kenneth, N.S. XIAP upregulates expression of HIF target genes by targeting HIF1α for Lys63-linked polyubiquitination. *Nucleic Acids Res.* **2017**, *45*, 9336–9347. [CrossRef]
121. Harikumar, K.B.; Yester, J.W.; Surace, M.J.; Oyeniran, C.; Price, M.M.; Huang, W.C.; Hait, N.C.; Allegood, J.C.; Yamada, A.; Kong, X.; et al. K63-linked polyubiquitination of transcription factor IRF1 is essential for IL-1-induced production of chemokines CXCL10 and CCL5. *Nat. Immunol.* **2014**, *15*, 231–238. [CrossRef] [PubMed]

122. El Hokayem, J.; Brittain, G.C.; Nawaz, Z.; Bethea, J.R. Tumor Necrosis Factor Receptor Associated Factors (TRAFs) 2 and 3 Form a Transcriptional Complex with Phosho-RNA Polymerase II and p65 in CD40 Ligand Activated Neuro2a Cells. *Mol. Neurobiol.* **2017**, *54*, 1301–1313. [CrossRef] [PubMed]
123. Xu, L.; Zhu, J.; Hu, X.; Zhu, H.; Kim, H.T.; LaBaer, J.; Goldberg, A.; Yuan, J. c-IAP1 cooperates with Myc by acting as a ubiquitin ligase for Mad1. *Mol. Cell* **2007**, *28*, 914–922. [CrossRef]
124. Li, H.; Fang, Y.; Niu, C.; Cao, H.; Mi, T.; Zhu, H.; Yuan, J.; Zhu, J. Inhibition of cIAP1 as a strategy for targeting c-MYC-driven oncogenic activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2018**, *115*, E9317–E9324. [CrossRef] [PubMed]
125. Seo, T.W.; Lee, Y.T.; Lee, J.S.; Yoo, S.J. Stabilization of C-terminal binding protein 2 by cellular inhibitor of apoptosis protein 1 via BIR domains without E3 ligase activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2020**, *530*, 440–447. [CrossRef] [PubMed]
126. Hanson, A.J.; Wallace, H.A.; Freeman, T.J.; Beauchamp, R.D.; Lee, L.A.; Lee, E. XIAP monoubiquitylates Groucho/TLE to promote canonical Wnt signaling. *Mol. Cell* **2012**, *45*, 619–628. [CrossRef]
127. Karimian, A.; Ahmadi, Y.; Yousefi, B. Multiple functions of p21 in cell cycle, apoptosis and transcriptional regulation after DNA damage. *DNA Repair* **2016**, *42*, 63–71. [CrossRef]
128. Chen, S.M.; Lin, T.K.; Tseng, Y.Y.; Tu, C.H.; Lui, T.N.; Huang, S.F.; Hsieh, L.L.; Li, Y.Y. Targeting inhibitors of apoptosis proteins suppresses medulloblastoma cell proliferation via G2/M phase arrest and attenuated neddylation of p21. *Cancer Med.* **2018**, *7*, 3988–4003. [CrossRef]
129. Han, X.; Zhang, L.; Chung, J.; Mayca Pozo, F.; Tran, A.; Seachrist, D.D.; Jacobberger, J.W.; Keri, R.A.; Gilmore, H.; Zhang, Y. UbcH7 regulates 53BP1 stability and DSB repair. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2014**, *111*, 17456–17461. [CrossRef]
130. Galvan, V.; Kurakin, A.V.; Bredesen, D.E. Interaction of checkpoint kinase 1 and the X-linked inhibitor of apoptosis during mitosis. *FEBS Lett.* **2004**, *558*, 57–62. [CrossRef]
131. Kim, K.S.; Heo, J.I.; Choi, K.J.; Bae, S. Enhancement of cellular radiation sensitivity through degradation of Chk1 by the XIAP-XAF1 complex. *Cancer Biol.* **2014**, *15*, 1622–1634. [CrossRef] [PubMed]
132. Nicholson, J.; Jevons, S.J.; Groselj, B.; Ellermann, S.; Konietzny, R.; Kerr, M.; Kessler, B.M.; Kiltie, A.E. E3 Ligase cIAP2 Mediates Downregulation of MRE11 and Radiosensitization in Response to HDAC Inhibition in Bladder Cancer. *Cancer Res.* **2017**, *77*, 3027–3039. [CrossRef] [PubMed]
133. Sweeney, M.C.; Wang, X.; Park, J.; Liu, Y.; Pei, D. Determination of the sequence specificity of XIAP BIR domains by screening a combinatorial peptide library. *Biochemistry* **2006**, *45*, 14740–14748. [CrossRef] [PubMed]

# BIBLIOGRAPHIE

Abbas, R. et Larisch, S. (2020) « Targeting XIAP for Promoting Cancer Cell Death—The Story of ARTS and SMAC », *Cells*, 9(3), p. 663. Disponible sur: <https://doi.org/10.3390/cells9030663>.

Abbott, D.W., Yang, Y., Hutt, J.E., Madhavarapu, S., Kelliher, M.A. et Cantley, L.C. (2007) « Coordinated Regulation of Toll-Like Receptor and NOD2 Signaling by K63-Linked Polyubiquitin Chains », *Molecular and Cellular Biology*, 27(17), p. 6012-6025. Disponible sur: <https://doi.org/10.1128/mcb.00270-07>.

Akutsu, M., Dikic, I. et Bremm, A. (2016) « Ubiquitin chain diversity at a glance », *Journal of Cell Science*, 129(5), p. 875-880. Disponible sur: <https://doi.org/10.1242/jcs.183954>.

Allègre, J., Cartier, J., Glorian, V., Droin, N., Dumetier, B., Kayaci, C., Berthelet, J., Gemble, S., Vuillier, C., Maillet, L., Garrido, C. et 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), p. e0206253. Disponible sur: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206253>.

Almagro, M.C. de, Goncharov, T., Newton, K. et Vucic, D. (2015) « Cellular IAP proteins and LUBAC differentially regulate necosome-associated RIP1 ubiquitination », *Cell Death & Disease*, 6(6), p. e1800-e1800. Disponible sur: <https://doi.org/10.1038/cddis.2015.158>.

Almanza, A., Carlesso, A., Chintha, C., Creedican, S., Doultsinos, D., Leuzzi, B., Luís, A., McCarthy, N., Montibeller, L., More, S., Papaioannou, A., Püschel, F., Sassano, M.L., Skoko, J., Agostinis, P., Belleroche, J., Eriksson, L.A., Fulda, S., Gorman, A.M., Healy, S., Kozlov, A., Muñoz-Pinedo, C., Rehm, M., Chevet, E. et Samali, A. (2019) « Endoplasmic reticulum stress signalling – from basic mechanisms to clinical applications », *The FEBS Journal*, 286(2), p. 241-278. Disponible sur: <https://doi.org/10.1111/febs.14608>.

Amarante-Mendes, G.P., Adjemian, S., Branco, L.M., Zanetti, L.C., Weinlich, R. et Bortoluci, K.R. (2018) « Pattern Recognition Receptors and the Host Cell Death Molecular Machinery », *Frontiers in Immunology*, 9, p. 2379. Disponible sur: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02379>.

Annibaldi, A., John, S.W., Berghe, T.V., Swatek, K.N., Ruan, J., Liccardi, G., Bianchi, K., Elliott, P.R., Choi, S.M., Coillie, S.V., Bertin, J., Wu, H., Komander, D., Vandenabeele, P., Silke, J. et Meier, P. (2018) « Ubiquitin-Mediated Regulation of RIPK1 Kinase Activity Independent of IKK and MK2 », *Molecular Cell*, 69(4), p. 566-580.e5. Disponible sur: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.01.027>.

Annunziata, C.M., Davis, R.E., Demchenko, Y., Bellamy, W., Gabrea, A., Zhan, F., Lenz, G., Hanamura, I., Wright, G., Xiao, W., Dave, S., Hurt, E.M., Tan, B., Zhao, H., Stephens, O., Santra, M., Williams, D.R., Dang, L., Barlogie, B., Shaughnessy, J.D., Kuehl, W.M. et Staudt, L.M. (2007) « Frequent Engagement of the Classical and Alternative NF-κB Pathways by Diverse Genetic Abnormalities in Multiple Myeloma », *Cancer Cell*, 12(2), p. 115-130. Disponible sur: <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2007.07.004>.

Ark, A.V., Cao, J. et Li, X. (2018) « TGF-β receptors: In and beyond TGF-β signaling », *Cellular Signalling*, 52, p. 112-120. Disponible sur: <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2018.09.002>.

Arnt, C.R., Chiorean, M.V., Heldebrant, M.P., Gores, G.J. et Kaufmann, S.H. (2002) « Synthetic Smac/DIABLO Peptides Enhance the Effects of Chemotherapeutic Agents by Binding XIAP and cIAP1 in Situ \* », *Journal of Biological Chemistry*, 277(46), p. 44236-44243. Disponible sur: <https://doi.org/10.1074/jbc.m207578200>.

Ashley, S.L., Sisson, T.H., Wheaton, A.K., Kim, K.K., Wilke, C.A., Ajayi, I.O., Subbotina, N., Wang, S., Duckett, C.S., Moore, B.B. et Horowitz, J.C. (2016) « Targeting Inhibitor of Apoptosis Proteins Protects from Bleomycin-Induced Lung Fibrosis », *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 54(4), p. 482-492. Disponible sur: <https://doi.org/10.1165/rmcb.2015-0148oc>.

Atfi, A., Dumont, E., Colland, F., Bonnier, D., L'Helgoualc'h, A., Prunier, C., Ferrand, N., Clément, B., Wewer, U.M. et Théret, N. (2007) « The disintegrin and metalloproteinase ADAM12 contributes to TGF-β signaling through interaction with the type II receptor », *The Journal of Cell Biology*, 178(2), p. 201-208. Disponible sur: <https://doi.org/10.1083/jcb.200612046>.

Baba, A.B., Rah, B., Bhat, Gh.R., Mushtaq, I., Parveen, S., Hassan, R., Zargar, M.H. et Afroze, D. (2022) « Transforming Growth Factor-Beta (TGF-β) Signaling in Cancer-A Betrayal Within », *Frontiers in Pharmacology*, 13, p. 791272. Disponible sur: <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.791272>.

Bai, L., Smith, D.C. et Wang, S. (2014) « Small-molecule SMAC mimetics as new cancer therapeutics », *Pharmacology & Therapeutics*, 144(1), p. 82-95. Disponible sur: <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2014.05.007>.

Bardia, A., Parton, M., Kümmel, S., Estévez, L.G., Huang, C.-S., Cortés, J., Ruiz-Borrego, M., Telli, M.L., Martin-Martorell, P., López, R., Beck, J.T., Ismail-Khan, R., Chen, S.-C., Hurvitz, S.A., Mayer, I.A., Carreon, D., Cameron, S., Liao, S., Baselga, J. et Kim, S.-B. (2018) « Paclitaxel With Inhibitor of Apoptosis Antagonist, LCL161, for Localized Triple-Negative Breast Cancer, Prospectively Stratified by Gene Signature in a Biomarker-Driven Neoadjuvant Trial », *Journal of Clinical Oncology*, 36(31), p. JCO.2017.74.839. Disponible sur: <https://doi.org/10.1200/jco.2017.74.8392>.

Batlle, E. et Massagué, J. (2019) « Transforming Growth Factor- $\beta$  Signaling in Immunity and Cancer », *Immunity*, 50(4), p. 924-940. Disponible sur: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.03.024>.

Berndt, N., Hamilton, A.D. et Sefti, S.M. (2011) « Targeting protein prenylation for cancer therapy », *Nature Reviews Cancer*, 11(11), p. 775-791. Disponible sur: <https://doi.org/10.1038/nrc3151>.

Berthelet, J. et Dubrez, L. (2013) « Regulation of Apoptosis by Inhibitors of Apoptosis (IAPs) », *Cells*, 2(1), p. 163-187. Disponible sur: <https://doi.org/10.3390/cells2010163>.

Bertrand, M.J.M., Doiron, K., Labbé, K., Korneluk, R.G., Barker, P.A. et Saleh, M. (2009) « Cellular Inhibitors of Apoptosis cIAP1 and cIAP2 Are Required for Innate Immunity Signaling by the Pattern Recognition Receptors NOD1 and NOD2 », *Immunity*, 30(6), p. 789-801. Disponible sur: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.04.011>.

Bertrand, M.J.M., Lippens, S., Staes, A., Gilbert, B., Roelandt, R., Medts, J.D., Gevaert, K., Declercq, W. et Vandenabeele, P. (2011) « cIAP1/2 Are Direct E3 Ligases Conjugating Diverse Types of Ubiquitin Chains to Receptor Interacting Proteins Kinases 1 to 4 (RIP1-4) », *PLoS ONE*, 6(9), p. e22356. Disponible sur: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022356>.

Bertrand, M.J.M., Milutinovic, S., Dickson, K.M., Ho, W.C., Boudreault, A., Durkin, J., Gillard, J.W., Jaquith, J.B., Morris, S.J. et Barker, P.A. (2008) « cIAP1 and cIAP2 Facilitate Cancer Cell Survival by Functioning as E3 Ligases that Promote RIP1 Ubiquitination », *Molecular Cell*, 30(6), p. 689-700. Disponible sur: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.05.014>.

Beug, S.T., Tang, V.A., LaCasse, E.C., Cheung, H.H., Beauregard, C.E., Brun, J., Nuyens, J.P., Earl, N., St-Jean, M., Holbrook, J., Dastidar, H., Mahoney, D.J., Ilkow, C., Boeuf, F.L., Bell, J.C. et Korneluk, R.G. (2014) « Smac mimetics and innate immune stimuli synergize to promote tumor death », *Nature Biotechnology*, 32(2), p. 182-190. Disponible sur: <https://doi.org/10.1038/nbt.2806>.

Bhowmick, N.A., Ghiassi, M., Bakin, A., Aakre, M., Lundquist, C.A., Engel, M.E., Arteaga, C.L. et Moses, H.L. (2001) « Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 Mediates Epithelial to Mesenchymal Transdifferentiation through a RhoA-dependent Mechanism », *Molecular Biology of the Cell*, 12(1), p. 27-36. Disponible sur: <https://doi.org/10.1091/mbc.12.1.27>.

Bian, J., Dannappel, M., Wan, C. et Firestein, R. (2020) « Transcriptional Regulation of Wnt/ $\beta$ -Catenin Pathway in Colorectal Cancer », *Cells*, 9(9), p. 2125. Disponible sur: <https://doi.org/10.3390/cells9092125>.

Birnbaum, M.J., Clem, R.J. et Miller, L.K. (1994) « An apoptosis-inhibiting gene from a nuclear polyhedrosis virus encoding a polypeptide with Cys/His sequence motifs », *Journal of Virology*, 68(4), p. 2521-2528. Disponible sur: <https://doi.org/10.1128/jvi.68.4.2521-2528.1994>.

Biswas, D.K., Cruz, A.P., Gansberger, E. et Pardee, A.B. (2000) « Epidermal growth factor-induced nuclear factor  $\kappa$ B activation: A major pathway of cell-cycle progression in estrogen-receptor negative breast cancer cells », *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(15), p. 8542-8547. Disponible sur: <https://doi.org/10.1073/pnas.97.15.8542>.

Biswas, S. et Shisler, J.L. (2017) « Molluscum Contagiosum Virus MC159 Abrogates cIAP1-NEMO Interactions and Inhibits NEMO Polyubiquitination », *Journal of Virology*, 91(15). Disponible sur: <https://doi.org/10.1128/jvi.00276-17>.

Blankenship, J.W., Varfolomeev, E., Goncharov, T., Fedorova, A.V., Kirkpatrick, D.S., Izrael-Tomasevic, A., Phu, L., Arnott, D., Aghajan, M., Zobel, K., Bazan, J.F., Fairbrother, W.J., Deshayes, K. et Vucic, D. (2008) « Ubiquitin binding modulates IAP antagonist-stimulated proteasomal degradation of c-IAP1 and c-IAP2 », *Biochemical Journal*, 417(1), p. 149-165. Disponible sur: <https://doi.org/10.1042/bj20081885>.

Bodmer, J.-L., Schneider, P. et Tschopp, J. (2002) « The molecular architecture of the TNF superfamily », *Trends in Biochemical Sciences*, 27(1), p. 19-26. Disponible sur: [https://doi.org/10.1016/s0968-0004\(01\)01995-8](https://doi.org/10.1016/s0968-0004(01)01995-8).

Bonardi, V., Cherkis, K., Nishimura, M.T. et Dangl, J.L. (2012) « A new eye on NLR proteins: focused on clarity or diffused by complexity? », *Current Opinion in Immunology*, 24(1), p. 41-50. Disponible sur: <https://doi.org/10.1016/j.coi.2011.12.006>.

Borghi, A., Haegman, M., Fischer, R., Carpentier, I., Bertrand, M.J.M., Libert, C., Afonina, I.S. et Beyaert, R. (2018) « The E3 ubiquitin ligases HOIP and cIAP1 are recruited to the TNFR2 signaling complex and mediate TNFR2-induced canonical NF- $\kappa$ B signaling », *Biochemical Pharmacology*, 153, p. 292-298. Disponible sur: <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2018.01.039>.

Borghi, A., Verstrepen, L. et Beyaert, R. (2016) « TRAF2 multitasking in TNF receptor-induced signaling to NF- $\kappa$ B, MAP kinases and cell death », *Biochemical Pharmacology*, 116, p. 1-10. Disponible sur: <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2016.03.009>.

Bornstein, B., Gottfried, Y., Edison, N., Shekhtman, A., Lev, T., Glaser, F. et Larisch, S. (2011) « ARTS binds to a distinct domain in XIAP-BIR3 and promotes apoptosis by a mechanism that is different from other IAP-antagonists », *Apoptosis*, 16(9), p. 869. Disponible sur: <https://doi.org/10.1007/s10495-011-0622-0>.

Bouchier-Hayes, L. et Martin, S.J. (2002) « CARD games in apoptosis and immunity », *EMBO reports*, 3(7), p. 616-621. Disponible sur: <https://doi.org/10.1093/embo-reports/kvf139>.

Bourhis, J., Sun, X., Pointreau, Y., Sire, C., Tourneau, C.L., Coutte, A., Kaminsky-Forrett, M.-C., Alfonsi, M., Boisselier, P., Martin, L., Delord, J.-P., Clatot, F., Miroir, J., Rolland, F., Crompton, P., Brienza, S., Szylbergemajn, S.A., Even, C. et Tao, Y. (2019) « LBA65Double-blind randomized phase II results comparing concurrent high-dose cisplatin chemorradiation (CRT) plus debio 1143 or placebo in high-risk patients with locally advanced squamous cell carcinoma of the head and neck (SCCHN): A GORTEC study », *Annals of Oncology*, 30(Supplement\_5), p. v902. Disponible sur: <https://doi.org/10.1093/annonc/mdz394.062>.

Brakebusch, C. (2021) « Rho GTPase Signaling in Health and Disease: A Complex Signaling Network », *Cells*, 10(2), p. 401. Disponible sur: <https://doi.org/10.3390/cells10020401>.

Brodsky, I.E. et Monack, D. (2009) « NLR-mediated control of inflammasome assembly in the host response against bacterial pathogens », *Seminars in Immunology*, 21(4), p. 199-207. Disponible sur: <https://doi.org/10.1016/j.smim.2009.05.007>.

Brown, M., Strudwick, N., Suwara, M., Sutcliffe, L.K., Mihai, A.D., Ali, A.A., Watson, J.N. et Schröder, M. (2016) « An initial phase of JNK activation inhibits cell death early in the endoplasmic reticulum stress response », *Journal of Cell Science*, 129(12), p. 2317-2328. Disponible sur: <https://doi.org/10.1242/jcs.179127>.

Brunckhorst, M.K., Lerner, D., Wang, S. et Yu, Q. (2012) « AT-406, an orally active antagonist of multiple inhibitor of apoptosis proteins, inhibits progression of human ovarian cancer », *Cancer Biology & Therapy*, 13(9), p. 804-811. Disponible sur: <https://doi.org/10.4161/cbt.20563>.

Budhidarmo, R. et Day, C.L. (2014) « The Ubiquitin-associated Domain of Cellular Inhibitor of Apoptosis Proteins Facilitates Ubiquitylation\* », *Journal of Biological Chemistry*, 289(37), p. 25721-25736. Disponible sur: <https://doi.org/10.1074/jbc.m113.545475>.

Busca, A., Konarski, Y., Gajanayaka, N., O'Hara, S., Angel, J., Kozlowski, M. et Kumar, A. (2018) « cIAP1/2-TRAF2-SHP-1-Src-MyD88 Complex Regulates Lipopolysaccharide-Induced IL-27 Production through NF- $\kappa$ B Activation in Human Macrophages », *The Journal of Immunology*, 200(5), p. ji1700199. Disponible sur: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1700199>.

Cabal-Hierro, L. et Lazo, P.S. (2012) « Signal transduction by tumor necrosis factor receptors », *Cellular Signalling*, 24(6), p. 1297-1305. Disponible sur: <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2012.02.006>.

Campbell, G.R., Bruckman, R.S., Chu, Y.-L., Trout, R.N. et Spector, S.A. (2018) « SMAC Mimetics Induce Autophagy-Dependent Apoptosis of HIV-1-Infected Resting Memory CD4+ T Cells », *Cell Host & Microbe*, 24(5), p. 689-702.e7. Disponible sur: <https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.09.007>.

Cao, L., Wang, Z., Yang, X., Xie, L. et Yu, L. (2008) « The evolution of BIR domain and its containing proteins », *FEBS Letters*, 582(27), p. 3817-3822. Disponible sur: <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2008.09.058>.

Cartier, J., Berthelet, J., Marivin, A., Gemble, S., Edmond, V., Plenquette, S., Lagrange, B., Hammann, A., Dupoux, A., Delva, L., Eymin, B., Solary, E. et Dubrez, L. (2011) « Cellular Inhibitor of Apoptosis Protein-1 (cIAP1) Can Regulate E2F1 Transcription Factor-mediated Control of Cyclin Transcription\* », *Journal of Biological Chemistry*, 286(30), p. 26406-26417. Disponible sur: <https://doi.org/10.1074/jbc.m110.191239>.

Caruso, R., Warner, N., Inohara, N. et Núñez, G. (2014) « NOD1 and NOD2: Signaling, Host Defense, and Inflammatory Disease », *Immunity*, 41(6), p. 898-908. Disponible sur: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.12.010>.

Castillo, K., Rojas-Rivera, D., Lisbona, F., Caballero, B., Nassif, M., Court, F.A., Schuck, S., Ibar, C., Walter, P., Sierralta, J., Glavic, A. et Hetz, C. (2011) « BAX inhibitor-1 regulates autophagy by controlling the IRE1α branch of the unfolded protein response », *The EMBO Journal*, 30(21), p. 4465-4478. Disponible sur: <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.318>.

Ceccarelli, A., Venere, A.D., Nicolai, E., Luca, A.D., Minicozzi, V., Rosato, N., Caccuri, A.M. et Mei, G. (2015) « TNFR-Associated Factor-2 (TRAF2): Not Only a Trimer », *Biochemistry*, 54(40), p. 6153-6161. Disponible sur: <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.5b00674>.

Cecchini, M.J., Hosein, K., Howlett, C.J., Joseph, M. et Mura, M. (2018) « Comprehensive gene expression profiling identifies distinct and overlapping transcriptional profiles in non-specific interstitial pneumonia and idiopathic pulmonary fibrosis », *Respiratory Research*, 19(1), p. 153. Disponible sur: <https://doi.org/10.1186/s12931-018-0857-1>.

Chacko, B.M., Qin, B.Y., Tiwari, A., Shi, G., Lam, S., Hayward, L.J., Caestecker, M. de et Lin, K. (2004) « Structural Basis of Heteromeric Smad Protein Assembly in TGF-β Signaling », *Molecular Cell*, 15(5), p. 813-823. Disponible sur: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.07.016>.

Chang, Y.-C. et Cheung, C.H.A. (2020) « An Updated Review of Smac Mimetics, LCL161, Birinapant, and GDC-0152 in Cancer Treatment », *Applied Sciences*, 11(1), p. 335. Disponible sur: <https://doi.org/10.3390/app11010335>.

Che, X., Yang, D., Zong, H., Wang, J., Li, X., Chen, F., Chen, X. et Song, X. (2012) « Nuclear clAP1 overexpression is a tumor stage- and grade-independent predictor of poor prognosis in human bladder cancer patients », *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*, 30(4), p. 450-456. Disponible sur: <https://doi.org/10.1016/j.urolonc.2010.12.016>.

Chen, G., Shaw, M.H., Kim, Y.-G. et Nuñez, G. (2009) « NOD-Like Receptors: Role in Innate Immunity and Inflammatory Disease », *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 4(1), p. 365-398. Disponible sur: <https://doi.org/10.1146/annurev.pathol.4.110807.092239>.

Chen, S., Lin, T., Tseng, Y., Tu, C., Lui, T., Huang, S., Hsieh, L. et Li, Y. (2018) « Targeting inhibitors of apoptosis proteins suppresses medulloblastoma cell proliferation via G2/M phase arrest and attenuated neddylation of p21 », *Cancer Medicine*, 7(8), p. 3988-4003. Disponible sur: <https://doi.org/10.1002/cam4.1658>.

Chen, X. et Cubillos-Ruiz, J.R. (2021) « Endoplasmic reticulum stress signals in the tumour and its microenvironment », *Nature Reviews Cancer*, 21(2), p. 71-88. Disponible sur: <https://doi.org/10.1038/s41568-020-00312-2>.

Chen, X., Wang, T., Yang, D., Wang, J., Li, X., He, Z., Chen, F., Che, X. et Song, X. (2013) « Expression of the IAP protein family acts cooperatively to predict prognosis in human bladder cancer patients », *Oncology Letters*, 5(4), p. 1278-1284. Disponible sur: <https://doi.org/10.3892/ol.2013.1150>.

Chen, Y.-G. (2009) « Endocytic regulation of TGF-β signaling », *Cell Research*, 19(1), p. 58-70. Disponible sur: <https://doi.org/10.1038/cr.2008.315>.

Cheng, L., Zhou, Z., Flesken-Nikitin, A., Toshkov, I.A., Wang, W., Camps, J., Ried, T. et Nikitin, A.Y. (2010) « Rb inactivation accelerates neoplastic growth and substitutes for recurrent amplification of clAP1, clAP2 and Yap1 in sporadic mammary carcinoma associated with p53 deficiency », *Oncogene*, 29(42), p. 5700-5711. Disponible sur: <https://doi.org/10.1038/onc.2010.300>.

Choi, Y.E., Butterworth, M., Malladi, S., Duckett, C.S., Cohen, G.M. et Bratton, S.B. (2009) « The E3 Ubiquitin Ligase clAP1 Binds and Ubiquitinates Caspase-3 and -7 via Unique Mechanisms at Distinct Steps in Their Processing\* », *Journal of Biological Chemistry*, 284(19), p. 12772-12782. Disponible sur: <https://doi.org/10.1074/jbc.m807550200>.

Chung, J.Y., Lu, M., Yin, Q., Lin, S.-C. et Wu, H. (2007) « TNF Receptor Associated Factors (TRAFs) », *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 597, p. 122-130. Disponible sur: [https://doi.org/10.1007/978-0-387-70630-6\\_10](https://doi.org/10.1007/978-0-387-70630-6_10).

Chung, J.-Y., Park, H.R., Lee, S.-J., Lee, S.-H., Kim, J.S., Jung, Y.-S., Hwang, S.H., Ha, N.-C., Seol, W.-G., Lee, J. et Park, B.-J. (2013) « Elevated TRAF2/6 expression in Parkinson's disease is caused by the loss of Parkin E3 ligase activity », *Laboratory Investigation*, 93(6), p. 663-676. Disponible sur: <https://doi.org/10.1038/labinvest.2013.60>.

Compagno, M., Lim, W.K., Grunn, A., Nandula, S.V., Brahmachary, M., Shen, Q., Bertoni, F., Ponzoni, M., Scandurra, M., Califano, A., Bhagat, G., Chadburn, A., Dalla-Favera, R. et Pasqualucci, L. (2009) « Mutations of multiple genes

cause deregulation of NF- $\kappa$ B in diffuse large B-cell lymphoma », *Nature*, 459(7247), p. 717-721. Disponible sur: <https://doi.org/10.1038/nature07968>.

Conze, D.B., Albert, L., Ferrick, D.A., Goeddel, D.V., Yeh, W.-C., Mak, T. et Ashwell, J.D. (2005) « Posttranscriptional Downregulation of c-IAP2 by the Ubiquitin Protein Ligase c-IAP1 In Vivo », *Molecular and Cellular Biology*, 25(8), p. 3348-3356. Disponible sur: <https://doi.org/10.1128/mcb.25.8.3348-3356.2005>.

Crook, N.E., Clem, R.J. et Miller, L.K. (1993) « An apoptosis-inhibiting baculovirus gene with a zinc finger-like motif », *Journal of Virology*, 67(4), p. 2168-2174. Disponible sur: <https://doi.org/10.1128/jvi.67.4.2168-2174.1993>.

Csomos, R.A., Brady, G.F. et Duckett, C.S. (2009) « Enhanced Cytoprotective Effects of the Inhibitor of Apoptosis Protein Cellular IAP1 through Stabilization with TRAF2\* », *Journal of Biological Chemistry*, 284(31), p. 20531-20539. Disponible sur: <https://doi.org/10.1074/jbc.m109.029983>.

Culpan, D., Cram, D., Chalmers, K., Cornish, A., Palmer, L., Palmer, J., Hughes, A., Passmore, P., Craig, D., Craigs, D., Wilcock, G.K., Kehoe, P.G. et Love, S. (2009) « TNFR-associated factor-2 (TRAF-2) in Alzheimer's disease », *Neurobiology of Aging*, 30(7), p. 1052-1060. Disponible sur: <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2007.10.014>.

Dai, Z., Zhu, W.-G., Morrison, C.D., Brena, R.M., Smiraglia, D.J., Raval, A., Wu, Y.-Z., Rush, L.J., Ross, P., Molina, J.R., Otterson, G.A. et Plass, C. (2003) « A comprehensive search for DNA amplification in lung cancer identifies inhibitors of apoptosis cIAP1 and cIAP2 as candidate oncogenes », *Human Molecular Genetics*, 12(7), p. 791-801. Disponible sur: <https://doi.org/10.1093/hmg/ddg083>.

Daly, A.C., Randall, R.A. et Hill, C.S. (2008) « Transforming Growth Factor  $\beta$ -Induced Smad1/5 Phosphorylation in Epithelial Cells Is Mediated by Novel Receptor Complexes and Is Essential for Anchorage-Independent Growth », *Molecular and Cellular Biology*, 28(22), p. 6889-6902. Disponible sur: <https://doi.org/10.1128/mcb.01192-08>.

Damgaard, R.B., Nachbur, U., Yabal, M., Wong, W.W.-L., Fiil, B.K., Kastirr, M., Rieser, E., Rickard, J.A., Bankovacki, A., Peschel, C., Ruland, J., Bekker-Jensen, S., Mailand, N., Kaufmann, T., Strasser, A., Walczak, H., Silke, J., Jost, P.J. et Gyrd-Hansen, M. (2012) « The Ubiquitin Ligase XIAP Recruits LUBAC for NOD2 Signaling in Inflammation and Innate Immunity », *Molecular Cell*, 46(6), p. 746-758. Disponible sur: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.04.014>.

Das, A., Foglizzo, M., Padala, P., Zhu, J. et Day, C.L. (2022) « TRAF trimers form immune signalling networks via RING domain dimerization », *FEBS Letters [Preprint]*. Disponible sur: <https://doi.org/10.1002/1873-3468.14530>.

Das, A., Middleton, A.J., Padala, P., Ledgerwood, E.C., Mace, P.D. et Day, C.L. (2021) « The Structure and Ubiquitin Binding Properties of TRAF RING Heterodimers », *Journal of Molecular Biology*, 433(8), p. 166844. Disponible sur: <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2021.166844>.

Decologna, N., Kolb, M., Margetts, P.J., Menetrier, F., Artur, Y., Garrido, C., Gauldie, J., Camus, P. et Bonniaud, P. (2007) « TGF- $\beta$ 1 Induces Progressive Pleural Scarring and Subpleural Fibrosis », *The Journal of Immunology*, 179(9), p. 6043-6051. Disponible sur: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.9.6043>.

Dees, C., Tomcik, M., Palumbo-Zerr, K., Distler, A., Beyer, C., Lang, V., Horn, A., Zerr, P., Zwerina, J., Gelse, K., Distler, O., Schett, G. et Distler, J.H.W. (2012) « JAK-2 as a novel mediator of the profibrotic effects of transforming growth factor  $\beta$  in systemic sclerosis », *Arthritis & Rheumatism*, 64(9), p. 3006-3015. Disponible sur: <https://doi.org/10.1002/art.34500>.

Degterev, A., Hitomi, J., Germscheid, M., Ch'en, I.L., Korkina, O., Teng, X., Abbott, D., Cuny, G.D., Yuan, C., Wagner, G., Hedrick, S.M., Gerber, S.A., Lugovskoy, A. et Yuan, J. (2008) « Identification of RIP1 kinase as a specific cellular target of necrostatins », *Nature Chemical Biology*, 4(5), p. 313-321. Disponible sur: <https://doi.org/10.1038/nchembio.83>.

Dejardin, E. (2006) « The alternative NF- $\kappa$ B pathway from biochemistry to biology: Pitfalls and promises for future drug development », *Biochemical Pharmacology*, 72(9), p. 1161-1179. Disponible sur: <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2006.08.007>.

Deng, L., Wang, C., Spencer, E., Yang, L., Braun, A., You, J., Slaughter, C., Pickart, C. et Chen, Z.J. (2000) « Activation of the I $\kappa$ B Kinase Complex by TRAF6 Requires a Dimeric Ubiquitin-Conjugating Enzyme Complex and a Unique Polyubiquitin Chain », *Cell*, 103(2), p. 351-361. Disponible sur: [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)00126-4](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)00126-4).

Dennler, S., Itoh, S., Vivien, D., Dijke, P. ten, Huet, S. et Gauthier, J. (1998) « Direct binding of Smad3 and Smad4 to critical TGF $\beta$ -inducible elements in the promoter of human plasminogen activator inhibitor-type 1 gene », *The EMBO Journal*, 17(11), p. 3091-3100. Disponible sur: <https://doi.org/10.1093/emboj/17.11.3091>.

Dickson, M.C., Martin, J.S., Cousins, F.M., Kulkarni, A.B., Karlsson, S. et Akhurst, R.J. (1995) « Defective haematopoiesis and vasculogenesis in transforming growth factor-beta 1 knock out mice », *Development*, 121(6), p. 1845-1854. Disponible sur: <https://doi.org/10.1242/dev.121.6.1845>.

Ding, W.-X. et Yin, X.-M. (2012) « Mitophagy: mechanisms, pathophysiological roles, and analysis », *bchm*, 393(7), p. 547-564. Disponible sur: <https://doi.org/10.1515/hsz-2012-0119>.

Dogan, T., Harms, G.S., Hekman, M., Karreman, C., Oberoi, T.K., Alnemri, E.S., Rapp, U.R. et Rajalingam, K. (2008) « X-linked and cellular IAPs modulate the stability of C-RAF kinase and cell motility », *Nature Cell Biology*, 10(12), p. 1447-1455. Disponible sur: <https://doi.org/10.1038/ncb1804>.

Dondelinger, Y., Darding, M., Bertrand, M.J.M. et Walczak, H. (2016) « Poly-ubiquitination in TNFR1-mediated necroptosis », *Cellular and Molecular Life Sciences*, 73(11-12), p. 2165-2176. Disponible sur: <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2191-4>.

Donnellan, W.B., Diez-Campelo, M., Heuser, M., Ritchie, E.K., Skolnik, J., Font, P. et Komrokji, R.S. (2016) « A phase 2 study of azacitidine (5-AZA) with or without birinapant in subjects with higher risk myelodysplastic syndrome (MDS) or chronic myelomonocytic leukemia (CMML). », *Journal of Clinical Oncology*, 34(15\_suppl), p. 7060-7060. Disponible sur: [https://doi.org/10.1200/jco.2016.34.15\\_suppl.7060](https://doi.org/10.1200/jco.2016.34.15_suppl.7060).

Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L. et Wang, X. (2000) « Smac, a Mitochondrial Protein that Promotes Cytochrome c-Dependent Caspase Activation by Eliminating IAP Inhibition », *Cell*, 102(1), p. 33-42. Disponible sur: [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)00008-8](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)00008-8).

Dubrez, L. (2017) « Regulation of E2F1 Transcription Factor by Ubiquitin Conjugation », *International Journal of Molecular Sciences*, 18(10), p. 2188. Disponible sur: <https://doi.org/10.3390/ijms18102188>.

Dubrez, L., Berthelet, J. et Glorian, V. (2013) « IAP proteins as targets for drug development in oncology », *Oncotargets and therapy*, 6, p. 1285-1304. Disponible sur: <https://doi.org/10.2147/ott.s33375>.

Dubrez, L. et Rajalingam, K. (2015) « IAPs and cell migration », *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 39, p. 124-131. Disponible sur: <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2015.02.015>.

Duckett, C.S., Nava, V.E., Gedrich, R.W., Clem, R.J., Dongen, J.L.V., Gilfillan, M.C., Shiels, H., Hardwick, J.M. et Thompson, C.B. (1996) « A conserved family of cellular genes related to the baculovirus iap gene and encoding apoptosis inhibitors. », *The EMBO Journal*, 15(11), p. 2685-2694. Disponible sur: <https://doi.org/10.1002/.1460-2075.1996.tb00629.x>.

Dueber, E.C., Schoeffler, A.J., Lingel, A., Elliott, J.M., Fedorova, A.V., Giannetti, A.M., Zobel, K., Maurer, B., Varfolomeev, E., Wu, P., Wallweber, H.J.A., Hymowitz, S.G., Deshayes, K., Vucic, D. et Fairbrother, W.J. (2011) « Antagonists Induce a Conformational Change in cIAP1 That Promotes Autoubiquitination », *Science*, 334(6054), p. 376-380. Disponible sur: <https://doi.org/10.1126/science.1207862>.

Dumétier, B., Zadoroznyj, A. et Dubrez, L. (2020) « IAP-Mediated Protein Ubiquitination in Regulating Cell Signaling », *Cells*, 9(5), p. 1118. Disponible sur: <https://doi.org/10.3390/cells9051118>.

Dupoux, A., Cartier, J., Cathelin, S., Filomenko, R., Solary, E. et Dubrez-Daloz, L. (2009) « cIAP1-dependent TRAF2 degradation regulates the differentiation of monocytes into macrophages and their response to CD40 ligand », *Blood*, 113(1), p. 175-185. Disponible sur: <https://doi.org/10.1182/blood-2008-02-137919>.

Dynek, J.N., Goncharov, T., Dueber, E.C., Fedorova, A.V., Israel-Tomasevic, A., Phu, L., Helgason, E., Fairbrother, W.J., Deshayes, K., Kirkpatrick, D.S. et Vucic, D. (2010) « c-IAP1 and UbcH5 promote K11-linked polyubiquitination of RIP1 in TNF signalling », *The EMBO Journal*, 29(24), p. 4198-4209. Disponible sur: <https://doi.org/10.1038/emboj.2010.300>.

Ebisawa, T., Fukuchi, M., Murakami, G., Chiba, T., Tanaka, K., Imamura, T. et Miyazono, K. (2001) « Smurf1 Interacts with Transforming Growth Factor- $\beta$  Type I Receptor through Smad7 and Induces Receptor Degradation\* », *Journal of Biological Chemistry*, 276(16), p. 12477-12480. Disponible sur: <https://doi.org/10.1074/jbc.c100008200>.

Eckelman, B.P. et Salvesen, G.S. (2006) « The Human Anti-apoptotic Proteins cIAP1 and cIAP2 Bind but Do Not Inhibit Caspases\* », *Journal of Biological Chemistry*, 281(6), p. 3254-3260. Disponible sur: <https://doi.org/10.1074/jbc.m510863200>.

Edlund, S., Landström, M., Heldin, C.-H. et Aspenström, P. (2002) « Transforming Growth Factor- $\beta$ -induced Mobilization of Actin Cytoskeleton Requires Signaling by Small GTPases Cdc42 and RhoA », *Molecular Biology of the Cell*, 13(3), p. 902-914. Disponible sur: <https://doi.org/10.1091/mbc.01-08-0398>.

Ekert, P.G., Silke, J., Hawkins, C.J., Verhagen, A.M. et Vaux, D.L. (2001) « Diablo Promotes Apoptosis by Removing Miha/Xiap from Processed Caspase 9 », *The Journal of Cell Biology*, 152(3), p. 483-490. Disponible sur: <https://doi.org/10.1083/jcb.152.3.483>.

Elinav, E., Strowig, T., Henao-Mejia, J. et Flavell, R.A. (2011) « Regulation of the Antimicrobial Response by NLR Proteins », *Immunity*, 34(5), p. 665-679. Disponible sur: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.05.007>.

Ely, K.R., Kodandapani, R. et Wu, S. (2007) « TNF Receptor Associated Factors (TRAFs) », *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 597, p. 114-121. Disponible sur: [https://doi.org/10.1007/978-0-387-70630-6\\_9](https://doi.org/10.1007/978-0-387-70630-6_9).

Engel, M.E., McDonnell, M.A., Law, B.K. et Moses, H.L. (1999) « Interdependent SMAD and JNK Signaling in Transforming Growth Factor- $\beta$ -mediated Transcription\* », *Journal of Biological Chemistry*, 274(52), p. 37413-37420. Disponible sur: <https://doi.org/10.1074/jbc.274.52.37413>.

Enwere, E.K., LaCasse, E.C., Adam, N.J. et Korneluk, R.G. (2014) « Role of the TWEAK-Fn14-clAP1-NF- $\kappa$ B Signaling Axis in the Regulation of Myogenesis and Muscle Homeostasis », *Frontiers in Immunology*, 5, p. 34. Disponible sur: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00034>.

Esposito, I., Kleeff, J., Abiatar, I., Shi, X., Giese, N., Bergmann, F., Roth, W., Friess, H. et Schirmacher, P. (2007) « Overexpression of cellular inhibitor of apoptosis protein 2 is an early event in the progression of pancreatic cancer », *Journal of Clinical Pathology*, 60(8), p. 885. Disponible sur: <https://doi.org/10.1136/jcp.2006.038257>.

Estornes, Y. et Bertrand, M.J.M. (2015) « IAPs, regulators of innate immunity and inflammation », *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 39, p. 106-114. Disponible sur: <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2014.03.035>.

Estornes, Y., Toscano, F., Virard, F., Jacquemin, G., Pierrot, A., Vanbervliet, B., Bonnin, M., Lalaoui, N., Mercier-Gouy, P., Pachéco, Y., Salaun, B., Renno, T., Micheau, O. et Lebecque, S. (2012) « dsRNA induces apoptosis through an atypical death complex associating TLR3 to caspase-8 », *Cell Death & Differentiation*, 19(9), p. 1482-1494. Disponible sur: <https://doi.org/10.1038/cdd.2012.22>.

Fang, R., Jiang, Q., Zhou, X., Wang, C., Guan, Y., Tao, J., Xi, J., Feng, J.-M. et Jiang, Z. (2017) « MAVS activates TBK1 and IKK $\kappa$  through TRAFs in NEMO dependent and independent manner », *PLoS Pathogens*, 13(11), p. e1006720. Disponible sur: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006720>.

Feltham, R., Bettjeman, B., Budhidarmo, R., Mace, P.D., Shirley, S., Condon, S.M., Chunduru, S.K., McKinlay, M.A., Vaux, D.L., Silke, J. et Day, C.L. (2011) « Smac Mimetics Activate the E3 Ligase Activity of clAP1 Protein by Promoting RING Domain Dimerization\* », *Journal of Biological Chemistry*, 286(19), p. 17015-17028. Disponible sur: <https://doi.org/10.1074/jbc.m111.222919>.

Feltham, R., Khan, N. et Silke, J. (2012) « IAPS and ubiquitylation », *IUBMB Life*, 64(5), p. 411-418. Disponible sur: <https://doi.org/10.1002/iub.565>.

Feoktistova, M., Geserick, P., Kellert, B., Dimitrova, D.P., Langlais, C., Hupe, M., Cain, K., MacFarlane, M., Häcker, G. et Leverkus, M. (2011) « clAPs Block Ripoptosome Formation, a RIP1/Caspase-8 Containing Intracellular Cell Death Complex Differentially Regulated by cFLIP Isoforms », *Molecular Cell*, 43(3), p. 449-463. Disponible sur: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.06.011>.

Fernandez, I.E. et Eickelberg, O. (2012) « The Impact of TGF- $\beta$  on Lung Fibrosis », *Proceedings of the American Thoracic Society*, 9(3), p. 111-116. Disponible sur: <https://doi.org/10.1513/pats.201203-023aw>.

Ferreira, C.G., Valk, P. van der, Span, S.W., Jonker, J.M., Postmus, P.E., Kruyt, F.A.E. et Giaccone, G. (2001) « Assessment of IAP (inhibitor of apoptosis) proteins as predictors of response to chemotherapy in advanced non-small-cell lung cancer patients », *Annals of Oncology*, 12(6), p. 799-805. Disponible sur: <https://doi.org/10.1023/a:1011167113067>.

Fotin-Mleczek, M., Henkler, F., Samel, D., Reichwein, M., Hausser, A., Parmryd, I., Scheurich, P., Schmid, J.A. et Wajant, H. (2002) « Apoptotic crosstalk of TNF receptors: TNF-R2-induces depletion of TRAF2 and IAP proteins and accelerates TNF-R1-dependent activation of caspase-8 », *Journal of Cell Science*, 115(13), p. 2757-2770. Disponible sur: <https://doi.org/10.1242/jcs.115.13.2757>.

Franklin, M.C., Kadkhodayan, S., Ackerly, H., Alexandru, D., Distefano, M.D., Elliott, L.O., Flygare, J.A., Mausisa, G., Okawa, D.C., Ong, D., Vucic, D., Deshayes, K. et Fairbrother, W.J. (2003) « Structure and Function Analysis of Peptide Antagonists of Melanoma Inhibitor of Apoptosis (ML-IAP) ‡ », *Biochemistry*, 42(27), p. 8223-8231. Disponible sur: <https://doi.org/10.1021/bi034227t>.

Friboulet, L., Pioche-Durieu, C., Rodriguez, S., Valent, A., Souquère, S., Ripoche, H., Khabir, A., Tsao, S.W., Bosq, J., v, K.W. et Busson, P. (2008) « Recurrent Overexpression of c-IAP2 in EBV-Associated Nasopharyngeal Carcinomas: Critical Role in Resistance to Toll-like Receptor 3-Mediated Apoptosis », *Neoplasia*, 10(11), p. 1183-IN7. Disponible sur: <https://doi.org/10.1593/neo.08590>.

Fulda, S., Wick, W., Weller, M. et Debatin, K.-M. (2002) « Smac agonists sensitize for Apo2L/TRAIL- or anticancer drug-induced apoptosis and induce regression of malignant glioma in vivo », *Nature Medicine*, 8(8), p. 808-815. Disponible sur: <https://doi.org/10.1038/nm735>.

Funaba, M., Zimmerman, C.M. et Mathews, L.S. (2002) « Modulation of Smad2-mediated Signaling by Extracellular Signal-regulated Kinase\* », *Journal of Biological Chemistry*, 277(44), p. 41361-41368. Disponible sur: <https://doi.org/10.1074/jbc.m204597200>.

Gao, J., Ulekleiv, C.H. et Halstensen, T.S. (2016) « Epidermal growth factor (EGF) receptor-ligand based molecular staging predicts prognosis in head and neck squamous cell carcinoma partly due to deregulated EGF- induced amphiregulin expression », *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 35(1), p. 151. Disponible sur: <https://doi.org/10.1186/s13046-016-0422-z>.

Gardam, S., Turner, V.M., Anderton, H., Limaye, S., Basten, A., Koentgen, F., Vaux, D.L., Silke, J. et Brink, R. (2011) « Deletion of cIAP1 and cIAP2 in murine B lymphocytes constitutively activates cell survival pathways and inactivates the germinal center response », *Blood*, 117(15), p. 4041-4051. Disponible sur: <https://doi.org/10.1182/blood-2010-10-312793>.

Ghosh, A.K. et Vaughan, D.E. (2012) « PAI-1 in tissue fibrosis », *Journal of Cellular Physiology*, 227(2), p. 493-507. Disponible sur: <https://doi.org/10.1002/jcp.22783>.

Glorian, V., Allègre, J., Berthelet, J., Dumetier, B., Boutanquois, P.-M., Droin, N., Kayaci, C., Cartier, J., Gemble, S., Marcion, G., Gonzalez, D., Boidot, R., Garrido, C., Michaud, O., Solary, E. et Dubrez, L. (2017) « DNA damage and S phase-dependent E2F1 stabilization requires the cIAP1 E3-ubiquitin ligase and is associated with K63-poly-ubiquitination on lysine 161/164 residues », *Cell Death & Disease*, 8(5), p. e2816-e2816. Disponible sur: <https://doi.org/10.1038/cddis.2017.222>.

Gomez-Roca, C., Even, C., Tourneau, C.L., Rotllan, N.B., Delord, J.-P., Sarini, J., Vergez, S., Teman, S., Hoffmann, C., Rochaix, P., Gavillet, B., Rouits, E., Brichory, F., Rechavi-Robinson, D., Bize, V., Rizzo, S.D., Purcea, D., Brienza, S., Zanna, C., Vuagniaux, G. et Szyldergmajn, S. (2019) « Abstract 5001: Open-label, non-randomized, exploratory pre-operative window-of-opportunity trial to investigate the pharmacokinetics and pharmacodynamics of the smac mimetic Debio 1143 in patients with resectable squamous cell carcinoma of the head and neck », *Cancer Research*, 79(13\_Supplement), p. 5001-5001. Disponible sur: <https://doi.org/10.1158/1538-7445.am2019-5001>.

Gong, Y., Fan, Z., Luo, G., Yang, C., Huang, Q., Fan, K., Cheng, H., Jin, K., Ni, Q., Yu, X. et Liu, C. (2019) « The role of necroptosis in cancer biology and therapy », *Molecular Cancer*, 18(1), p. 100. Disponible sur: <https://doi.org/10.1186/s12943-019-1029-8>.

Gonzalez, F., Lawrence, D., Yang, B., Yee, S., Pitti, R., Marsters, S., Pham, V.C., Stephan, J.-P., Lill, J. et Ashkenazi, A. (2012) « TRAF2 Sets a Threshold for Extrinsic Apoptosis by Tagging Caspase-8 with a Ubiquitin Shutoff Timer », *Molecular Cell*, 48(6), p. 888-899. Disponible sur: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.09.031>.

Goumans, M.-J., Valdimarsdottir, G., Itoh, S., Lebrin, F., Larsson, J., Mummery, C., Karlsson, S. et Dijke, P. ten (2003) « Activin Receptor-like Kinase (ALK)1 Is an Antagonistic Mediator of Lateral TGF $\beta$ /ALK5 Signaling », *Molecular Cell*, 12(4), p. 817-828. Disponible sur: [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(03\)00386-1](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(03)00386-1).

Grivennikov, S. et Karin, M. (2008) « Autocrine IL-6 Signaling: A Key Event in Tumorigenesis? », *Cancer Cell*, 13(1), p. 7-9. Disponible sur: <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2007.12.020>.

Grzybowska-Izydorczyk, O., Cebula, B., Robak, T. et Smolewski, P. (2010) « Expression and prognostic significance of the inhibitor of apoptosis protein (IAP) family and its antagonists in chronic lymphocytic leukaemia », *European Journal of Cancer*, 46(4), p. 800-810. Disponible sur: <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2009.11.023>.

Guglielmo, G.M.D., Roy, C.L., Goodfellow, A.F. et Wrana, J.L. (2003) « Distinct endocytic pathways regulate TGF- $\beta$  receptor signalling and turnover », *Nature Cell Biology*, 5(5), p. 410-421. Disponible sur: <https://doi.org/10.1038/ncb975>.

Guo, X., Yin, H., Li, L., Chen, Y., Li, J., Doan, J., Steinmetz, R. et Liu, Q. (2017) « Cardioprotective Role of Tumor Necrosis Factor Receptor-Associated Factor 2 by Suppressing Apoptosis and Necroptosis », *Circulation*, 136(8), p. 729-742. Disponible sur: <https://doi.org/10.1161/circulationaha.116.026240>.

Guo, Y.-J., Pan, W.-W., Liu, S.-B., Shen, Z.-F., Xu, Y. et Hu, L.-L. (2020) « ERK/MAPK signalling pathway and tumorigenesis », *Experimental and Therapeutic Medicine*, 19(3), p. 1997-2007. Disponible sur: <https://doi.org/10.3892/etm.2020.8454>.

Gyrd-Hansen, M., Dardignac, M., Miasari, M., Santoro, M.M., Zender, L., Xue, W., Tenev, T., Fonseca, P.C.A. da, Zvelebil, M., Bujnicki, J.M., Lowe, S., Silke, J. et Meier, P. (2008) « IAPs contain an evolutionarily conserved ubiquitin-binding domain that regulates NF- $\kappa$ B as well as cell survival and oncogenesis », *Nature Cell Biology*, 10(11), p. 1309-1317. Disponible sur: <https://doi.org/10.1038/ncb1789>.

Gyrd-Hansen, M. et Meier, P. (2010) « IAPs: from caspase inhibitors to modulators of NF- $\kappa$ B, inflammation and cancer », *Nature Reviews Cancer*, 10(8), p. 561-574. Disponible sur: <https://doi.org/10.1038/nrc2889>.

Häcker, H., Redecke, V., Blagoev, B., Kratchmarova, I., Hsu, L.-C., Wang, G.G., Kamps, M.P., Raz, E., Wagner, H., Häcker, G., Mann, M. et Karin, M. (2006) « Specificity in Toll-like receptor signalling through distinct effector functions of TRAF3 and TRAF6 », *Nature*, 439(7073), p. 204-207. Disponible sur: <https://doi.org/10.1038/nature04369>.

Hamidi, A., Bulow, V. von, Hamidi, R., Winssinger, N., Barluenga, S., Heldin, C.-H. et Landström, M. (2012) « Polyubiquitination of Transforming Growth Factor  $\beta$  (TGF $\beta$ )-associated Kinase 1 Mediates Nuclear Factor- $\kappa$ B Activation in Response to Different Inflammatory Stimuli\* », *Journal of Biological Chemistry*, 287(1), p. 123-133. Disponible sur: <https://doi.org/10.1074/jbc.m111.285122>.

Hamidi, A., Song, J., Thakur, N., Itoh, S., Marcusson, A., Bergh, A., Heldin, C.-H. et Landström, M. (2017) « TGF- $\beta$  promotes PI3K-AKT signaling and prostate cancer cell migration through the TRAF6-mediated ubiquitylation of p85 $\alpha$  », *Science Signaling*, 10(486). Disponible sur: <https://doi.org/10.1126/scisignal.aal4186>.

Han, L., Zhu, B., Chen, H., Jin, Y., Liu, J. et Wang, W. (2019) « Proteasome inhibitor MG132 inhibits the process of renal interstitial fibrosis », *Experimental and Therapeutic Medicine*, 17(4), p. 2953-2962. Disponible sur: <https://doi.org/10.3892/etm.2019.7329>.

Hartsough, M.T. et Mulder, K.M. (1995) « Transforming Growth Factor  $\beta$  Activation of p44mapk in Proliferating Cultures of Epithelial Cells (\*) », *Journal of Biological Chemistry*, 270(13), p. 7117-7124. Disponible sur: <https://doi.org/10.1074/jbc.270.13.7117>.

Hasegawa, M., Fujimoto, Y., Lucas, P.C., Nakano, H., Fukase, K., Núñez, G. et Inohara, N. (2008) « A critical role of RICK/RIP2 polyubiquitination in Nod-induced NF- $\kappa$ B activation », *The EMBO Journal*, 27(2), p. 373-383. Disponible sur: <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601962>.

Hattori, N., Degen, J.L., Sisson, T.H., Liu, H., Moore, B.B., Pandrangi, R.G., Simon, R.H. et Drew, A.F. (2000) « Bleomycin-induced pulmonary fibrosis in fibrinogen-null mice », *Journal of Clinical Investigation*, 106(11), p. 1341-1350. Disponible sur: <https://doi.org/10.1172/jci10531>.

Hayashi, H. et Sakai, T. (2012) « Biological Significance of Local TGF- $\beta$  Activation in Liver Diseases », *Frontiers in Physiology*, 3, p. 12. Disponible sur: <https://doi.org/10.3389/fphys.2012.00012>.

Hayes, S., Chawla, A. et Corvera, S. (2002) « TGF $\beta$  receptor internalization into EEA1-enriched early endosomes », *The Journal of Cell Biology*, 158(7), p. 1239-1249. Disponible sur: <https://doi.org/10.1083/jcb.200204088>.

He, L., Grammer, A.C., Wu, X. et Lipsky, P.E. (2004) « TRAF3 Forms Heterotrimers with TRAF2 and Modulates Its Ability to Mediate NF- $\kappa$ B Activation\* », *Journal of Biological Chemistry*, 279(53), p. 55855-55865. Disponible sur: <https://doi.org/10.1074/jbc.m407284200>.

Heard, K.N., Bertrand, M.J. et Barker, P.A. (2015) « cIAP2 supports viability of mice lacking cIAP1 and XIAP », *The EMBO Journal*, 34(19), p. 2393-2395. Disponible sur: <https://doi.org/10.15252/embj.201592060>.

Heldin, C.-H. et Moustakas, A. (2016) « Signaling Receptors for TGF- $\beta$  Family Members », *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 8(8), p. a022053. Disponible sur: <https://doi.org/10.1101/csdperspect.a022053>.

Hetz, C. et Glimcher, L.H. (2009) « Fine-Tuning of the Unfolded Protein Response: Assembling the IRE1 $\alpha$  Interactome », *Molecular Cell*, 35(5), p. 551-561. Disponible sur: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.08.021>.

Hill, C., Jones, M.G., Davies, D.E. et Wang, Y. (2019) « Epithelial-mesenchymal transition contributes to pulmonary fibrosis via aberrant epithelial/fibroblastic cross-talk. », *Journal of lung health and diseases*, 3(2), p. 31-35.

Hinds, M.G., Norton, R.S., Vaux, D.L. et Day, C.L. (1999) « Solution structure of a baculoviral inhibitor of apoptosis (IAP) repeat », *Nature Structural Biology*, 6(7), p. 648-651. Disponible sur: <https://doi.org/10.1038/10701>.

Hinz, M., Stilmann, M., Arslan, S.Ç., Khanna, K.K., Dittmar, G. et Scheidereit, C. (2010) « A Cytoplasmic ATM-TRAF6-clAP1 Module Links Nuclear DNA Damage Signaling to Ubiquitin-Mediated NF- $\kappa$ B Activation », *Molecular Cell*, 40(1), p. 63-74. Disponible sur: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.09.008>.

Hoppe, T. (2005) « Multiubiquitylation by E4 enzymes: 'one size' doesn't fit all », *Trends in Biochemical Sciences*, 30(4), p. 183-187. Disponible sur: <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2005.02.004>.

Horie, R., Watanabe, Takuro, Ito, K., Morisita, Y., Watanabe, M., Ishida, T., Higashihara, M., Kadin, M. et Watanabe, Toshiki (2002) « Cytoplasmic Aggregation of TRAF2 and TRAF5 Proteins in the Hodgkin-Reed-Sternberg Cells », *The American Journal of Pathology*, 160(5), p. 1647-1654. Disponible sur: [https://doi.org/10.1016/s0002-9440\(10\)61112-1](https://doi.org/10.1016/s0002-9440(10)61112-1).

Hornburger, M.C., Mayer, B.A., Leonhardt, S., Willer, E.A., Zahler, S., Beyerle, A., Rajalingam, K., Vollmar, A.M. et Fürst, R. (2014) « A novel role for inhibitor of apoptosis (IAP) proteins as regulators of endothelial barrier function by mediating RhoA activation », *The FASEB Journal*, 28(4), p. 1938-1946. Disponible sur: <https://doi.org/10.1096/fj.13-235754>.

Horvath, C.M. (2004) « The Jak-STAT Pathway Stimulated by Interferon  $\gamma$  », *Science's STKE*, 2004(260), p. tr8. Disponible sur: <https://doi.org/10.1126/stke.2602004tr8>.

Hosler, M.R., Wang-Su, S.-T. et Wagner, B.J. (2006) « Role of the Proteasome in TGF- $\beta$  Signaling in Lens Epithelial Cells », *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 47(5), p. 2045. Disponible sur: <https://doi.org/10.1167/iovs.05-0650>.

Hostager, B.S. et Bishop, G.A. (2013) « CD40-Mediated Activation of the NF- $\kappa$ B2 Pathway », *Frontiers in Immunology*, 4, p. 376. Disponible sur: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00376>.

Houghton, P.J., Kang, M.H., Reynolds, C.P., Morton, C.L., Kolb, E.A., Gorlick, R., Keir, S.T., Carol, H., Lock, R., Maris, J.M., Billups, C.A. et Smith, M.A. (2012) « Initial testing (stage 1) of LCL161, a SMAC mimetic, by the pediatric preclinical testing program », *Pediatric Blood & Cancer*, 58(4), p. 636-639. Disponible sur: <https://doi.org/10.1002/pbc.23167>.

Hsu, H., Shu, H.-B., Pan, M.-G. et Goeddel, D.V. (1996) « TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD Interactions Define Two Distinct TNF Receptor 1 Signal Transduction Pathways », *Cell*, 84(2), p. 299-308. Disponible sur: [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80984-8](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80984-8).

Hu, B., Wu, Z. et Phan, S.H. (2003) « Smad3 Mediates Transforming Growth Factor- $\beta$ -Induced  $\alpha$ -Smooth Muscle Actin Expression », *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 29(3), p. 397-404. Disponible sur: <https://doi.org/10.1165/rcmb.2003-0063oc>.

Hu, H., Tian, M., Ding, C. et Yu, S. (2019) « The C/EBP Homologous Protein (CHOP) Transcription Factor Functions in Endoplasmic Reticulum Stress-Induced Apoptosis and Microbial Infection », *Frontiers in Immunology*, 9, p. 3083. Disponible sur: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.03083>.

Hu, M., Luo, Q., Alitongbieke, G., Chong, S., Xu, C., Xie, L., Chen, X., Zhang, D., Zhou, Y., Wang, Z., Ye, X., Cai, L., Zhang, F., Chen, H., Jiang, F., Fang, H., Yang, S., Liu, J., Diaz-Meco, M.T., Su, Y., Zhou, H., Moscat, J., Lin, X. et Zhang, X. (2017) « Celastrol-Induced Nur77 Interaction with TRAF2 Alleviates Inflammation by Promoting Mitochondrial Ubiquitination and Autophagy », *Molecular Cell*, 66(1), p. 141-153.e6. Disponible sur: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.03.008>.

Huang, Y., Rich, R.L., Myszka, D.G. et Wu, H. (2003) « Requirement of Both the Second and Third BIR Domains for the Relief of X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein (XIAP)-mediated Caspase Inhibition by Smac\* », *Journal of Biological Chemistry*, 278(49), p. 49517-49522. Disponible sur: <https://doi.org/10.1074/jbc.m310061200>.

Hui, K.K.W., Kanungo, A.K., Elia, A.J. et Henderson, J.T. (2011) « Caspase-3 deficiency reveals a physiologic role for Smac/DIABLO in regulating programmed cell death », *Cell Death & Differentiation*, 18(11), p. 1780-1790. Disponible sur: <https://doi.org/10.1038/cdd.2011.50>.

Huse, M., Muir, T.W., Xu, L., Chen, Y.-G., Kuriyan, J. et Massagué, J. (2001) « The TGF $\beta$  Receptor Activation Process An Inhibitor- to Substrate-Binding Switch », *Molecular Cell*, 8(3), p. 671-682. Disponible sur: [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(01\)00332-x](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(01)00332-x).

Imoto, I., Tsuda, H., Hirasawa, A., Miura, M., Sakamoto, M., Hirohashi, S. et Inazawa, J. (2002) « Expression of cIAP1, a target for 11q22 amplification, correlates with resistance of cervical cancers to radiotherapy. », *Cancer research*, 62(17), p. 4860-6.

Imoto, I., Yang, Z.Q., Pimkhaokham, A., Tsuda, H., Shimada, Y., Immamura, M., Ohki, M. et Inazawa, J. (2001) « Identification of cIAP1 as a candidate target gene within an amplicon at 11q22 in esophageal squamous cell carcinomas. », *Cancer research*, 61(18), p. 6629-34.

Inohara, N., Koseki, T., Peso, L. del, Hu, Y., Yee, C., Chen, S., Carrio, R., Merino, J., Liu, D., Ni, J. et Núñez, G. (1999) « Nod1, an Apaf-1-like Activator of Caspase-9 and Nuclear Factor- $\kappa$ B\* », *Journal of Biological Chemistry*, 274(21), p. 14560-14567. Disponible sur: <https://doi.org/10.1074/jbc.274.21.14560>.

Itoh, N. et Nagata, S. (1993) « A novel protein domain required for apoptosis. Mutational analysis of human Fas antigen. », *The Journal of biological chemistry*, 268(15), p. 10932-7.

Jiang, C. et Lin, X. (2012) « Regulation of NF- $\kappa$ B by the CARD proteins », *Immunological Reviews*, 246(1), p. 141-153. Disponible sur: <https://doi.org/10.1111/i.1600-065x.2012.01110.x>.

Jin, H.-S., Lee, D.-H., Kim, D.-H., Chung, J.-H., Lee, S.-J. et Lee, T.H. (2009) « cIAP1, cIAP2, and XIAP Act Cooperatively via Nonredundant Pathways to Regulate Genotoxic Stress-Induced Nuclear Factor- $\kappa$ B Activation », *Cancer Research*, 69(5), p. 1782-1791. Disponible sur: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-08-2256>.

Jin, H.-S., Park, H.-S., Shin, J.-H., Kim, D.-H., Jun, S.-H., Lee, C.-J. et Lee, T.H. (2011) « A novel inhibitor of apoptosis protein (IAP)-interacting protein, Vestigial-like (Vgl)-4, counteracts apoptosis-inhibitory function of IAPs by nuclear sequestration », *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 412(3), p. 454-459. Disponible sur: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.07.117>.

Jin, J., Xiao, Y., Hu, H., Zou, Q., Li, Y., Gao, Y., Ge, W., Cheng, X. et Sun, S.-C. (2015) « Proinflammatory TLR signalling is regulated by a TRAF2-dependent proteolysis mechanism in macrophages », *Nature Communications*, 6(1), p. 5930. Disponible sur: <https://doi.org/10.1038/ncomms6930>.

Johnson, D.E., O'Keefe, R.A. et Grandis, J.R. (2018) « Targeting the IL-6/JAK/STAT3 signalling axis in cancer », *Nature Reviews Clinical Oncology*, 15(4), p. 234-248. Disponible sur: <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2018.8>.

Kaur, S., Wang, F., Venkatraman, M. et Arsura, M. (2005) « X-linked Inhibitor of Apoptosis (XIAP) Inhibits c-Jun N-terminal Kinase 1 (JNK1) Activation by Transforming Growth Factor  $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) through Ubiquitin-mediated Proteosomal Degradation of the TGF- $\beta$ 1-activated Kinase 1 (TAK1)\* », *Journal of Biological Chemistry*, 280(46), p. 38599-38608. Disponible sur: <https://doi.org/10.1074/jbc.m505671200>.

Keating, S.E. et Bowie, A.G. (2009) « Role of Non-degradative Ubiquitination in Interleukin-1 and Toll-like Receptor Signaling\* », *Journal of Biological Chemistry*, 284(13), p. 8211-8215. Disponible sur: <https://doi.org/10.1074/jbc.r800038200>.

Keats, J.J., Fonseca, R., Chesi, M., Schop, R., Baker, A., Chng, W.-J., Wier, S.V., Tiedemann, R., Shi, C.-X., Sebag, M., Braggio, E., Henry, T., Zhu, Y.-X., Fogle, H., Price-Troska, T., Ahmann, G., Mancini, C., Brents, L.A., Kumar, S., Greipp, P., Dispenzieri, A., Bryant, B., Mulligan, G., Bruhn, L., Barrett, M., Valdez, R., Trent, J., Stewart, A.K., Carpten, J. et Bergsagel, P.L. (2007) « Promiscuous Mutations Activate the Noncanonical NF- $\kappa$ B Pathway in Multiple Myeloma », *Cancer Cell*, 12(2), p. 131-144. Disponible sur: <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2007.07.003>.

Khalil, N. et Greenberg, A.H. (2007) « The role of TGF-beta in pulmonary fibrosis », *Ciba Foundation Symposium*, 157, p. 194-211. Disponible sur: <https://doi.org/10.1002/9780470514061.ch13>.

Khalil, N. et O'Connor, R. (2008) « Transforming Growth Factor- $\beta$  in Cancer Therapy, Volume I, Basic and Clinical Biology », p. 581-594. Disponible sur: [https://doi.org/10.1007/978-1-59745-292-2\\_36](https://doi.org/10.1007/978-1-59745-292-2_36).

Kholodenko, B.N. et Birtwistle, M.R. (2009) « Four-dimensional dynamics of MAPK information-processing systems », *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine*, 1(1), p. 28-44. Disponible sur: <https://doi.org/10.1002/wsbm.16>.

Kim, C.M., Choi, J.Y., Bhat, E.A., Jeong, J.-H., Son, Y.-J., Kim, S. et Park, H.H. (2016) « Crystal structure of TRAF1 TRAF domain and its implications in the TRAF1-mediated intracellular signaling pathway », *Scientific Reports*, 6(1), p. 25526. Disponible sur: <https://doi.org/10.1038/srep25526>.

Kim, S.K., Henen, M.A. et Hinck, A.P. (2019) « Structural biology of betaglycan and endoglin, membrane-bound co-receptors of the TGF-beta family », *Experimental Biology and Medicine*, 244(17), p. 1547-1558. Disponible sur: <https://doi.org/10.1177/1535370219881160>.

Kim, W.Y., Lee, Sun Yong, Jung, Y.J., Chae, H.B., Nawkar, G.M., Shin, M.R., Kim, S.Y., Park, J.H., Kang, C.H., Chi, Y.H., Ahn, I.P., Yun, D.J., Lee, K.O., Kim, Y.-M., Kim, M.G. et Lee, Sang Yeol (2011) « Inhibitor of Apoptosis (IAP)-like Protein Lacks a Baculovirus IAP Repeat (BIR) Domain and Attenuates Cell Death in Plant and Animal Systems\* », *Journal of Biological Chemistry*, 286(49), p. 42670-42678. Disponible sur: <https://doi.org/10.1074/jbc.m111.262204>.

Kimura, M., Nagashima, H., Okuyama, Y., Ishii, N. et So, T. (2018) « TRAF2 and TRAF5 associated with the signal transducing receptor gp130 limit IL-6-driven transphosphorylation of JAK1 through the inhibition of proximal JAK–JAK interaction », *International Immunology*, 30(7), p. 291-299. Disponible sur: <https://doi.org/10.1093/intimm/dxy029>.

Kirisako, T., Kamei, K., Murata, S., Kato, M., Fukumoto, H., Kanie, M., Sano, S., Tokunaga, F., Tanaka, K. et Iwai, K. (2006) « A ubiquitin ligase complex assembles linear polyubiquitin chains », *The EMBO Journal*, 25(20), p. 4877-4887. Disponible sur: <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601360>.

Ko, R., Park, H., Lee, N., Seo, J., Jeong, W. et Lee, S.Y. (2019) « Glycogen Synthase Kinase 3 $\beta$  Regulates Antiviral Responses of TLR3 via TRAF2–Src Axis », *The Journal of Immunology*, 203(11), p. 2990-2999. Disponible sur: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1900685>.

Kocab, A.J. et Duckett, C.S. (2016) « Inhibitor of apoptosis proteins as intracellular signaling intermediates », *The FEBS Journal*, 283(2), p. 221-231. Disponible sur: <https://doi.org/10.1111/febs.13554>.

Koyama, S., Ishii, K.J., Coban, C. et Akira, S. (2008) « Innate immune response to viral infection », *Cytokine*, 43(3), p. 336-341. Disponible sur: <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2008.07.009>.

Kretzschmar, M., Doody, J., Timokhina, I. et Massagué, J. (1999) « A mechanism of repression of TGF $\beta$ / Smad signaling by oncogenic Ras », *Genes & Development*, 13(7), p. 804-816. Disponible sur: <https://doi.org/10.1101/gad.13.7.804>.

Krieg, A., Correa, R.G., Garrison, J.B., Negrate, G.L., Welsh, K., Huang, Z., Knoefel, W.T. et Reed, J.C. (2009) « XIAP mediates NOD signaling via interaction with RIP2 », *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(34), p. 14524-14529. Disponible sur: <https://doi.org/10.1073/pnas.0907131106>.

Kulathila, R., Vash, B., Sage, D., Cornell-Kennon, S., Wright, K., Koehn, J., Stams, T., Clark, K. et Price, A. (2009) « The structure of the BIR3 domain of cIAP1 in complex with the N-terminal peptides of SMAC and caspase-9 », *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 65(1), p. 58-66. Disponible sur: <https://doi.org/10.1107/s0907444908039243>.

Kulkarni, A.B., Huh, C.G., Becker, D., Geiser, A., Lyght, M., Flanders, K.C., Roberts, A.B., Sporn, M.B., Ward, J.M. et Karlsson, S. (1993) « Transforming growth factor beta 1 null mutation in mice causes excessive inflammatory response and early death. », *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(2), p. 770-774. Disponible sur: <https://doi.org/10.1073/pnas.90.2.770>.

Kumar, S., Fairmichael, C., Longley, D.B. et Turkington, R.C. (2020) « The multiple roles of the IAP super-family in cancer », *Pharmacology & Therapeutics*, 214, p. 107610. Disponible sur: <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2020.107610>.

Kurakin, A. et Bredesen, D.E. (2007) « An unconventional IAP-binding motif revealed by target-assisted iterative screening (TAIS) of the BIR3-cIAP1 domain », *Journal of Molecular Recognition*, 20(1), p. 39-50. Disponible sur: <https://doi.org/10.1002/jmr.809>.

Kuzmich, N., Sivak, K., Chubarev, V., Porozov, Y., Savateeva-Lyubimova, T. et Peri, F. (2017) « TLR4 Signaling Pathway Modulators as Potential Therapeutics in Inflammation and Sepsis », *Vaccines*, 5(4), p. 34. Disponible sur: <https://doi.org/10.3390/vaccines5040034>.

Labbé, K., McIntire, C.R., Doiron, K., Leblanc, P.M. et Saleh, M. (2011) « Cellular Inhibitors of Apoptosis Proteins cIAP1 and cIAP2 Are Required for Efficient Caspase-1 Activation by the Inflammasome », *Immunity*, 35(6), p. 897-907. Disponible sur: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.10.016>.

Lalani, A.I., Zhu, S., Gokhale, S., Jin, J. et Xie, P. (2018) « TRAF Molecules in Inflammation and Inflammatory Diseases », *Current Pharmacology Reports*, 4(1), p. 64-90. Disponible sur: <https://doi.org/10.1007/s40495-017-0117-y>.

Lamothe, B., Besse, A., Campos, A.D., Webster, W.K., Wu, H. et Darnay, B.G. (2007) « Site-specific Lys-63-linked Tumor Necrosis Factor Receptor-associated Factor 6 Auto-ubiquitination Is a Critical Determinant of I $\kappa$ B Kinase Activation\* », *Journal of Biological Chemistry*, 282(6), p. 4102-4112. Disponible sur: <https://doi.org/10.1074/jbc.m609503200>.

Lamouille, S., Connolly, E., Smyth, J.W., Akhurst, R.J. et Deryck, R. (2012) « TGF- $\beta$ -induced activation of mTOR complex 2 drives epithelial–mesenchymal transition and cell invasion », *Journal of Cell Science*, 125(5), p. 1259-1273. Disponible sur: <https://doi.org/10.1242/jcs.095299>.

Larco, J.E. de et Todaro, G.J. (1978) « Growth factors from murine sarcoma virus-transformed cells. », *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 75(8), p. 4001-4005. Disponible sur: <https://doi.org/10.1073/pnas.75.8.4001>.

Lawlor, K.E., Feltham, R., Yabal, M., Conos, S.A., Chen, K.W., Ziehe, S., Graß, C., Zhan, Y., Nguyen, T.A., Hall, C., Vince, A.J., Chatfield, S.M., D'Silva, D.B., Pang, K.C., Schroder, K., Silke, J., Vaux, D.L., Jost, P.J. et Vince, J.E. (2017) « XIAP Loss Triggers RIPK3- and Caspase-8-Driven IL-1 $\beta$  Activation and Cell Death as a Consequence of TLR-MyD88-Induced cIAP1-TRAF2 Degradation », *Cell Reports*, 20(3), p. 668-682. Disponible sur: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.06.073>.

Lee, D.Y., Choi, I.H., Joo, S.T., Kim, G.-D., Choi, J.S., Kim, W.H., Kim, J.H., Jeong, J.W., Yun, S.H., Lee, S.Y. et Hur, S.J. (2022) « Review of the current research on fetal bovine serum and the development of cultured meat », *Food Science of Animal Resources*, 42(5), p. 775-799. Disponible sur: <https://doi.org/10.5851/kosfa.2022.e46>.

Lee, M.K., Pardoux, C., Hall, M.C., Lee, P.S., Warburton, D., Qing, J., Smith, S.M. et Deryck, R. (2007) « TGF- $\beta$  activates Erk MAP kinase signalling through direct phosphorylation of ShcA », *The EMBO Journal*, 26(17), p. 3957-3967. Disponible sur: <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601818>.

Lee, S., Challa-Malladi, M., Bratton, S.B. et Wright, C.W. (2014) « Nuclear Factor- $\kappa$ B-inducing Kinase (NIK) Contains an Amino-terminal Inhibitor of Apoptosis (IAP)-binding Motif (IBM) That Potentiates NIK Degradation by Cellular IAP1 (c-IAP1)\* », *Journal of Biological Chemistry*, 289(44), p. 30680-30689. Disponible sur: <https://doi.org/10.1074/jbc.m114.587808>.

Lee, T.H., Shank, J., Cusson, N. et Kelliher, M.A. (2004) « The Kinase Activity of Rip1 Is Not Required for Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ -induced I $\kappa$ B Kinase or p38 MAP Kinase Activation or for the Ubiquitination of Rip1 by Traf2\* », *Journal of Biological Chemistry*, 279(32), p. 33185-33191. Disponible sur: <https://doi.org/10.1074/jbc.m404206200>.

Li, J., McQuade, T., Siemer, A.B., Napetschnig, J., Moriwaki, K., Hsiao, Y.-S., Damko, E., Moquin, D., Walz, T., McDermott, A., Chan, F.K.-M. et Wu, H. (2012) « The RIP1/RIP3 Necrosome Forms a Functional Amyloid Signaling Complex Required for Programmed Necrosis », *Cell*, 150(2), p. 339-350. Disponible sur: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.06.019>.

Liu, Hongxiang, Liao, R., He, K., Zhu, X., Li, P. et Gong, J. (2017) « The SMAC mimetic birinapant attenuates lipopolysaccharide-induced liver injury by inhibiting the tumor necrosis factor receptor–associated factor 3 degradation in Kupffer cells », *Immunology Letters*, 185, p. 79-83. Disponible sur: <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2017.02.016>.

Liu, Hong, Ma, Y., He, H.-W., Zhao, W.-L. et Shao, R.-G. (2017) « SPHK1 (sphingosine kinase 1) induces epithelial–mesenchymal transition by promoting the autophagy-linked lysosomal degradation of CDH1/E-cadherin in hepatoma cells », *Autophagy*, 13(5), p. 900-913. Disponible sur: <https://doi.org/10.1080/15548627.2017.1291479>.

Liu, N., Tao, Z., Blanc, J.M.L., Zaorsky, N.G., Sun, Y., Vuagniaux, G., Dicker, A.P. et Lu, B. (2014) « Debio 1143, an antagonist of multiple inhibitor-of-apoptosis proteins, activates apoptosis and enhances radiosensitization of non-small cell lung cancer cells in vitro. », *American journal of cancer research*, 4(6), p. 943-51.

Liu, S., Cai, X., Wu, J., Cong, Q., Chen, X., Li, T., Du, F., Ren, J., Wu, Y.-T., Grishin, N.V. et Chen, Z.J. (2015) « Phosphorylation of innate immune adaptor proteins MAVS, STING, and TRIF induces IRF3 activation », *Science*, 347(6227), p. aaa2630. Disponible sur: <https://doi.org/10.1126/science.aaa2630>.

Liu, S., Chen, J., Cai, X., Wu, J., Chen, X., Wu, Y.-T., Sun, L. et Chen, Z.J. (2013) « MAVS recruits multiple ubiquitin E3 ligases to activate antiviral signaling cascades », *eLife*, 2, p. e00785. Disponible sur: <https://doi.org/10.7554/elife.00785>.

Liu, S. et Chen, Z.J. (2011) « Expanding role of ubiquitination in NF-κB signaling », *Cell Research*, 21(1), p. 6-21. Disponible sur: <https://doi.org/10.1038/cr.2010.170>.

Liu, Z., Sun, C., Olejniczak, E.T., Meadows, R.P., Betz, S.F., Oost, T., Herrmann, J., Wu, J.C. et Fesik, S.W. (2000) « Structural basis for binding of Smac/DIABLO to the XIAP BIR3 domain », *Nature*, 408(6815), p. 1004-1008. Disponible sur: <https://doi.org/10.1038/35050006>.

Lo, R.S., Chen, Y., Shi, Y., Pavletich, N.P. et Massagué, J. (1998) « The L3 loop: a structural motif determining specific interactions between SMAD proteins and TGF-β receptors », *The EMBO Journal*, 17(4), p. 996-1005. Disponible sur: <https://doi.org/10.1093/emboj/17.4.996>.

Lokau, J., Schoeder, V., Haybaeck, J. et Garbers, C. (2019) « Jak-Stat Signaling Induced by Interleukin-6 Family Cytokines in Hepatocellular Carcinoma », *Cancers*, 11(11), p. 1704. Disponible sur: <https://doi.org/10.3390/cancers11111704>.

Lopez, J., John, S.W., Tenev, T., Rautureau, G.J.P., Hinds, M.G., Francalanci, F., Wilson, R., Broemer, M., Santoro, M.M., Day, C.L. et Meier, P. (2011) « CARD-Mediated Autoinhibition of cIAP1's E3 Ligase Activity Suppresses Cell Proliferation and Migration », *Molecular Cell*, 42(5), p. 569-583. Disponible sur: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.04.008>.

Lork, M., Verhelst, K. et Beyaert, R. (2017) « CYLD, A20 and OTULIN deubiquitinases in NF-κB signaling and cell death: so similar, yet so different », *Cell Death & Differentiation*, 24(7), p. 1172-1183. Disponible sur: <https://doi.org/10.1038/cdd.2017.46>.

Lu, M., Lin, S.-C., Huang, Y., Kang, Y.J., Rich, R., Lo, Y.-C., Myszka, D., Han, J. et Wu, H. (2007) « XIAP Induces NF-κB Activation via the BIR1/TAB1 Interaction and BIR1 Dimerization », *Molecular Cell*, 26(5), p. 689-702. Disponible sur: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.05.006>.

Ma, O., Cai, W.-W., Zender, L., Dayaram, T., Shen, J., Herron, A.J., Lowe, S.W., Man, T.-K., Lau, C.C. et Donehower, L.A. (2009) « MMP13, Birc2 (cIAP1), and Birc3 (cIAP2), Amplified on Chromosome 9, Collaborate with p53 Deficiency in Mouse Osteosarcoma Progression », *Cancer Research*, 69(6), p. 2559-2567. Disponible sur: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-08-2929>.

Ma, W.W., Zhang, H., Hylander, B., LeVea, C., Repasky, E., Weng, D., Burns, J., Chunduru, S., Graham, M., Fetterly, G., McKinlay, M. et Adjei, A. (2012) « Abstract 1939: TL32711, a novel Smac mimetic, exerts significant antitumor efficacy in primary pancreatic adenocarcinoma model », *Cancer Research*, 72(8\_Supplement), p. 1939-1939. Disponible sur: <https://doi.org/10.1158/1538-7445.am2012-1939>.

Mace, P.D., Linke, K., Feltham, R., Schumacher, F.-R., Smith, C.A., Vaux, D.L., Silke, J. et Day, C.L. (2008) « Structures of the cIAP2 RING Domain Reveal Conformational Changes Associated with Ubiquitin-conjugating Enzyme (E2) Recruitment\* », *Journal of Biological Chemistry*, 283(46), p. 31633-31640. Disponible sur: <https://doi.org/10.1074/jbc.m804753200>.

Mace, P.D., Smits, C., Vaux, D.L., Silke, J. et Day, C.L. (2010) « Asymmetric Recruitment of cIAPs by TRAF2 », *Journal of Molecular Biology*, 400(1), p. 8-15. Disponible sur: <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2010.04.055>.

Madden, S.K., Araujo, A.D. de, Gerhardt, M., Fairlie, D.P. et Mason, J.M. (2021) « Taking the Myc out of cancer: toward therapeutic strategies to directly inhibit c-Myc », *Molecular Cancer*, 20(1), p. 3. Disponible sur: <https://doi.org/10.1186/s12943-020-01291-6>.

Mahoney, D.J., Cheung, H.H., Mrad, R.L., Plenchette, S., Simard, C., Enwere, E., Arora, V., Mak, T.W., Lacasse, E.C., Waring, J. et Korneluk, R.G. (2008) « Both cIAP1 and cIAP2 regulate TNFα-mediated NF-κB activation », *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(33), p. 11778-11783. Disponible sur: <https://doi.org/10.1073/pnas.0711122105>.

Mambetsariev, N., Lin, W.W., Stunz, L.L., Hanson, B.M., Hildebrand, J.M. et Bishop, G.A. (2016) « Nuclear TRAF3 is a negative regulator of CREB in B cells », *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(4), p. 1032-1037. Disponible sur: <https://doi.org/10.1073/pnas.1514586113>.

Mao, A.-P., Li, S., Zhong, B., Li, Y., Yan, J., Li, Q., Teng, C. et Shu, H.-B. (2010) « Virus-triggered Ubiquitination of TRAF3/6 by cIAP1/2 Is Essential for Induction of Interferon-β (IFN-β) and Cellular Antiviral Response\* », *Journal of Biological Chemistry*, 285(13), p. 9470-9476. Disponible sur: <https://doi.org/10.1074/jbc.m109.071043>.

Marivin, A., Berthelet, J., Cartier, J., Paul, C., Gemble, S., Morizot, A., Boireau, W., Saleh, M., Bertoglio, J., Solary, E. et Dubrez, L. (2014) « cIAP1 regulates TNF-mediated cdc42 activation and filopodia formation », *Oncogene*, 33(48), p. 5534-5545. Disponible sur: <https://doi.org/10.1038/onc.2013.499>.

Martin-Malpartida, P., Batet, M., Kaczmarska, Z., Freier, R., Gomes, T., Aragón, E., Zou, Y., Wang, Q., Xi, Q., Ruiz, L., Vea, A., Márquez, J.A., Massagué, J. et Macias, M.J. (2017) « Structural basis for genome wide recognition of 5-bp GC motifs by SMAD transcription factors », *Nature Communications*, 8(1), p. 2070. Disponible sur: <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02054-6>.

Matsuzawa, A., Tseng, P.-H., Vallabhapurapu, S., Luo, J.-L., Zhang, W., Wang, H., Vignali, D.A.A., Gallagher, E. et Karin, M. (2008) « Essential Cytoplasmic Translocation of a Cytokine Receptor-Assembled Signaling Complex », *Science*, 321(5889), p. 663-668. Disponible sur: <https://doi.org/10.1126/science.1157340>.

Mauro, C., Crescenzi, E., Mattia, R.D., Pacifico, F., Mellone, S., Salzano, S., Luca, C. de, D'Adamio, L., Palumbo, G., Formisano, S., Vito, P. et Leonardi, A. (2006) « Central Role of the Scaffold Protein Tumor Necrosis Factor Receptor-associated Factor 2 in Regulating Endoplasmic Reticulum Stress-induced Apoptosis\* », *Journal of Biological Chemistry*, 281(5), p. 2631-2638. Disponible sur: <https://doi.org/10.1074/jbc.m502181200>.

Mavrakis, K.J., Andrew, R.L., Lee, K.L., Petropoulou, C., Dixon, J.E., Navaratnam, N., Norris, D.P. et Episkopou, V. (2007) « Arkadia Enhances Nodal/TGF-β Signaling by Coupling Phospho-Smad2/3 Activity and Turnover », *PLoS Biology*, 5(3), p. e67. Disponible sur: <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0050067>.

McComb, S., Cheung, H.H., Korneluk, R.G., Wang, S., Krishnan, L. et Sad, S. (2012) « cIAP1 and cIAP2 limit macrophage necroptosis by inhibiting Rip1 and Rip3 activation », *Cell Death & Differentiation*, 19(11), p. 1791-1801. Disponible sur: <https://doi.org/10.1038/cdd.2012.59>.

Meng, X., Nikolic-Paterson, D.J. et Lan, H.Y. (2016) « TGF-β: the master regulator of fibrosis », *Nature Reviews Nephrology*, 12(6), p. 325-338. Disponible sur: <https://doi.org/10.1038/nrneph.2016.48>.

Mifflin, L., Ofengeim, D. et Yuan, J. (2020) « Receptor-interacting protein kinase 1 (RIPK1) as a therapeutic target », *Nature Reviews Drug Discovery*, 19(8), p. 553-571. Disponible sur: <https://doi.org/10.1038/s41573-020-0071-y>.

Mikkelsen, S.S., Jensen, S.B., Chiliveru, S., Melchjorsen, J., Julkunen, I., Gaestel, M., Arthur, J.S.C., Flavell, R.A., Ghosh, S. et Paludan, S.R. (2009) « RIG-I-mediated Activation of p38 MAPK Is Essential for Viral Induction of Interferon and Activation of Dendritic Cells », *Journal of Biological Chemistry*, 284(16), p. 10774-10782. Disponible sur: <https://doi.org/10.1074/jbc.m807272200>.

Mita, M.M., LoRusso, P.M., Papadopoulos, K.P., Gordon, M.S., Mita, A.C., Ferraldeschi, R., Keer, H., Oganesian, A., Su, X.Y., Jueliger, S. et Tolcher, A.W. (2020) « A Phase I Study of ASTX660, an Antagonist of Inhibitors of Apoptosis Proteins, in Adults with Advanced Cancers or Lymphoma », *Clinical Cancer Research*, 26(12), p. 2819-2826. Disponible sur: <https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-19-1430>.

Mitchell, H., Choudhury, A., Pagano, R.E. et Leof, E.B. (2004) « Ligand-dependent and -independent Transforming Growth Factor-β Receptor Recycling Regulated by Clathrin-mediated Endocytosis and Rab11 », *Molecular Biology of the Cell*, 15(9), p. 4166-4178. Disponible sur: <https://doi.org/10.1091/mbc.e04-03-0245>.

Mochizuki, T., Miyazaki, H., Hara, T., Furuya, T., Imamura, T., Watabe, T. et Miyazono, K. (2004) « Roles for the MH2 Domain of Smad7 in the Specific Inhibition of Transforming Growth Factor-β Superfamily Signaling\* », *Journal of Biological Chemistry*, 279(30), p. 31568-31574. Disponible sur: <https://doi.org/10.1074/jbc.m313977200>.

Moens, U., Kostenko, S. et Sveinbjörnsson, B. (2013) « The Role of Mitogen-Activated Protein Kinase-Activated Protein Kinases (MAPKAPKs) in Inflammation », *Genes*, 4(2), p. 101-133. Disponible sur: <https://doi.org/10.3390/genes4020101>.

Morrison, D.K. (2012) « MAP Kinase Pathways », *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(11), p. a011254. Disponible sur: <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a011254>.

Moses, H.L., Roberts, A.B. et Deryck, R. (2016) « The Discovery and Early Days of TGF-β: A Historical Perspective », *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 8(7), p. a021865. Disponible sur: <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a021865>.

Mosley, J.D. et Keri, R.A. (2006) « Splice variants of mIAP1 have an enhanced ability to inhibit apoptosis », *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 348(3), p. 1174-1183. Disponible sur: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.07.176>.

Moulin, M., Anderton, H., Voss, A.K., Thomas, T., Wong, W.W., Bankovacki, A., Feltham, R., Chau, D., Cook, W.D., Silke, J. et Vaux, D.L. (2012) « IAPs limit activation of RIP kinases by TNF receptor 1 during development », *The EMBO Journal*, 31(7), p. 1679-1691. Disponible sur: <https://doi.org/10.1038/emboj.2012.18>.

Muntané, J. (2011) « Harnessing Tumor Necrosis Factor Receptors to Enhance Antitumor Activities of Drugs », *Chemical Research in Toxicology*, 24(10), p. 1610-1616. Disponible sur: <https://doi.org/10.1021/tx2002349>.

Muppidi, J.R., Tschopp, J. et Siegel, R.M. (2004) « Life And Death Decisions Secondary Complexes and Lipid Rafts in TNF Receptor Family Signal Transduction », *Immunity*, 21(4), p. 461-465. Disponible sur: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2004.10.001>.

Nagashima, H., Okuyama, Y., Hayashi, T., Ishii, N. et So, T. (2016) « TNFR-Associated Factors 2 and 5 Differentially Regulate the Instructive IL-6 Receptor Signaling Required for Th17 Development », *The Journal of Immunology*, 196(10), p. 4082-4089. Disponible sur: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1501610>.

Nakhaei, P., Genin, P., Civas, A. et Hiscott, J. (2009) « RIG-I-like receptors: Sensing and responding to RNA virus infection », *Seminars in Immunology*, 21(4), p. 215-222. Disponible sur: <https://doi.org/10.1016/j.smim.2009.05.001>.

Neil, J.R., Tian, M. et Schiemann, W.P. (2009) « X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein and Its E3 Ligase Activity Promote Transforming Growth Factor-B-mediated Nuclear Factor- $\kappa$ B Activation during Breast Cancer Progression\* », *Journal of Biological Chemistry*, 284(32), p. 21209-21217. Disponible sur: <https://doi.org/10.1074/jbc.m109.018374>.

Niu, F., Ru, H., Ding, W., Ouyang, S. et Liu, Z.-J. (2013) « Structural biology study of human TNF receptor associated factor 4 TRAF domain », *Protein & Cell*, 4(9), p. 687-694. Disponible sur: <https://doi.org/10.1007/s13238-013-3068-z>.

Noonan, A.M., Bunch, K.P., Chen, J., Herrmann, M.A., Lee, J., Kohn, E.C., O'Sullivan, C.C., Jordan, E., Houston, N., Takebe, N., Kinders, R.J., Cao, L., Peer, C.J., Figg, W.D. et Annunziata, C.M. (2016) « Pharmacodynamic markers and clinical results from the phase 2 study of the SMAC mimetic birinapant in women with relapsed platinum-resistant or -refractory epithelial ovarian cancer », *Cancer*, 122(4), p. 588-597. Disponible sur: <https://doi.org/10.1002/cncr.29783>.

Oberoi, T.K., Dogan, T., Hocking, J.C., Scholz, R., Mooz, J., Anderson, C.L., Karreman, C., Heringdorf, D.M. zu, Schmidt, G., Ruonala, M., Namikawa, K., Harms, G.S., Carpy, A., Macek, B., Köster, R.W. et Rajalingam, K. (2012) « IAPs regulate the plasticity of cell migration by directly targeting Rac1 for degradation », *The EMBO Journal*, 31(1), p. 14-28. Disponible sur: <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.423>.

O'Donnell, M.A., Legarda-Addison, D., Skountzos, P., Yeh, W.C. et Ting, A.T. (2007) « Ubiquitination of RIP1 Regulates an NF- $\kappa$ B-Independent Cell-Death Switch in TNF Signaling », *Current Biology*, 17(5), p. 418-424. Disponible sur: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.01.027>.

Oganesyan, G., Saha, S.K., Guo, B., He, J.Q., Shahangian, A., Zarngar, B., Perry, A. et Cheng, G. (2006) « Critical role of TRAF3 in the Toll-like receptor-dependent and -independent antiviral response », *Nature*, 439(7073), p. 208-211. Disponible sur: <https://doi.org/10.1038/nature04374>.

Ogura, Y., Inohara, N., Benito, A., Chen, F.F., Yamaoka, S. et Núñez, G. (2001) « Nod2, a Nod1/Apaf-1 Family Member That Is Restricted to Monocytes and Activates NF- $\kappa$ B\* », *Journal of Biological Chemistry*, 276(7), p. 4812-4818. Disponible sur: <https://doi.org/10.1074/jbc.m008072200>.

Ong, C.H., Tham, C.L., Harith, H.H., Firdaus, N. et Israf, D.A. (2021) « TGF- $\beta$ -induced fibrosis: A review on the underlying mechanism and potential therapeutic strategies », *European Journal of Pharmacology*, 911, p. 174510. Disponible sur: <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2021.174510>.

Ostuni, R., Zanoni, I. et Granucci, F. (2010) « Deciphering the complexity of Toll-like receptor signaling », *Cellular and Molecular Life Sciences*, 67(24), p. 4109-4134. Disponible sur: <https://doi.org/10.1007/s0018-010-0464-x>.

Ozdamar, B., Bose, R., Barrios-Rodiles, M., Wang, H.-R., Zhang, Y. et Wrana, J.L. (2005) « Regulation of the Polarity Protein Par6 by TGF $\beta$  Receptors Controls Epithelial Cell Plasticity », *Science*, 307(5715), p. 1603-1609. Disponible sur: <https://doi.org/10.1126/science.1105718>.

Parisien, J., Lenoir, J.J., Mandhana, R., Rodriguez, K.R., Qian, K., Bruns, A.M. et Horvath, C.M. (2018) « RNA sensor LGP2 inhibits TRAF ubiquitin ligase to negatively regulate innate immune signaling », *EMBO reports*, 19(6). Disponible sur: <https://doi.org/10.15252/embr.201745176>.

Park, H.H. (2018) « Structure of TRAF Family: Current Understanding of Receptor Recognition », *Frontiers in Immunology*, 9, p. 1999. Disponible sur: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01999>.

Park, K., Ikushiro, H., Seo, H.S., Shin, K.-O., Kim, Y. il, Kim, J.Y., Lee, Y.-M., Yano, T., Holleran, W.M., Elias, P. et Uchida, Y. (2016) « ER stress stimulates production of the key antimicrobial peptide, cathelicidin, by forming a previously unidentified intracellular S1P signaling complex », *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(10), p. E1334-E1342. Disponible sur: <https://doi.org/10.1073/pnas.1504555113>.

Park, M.Y., Ha, S.E., Vetrivel, P., Kim, H.H., Bhosale, P.B., Abusaliya, A. et Kim, G.S. (2021) « Differences of Key Proteins between Apoptosis and Necroptosis », *BioMed Research International*, 2021, p. 3420168. Disponible sur: <https://doi.org/10.1155/2021/3420168>.

Park, S.-M., Yoon, J.-B. et Lee, T.H. (2004) « Receptor interacting protein is ubiquitinated by cellular inhibitor of apoptosis proteins (c-IAP1 and c-IAP2) in vitro », *FEBS Letters*, 566(1-3), p. 151-156. Disponible sur: <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.04.021>.

Park, Y.C., Burkitt, V., Villa, A.R., Tong, L. et Wu, H. (1999) « Structural basis for self-association and receptor recognition of human TRAF2 », *Nature*, 398(6727), p. 533-538. Disponible sur: <https://doi.org/10.1038/19110>.

Parton, M., Bardia, A., Kummel, S., Estevez, L.G., Huang, C.-S., Castan, J.C., Borrego, M.R., Tell, M.L., Lluch, A., Lopez, R., Beck, J.T., Ismail-Khan, R., Chen, S.-C., Hurvitz, S.A., Mayer, I.A., Atienza, R.S., Cameron, S., Krygowski, M. et Kim, S.-B. (2015) « A phase II, open-label, neoadjuvant, randomized study of LCL161 with paclitaxel in patients with triple-negative breast cancer (TNBC). », *Journal of Clinical Oncology*, 33(15\_suppl), p. 1014-1014. Disponible sur: [https://doi.org/10.1200/jco.2015.33.15\\_suppl.1014](https://doi.org/10.1200/jco.2015.33.15_suppl.1014).

Pemmaraju, N., Carter, B.Z., Kantarjian, H.M., Cortes, J.E., Kadia, T.M., Garcia-Manero, G., DiNardo, C.D., Bose, P., Daver, N.G., Konopleva, M.Y., Ohanian, M.N., Pierce, S.A., Zhou, L., Estrov, Z.E., Borthakur, G., Salinas, K., Mak, P.Y., Jain, N., Jabbour, E.J. et Verstovsek, S. (2018) « LCL161, an Oral Smac Mimetic/IAP Antagonist for Patients with Myelofibrosis (MF): Novel Translational Findings Among Long-Term Responders in a Phase 2 Clinical Trial », *Blood*, 132(Supplement 1), p. 687-687. Disponible sur: <https://doi.org/10.1182/blood-2018-99-119753>.

Peng, C., Zhu, F., Wen, W., Yao, K., Li, S., Zykova, T., Liu, K., Li, X., Ma, W.-Y., Bode, A.M. et Dong, Z. (2012) « Tumor Necrosis Factor Receptor-associated Factor Family Protein 2 Is a Key Mediator of the Epidermal Growth Factor-induced Ribosomal S6 Kinase 2/cAMP-responsive Element-binding Protein/Fos Protein Signaling Pathway\* », *Journal of Biological Chemistry*, 287(31), p. 25881-25892. Disponible sur: <https://doi.org/10.1074/jbc.m112.359521>.

Persson, U., Izumi, H., Souchelnytskyi, S., Itoh, S., Grimsby, S., Engström, U., Heldin, C.-H., Funai, K. et Dijke, P. ten (1998) « The L45 loop in type I receptors for TGF- $\beta$  family members is a critical determinant in specifying Smad isoform activation », *FEBS Letters*, 434(1-2), p. 83-87. Disponible sur: [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(98\)00954-5](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(98)00954-5).

Pesci, A., Ricchiuti, E., Ruggiero, R. et Micheli, A.D. (2010) « Bronchoalveolar lavage in idiopathic pulmonary fibrosis: What does it tell us? », *Respiratory Medicine*, 104, p. S70-S73. Disponible sur: <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2010.03.019>.

Petersen, S.L., Chen, T.T., Lawrence, D.A., Marsters, S.A., Gonzalvez, F. et Ashkenazi, A. (2015) « TRAF2 is a biologically important necroptosis suppressor », *Cell Death & Differentiation*, 22(11), p. 1846-1857. Disponible sur: <https://doi.org/10.1038/cdd.2015.35>.

Petersen, S.L., Wang, L., Yalcin-Chin, A., Li, L., Peyton, M., Minna, J., Harran, P. et Wang, X. (2007) « Autocrine TNF $\alpha$  Signaling Renders Human Cancer Cells Susceptible to Smac-Mimetic-Induced Apoptosis », *Cancer Cell*, 12(5), p. 445-456. Disponible sur: <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2007.08.029>.

Phillips, A.H., Schoeffler, A.J., Matsui, T., Weiss, T.M., Blankenship, J.W., Zobel, K., Giannetti, A.M., Dueber, E.C. et Fairbrother, W.J. (2014) « Internal motions prime cIAP1 for rapid activation », *Nature Structural & Molecular Biology*, 21(12), p. 1068-1074. Disponible sur: <https://doi.org/10.1038/nsmb.2916>.

Philpott, D.J. et Girardin, S.E. (2010) « Nod-like receptors: sentinels at host membranes », *Current Opinion in Immunology*, 22(4), p. 428-434. Disponible sur: <https://doi.org/10.1016/j.co.2010.04.010>.

Pickart, C.M. et Fushman, D. (2004) « Polyubiquitin chains: polymeric protein signals », *Current Opinion in Chemical Biology*, 8(6), p. 610-616. Disponible sur: <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2004.09.009>.

Plencharre, S., Cathelin, S., Rébé, C., Launay, S., Ladoire, S., Sordet, O., Ponnelle, T., Debili, N., Phan, T.-H., Padua, R.-A., Dubrez-Daloz, L. et Solary, E. (2004) « Translocation of the inhibitor of apoptosis protein c-IAP1 from the nucleus to the Golgi in hematopoietic cells undergoing differentiation: a nuclear export signal-mediated event », *Blood*, 104(7), p. 2035-2043. Disponible sur: <https://doi.org/10.1182/blood-2004-01-0065>.

Pluta, A., Wierzbowska, A., Cebula-Obrzut, B., Pluta, P., Stępka, K., Szmigelska-Kaplon, A., Grzybowska-Izydorczyk, O., Czemerska, M., Smolewski, P., Wrzesien-Kus, A. et Robak, T. (2015) « Prognostic value of inhibitor of apoptosis protein family expression in patients with acute myeloid leukemia », *Leukemia & Lymphoma*, 56(9), p. 2529-2535. Disponible sur: <https://doi.org/10.3109/10428194.2014.1003052>.

Proetzel, G., Pawlowski, S.A., Wiles, M.V., Yin, M., Boivin, G.P., Howles, P.N., Ding, J., Ferguson, M.W.J. et Doetschman, T. (1995) « Transforming growth factor- $\beta$ 3 is required for secondary palate fusion », *Nature Genetics*, 11(4), p. 409-414. Disponible sur: <https://doi.org/10.1038/ng1295-409>.

Qi, S., Mogi, S., Tsuda, H., Tanaka, Y., Kozaki, K., Imoto, I., Inazawa, J., Hasegawa, S. et Omura, K. (2008) « Expression of cIAP-1 correlates with nodal metastasis in squamous cell carcinoma of the tongue », *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 37(11), p. 1047-1053. Disponible sur: <https://doi.org/10.1016/j.ijom.2008.06.004>.

Qi, Y. et Xia, P. (2012) « Cellular Inhibitor of Apoptosis Protein-1 (cIAP1) Plays a Critical Role in  $\beta$ -Cell Survival under Endoplasmic Reticulum Stress PROMOTING UBIQUITINATION AND DEGRADATION OF C/EBP HOMOLOGOUS PROTEIN (CHOP)\* », *Journal of Biological Chemistry*, 287(38), p. 32236-32245. Disponible sur: <https://doi.org/10.1074/jbc.m112.362160>.

Qiao, Y.Q., Shen, J., Gu, Y., Tong, J.L., Xu, X.T., Huang, M.L. et Ran, Z.H. (2013) « TRAF-1 and TRAF-2 in IBD », *Journal of Digestive Diseases*, 14(5), p. 244-250. Disponible sur: <https://doi.org/10.1111/j.1751-2980.12044>.

Qiu, W., Liu, H., Sebastini, A., Sun, Q., Wang, H., Zhang, L. et Yu, J. (2013) « An apoptosis-independent role of SMAC in tumor suppression », *Oncogene*, 32(19), p. 2380-2389. Disponible sur: <https://doi.org/10.1038/onc.2012.265>.

Rahal, R., Frick, M., Romero, R., Korn, J.M., Kridel, R., Chan, F.C., Meissner, B., Bhang, H., Ruddy, D., Kauffmann, A., Farsidjani, A., Derti, A., Rakiec, D., Naylor, T., Pfister, E., Kovats, S., Kim, S., Dietze, K., Dörken, B., Steidl, C., Tzankov, A., Hummel, M., Monahan, J., Morrissey, M.P., Fritsch, C., Sellers, W.R., Cooke, V.G., Gascoyne, R.D., Lenz, G. et Stegmeier, F. (2014) « Pharmacological and genomic profiling identifies NF- $\kappa$ B-targeted treatment strategies for mantle cell lymphoma », *Nature Medicine*, 20(1), p. 87-92. Disponible sur: <https://doi.org/10.1038/nm.3435>.

Ramachandran, A., Vizán, P., Das, D., Chakravarty, P., Vogt, J., Rogers, K.W., Müller, P., Hinck, A.P., Sapkota, G.P. et Hill, C.S. (2018) « TGF- $\beta$  uses a novel mode of receptor activation to phosphorylate SMAD1/5 and induce epithelial-to-mesenchymal transition », *eLife*, 7, p. e31756. Disponible sur: <https://doi.org/10.7554/elife.31756>.

Rasmi, R.R., Sakthivel, K.M. et Guruvayoorappan, C. (2020) « NF- $\kappa$ B inhibitors in treatment and prevention of lung cancer », *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 130, p. 110569. Disponible sur: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110569>.

Rauert, H., Wicosky, A., Müller, N., Siegmund, D., Spindler, V., Waschke, J., Kneitz, C. et Wajant, H. (2010) « Membrane Tumor Necrosis Factor (TNF) Induces p100 Processing via TNF Receptor-2 (TNFR2)\* », *Journal of Biological Chemistry*, 285(10), p. 7394-7404. Disponible sur: <https://doi.org/10.1074/jbc.m109.037341>.

Razani, B., Zhang, X.L., Bitzer, M., Gersdorff, G. von, Böttlinger, E.P. et Lisanti, M.P. (2001) « Caveolin-1 Regulates Transforming Growth Factor (TGF)- $\beta$ /SMAD Signaling through an Interaction with the TGF- $\beta$  Type I Receptor\* », *Journal of Biological Chemistry*, 276(9), p. 6727-6738. Disponible sur: <https://doi.org/10.1074/jbc.m008340200>.

Reardon, D.A., Michalkiewicz, E., Boyett, J.M., Sublett, J.E., Entrekin, R.E., Ragsdale, S.T., Valentine, M.B., Behm, F.G., Li, H., Heideman, R.L., Kun, L.E., Shapiro, D.N. et Look, A.T. (1997) « Extensive genomic abnormalities in childhood medulloblastoma by comparative genomic hybridization. », *Cancer research*, 57(18), p. 4042-7.

Reffey, S.B., Wurthner, J.U., Parks, W.T., Roberts, A.B. et Duckett, C.S. (2001) « X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein Functions as a Cofactor in Transforming Growth Factor- $\beta$  Signaling\* », *Journal of Biological Chemistry*, 276(28), p. 26542-26549. Disponible sur: <https://doi.org/10.1074/jbc.m100331200>.

Rehwinkel, J. et Gack, M.U. (2020) « RIG-I-like receptors: their regulation and roles in RNA sensing », *Nature Reviews Immunology*, 20(9), p. 537-551. Disponible sur: <https://doi.org/10.1038/s41577-020-0288-3>.

Rezaei, H.B., Kamato, D., Ansari, G., Osman, N. et Little, P.J. (2012) « Cell biology of Smad2/3 linker region phosphorylation in vascular smooth muscle », *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 39(8), p. 661-667. Disponible sur: <https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2011.05592.x>.

Richardson, P.G., Barlogie, B., Berenson, J., Singhal, S., Jagannath, S., Irwin, D., Rajkumar, S.V., Srkalovic, G., Alsina, M., Alexanian, R., Siegel, D., Orlowski, R.Z., Kuter, D., Limantani, S.A., Lee, S., Hidemitsu, T., Esseltine, D.-L., Kauffman, M., Adams, J., Schenkein, D.P. et Anderson, K.C. (2003) « A Phase 2 Study of Bortezomib in Relapsed, Refractory Myeloma », *The New England Journal of Medicine*, 348(26), p. 2609-2617. Disponible sur: <https://doi.org/10.1056/nejmoa030288>.

Rodriguez, K.R., Bruns, A.M. et Horvath, C.M. (2014) « MDA5 and LGP2: Accomplices and Antagonists of Antiviral Signal Transduction », *Journal of Virology*, 88(15), p. 8194-8200. Disponible sur: <https://doi.org/10.1128/jvi.00640-14>.

Ross, S. et Hill, C.S. (2008) « How the Smads regulate transcription », *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 40(3), p. 383-408. Disponible sur: <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2007.09.006>.

Rothe, M., Pan, M.-G., Henzel, W.J., Ayres, T.M. et Goeddel, D.V. (1995) « The TNFR2-TRAF signaling complex contains two novel proteins related to baculoviral inhibitor of apoptosis proteins », *Cell*, 83(7), p. 1243-1252. Disponible sur: [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90149-3](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90149-3).

Rothe, M., Wong, S.C., Henzel, W.J. et Goeddel, D.V. (1994) « A novel family of putative signal transducers associated with the cytoplasmic domain of the 75 kDa tumor necrosis factor receptor », *Cell*, 78(4), p. 681-692. Disponible sur: [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90532-0](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90532-0).

Roy, N., Mahadevan, M.S., McLean, M., Shutter, G., Yaraghi, Z., Farahani, R., Baird, S., Besner-Johnston, A., Lefebvre, C., Kang, X., Salih, M., Aubry, H., Tamai, K., Guan, X., Ioannou, P., Crawford, T.O., Jong, P.J. de, Surh, L., Ikeda, J.-E., Korneluk, R.G. et MacKenzie, A. (1995) « The gene for neuronal apoptosis inhibitory protein is partially deleted in individuals with spinal muscular atrophy », *Cell*, 80(1), p. 167-178. Disponible sur: [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90461-1](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90461-1).

Saba, N. et Wiestner, A. (2014) « Do mantle cell lymphomas have an 'Achilles heel' », *Current Opinion in Hematology*, 21(4), p. 350-357. Disponible sur: <https://doi.org/10.1097/moh.0000000000000057>.

Sadok, A. et Marshall, C.J. (2014) « Rho GTPases », *Small GTPases*, 5(4), p. e983878. Disponible sur: <https://doi.org/10.4161/sqtp.29710>.

Samaniego, F., Hollebecque, A., Foss, F., Lister, J., Mita, M., Wagner-Johnston, N., Dyer, M., You, B., Prica, A., Hernandez-Llizaliturri, F., Ferraldeschi, R., Chan, D., Zhang, J. et Mehta, A. (2019) « PRELIMINARY RESULTS OF ASTX660, A NOVEL NON-PEPTIDOMIMETIC cIAP1/2 AND XIAP ANTAGONIST, IN RELAPSED/REFRACTORY PERIPHERAL T-CELL LYMPHOMA AND CUTANEOUS T CELL LYMPHOMA », *Hematological Oncology*, 37, p. 527-527. Disponible sur: [https://doi.org/10.1002/hon.211\\_2631](https://doi.org/10.1002/hon.211_2631).

Samuel, T., Welsh, K., Lober, T., Togo, S.H., Zapata, J.M. et Reed, J.C. (2006) « Distinct BIR Domains of cIAP1 Mediate Binding to and Ubiquitination of Tumor Necrosis Factor Receptor-associated Factor 2 and Second Mitochondrial Activator of Caspases\* », *Journal of Biological Chemistry*, 281(2), p. 1080-1090. Disponible sur: <https://doi.org/10.1074/jbc.m509381200>.

Sanford, L.P., Ormsby, I., Groot, A.C.G., Sariola, H., Friedman, R., Boivin, G.P., Cardell, E.L. et Doetschman, T. (1997) « TGFbeta2 knockout mice have multiple developmental defects that are non-overlapping with other TGFbeta knockout phenotypes », *Development*, 124(13), p. 2659-2670. Disponible sur: <https://doi.org/10.1242/dev.124.13.2659>.

Schilling, R., Geserick, P. et Leverkus, M. (2014) « Characterization of the Ripoptosome and Its Components Implications for Anti-inflammatory and Cancer Therapy », *Methods in Enzymology*, 545, p. 83-102. Disponible sur: <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-801430-1.00004-4>.

Schneider, A.T., Gautheron, J., Feoktistova, M., Roderburg, C., Loosen, S.H., Roy, S., Benz, F., Schemmer, P., Büchler, M.W., Nachbur, U., Neumann, U.P., Tolba, R., Luedde, M., Zucman-Rossi, J., Panayotova-Dimitrova, D., Leverkus, M., Preisinger, C., Tacke, F., Trautwein, C., Longerich, T., Vucur, M. et Luedde, T. (2017) « RIPK1 Suppresses a TRAF2-Dependent Pathway to Liver Cancer », *Cancer Cell*, 31(1), p. 94-109. Disponible sur: <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2016.11.009>.

Schwandner, R., Yamaguchi, K. et Cao, Z. (2000) « Requirement of Tumor Necrosis Factor Receptor-Associated Factor (Traf)6 in Interleukin 17 Signal Transduction », *The Journal of Experimental Medicine*, 191(7), p. 1233-1240. Disponible sur: <https://doi.org/10.1084/jem.191.7.1233>.

Scott, F.L., Denault, J., Riedl, S.J., Shin, H., Renatus, M. et Salvesen, G.S. (2005) « XIAP inhibits caspase-3 and -7 using two binding sites: evolutionarily conserved mechanism of IAPs », *The EMBO Journal*, 24(3), p. 645-655. Disponible sur: <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600544>.

Sebe, A., Leivonen, S.-K., Fintha, A., Masszi, A., Rosivall, L., Kähäri, V.-M. et Mucsi, I. (2008) « Transforming growth factor- $\beta$ -induced alpha-smooth muscle cell actin expression in renal proximal tubular cells is regulated by p38 $\beta$  mitogen-activated protein kinase, extracellular signal-regulated protein kinase1,2 and the Smad signalling during epithelial–myofibroblast transdifferentiation », *Nephrology Dialysis Transplantation*, 23(5), p. 1537-1545. Disponible sur: <https://doi.org/10.1093/ndt/gfm789>.

Senoo, T., Hattori, N., Tanimoto, T., Furukawa, M., Ishikawa, N., Fujitaka, K., Haruta, Y., Murai, H., Yokoyama, A. et Kohno, N. (2010) « Suppression of plasminogen activator inhibitor-1 by RNA interference attenuates pulmonary fibrosis », *Thorax*, 65(4), p. 334. Disponible sur: <https://doi.org/10.1136/thx.2009.119974>.

Senzer, N.N., LoRusso, P., Martin, L.P., Schilder, R.J., Amaravadi, R.K., Papadopoulos, K.P., Segota, Z.E., Weng, D.E., Graham, M. et Adjei, A.A. (2013) « Phase II clinical activity and tolerability of the SMAC-mimetic birinapant (TL32711) plus irinotecan in irinotecan-relapsed/refractory metastatic colorectal cancer. », *Journal of Clinical Oncology*, 31(15\_suppl), p. 3621-3621. Disponible sur: [https://doi.org/10.1200/jco.2013.31.15\\_suppl.3621](https://doi.org/10.1200/jco.2013.31.15_suppl.3621).

Seo, T.W., Lee, Y.T., Lee, J.S. et Yoo, S.J. (2020) « Stabilization of C-terminal binding protein 2 by cellular inhibitor of apoptosis protein 1 via BIR domains without E3 ligase activity », *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 530(2), p. 440-447. Disponible sur: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.05.098>.

Seong, H.-A., Jung, H. et Ha, H. (2010) « Murine Protein Serine/Threonine Kinase 38 Stimulates TGF- $\beta$  Signaling in a Kinase-dependent Manner via Direct Phosphorylation of Smad Proteins\* », *Journal of Biological Chemistry*, 285(40), p. 30959-30970. Disponible sur: <https://doi.org/10.1074/jbc.m110.138370>.

Seshagiri, S. et Miller, L.K. (1997) « Baculovirus inhibitors of apoptosis (IAPs) block activation of Sf-caspase-1 », *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(25), p. 13606-13611. Disponible sur: <https://doi.org/10.1073/pnas.94.25.13606>.

Sheen, Y.Y., Kim, M.-J., Park, S.-A., Park, S.-Y. et Nam, J.-S. (2013) « Targeting the Transforming Growth Factor- $\beta$  Signaling in Cancer Therapy », *Biomolecules and Therapeutics*, 21(5), p. 323-331. Disponible sur: <https://doi.org/10.4062/biomolther.2013.072>.

Shembade, N., Ma, A. et Harhaj, E.W. (2010) « Inhibition of NF- $\kappa$ B Signaling by A20 Through Disruption of Ubiquitin Enzyme Complexes », *Science*, 327(5969), p. 1135-1139. Disponible sur: <https://doi.org/10.1126/science.1182364>.

Shen, J., Qiao, Y., Ran, Z., Wang, T., Xu, J. et Feng, J. (2013) « Intestinal protein expression profile identifies inflammatory bowel disease and predicts relapse. », *International journal of clinical and experimental pathology*, 6(5), p. 917-25.

Shen, R.R., Zhou, A.Y., Kim, E., O'Connell, J.T., Hagerstrand, D., Beroukhim, R. et Hahn, W.C. (2015) « TRAF2 is an NF- $\kappa$ B-activating oncogene in epithelial cancers », *Oncogene*, 34(2), p. 209-216. Disponible sur: <https://doi.org/10.1038/onc.2013.543>.

Shi, W., Sun, C., He, B., Xiong, W., Shi, X., Yao, D. et Cao, X. (2004) « GADD34-PP1c recruited by Smad7 dephosphorylates TGF $\beta$  type I receptor », *The Journal of Cell Biology*, 164(2), p. 291-300. Disponible sur: <https://doi.org/10.1083/jcb.200307151>.

Shi, Y. (2002) « A conserved tetrapeptide motif: potentiating apoptosis through IAP-binding », *Cell Death & Differentiation*, 9(2), p. 93-95. Disponible sur: <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4400957>.

Shi, Y., Hata, A., Lo, R.S., Massagué, J. et Pavletich, N.P. (1997) « A structural basis for mutational inactivation of the tumour suppressor Smad4 », *Nature*, 388(6637), p. 87-93. Disponible sur: <https://doi.org/10.1038/40431>.

Shi, Y., Wang, Y.-F., Jayaraman, L., Yang, H., Massagué, J. et Pavletich, N.P. (1998) « Crystal Structure of a Smad MH1 Domain Bound to DNA Insights on DNA Binding in TGF- $\beta$  Signaling », *Cell*, 94(5), p. 585-594. Disponible sur: [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81600-1](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81600-1).

Shu, H.-B., Takeuchi, M. et Goeddel, D.V. (1996) « The tumor necrosis factor receptor 2 signal transducers TRAF2 and c-IAP1 are components of the tumor necrosis factor receptor 1 signaling complex », *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(24), p. 13973-13978. Disponible sur: <https://doi.org/10.1073/pnas.93.24.13973>.

Siednienko, J., Gajanayake, T., Fitzgerald, K.A., Moynagh, P. et Miggan, S.M. (2011) « Absence of MyD88 Results in Enhanced TLR3-Dependent Phosphorylation of IRF3 and Increased IFN- $\beta$  and RANTES Production », *The Journal of Immunology*, 186(4), p. 2514-2522. Disponible sur: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1003093>.

Siegmund, D., Wagner, J. et Wajant, H. (2022) « TNF Receptor Associated Factor 2 (TRAF2) Signaling in Cancer », *Cancers*, 14(16), p. 4055. Disponible sur: <https://doi.org/10.3390/cancers14164055>.

Silke, J. (2011) « The regulation of TNF signalling: what a tangled web we weave », *Current Opinion in Immunology*, 23(5), p. 620-626. Disponible sur: <https://doi.org/10.1016/j.coic.2011.08.002>.

Silke, J., Kratina, T., Chu, D., Ekert, P.G., Day, C.L., Pakusch, M., Huang, D.C.S. et Vaux, D.L. (2005a) « Determination of cell survival by RING-mediated regulation of inhibitor of apoptosis (IAP) protein abundance », *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(45), p. 16182-16187. Disponible sur: <https://doi.org/10.1073/pnas.0502828102>.

Silke, J., Kratina, T., Chu, D., Ekert, P.G., Day, C.L., Pakusch, M., Huang, D.C.S. et Vaux, D.L. (2005b) « Determination of cell survival by RING-mediated regulation of inhibitor of apoptosis (IAP) protein abundance », *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(45), p. 16182-16187. Disponible sur: <https://doi.org/10.1073/pnas.0502828102>.

Silke, J. et Meier, P. (2013) « Inhibitor of Apoptosis (IAP) Proteins—Modulators of Cell Death and Inflammation », *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(2), p. a008730. Disponible sur: <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008730>.

Smith, M.A., Carol, H., Evans, K., Richmond, J., Kang, M., Reynolds, C.P., Chunduru, S., Graham, M.A., Geier, B., Kurmasheva, R., Houghton, P.J. et Lock, R.B. (2012) « Birinapant (TL32711), a Small Molecule Smac Mimetic, Induces Regressions in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL) Xenografts That Express TNF $\alpha$  and Synergizes with TNF $\alpha$  in Vitro – A Report From the Pediatric Preclinical Testing Program (PPTP) », *Blood*, 120(21), p. 3565-3565. Disponible sur: <https://doi.org/10.1182/blood.v120.21.3565.3565>.

So, T., Nagashima, H. et Ishii, N. (2015) « TNF Receptor-Associated Factor (TRAF) Signaling Network in CD4+ T-Lymphocytes », *The Tohoku Journal of Experimental Medicine*, 236(2), p. 139-154. Disponible sur: <https://doi.org/10.1620/tjem.236.139>.

Sorrentino, A., Thakur, N., Grimsby, S., Marcusson, A., Bulow, V. von, Schuster, N., Zhang, S., Heldin, C.-H. et Landström, M. (2008) « The type I TGF- $\beta$  receptor engages TRAF6 to activate TAK1 in a receptor kinase-independent manner », *Nature Cell Biology*, 10(10), p. 1199-1207. Disponible sur: <https://doi.org/10.1038/ncb1780>.

Srinivasula, S.M. et Ashwell, J.D. (2008) « IAPs: What's in a Name? », *Molecular Cell*, 30(2), p. 123-135. Disponible sur: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.03.008>.

Srinivasula, S.M., Hegde, R., Saleh, A., Datta, P., Shiozaki, E., Chai, J., Lee, R.-A., Robbins, P.D., Fernandes-Alnemri, T., Shi, Y. et Alnemri, E.S. (2001) « A conserved XIAP-interaction motif in caspase-9 and Smac/DIABLO regulates caspase activity and apoptosis », *Nature*, 410(6824), p. 112-116. Disponible sur: <https://doi.org/10.1038/35065125>.

Stenvers, K.L., Tursky, M.L., Harder, K.W., Kountouri, N., Amatayakul-Chantler, S., Grail, D., Small, C., Weinberg, R.A., Sizeland, A.M. et Zhu, H.-J. (2003) « Heart and Liver Defects and Reduced Transforming Growth Factor  $\beta$ 2 Sensitivity in Transforming Growth Factor  $\beta$  Type III Receptor-Deficient Embryos », *Molecular and Cellular Biology*, 23(12), p. 4371-4385. Disponible sur: <https://doi.org/10.1128/mcb.23.12.4371-4385.2003>.

Sujitha, S., Dinesh, P. et Rasool, M. (2018) « Berberine modulates ASK1 signaling mediated through TLR4/TRAF2 via upregulation of miR-23a », *Toxicology and Applied Pharmacology*, 359, p. 34-46. Disponible sur: <https://doi.org/10.1016/j.taap.2018.09.017>.

Sun, C., Cai, M., Gunasekera, A.H., Meadows, R.P., Wang, H., Chen, J., Zhang, H., Wu, W., Xu, N., Ng, S.-C. et Fesik, S.W. (1999) « NMR structure and mutagenesis of the inhibitor-of-apoptosis protein XIAP », *Nature*, 401(6755), p. 818-822. Disponible sur: <https://doi.org/10.1038/44617>.

Sun, H., Nikolovska-Coleska, Z., Lu, J., Meagher, J.L., Yang, C.-Y., Qiu, S., Tomita, Y., Ueda, Y., Jiang, S., Krajewski, K., Roller, P.P., Stuckey, J.A. et Wang, S. (2007) « Design, Synthesis, and Characterization of a Potent, Nonpeptide, Cell-Permeable, Bivalent Smac Mimetic That Concurrently Targets Both the BIR2 and BIR3 Domains in XIAP », *Journal of the American Chemical Society*, 129(49), p. 15279-15294. Disponible sur: <https://doi.org/10.1021/ja074725f>.

Sun, H., Nikolovska-Coleska, Z., Yang, C.-Y., Qian, D., Lu, J., Qiu, S., Bai, L., Peng, Y., Cai, Q. et Wang, S. (2008) « Design of Small-Molecule Peptidic and Nonpeptidic Smac Mimetics », *Accounts of Chemical Research*, 41(10), p. 1264-1277. Disponible sur: <https://doi.org/10.1021/ar8000553>.

Sun, H., Nikolovska-Coleska, Z., Yang, C.-Y., Xu, L., Liu, M., Tomita, Y., Pan, H., Yoshioka, Y., Krajewski, K., Roller, P.P. et Wang, S. (2004) « Structure-Based Design of Potent, Conformationally Constrained Smac Mimetics », *Journal of the American Chemical Society*, 126(51), p. 16686-16687. Disponible sur: <https://doi.org/10.1021/ja047438+>.

Sun, S.-C. (2017) « The non-canonical NF- $\kappa$ B pathway in immunity and inflammation », *Nature Reviews Immunology*, 17(9), p. 545-558. Disponible sur: <https://doi.org/10.1038/nri.2017.52>.

Suzuki, Y., Nakabayashi, Y. et Takahashi, R. (2001) « Ubiquitin-protein ligase activity of X-linked inhibitor of apoptosis protein promotes proteasomal degradation of caspase-3 and enhances its anti-apoptotic effect in Fas-induced cell death », *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(15), p. 8662-8667. Disponible sur: <https://doi.org/10.1073/pnas.161506698>.

Swaidani, S., Liu, C., Zhao, J., Bulek, K. et Li, X. (2019) « TRAF Regulation of IL-17 Cytokine Signaling », *Frontiers in Immunology*, 10, p. 1293. Disponible sur: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01293>.

Swanson, K.A., Hicke, L. et Radhakrishnan, I. (2006) « Structural Basis for Monoubiquitin Recognition by the Ede1 UBA Domain », *Journal of Molecular Biology*, 358(3), p. 713-724. Disponible sur: <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.02.059>.

Takeda, A., Oberoi-Khanuja, T.K., Glatz, G., Schulenburg, K., Scholz, R., Carpy, A., Macek, B., Remenyi, A. et Rajalingam, K. (2014) « Ubiquitin-dependent regulation of MEKK2/3-MEK5-ERK5 signaling module by XIAP and cIAP1 », *The EMBO Journal*, 33(16), p. 1784-1801. Disponible sur: <https://doi.org/10.15252/embj.201487808>.

Tamm, I., Kornblau, S.M., Segall, H., Krajewski, S., Welsh, K., Kitada, S., Scudiero, D.A., Tudor, G., Qui, Y.H., Monks, A., Andreeff, M. et Reed, J.C. (2000) « Expression and prognostic significance of IAP-family genes in human cancers and myeloid leukemias. », *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 6(5), p. 1796-803.

Tang, E.D., Wang, C.-Y., Xiong, Y. et Guan, K.-L. (2003) « A Role for NF- $\kappa$ B Essential Modifier/IkB Kinase- $\gamma$  (NEMO/IKK $\gamma$ ) Ubiquitination in the Activation of the IkB Kinase Complex by Tumor Necrosis Factor- $\alpha^*$  », *Journal of Biological Chemistry*, 278(39), p. 37297-37305. Disponible sur: <https://doi.org/10.1074/jbc.m303389200>.

Tang, L., Yamashita, M., Coussens, N.P., Tang, Y., Wang, X., Li, C., Deng, C., Cheng, S.Y. et Zhang, Y.E. (2011) « Ablation of Smurf2 reveals an inhibition in TGF- $\beta$  signalling through multiple mono-ubiquitination of Smad3 », *The EMBO Journal*, 30(23), p. 4777-4789. Disponible sur: <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.393>.

Tang, L.-Y., Heller, M., Meng, Z., Yu, L.-R., Tang, Y., Zhou, M. et Zhang, Y.E. (2017) « Transforming Growth Factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) Directly Activates the JAK1-STAT3 Axis to Induce Hepatic Fibrosis in Coordination with the SMAD Pathway\* », *Journal of Biological Chemistry*, 292(10), p. 4302-4312. Disponible sur: <https://doi.org/10.1074/jbc.m116.773085>.

Tanimoto, T., Tsuda, H., Imazeki, N., Ohno, Y., Imoto, I., Inazawa, J. et Matsubara, O. (2005) « Nuclear expression of cIAP-1, an apoptosis inhibiting protein, predicts lymph node metastasis and poor patient prognosis in head and neck squamous cell carcinomas », *Cancer Letters*, 224(1), p. 141-151. Disponible sur: <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2004.11.049>.

Tartaglia, L.A., Ayres, T.M., Wong, G.H.W. et Goeddel, D.V. (1993) « A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death », *Cell*, 74(5), p. 845-853. Disponible sur: [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90464-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90464-2).

Tchoghandjian, A., Jennewein, C., Eckhardt, I., Rajalingam, K. et Fulda, S. (2013) « Identification of non-canonical NF- $\kappa$ B signaling as a critical mediator of Smac mimetic-stimulated migration and invasion of glioblastoma cells », *Cell Death & Disease*, 4(3), p. e564-e564. Disponible sur: <https://doi.org/10.1038/cddis.2013.70>.

Tchoghandjian, A., Soubéran, A., Tabouret, E., Colin, C., Denicolaï, E., Jiguet-Jiglaire, C., El-Battari, A., Villard, C., Baeza-Kallee, N. et Figarella-Branger, D. (2016) « Inhibitor of apoptosis protein expression in glioblastomas and their in vitro and in vivo targeting by SMAC mimetic GDC-0152 », *Cell Death & Disease*, 7(8), p. e2325-e2325. Disponible sur: <https://doi.org/10.1038/cddis.2016.214>.

Tenev, T., Bianchi, K., Dardign, M., Broemer, M., Langlais, C., Wallberg, F., Zachariou, A., Lopez, J., MacFarlane, M., Cain, K. et Meier, P. (2011) « The Ripoptosome, a Signaling Platform that Assembles in Response to Genotoxic Stress and Loss of IAPs », *Molecular Cell*, 43(3), p. 432-448. Disponible sur: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.06.006>.

Tesio, M., Tang, Y., Müdder, K., Saini, M., Paleske, L. von, Macintyre, E., Pasparakis, M., Waisman, A. et Trumpp, A. (2015) « Hematopoietic stem cell quiescence and function are controlled by the CYLD-TRAF2-p38MAPK pathway », *Journal of Experimental Medicine*, 212(4), p. 525-538. Disponible sur: <https://doi.org/10.1084/jem.20141438>.

Thibault, B., Genre, L., Naour, A.L., Broca, C., Mery, E., Vuagniaux, G., Delord, J.P., Wiedemann, N. et Couderc, B. (2018) « DEBIO 1143, an IAP inhibitor, reverses carboplatin resistance in ovarian cancer cells and triggers apoptotic or necroptotic cell death », *Scientific Reports*, 8(1), p. 17862. Disponible sur: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-35860-z>.

Tobin, D., Hogerlinden, M. van et Toftgård, R. (1998) « UVB-induced association of tumor necrosis factor (TNF) receptor 1/TNF receptor-associated factor-2 mediates activation of Rel proteins », *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(2), p. 565-569. Disponible sur: <https://doi.org/10.1073/pnas.95.2.565>.

Trauzold, A., Röder, C., Sipos, B., Karsten, K., Arlt, A., Jiang, P., Martin-Subero, J.I., Siegmund, D., Müerköster, S., Raluy, L.P., Siebert, R., Wajant, H. et Kalthoff, H. (2005) « CD95 and TRAF2 promote invasiveness of pancreatic cancer cells », *The FASEB Journal*, 19(6), p. 1-24. Disponible sur: <https://doi.org/10.1096/fj.04-2984fie>.

Trompouki, E., Hatzivassiliou, E., Tsichritzis, T., Farmer, H., Ashworth, A. et Mosialos, G. (2003) « CYLD is a deubiquitinating enzyme that negatively regulates NF-κB activation by TNFR family members », *Nature*, 424(6950), p. 793-796. Disponible sur: <https://doi.org/10.1038/nature01803>.

Tse, M.K., Hui, S.K., Yang, Y., Yin, S.-T., Hu, H.-Y., Zou, B., Wong, B.C.Y. et Sze, K.H. (2011) « Structural Analysis of the UBA Domain of X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein Reveals Different Surfaces for Ubiquitin-Binding and Self-Association », *PLoS ONE*, 6(12), p. e28511. Disponible sur: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028511>.

Tseng, P.-H., Matsuzawa, A., Zhang, W., Mino, T., Vignali, D.A.A. et Karin, M. (2010) « Different modes of ubiquitination of the adaptor TRAF3 selectively activate the expression of type I interferons and proinflammatory cytokines », *Nature Immunology*, 11(1), p. 70-75. Disponible sur: <https://doi.org/10.1038/ni.1819>.

Twohig, J.P., Cuff, S.M., Yong, A.A. et Wang, E.C.Y. (2011) « The role of tumor necrosis factor receptor superfamily members in mammalian brain development, function and homeostasis », *Reviews in the Neurosciences*, 22(5), p. 509-533. Disponible sur: <https://doi.org/10.1515/rns.2011.041>.

Tzavlaiki, K. et Moustakas, A. (2020) « TGF-β Signaling », *Biomolecules*, 10(3), p. 487. Disponible sur: <https://doi.org/10.3390/biom10030487>.

Vallabhapurapu, S., Matsuzawa, A., Zhang, W., Tseng, P.-H., Keats, J.J., Wang, H., Vignali, D.A.A., Bergsagel, P.L. et Karin, M. (2008) « Nonredundant and complementary functions of TRAF2 and TRAF3 in a ubiquitination cascade that activates NIK-dependent alternative NF-κB signaling », *Nature Immunology*, 9(12), p. 1364-1370. Disponible sur: <https://doi.org/10.1038/ni.1678>.

Vallat, L., Magdelénat, H., Merle-Béral, H., Masdehors, P., Montalk, G.P. de, Davi, F., Kruhoffer, M., Sabatier, L., Orntoft, T.F. et Delic, J. (2003) « The resistance of B-CLL cells to DNA damage-induced apoptosis defined by DNA microarrays », *Blood*, 101(11), p. 4598-4606. Disponible sur: <https://doi.org/10.1182/blood-2002-06-1743>.

Vanlangenakker, N., Berghe, T.V., Bogaert, P., Laukens, B., Zobel, K., Deshayes, K., Vucic, D., Fulda, S., Vandenameele, P. et Bertrand, M.J.M. (2011) « cIAP1 and TAK1 protect cells from TNF-induced necrosis by preventing RIP1/RIP3-dependent reactive oxygen species production », *Cell Death & Differentiation*, 18(4), p. 656-665. Disponible sur: <https://doi.org/10.1038/cdd.2010.138>.

Varfolomeev, E., Blankenship, J.W., Wayson, S.M., Fedorova, A.V., Kayagaki, N., Garg, P., Zobel, K., Dynek, J.N., Elliott, L.O., Wallweber, H.J.A., Flygare, J.A., Fairbrother, W.J., Deshayes, K., Dixit, V.M. et Vucic, D. (2007) « IAP Antagonists Induce Autoubiquitination of c-IAPs, NF-κB Activation, and TNFα-Dependent Apoptosis », *Cell*, 131(4), p. 669-681. Disponible sur: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.10.030>.

Varfolomeev, E., Goncharov, T., Fedorova, A.V., Dynek, J.N., Zobel, K., Deshayes, K., Fairbrother, W.J. et Vucic, D. (2008) « c-IAP1 and c-IAP2 Are Critical Mediators of Tumor Necrosis Factor α (TNFα)-induced NF-κB Activation\* », *Journal of Biological Chemistry*, 283(36), p. 24295-24299. Disponible sur: <https://doi.org/10.1074/jbc.c800128200>.

Varfolomeev, E., Goncharov, T., Maecker, H., Zobel, K., Kömüves, L.G., Deshayes, K. et Vucic, D. (2012) « Cellular Inhibitors of Apoptosis Are Global Regulators of NF-κB and MAPK Activation by Members of the TNF Family of Receptors », *Science Signaling*, 5(216), p. ra22. Disponible sur: <https://doi.org/10.1126/scisignal.2001878>.

Vega-Rubín-de-Celis, S. (2019) « The Role of Beclin 1-Dependent Autophagy in Cancer », *Biology*, 9(1), p. 4. Disponible sur: <https://doi.org/10.3390/biology9010004>.

Verhagen, A.M., Ekert, P.G., Pakusch, M., Silke, J., Connolly, L.M., Reid, G.E., Moritz, R.L., Simpson, R.J. et Vaux, D.L. (2000) « Identification of DIABLO, a Mammalian Protein that Promotes Apoptosis by Binding to and Antagonizing IAP Proteins », *Cell*, 102(1), p. 43-53. Disponible sur: [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)00009-x](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)00009-x).

Vince, J.E., Pantaki, D., Feltham, R., Mace, P.D., Cordier, S.M., Schmukle, A.C., Davidson, A.J., Callus, B.A., Wong, W.W.-L., Gentle, I.E., Carter, H., Lee, E.F., Walczak, H., Day, C.L., Vaux, D.L. et Silke, J. (2009) « TRAF2 Must Bind to Cellular Inhibitors of Apoptosis for Tumor Necrosis Factor (TNF) to Efficiently Activate NF- $\kappa$ B and to Prevent TNF-induced Apoptosis », *Journal of Biological Chemistry*, 284(51), p. 35906-35915. Disponible sur: <https://doi.org/10.1074/jbc.m109.072256>.

Vince, J.E., Wong, W.W.-L., Gentle, I., Lawlor, K.E., Allam, R., O'Reilly, L., Mason, K., Gross, O., Ma, S., Guarda, G., Anderton, H., Castillo, R., Häcker, G., Silke, J. et Tschoopp, J. (2012) « Inhibitor of Apoptosis Proteins Limit RIP3 Kinase-Dependent Interleukin-1 Activation », *Immunity*, 36(2), p. 215-227. Disponible sur: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.01.012>.

Vince, J.E., Wong, W.W.-L., Khan, N., Feltham, R., Chau, D., Ahmed, A.U., Benetatos, C.A., Chunduru, S.K., Condon, S.M., McKinlay, M., Brink, R., Leverkus, M., Tergaonkar, V., Schneider, P., Callus, B.A., Koentgen, F., Vaux, D.L. et Silke, J. (2007) « IAP Antagonists Target cIAP1 to Induce TNF $\alpha$ -Dependent Apoptosis », *Cell*, 131(4), p. 682-693. Disponible sur: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.10.037>.

Vladimer, G.I., Marty-Roix, R., Ghosh, S., Weng, D. et Lien, E. (2013) « Inflammasomes and host defenses against bacterial infections », *Current Opinion in Microbiology*, 16(1), p. 23-31. Disponible sur: <https://doi.org/10.1016/j.mib.2012.11.008>.

Vucic, D., Deshayes, K., Ackerly, H., Pisabarro, M.T., Kadkhodayan, S., Fairbrother, W.J. et Dixit, V.M. (2002) « SMAC Negatively Regulates the Anti-apoptotic Activity of Melanoma Inhibitor of Apoptosis (ML-IAP)\* », *Journal of Biological Chemistry*, 277(14), p. 12275-12279. Disponible sur: <https://doi.org/10.1074/jbc.m112045200>.

Waes, C.V. (2007) « Nuclear Factor- $\kappa$ B in Development, Prevention, and Therapy of Cancer », *Clinical Cancer Research*, 13(4), p. 1076-1082. Disponible sur: <https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-06-2221>.

Wajant, H. et Scheurich, P. (2011) « TNFR1-induced activation of the classical NF- $\kappa$ B pathway », *The FEBS Journal*, 278(6), p. 862-876. Disponible sur: <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08015.x>.

Walsh, D., McCarthy, J., O'Driscoll, C. et Melgar, S. (2013) « Pattern recognition receptors—Molecular orchestrators of inflammation in inflammatory bowel disease », *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 24(2), p. 91-104. Disponible sur: <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2012.09.003>.

Wang, F., Weng, H., Quon, M.J., Yu, J., Wang, J.-Y., Hueber, A.-O. et Yang, P. (2015) « Dominant negative FADD dissipates the proapoptotic signalosome of the unfolded protein response in diabetic embryopathy », *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 309(10), p. E861-E873. Disponible sur: <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00215.2015>.

Ward-Kavanagh, L.K., Lin, W.W., Šedý, J.R. et Ware, C.F. (2016) « The TNF Receptor Superfamily in Co-stimulating and Co-inhibitory Responses », *Immunity*, 44(5), p. 1005-1019. Disponible sur: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.04.019>.

Weber, A., Kirejczyk, Z., Besch, R., Potthoff, S., Leverkus, M. et Häcker, G. (2010) « Proapoptotic signalling through Toll-like receptor-3 involves TRIF-dependent activation of caspase-8 and is under the control of inhibitor of apoptosis proteins in melanoma cells », *Cell Death & Differentiation*, 17(6), p. 942-951. Disponible sur: <https://doi.org/10.1038/cdd.2009.190>.

Weber, C.H. et Vincenz, C. (2001) « The death domain superfamily: a tale of two interfaces? », *Trends in Biochemical Sciences*, 26(8), p. 475-481. Disponible sur: [https://doi.org/10.1016/s0968-0004\(01\)01905-3](https://doi.org/10.1016/s0968-0004(01)01905-3).

Wee, P. et Wang, Z. (2017) « Epidermal Growth Factor Receptor Cell Proliferation Signaling Pathways », *Cancers*, 9(5), p. 52. Disponible sur: <https://doi.org/10.3390/cancers9050052>.

Wei, B., Ruan, J., Mi, Y., Hu, J., Zhang, J., Wang, Z., Hu, Q., Jiang, H. et Ding, Q. (2017) « Knockdown of TNF receptor-associated factor 2 (TRAF2) modulates in vitro growth of TRAIL-treated prostate cancer cells », *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 93, p. 462-469. Disponible sur: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.05.145>.

Wen, A.Y., Sakamoto, K.M. et Miller, L.S. (2010) « The Role of the Transcription Factor CREB in Immune Function », *The Journal of Immunology*, 185(11), p. 6413-6419. Disponible sur: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1001829>.

Wilkes, M.C., Murphy, S.J., Garamszegi, N. et Leof, E.B. (2003) « Cell-Type-Specific Activation of PAK2 by Transforming Growth Factor  $\beta$  Independent of Smad2 and Smad3 », *Molecular and Cellular Biology*, 23(23), p. 8878-8889. Disponible sur: <https://doi.org/10.1128/mcb.23.23.8878-8889.2003>.

Witt, A. et Vucic, D. (2017) « Diverse ubiquitin linkages regulate RIP kinases-mediated inflammatory and cell death signaling », *Cell Death & Differentiation*, 24(7), p. 1160-1171. Disponible sur: <https://doi.org/10.1038/cdd.2017.33>.

Wu, C., Conze, D.B., Li, X., Ying, S., Hanover, J.A. et Ashwell, J.D. (2005) « TNF- $\alpha$  induced c-IAP1/TRAFF complex translocation to a Ubc6-containing compartment and TRAFF ubiquitination », *The EMBO Journal*, 24(10), p. 1886-1898. Disponible sur: <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600649>.

Wu, G., Chai, J., Suber, T.L., Wu, J.-W., Du, C., Wang, X. et Shi, Y. (2000) « Structural basis of IAP recognition by Smac/DIABLO », *Nature*, 408(6815), p. 1008-1012. Disponible sur: <https://doi.org/10.1038/35050012>.

Xia, L., Tan, S., Zhou, Y., Lin, J., Wang, Heran, Oyang, L., Tian, Y., Liu, L., Su, M., Wang, Hui, Cao, D. et Liao, Q. (2018) « Role of the NF $\kappa$ B-signaling pathway in cancer », *Oncotargets and therapy*, 11, p. 2063-2073. Disponible sur: <https://doi.org/10.2147/ott.s161109>.

Xiao, Y., Jin, J., Chang, M., Chang, J.-H., Hu, H., Zhou, X., Brittain, G.C., Stansberg, C., Torkildsen, Ø., Wang, X., Brink, R., Cheng, X. et Sun, S.-C. (2013) « Peli1 promotes microglia-mediated CNS inflammation by regulating Traf3 degradation », *Nature Medicine*, 19(5), p. 595-602. Disponible sur: <https://doi.org/10.1038/nm.3111>.

Xie, P. (2013) « TRAF molecules in cell signaling and in human diseases », *Journal of Molecular Signaling*, 8(0), p. Art. 7. Disponible sur: <https://doi.org/10.1186/1750-2187-8-7>.

Xie, X., Jin, J., Zhu, L., Jie, Z., Li, Y., Zhao, B., Cheng, X., Li, P. et Sun, S.-C. (2019) « Cell type-specific function of TRAF2 and TRAF3 in regulating type I IFN induction », *Cell & Bioscience*, 9(1), p. 5. Disponible sur: <https://doi.org/10.1186/s13578-018-0268-5>.

Xu, D., Zhao, H., Jin, M., Zhu, H., Shan, B., Geng, J., Dziedzic, S.A., Amin, P., Mifflin, L., Naito, M.G., Najafov, A., Xing, J., Yan, L., Liu, J., Qin, Y., Hu, X., Wang, H., Zhang, M., Manuel, V.J., Tan, L., He, Z., Sun, Z.J., Lee, V.M.Y., Wagner, G. et Yuan, J. (2020) « Modulating TRADD to restore cellular homeostasis and inhibit apoptosis », *Nature*, 587(7832), p. 133-138. Disponible sur: <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2757-z>.

Xu, L. (2006) « Regulation of Smad activities », *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression*, 1759(11-12), p. 503-513. Disponible sur: <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2006.11.001>.

Xu, L., Zhang, Y., Qu, X., Che, X., Guo, T., Li, C., Ma, R., Fan, Y., Ma, Y., Hou, K., Li, D., Hu, X., Liu, B., Yu, R., Yan, H., Gong, J. et Liu, Y. (2017) « DR5-Cbl-b/c-Cbl-TRAFF complex inhibits TRAIL-induced apoptosis by promoting TRAFF-mediated polyubiquitination of caspase-8 in gastric cancer cells », *Molecular Oncology*, 11(12), p. 1733-1751. Disponible sur: <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12140>.

Xu, L., Zhu, J., Hu, X., Zhu, H., Kim, H.T., LaBaer, J., Goldberg, A. et Yuan, J. (2007) « c-IAP1 Cooperates with Myc by Acting as a Ubiquitin Ligase for Mad1 », *Molecular Cell*, 28(5), p. 914-922. Disponible sur: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.10.027>.

Xu, P., Lin, X. et Feng, X.-H. (2016) « Posttranslational Regulation of Smads », *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 8(12), p. a022087. Disponible sur: <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a022087>.

Yakymovych, I., Dijke, P. ten, Heldin, C. et Souchelnytskyi, S. (2001) « Regulation of Smad signaling by protein kinase C », *The FASEB Journal*, 15(3), p. 553-555. Disponible sur: <https://doi.org/10.1096/fj.00-0474fje>.

Yamaguchi, K., Shirakabe, K., Shibuya, H., Irie, K., Oishi, I., Ueno, N., Taniguchi, T., Nishida, E. et Matsumoto, K. (1995) « Identification of a Member of the MAPKKK Family as a Potential Mediator of TGF- $\beta$  Signal Transduction », *Science*, 270(5244), p. 2008-2011. Disponible sur: <https://doi.org/10.1126/science.270.5244.2008>.

Yamashita, M., Fatyol, K., Jin, C., Wang, X., Liu, Z. et Zhang, Y.E. (2008) « TRAF6 Mediates Smad-Independent Activation of JNK and p38 by TGF- $\beta$  », *Molecular Cell*, 31(6), p. 918-924. Disponible sur: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.09.002>.

Yan, R., Zhu, H., Huang, P., Yang, M., Shen, M., Pan, Y., Zhang, C., Zhou, X., Li, H., Ke, X., Zhang, W., Hao, P. et Qu, Y. (2022) « Liquidambaric acid inhibits Wnt/β-catenin signaling and colon cancer via targeting TNF receptor-associated factor 2 », *Cell Reports*, 38(5), p. 110319. Disponible sur: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.110319>.

Yan, X., Zhang, J., Sun, Q., Tuazon, P.T., Wu, X., Traugh, J.A. et Chen, Y.-G. (2012) « p21-activated Kinase 2 (PAK2) Inhibits TGF-β Signaling in Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) Epithelial Cells by Interfering with the Receptor-Smad Interaction\* », *Journal of Biological Chemistry*, 287(17), p. 13705-13712. Disponible sur: <https://doi.org/10.1074/jbc.m112.346221>.

Yang, C., Patel, K., Harding, P., Sorokin, A. et Glass, W.F. (2007) « Regulation of TGF-β1/MAPK-mediated PAI-1 gene expression by the actin cytoskeleton in human mesangial cells », *Experimental Cell Research*, 313(6), p. 1240-1250. Disponible sur: <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2007.01.011>.

Yang, C.H., Murti, A., Pfeffer, S.R., Fan, M., Du, Z. et Pfeffer, L.M. (2008) « The Role of TRAF2 Binding to the Type I Interferon Receptor in Alternative NFκB Activation and Antiviral Response », *Journal of Biological Chemistry*, 283(21), p. 14309-14316. Disponible sur: <https://doi.org/10.1074/jbc.m708895200>.

Yang, K.-C., Ma, X., Liu, H., Murphy, J., Barger, P.M., Mann, D.L. et Diwan, A. (2018) « Tumor Necrosis Factor Receptor–Associated Factor 2 Mediates Mitochondrial Autophagy », *Circulation: Heart Failure*, 8(1), p. 175-187. Disponible sur: <https://doi.org/10.1161/circheartfailure.114.001635>.

Yang, Q.-H. et Du, C. (2004) « Smac/DIABLO Selectively Reduces the Levels of c-IAP1 and c-IAP2 but Not That of XIAP and Livin in HeLa Cells\* », *Journal of Biological Chemistry*, 279(17), p. 16963-16970. Disponible sur: <https://doi.org/10.1074/jbc.m401253200>.

Yang, S., Wang, Y., Mei, K., Zhang, S., Sun, X., Ren, F., Liu, S., Yang, Z., Wang, X., Qin, Z. et Chang, Z. (2015) « Tumor Necrosis Factor Receptor 2 (TNFR2)-Interleukin-17 Receptor D (IL-17RD) Heteromerization Reveals a Novel Mechanism for NF-κB Activation\* », *Journal of Biological Chemistry*, 290(2), p. 861-871. Disponible sur: <https://doi.org/10.1074/jbc.m114.586560>.

Yang, X. et Sun, S. (2015) « Targeting signaling factors for degradation, an emerging mechanism for TRAF functions », *Immunological Reviews*, 266(1), p. 56-71. Disponible sur: <https://doi.org/10.1111/imr.12311>.

Yang, Y., Fang, S., Jensen, J.P., Weissman, A.M. et Ashwell, J.D. (2000) « Ubiquitin Protein Ligase Activity of IAPs and Their Degradation in Proteasomes in Response to Apoptotic Stimuli », *Science*, 288(5467), p. 874-877. Disponible sur: <https://doi.org/10.1126/science.288.5467.874>.

Yang, Y., Yin, C., Pandey, A., Abbott, D., Sassetti, C. et Kelliher, M.A. (2007) « NOD2 Pathway Activation by MDP or Mycobacterium tuberculosis Infection Involves the Stable Polyubiquitination of Rip2\* », *Journal of Biological Chemistry*, 282(50), p. 36223-36229. Disponible sur: <https://doi.org/10.1074/jbc.m703079200>.

Ye, H., Arron, J.R., Lamothe, B., Cirilli, M., Kobayashi, T., Shevde, N.K., Segal, D., Dzivenu, O.K., Vologodskaia, M., Yim, M., Du, K., Singh, S., Pike, J.W., Darnay, B.G., Choi, Y. et Wu, H. (2002) « Distinct molecular mechanism for initiating TRAF6 signalling », *Nature*, 418(6896), p. 443-447. Disponible sur: <https://doi.org/10.1038/nature00888>.

Ye, Z. et Hu, Y. (2021) « TGF-β1: Gentlemanly orchestrator in idiopathic pulmonary fibrosis (Review) », *International Journal of Molecular Medicine*, 48(1), p. 132. Disponible sur: <https://doi.org/10.3892/ijmm.2021.4965>.

Yi, J.Y., Shin, I. et Arteaga, C.L. (2005) « Type I Transforming Growth Factor β Receptor Binds to and Activates Phosphatidylinositol 3-Kinase\* », *Journal of Biological Chemistry*, 280(11), p. 10870-10876. Disponible sur: <https://doi.org/10.1074/jbc.m413223200>.

Yin, M., Wang, X. et Lu, J. (2020) « Advances in IKBKE as a potential target for cancer therapy », *Cancer Medicine*, 9(1), p. 247-258. Disponible sur: <https://doi.org/10.1002/cam4.2678>.

Yin, Q., Lamothe, B., Darnay, B.G. et Wu, H. (2009) « Structural Basis for the Lack of E2 Interaction in the RING Domain of TRAF2 », *Biochemistry*, 48(44), p. 10558-10567. Disponible sur: <https://doi.org/10.1021/bi901462e>.

Yin, Q., Lin, S.-C., Lamothe, B., Lu, M., Lo, Y.-C., Hura, G., Zheng, L., Rich, R.L., Campos, A.D., Myszka, D.G., Lenardo, M.J., Darnay, B.G. et Wu, H. (2009) « E2 interaction and dimerization in the crystal structure of TRAF6 », *Nature Structural & Molecular Biology*, 16(6), p. 658-666. Disponible sur: <https://doi.org/10.1038/nsmb.1605>.

Yu, J., Pan, L., Qin, X., Chen, H., Xu, Y., Chen, Y. et Tang, H. (2010) « MTMR4 Attenuates Transforming Growth Factor  $\beta$  (TGF $\beta$ ) Signaling by Dephosphorylating R-Smads in Endosomes\* », *Journal of Biological Chemistry*, 285(11), p. 8454-8462. Disponible sur: <https://doi.org/10.1074/jbc.m109.075036>.

Yu, L., Hébert, M.C. et Zhang, Y.E. (2002) « TGF- $\beta$  receptor-activated p38 MAP kinase mediates Smad-independent TGF- $\beta$  responses », *The EMBO Journal*, 21(14), p. 3749-3759. Disponible sur: <https://doi.org/10.1093/emboj/cdf366>.

Yu, Y., Wan, Y. et Huang, C. (2009) « The Biological Functions of NF- $\kappa$ B1 (p50) and its Potential as an Anti-Cancer Target », *Current Cancer Drug Targets*, 9(4), p. 566-571. Disponible sur: <https://doi.org/10.2174/156800909788486759>.

Yue, J. et López, J.M. (2020) « Understanding MAPK Signaling Pathways in Apoptosis », *International Journal of Molecular Sciences*, 21(7), p. 2346. Disponible sur: <https://doi.org/10.3390/ijms21072346>.

Yue, X., Shan, B. et Lasky, J.A. (2010) « TGF- $\beta$ : Titan of Lung Fibrogenesis. », *Current enzyme inhibition*, 6(2). Disponible sur: <https://doi.org/10.2174/10067>.

Zachari, M., Gudmundsson, S.R., Li, Z., Manifava, M., Cugliandolo, F., Shah, R., Smith, M., Stronge, J., Karanasios, E., Piunti, C., Kishi-Itakura, C., Viñinen, H., Jokitalo, E., Guan, J.-L., Buss, F., Smith, A.M., Walker, S.A., Eskelinen, E.-L. et Ktistakis, N.T. (2019) « Selective Autophagy of Mitochondria on a Ubiquitin-Endoplasmic-Reticulum Platform », *Developmental Cell*, 50(5), p. 627-643.e5. Disponible sur: <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2019.06.016>.

Zadoroznyj, A. et Dubrez, L. (2022) « Cytoplasmic and Nuclear Functions of cIAP1 », *Biomolecules*, 12(2), p. 322. Disponible sur: <https://doi.org/10.3390/biom12020322>.

Zarnegar, B.J., Wang, Y., Mahoney, D.J., Dempsey, P.W., Cheung, H.H., He, J., Shiba, T., Yang, X., Yeh, W., Mak, T.W., Korneluk, R.G. et Cheng, G. (2008) « Noncanonical NF- $\kappa$ B activation requires coordinated assembly of a regulatory complex of the adaptors cIAP1, cIAP2, TRAF2 and TRAF3 and the kinase NIK », *Nature Immunology*, 9(12), p. 1371-1378. Disponible sur: <https://doi.org/10.1038/ni.1676>.

Zawel, L., Dai, J.L., Buckhaults, P., Zhou, S., Kinzler, K.W., Vogelstein, B. et Kern, S.E. (1998) « Human Smad3 and Smad4 Are Sequence-Specific Transcription Activators », *Molecular Cell*, 1(4), p. 611-617. Disponible sur: [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(00\)80061-1](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(00)80061-1).

Zender, L., Spector, M.S., Xue, W., Flemming, P., Cordon-Cardo, C., Silke, J., Fan, S.-T., Luk, J.M., Wigler, M., Hannon, G.J., Mu, D., Lucito, R., Powers, S. et Lowe, S.W. (2006) « Identification and Validation of Oncogenes in Liver Cancer Using an Integrative Oncogenomic Approach », *Cell*, 125(7), p. 1253-1267. Disponible sur: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.05.030>.

Zhang, J., Stirling, B., Temmerman, S.T., Ma, C.A., Fuss, I.J., Derry, J.M.J. et Jain, A. (2006) « Impaired regulation of NF- $\kappa$ B and increased susceptibility to colitis-associated tumorigenesis in CYLD-deficient mice », *Journal of Clinical Investigation*, 116(11), p. 3042-3049. Disponible sur: <https://doi.org/10.1172/jci28746>.

Zhang, L., Zhou, F., García de Vinuesa, A., de Kruijf, E.M., Mesker, W.E., Hui, L., Drabsch, Y., Li, Y., Bauer, A., Rousseau, A., Sheppard, K.-A., Mickanin, C., Kuppen, P.J.K., Lu, C.X. et ten Dijke, P. (2013) « TRAF4 Promotes TGF- $\beta$  Receptor Signaling and Drives Breast Cancer Metastasis », *Molecular Cell*, 51(5), p. 559-572. Disponible sur: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.07.014>.

Zhang, P., Reichardt, A., Liang, H., Aliyari, R., Cheng, D., Wang, Y., Xu, F., Cheng, G. et Liu, Y. (2012) « Single Amino Acid Substitutions Confer the Antiviral Activity of the TRAF3 Adaptor Protein onto TRAF5 », *Science Signaling*, 5(250), p. ra81. Disponible sur: <https://doi.org/10.1126/scisignal.2003152>.

Zhang, P., Zhang, Z., Fu, Y., Zhang, Y., Washburn, M.P., Florens, L., Wu, M., Huang, C., Hou, Z. et Mohan, M. (2021) « K63-linked ubiquitination of DYRK1A by TRAF2 alleviates Sprouty 2-mediated degradation of EGFR », *Cell Death & Disease*, 12(6), p. 608. Disponible sur: <https://doi.org/10.1038/s41419-021-03887-2>.

Zhang, Q., Lenardo, M.J. et Baltimore, D. (2017) « 30 Years of NF- $\kappa$ B: A Blossoming of Relevance to Human Pathobiology », *Cell*, 168(1-2), p. 37-57. Disponible sur: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.12.012>.

Zhang, S., Fei, T., Zhang, L., Zhang, R., Chen, F., Ning, Y., Han, Y., Feng, X.-H., Meng, A. et Chen, Y.-G. (2007) « Smad7 Antagonizes Transforming Growth Factor  $\beta$  Signaling in the Nucleus by Interfering with Functional Smad-DNA Complex Formation », *Molecular and Cellular Biology*, 27(12), p. 4488-4499. Disponible sur: <https://doi.org/10.1128/mcb.01636-06>.

Zhang, W., Sun, Y., Liu, L. et Li, Z. (2017) « Prognostic Significance of TNFR-Associated Factor 1 and 2 (TRAF1 and TRAF2) in Glioblastoma », *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*, 23, p. 4506-4512. Disponible sur: <https://doi.org/10.12659/msm.903397>.

Zhang, Y., Alexander, P.B. et Wang, X.-F. (2017) « TGF- $\beta$  Family Signaling in the Control of Cell Proliferation and Survival », *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 9(4), p. a022145. Disponible sur: <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a022145>.

Zhang, Y., Chang, C., Gehling, D.J., Hemmati-Brivanlou, A. et Deryck, R. (2001) « Regulation of Smad degradation and activity by Smurf2, an E3 ubiquitin ligase », *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(3), p. 974-979. Disponible sur: <https://doi.org/10.1073/pnas.98.3.974>.

Zhang, Y. et Dong, C. (2007) « Regulatory mechanisms of mitogen-activated kinase signaling », *Cellular and Molecular Life Sciences*, 64(21), p. 2771-2789. Disponible sur: <https://doi.org/10.1007/s0018-007-7012-3>.

Zhao, J., Li, H., Min, L., Han, X., Shu, P., Yang, Y., Gan, Q., Wang, X., Wang, H., Ruan, Y., Qin, J., Sun, Y. et Qin, X. (2018) « High expression of tumor necrosis factor receptor-associated factor 2 promotes tumor metastasis and is associated with unfavorable prognosis in gastric cancer », *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 33(2), p. 431-442. Disponible sur: <https://doi.org/10.1111/jgh.13818>.

Zhao, Y., Conze, D.B., Hanover, J.A. et Ashwell, J.D. (2007) « Tumor Necrosis Factor Receptor 2 Signaling Induces Selective c-IAP1-dependent ASK1 Ubiquitination and Terminates Mitogen-activated Protein Kinase Signaling\* », *Journal of Biological Chemistry*, 282(11), p. 7777-7782. Disponible sur: <https://doi.org/10.1074/jbc.m609146200>.

Zheng, M., Morgan-Lappe, S.E., Yang, J., Bockbrader, K.M., Pamarthi, D., Thomas, D., Fesik, S.W. et Sun, Y. (2008) « Growth Inhibition and Radiosensitization of Glioblastoma and Lung Cancer Cells by Small Interfering RNA Silencing of Tumor Necrosis Factor Receptor-Associated Factor 2 », *Cancer Research*, 68(18), p. 7570-7578. Disponible sur: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-08-0632>.

Zheng, N. et Shabek, N. (2015) « Ubiquitin Ligases: Structure, Function, and Regulation », *Annual Review of Biochemistry*, 86(1), p. 1-29. Disponible sur: <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060815-014922>.

Zhou, A.Y., Shen, R.R., Kim, E., Lock, Y.J., Xu, M., Chen, Z.J. et Hahn, W.C. (2013) « IKK $\epsilon$ -Mediated Tumorigenesis Requires K63-Linked Polyubiquitination by a cIAP1/cIAP2/TRAF2 E3 Ubiquitin Ligase Complex », *Cell Reports*, 3(3), p. 724-733. Disponible sur: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.01.031>.

Zhu, S., Jin, J., Gokhale, S., Lu, A.M., Shan, H., Feng, J. et Xie, P. (2018) « Genetic Alterations of TRAF Proteins in Human Cancers », *Frontiers in Immunology*, 9, p. 2111. Disponible sur: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02111>.

Zirlik, A., Bavendiek, U., Libby, P., MacFarlane, L., Gerdes, N., Jagielska, J., Ernst, S., Aikawa, M., Nakano, H., Tsitsikov, E. et Schönbeck, U. (2007) « TRAF-1, -2, -3, -5, and -6 Are Induced in Atherosclerotic Plaques and Differentially Mediate Proinflammatory Functions of CD40L in Endothelial Cells », *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 27(5), p. 1101-1107. Disponible sur: <https://doi.org/10.1161/atvaha.107.140566>.

Zuo, W. et Chen, Y.-G. (2009) « Specific Activation of Mitogen-activated Protein Kinase by Transforming Growth Factor- $\beta$  Receptors in Lipid Rafts Is Required for Epithelial Cell Plasticity », *Molecular Biology of the Cell*, 20(3), p. 1020-1029. Disponible sur: <https://doi.org/10.1091/mbc.e08-09-0898>.

## Analyse des propriétés oncogéniques et pro-fibrosantes de cIAP1/TRAFF2

cIAP1 (*cellular Inhibitor of Apoptosis*) est un important régulateur de la signalisation cellulaire et moléculaire appartenant à la famille des IAP (*Inhibitor of Apoptosis*). Elle interagit avec ses différents partenaires par ses domaines BIR (*Baculovirus IAP repeat*) et possède un domaine RING (*Really interesting New Gene*) lui conférant une activité E3 ubiquitine ligase. cIAP1 est impliquée dans différentes fonctions telles que l'inflammation, la différenciation, la migration et la prolifération cellulaire. Des anomalies d'expression ont été détectées dans différents types de cancers et sont très souvent associées à un mauvais pronostic et à une résistance aux traitements chimiothérapeutiques. Une surexpression de cIAP1 a aussi été retrouvée chez des patients atteints de fibrose pulmonaire idiopathique. Mon projet de thèse porte sur l'analyse des propriétés oncogéniques et pro-fibrosantes de cIAP1. Mes travaux ont démontré que son interaction avec son partenaire TRAF2 (*TNF Receptor-Associated Factor 2*) est nécessaire à ses propriétés oncogéniques, dans un modèle de MEF (*Mouse Embryonic Fibroblasts*) transformés avec l'oncogène H-Ras V12. TRAF2 est un adaptateur moléculaire permettant le recrutement de cIAP1 dans des plateformes de signalisation. Elle se lie sous forme de trimère au domaine BIR1 de cIAP1. La mutation ou la déplétion de ce domaine inhibe la croissance tumorale et la formation de métastases. L'expression d'un domaine BIR1 isolé force l'agrégration de TRAF2 et suffit à stimuler la croissance tumorale. Le binôme cIAP1/TRAFF2 stimulate l'activation des voies de signalisation ERK1/2 (*Extracellular signal-Regulated Kinase*) et NF- $\kappa$ B (*Nuclear Factor  $\kappa$ B*). L'activation de NF- $\kappa$ B stimule la production d'IL-6, menant à l'activation autocrine de la voie STAT3 (*Signal Transducers and Activators of Transcription 3*) /JAK (*Janus Kinase*). L'utilisation du niclosamide, un inhibiteur de l'activation de STAT3, inhibe la croissance tumorale des MEF exprimant cIAP1 mais n'a pas d'effet sur les MEF exprimant le mutant de cIAP1 déplété de son domaine BIR1, dans un modèle de xénogreffe chez la souris. Ces résultats montrent pour la première fois l'importance de la voie JAK/STAT3 dans les propriétés oncogéniques de cIAP1/TRAFF2. La suite de mes travaux de thèse a porté sur l'étude du rôle du binôme cIAP1/TRAFF2 dans le développement de la fibrose pulmonaire. Dans un modèle murin de fibrose pulmonaire induite à la bléomycine, l'utilisation du GDC-0152, un antagoniste des IAP, inhibe le développement de la maladie. Le développement de la fibrose pulmonaire est étroitement lié au TGF- $\beta$  (*Transforming Growth Factor- $\beta$* ). Pour la première fois, un rôle de cIAP1 dans les processus cellulaires médiés par le TGF- $\beta$  a été démontré. La déplétion de cIAP1 ou de TRAF2 bloque les processus cellulaires médiés par le TGF- $\beta$  : il inhibe l'expression des marqueurs terminaux de différenciation mésenchymateuse et inhibe les différentes voies de signalisation, canonique ou non canonique activées par la cytokine. Une interaction entre cIAP1 et le récepteur TGFR2 (*TGF- $\beta$  Receptor 2*) a été détectée. L'ensemble de ces données mettent en évidence de nouvelles propriétés oncogéniques et pro-fibrosantes de cIAP1 dépendantes de son interaction avec TRAF2.

**Mots clés :** Signalisation cellulaire, IAP, TRAF2, TGF- $\beta$ , STAT3, Fibrose

## Analysis of the oncogenic and pro-fibrotic properties of cIAP1/TRAFF2

cIAP1 (*cellular Inhibitor of Apoptosis*) is an important regulator of cellular and molecular signaling belonging to the IAP (*Inhibitor of Apoptosis*) family. It interacts with its partners through its BIR domain (*Baculovirus IAP repeat*) and has a RING domain (*Really interesting New Gene*) conferring an E3 ubiquitin ligase activity. cIAP1 participates in various functions such as inflammation, differentiation, migration and cell proliferation. Expression abnormalities have been detected in various types of cancers and are often associated with poor prognosis and resistance to chemotherapy. Over-expression of cIAP1 was found in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. My research project aimed to analyze the oncogenic and pro-fibrotic properties of cIAP1. My thesis work has shown that its interaction with its partner TRAF2 (*TNF Receptor-Associated Factor 2*) is essential for cIAP1's oncogenic properties in a model of Mouse Embryonic Fibroblasts transformed with the H-Ras V12 oncogene. TRAF2 is a molecular adaptor allowing the recruitment of cIAP1 in signaling platforms. TRAF2 trimer binds to the BIR1 domain of cIAP1 and mutation or depletion of this domain inhibited tumor growth and metastases formation. The expression of an isolated BIR1 domain forced the aggregation of TRAF2 and was sufficient to stimulate tumor growth. cIAP1/TRAFF2 stimulated the activation of ERK1/2 (*Extracellular signal-Regulated Kinase*) and NF- $\kappa$ B (*Nuclear Factor  $\kappa$ B*) signaling pathways. The activation of NF- $\kappa$ B stimulated the production of IL-6, leading to autocrine activation of STAT3 (*Signal Transducers and Activators of Transcription 3*) /JAK (*Janus Kinase*) pathway. Niclosamide, an inhibitor of STAT3 activation, inhibited tumor growth of MEF expressing cIAP1 but had no effect on MEF expressing the cIAP1 mutant depleted from its BIR1 domain in a xenograft model in mice. These results showed for the first time the importance of JAK/STAT3 pathway in the oncogenic properties of cIAP1/TRAFF2. The rest of my thesis work focused on the study of the role of cIAP1/TRAFF2 in the development of pulmonary fibrosis. In a mouse model of pulmonary fibrosis induced by bleomycin, the use of GDC-0152, an IAP antagonist, inhibited the disease development. The development of pulmonary fibrosis is closely related to TGF- $\beta$  (*Transforming Growth Factor- $\beta$* ). For the first time, a role of cIAP1 in cellular processes mediated by TGF- $\beta$  has been demonstrated. Depletion of cIAP1 blocked cellular processes mediated by TGF- $\beta$ . In addition, the expression of a cIAP1 mutant without E3 ubiquitin ligase activity or BIR1 domain also inhibited these cellular processes. The latter are dependent of the canonical and alternative signaling pathways of TGF- $\beta$ . Depletion of cIAP1 blocked the activation of these signaling pathways. An interaction between cIAP1 and the TGFR2 (*TGF- $\beta$  Receptor 2*) was detected by GST pull-down and co-immunoprecipitation. All these data highlight new oncogenic and pro-fibrotic properties of cIAP1 dependent on its interaction with TRAF2.

**Keywords:** Cell signaling, IAP, TRAF2, TGF- $\beta$ , STAT3, Fibrosis