Etude de stratégies innovantes pour augmenter l'efficacité antitumorale de ligands synthétiques de TRAIL-R2 et CD40

Neïla Chekkat

▶ **To cite this version:**

Neïla Chekkat. Etude de stratégies innovantes pour augmenter l'efficacité antitumorale de ligands synthétiques de TRAIL-R2 et CD40. Immunothérapie. Université de Strasbourg, 2014. Français. NNT : 2014STRAJ043 . tel-01423851

HAL Id: tel-01423851

https://theses.hal.science/tel-01423851

Submitted on 1 Jan 2017

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

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

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

Laboratoire CAMB-UMR 7199 CNRS/Université de Strasbourg

THÈSE

présentée par :

Neila CHEKKAT

soutenue le : **08 décembre 2014**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Spécialité : Immunologie

Etude de stratégies innovantes pour augmenter l'efficacité antitumorale de ligands synthétiques de TRAIL-R2 et CD40

THÈSE dirigée par :
Pr FOURNEL Sylvie — Professeur, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :
Dr MICHEAU Olivier — Chargé de recherche, Université de Bourgogne
Dr GUILLAUDEUX Thierry — Maître de conférences, Université de Rennes 1

EXAMINATEUR :
Dr DONTENWILL Monique — Directeur de recherche, Université de Strasbourg

Remerciements

Voilà une page de ma vie qui se termine. Non par un point final car j'espère sincèrement que nos chemins se recroiseront.
C'est avec la larme à l'œil que j'écris ces quelques mots.

Je tiens tout d'abord à exprimer mes sincères remerciements aux membres du jury, le Dr. Monique Dontenwill, le Dr. Thierry Guillaudeux, et le Dr. Olivier Micheau, ainsi que le Dr. Danièle Altschuh, et le Dr. Gilles Guichard pour m'avoir fait l'honneur de juger mes travaux de thèse.

Qu'aurait été cette expérience sans un mentor à qui va toute ma gratitude.
Je te remercie du fond du cœur Sylvie, merci de m'avoir fait confiance pour mener à bien plusieurs projets de l'équipe. C'est à partir de ce moment que mon aventure a commencé. Je me souviens encore du moment où les résultats du concours ont été publiés, je savais que je me lancerai dans un belle aventure à tes côtés. Tu as été plus qu'une directrice de thèse, tu as été une accompagnatrice qui m'a laissé beaucoup de libertés, mais tu as su aussi me guider lorsque je m'éloignais trop de la route. Tu as toujours été patiente et disponible pour m'aider dans la réalisation de ce projet de thèse. Tu as été présente pour m'encourager, me remonter le moral dans les moments de doute, tu m'as appris la patience et la prise de distance que la recherche nécessite. Au-delà de la recherche scientifique tu m'as permis de découvrir le monde de l'enseignement dans lequel je me suis pleinement épanouie. Je te remercie de m'avoir permis de réaliser ma thèse dans les meilleures conditions.

Travailler avec des chimistes a été très enrichissant pendant mon parcours.
Je remercie le Dr. Gilles Guichard de participer à mon jury de thèse et de m'avoir confié les précieux ligands de TRAIL-R2. Merci à Neil Owen et Caterina Lombardo, pour avoir produit les ligands de TRAIL-R2, et d'avoir été toujours disponibles pour m'expliquer la chimie. Ca été un plaisir de travailler avec vous.
Je remercie également le Dr. Stéphane Bellemin-Laponnaz, pour m'avoir confié les NHCs. Merci à mon binôme de thèse chimiste Georges Dahm (je n'ai jamais vu un

chimiste produire aussi rapidement et en aussi grande quantité les produits pour les expériences *in vivo*).

J'ai pu croiser le chemin de Gabrielle et Danièle, les reines de la SPR. MERCI à vous deux de m'avoir fait découvrir les joies de la SPR (mais aussi les belles migraines à analyser tous ces sensorgrammes). Merci pour votre patience, votre disponibilité. Merci Danièle de m'accompagner dans les derniers moments difficiles de la fin de thèse et de participer à mon jury.

Mon chemin à également croisé celui du Pr. Etienne Weiss, de son équipe (et aussi une bonne partie du 4ème étage de l'IREBS). Je tiens à tous vous remercier pour m'avoir accueilli dans votre équipe, de m'avoir formé au phage display. J'ai vraiment apprécié travailler avec vous. J'en profite pour souligner que les peptides présentent de nombreux avantages à être utilisés en clinique (il n'y a pas que les anticorps).

J'ai commencé mon stage de master 2 et le début de ma thèse à l'UPR9021. Je remercie le Dr. Sylviane Muller, directrice de l'UPR 9021, de m'avoir accueilli dans son unité. J'en profite pour remercier tous mes anciens collègues (la liste est longue) qui ont participé à mes premiers pas dans la recherche, et avec qui j'ai passé de bons moments. Ma reconnaissance s'adresse particulièrement à Cristian Smulski pour m'avoir accompagné à la paillasse au début de ce projet et merci pour tes précieux conseils. Merci également à Julien Beyrath, qui a initié le projet TRAIL, et avec qui j'ai apprécié travailler (sur skype).

Ensuite déménagement à Illkirch… Un grand merci au Dr Benoît Frisch, directeur de l'équipe de Biovectorologie, et au Dr Jean Serge Rémy, directeur de l'UMR 7199, de m'avoir permis de continuer mes travaux de thèse dans votre laboratoire. Un ENORME MERCI à toute l'équipe Biovec pour votre soutien. Je remercie particulièrement Béatrice, de m'avoir accompagnée lors de la formulation de mes premiers liposomes (et non les derniers) ainsi que du temps consacré à la relecture de ce manuscrit. Merci à toi Maria pour ta bonne humeur et de m'avoir aidé à plusieurs reprise à comprendre le monde de la chimie.

Au cours de cette expérience, j'ai eu la chance de pouvoir enseigner la biologie cellulaire et moléculaire à l'Université de Strasbourg. J'adresse ma profonde reconnaissance Pascaline pour m'avoir intégré dans son équipe d'enseignants, de m'avoir formé et merci pour ta gentillesse, ta bienveillance et ta disponibilité. Un GRAND MERCI à toute l'équipe d'enseignants avec qui j'ai passé de très bons moments. Grâce à vous, j'ai adoré enseigner et j'espère pouvoir renouveler cette expérience.

Qu'aurait été ma thèse sans une équipe de bureau de choc ?! MERCI à la patrouille volante ;), pour ta bonne humeur, ton soutien et disponibilité. Tu vas me manquer. Merci à Maya l'abeille ma binôme de bureau dès le début. Tu as été précieuse pour moi, toujours présente dans les bons comme dans les mauvais moments (surtout en ce moment d'impression de la thèse). MERCI à Corinne (bon même si tu es dans l'équipe d'à côté). C'est dommage que nos chemins se soient croisés si tard mais tu as été un rayon de soleil. Merci je ne sais pas ce que j'aurai fait sans toi ! Et bien sûr je n'oublie pas François le français ;) ah François… Merci à Célia, the next generation, merci pour ta bonne humeur, ta gentillesse et ton soutien. Merci à Hanadi (le bureau n'a jamais été aussi animé que lorsque que tu étais là), Salif (pour les migraines à cause des débats politiques), à Bouchra (pour ta bonne humeur et les crêpes milles trous) à Juju et à Nadjat (mes stagiaires qui m'ont bien aidé dans mes travaux sur les NHCs).
Merci à Vanessa, Susana, Akkiz pour votre bonne humeur, soutien soirée girly, ça a été un plaisir de travailler avec vous. Marie Carotte, l'italien, Coraline (promis dans la version finale de ma thèse je mettrai une de tes citations) mes 3 chimistes préférés. Vous êtes des anciens collègues qui sont devenus aujourd'hui de vrais amis ;). A bientôt pour créer notre start up ;).

Je tiens également à remercier tous ce que je n'ai pas cités mais qui ont partagés une partie de mon quotidien et ont rendu ces 3 années enrichissantes.

Merci à toute l'équipe de l'Association des Docteurs et Doctorants d'Alsace et du forum BIOTechno. J'ai été embarquée dans une sacrée aventure à vos côtés. Grâce à vous, j'ai eu une autre vision de mon doctorat. J'ai dans cette aventure rencontré de jeunes doctorants exceptionnels tant sur le point professionnel que personnel qui ont été très important dans durant ces 3 années. Merci à vous tous.

Je tiens à remercier tous mes amis qui ont vécu cette expérience avec moi durant ces 3 années qui se sont intéressés à mon travail et qui m'ont toujours soutenue et encouragée. Merci d'être resté à mes côtés.

Je dédie cette thèse à mes parents qui m'ont accompagné et ont été un véritable soutien dans cette aventure. Vous m'avez donné l'opportunité de réaliser mes rêves et la force de persévérer quoi qu'il arrive. Vous êtes mes premiers supporters qui s'intéressaient à mon travail, au monde de la recherche dans lequel je me suis pleinement épanouie. J'espère aujourd'hui que vous êtes fiers de mon parcours et de l'adulte que je suis devenue.

Ce n'est plus la larme, mais les larmes qui coulent…
MERCI à vous tous pour avoir humanisé cette expérience professionnelle. Cette thèse réalisée à vos côtés m'aura permis de m'épanouir professionnellement et personnellement. De découvrir mes capacités et mes limites, les choses que j'aime et surtout celles que je n'apprécie pas. Aujourd'hui je n'ai aucun regret et j'ai été conforté dans mon désir de poursuivre ma carrière dans la recherche. Grâce à cette expérience très enrichissante, je vais pouvoir partir pour une nouvelle aventure…

Table des matières

Table des illustrations 5
Listes des abréviations 6

PREAMBULE

A. GENERALITES SUR LES CANCERS 8
1. Les cancers 8
2. Stratégies de traitements du cancer 8
2.1. Les traitements conventionnels 9
2.2. Les thérapies ciblées 10
2.3. Vers une médecine personnalisée 12
3. L'apoptose : une cible pour la thérapie des cancers 12

B. L'APOPTOSE EN THERAPIE DU CANCER 13
1. Voies moléculaires de l'apoptose 13
1.1. Caractéristiques de l'apoptose 13
1.2. Deux voies de signalisations pour induire l'apoptose 16

INTRODUCTION

A. ELIMINER LES CELLULES CANCEREUSES EN INDUISANT LEUR APOPTOSE PAR LES RECEPTEURS DE LA FAMILLE DU TNF-R 21

PARTIE I : Les récepteurs TRAIL-R et CD40 en thérapie des cancers 21

1. Les récepteurs de la famille du TNF-R 21
1.1. Description 21
1.2. Les récepteurs de mort 23

2. TRAIL : un inducteur d'apoptose spécifique des cellules cancéreuses 25
2.1. Les récepteurs de TRAIL 25
2.2. Les fonctions biologiques de TRAIL 27
2.2.1. Rôle de TRAIL dans l'homéostasie et la différenciation des LT 28
2.2.2. Rôle de TRAIL dans le développement de l'auto-immunité 28

2.2.3. Rôle de TRAIL dans la réponse immunitaire anti-infectieuse....28
2.2.4. Rôle de TRAIL dans la réponse immunitaire anti-tumorale....29
2.3. Voies de signalisation induites par TRAIL....31
2.4. Mécanismes de régulation de la signalisation apoptotique induite par TRAIL....37
2.4.1. Régulation de l'apoptose induite par TRAIL au niveau membranaire....38
2.4.2. Régulation de l'apoptose induite par TRAIL au niveau du DISC....41
2.4.3. Régulation de l'apoptose induite par TRAIL au niveau cellulaire....41
2.5. TRAIL en thérapie des cancers....42
2.5.1. TRAIL recombinant....44
2.5.2. Anticorps monoclonaux agonistes de TRAIL-R1 ou de TRAIL-R2....44
2.5.3. Bilan des essais cliniques....45
2.6. Vers une optimisation des traitements....46
2.6.1. Les ligands multivalents....46
2.6.2. Sensibilisateurs à la mort induite par TRAIL....46
2.6.3. Identification de marqueurs de sensibilité à TRAIL....48

3. CD40 : une cible de choix pour éliminer les cellules cancéreuses....50
3.1. Le récepteur CD40 et son ligand CD40L....50
3.1.1. Le récepteur CD40....50
3.1.2. Le CD40L....50
3.1.3. Les autres ligands de CD40 et les autres récepteurs de CD40L....51
3.2. Signalisation induite par le pontage de CD40 par son ligand CD40L....51
3.2.1. Rôle des protéines TRAF....51
3.2.2. Type de signalisation induite par CD40....52
3.2.3. Initialisation de la signalisation induite par CD40 au niveau membranaire....54
3.3. CD40, le chef d'orchestre de la réponse immunitaire....56
3.4. Rôle en thérapie des cancers....58
3.5. CD40 en clinique pour la thérapie des cancers....62
3.5.1. Les agonistes de CD40....62
3.5.2. Variation de la signalisation intracellulaire induite par les agonistes de CD40 : le rôle de l'oligomérisation de CD40....64
3.5.3. Thérapies combinées....65

4. Peut-on combiner des traitements ciblant les récepteurs CD40 et TRAIL-R dans une stratégie anti tumorale ?....67
4.1. Induction de la mort cellulaire par une synergie entre CD40 et TRAIL-R....67
4.2. Augmentation de la réponse immunitaire anti-tumorale par association entre CD40 et TRAIL-R....67

4.3. Les limites de l'association entre CD40 et TRAIL-R 67
4.4. Association physique entre TRAIL-R et CD40? 68

Partie 2 : Importance des interactions multivalentes entre ligands et récepteurs : la résonance plasmonique de surface et un biocapteur basé sur la fluorescence (Fluorescence-based biosensing) comme outils de mesure pour caractériser les interactions ligand-récepteur 69

1. La résonance plasmonique de surface comme outil de mesure pour caractériser les interactions entre récepteurs et ligands 69
1.1. Principe de la Résonance Plasmonique de Surface (SPR) (source : Biacore™ Assay Handbook) 69
1.2. Modélisations des interactions monovalentes et multivalentes et obtention des constantes cinétiques 71
2. Mesure des interactions L/R à la surface de la cellule, à l'aide d'un biocapteur basé sur la fluorescence 73

B. ELIMINER LES CELLULES CANCEREUSES EN INDUISANT LEUR APOPTOSE PAR CHIMIOTHERAPIE A BASE DE PLATINE 76

1. La chimiothérapie 76
1.1. Les différentes familles de molécules de chimiothérapie 76
1.1.1. Les agents alkylants et apparentés 76
1.1.2. Les inhibiteurs mitotiques 76
1.1.3. Les anti-métabolites 77
1.1.4. Les inhibiteurs de topoisomérase (dérivés de camptothécine ou d'étoposide) 77
1.2. Les combothérapies 77

2. Les dérivés du platine 78
2.1. Le *cis*platine 78
2.1.2. Analogues du *cis*platine utilisés en cancérologie 82
2.1.3. Les avantages et les limites de l'utilisation des dérivés du platine en cancérologie 84
2.2. Développement de nouveaux dérivés de platines vectorisés 84

3. Les complexes de Platine/Carbène-N-hétérocycliques comme agent antitumorale 86
3.1. Les carbènes-N-hétérocycliques 86
3.2. Les complexes Platine/Carbène-N-hétérocycliques en thérapie des cancers 86
3.2.1. Activité anti-tumorales des NHC-Pt (II) 86
3.2.2. Mode d'action des NHC-Pt (II) 87
3.2.3. Les complexes NHC-Pt (II) pour cibler les cellules tumorales? 87

CONTEXTE ET OBJECTIFS DU PROJET DE THESE 88

RESULTATS 93

CHAPITRE 1 : Développement de ligands peptidiques multivalents spécifiques du récepteur TRAIL-R2 pour induire efficacement l'apoptose 94

Article 1: Thioether Analogues of Disulfide-bridged Cyclic Peptides Targeting Death Receptor 5: Conformational Analysis, Dimerization and Consequences for Receptor Activation 96

Article 2 : The degree of Death Receptor 5 oligomerization required to induce apoptosis differs according to tumor cell lines and is independent of ligand internalization 97

Article 3 : Multimerization of an apoptogenic TRAIL-Mimicking Peptide by Using Adamentane-Based Dendrons 121

Article 4 : Effect of various strategies for the presentation of TRAIL-R2 specific peptides on helical oligourea foldamer scaffold on their binding parameters and pro-apototic activity 122

CHAPITRE 2 : Caractérisation des interactions entre ligands et récepteurs et des interactions entre récepteurs/récepteurs au niveau de la membrane cellulaire 138

Article 5 : Characterization of interactions between TRAIL-R2 and divalent ligands at the membrane level and correlation with pro-apoptotic activity 140

Article 6 : Cysteine-rich doman one of CD40 mediates receptor self assembly 162

Article 7 : Hetero-oligomerization between the TNF receptor superfamily members CD40, FAS and TRAIL-R2 modulate CD40 signalling 163

CHAPITRE 3 : Evaluation du potentiel anticancéreux de complexes carbènes-N-hétérocyclique-Pt(II) 164

Article 8 : *In Vitro* and *In Vivo* Antitumor Efficacy of complexes of N-Heterocyclic Carbene Platin(II) and Polyethylenimine 165

DISCUSSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES 178

BIBLIOGRAPHIE 194

Table des illustrations

Figure 1 : Les 8 capacités acquises des cellules tumorales
Figure 2 : Caractéristiques morphologique de l'apoptose
Figure 3 : Les caspases initiatrices et effectrices, chefs d'orchestre de l'apoptose
Figure 4 : les protéines IAPs
Figure 5 : Les protéines de la famille Bcl-2
Figure 6 : Les voies intrinsèques et extrinsèques de l'apoptose
Figure 7 : Les récepteurs et les ligands de la superfamille du TNF-R
Figure 8 : Interactions entre les ligands et les récepteurs de la superfamille du TNF
Figure 9 : Structure cristallographique de TRAIL et TRAIL-R2
Figure 10: Structure cristallographique de TRAIL et TRAIL-R2.
Figure 11 : Modèle de pré-oligomérisation du récepteur TRAIL-R2 à la surface de la cellule en l'absence de TRAIL
Figure 12 Les voies apoptotiques induites par TRAIL
Figure 13 : Les différentes voies de signalisations induites par TRAIL
Figure 14 : Les éléments de régulations de la signalisation induite par TRAIL
Figure 15 : Les protéines TRAF.
Figure 16 : Les différentes voies de signalisation induites par CD40.
Figure 17 Structure cristallographique du récepteur CD40 et son ligand CD40L
Figure 18 : Rôles de CD40 dans la l'activation et la différenciation des LB et LT
Figure 19 : Les différents mécanismes anti apoptotique induit par CD40
Figure 20 : Les effets anti tumoraux induits par CD40
Figure 21 : Impact de l'oligomérisation de CD40 sur l'orientation de la réponse cellulaire
Figure 22 : Principe de la SPR
Figure 23 : Sensorgramme
Figure 24 : Interactions inter et intramoléculaires
Figure 25 : Principe du Ligand Tracer®
Figure 26 : le *cis*platine et le *trans*platine
Figure 27 : Mécanisme d'action du *cis*platine
Figure 28 : Mécanisme de résistance au *cisplatine*
Figure 29 : Les analogues du *cis*platine
Figure 30 : Le Lipoplatine®
Figure 31 : Les carbènes-N-héterocycliques
Figure 32 : Evénements membranaires qui régulent l'apoptose induite par des Ligands de TRAIL-R2
Tableau 1 : Les récepteurs de mort et leurs ligands
Tableau 2 : Les agonistes de TRAIL associés avec d'autres médicaments anticancéreux et évalués en essais cliniques.

Listes des abréviations

aa : acide aminés
Acm : anticorps monoclonal
ADCC : Antibody Dependent Cell Cytotoxicity
ADN : Acide DesoxyriboNucléique
ARN : Acide RiboNucléique
ATP : Adénosine TriPhosphate
BIR : Baculovirus IAPs Repeat
BJAB : Lymphome de Burkitt
BH : Bcl-2 Homology Domain
CARD : Capases Recruitment Domain
c-FLIP : cellular FLICE-Inhibitory Protein
CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CLL : Leucémie Lymphocytaire Chronique
CPT : Circularly Cermutated TRAIL
CRD : Cystein Rich Domain
DAMP : Dommages Associated Molecular Pattern
DC : Cellule Dendritique
DD : Death Domain
DED : Death Effector Domain
DISC : Death Inducing Signaling Complex
DMSO : diméthylsesulfoxide
FADD : Fas Associated Death Domain
FDA: Food and Drugs Administration's
5-FU : Fluorouracile
HR : Recombinaison Homologue
IAP : Initiator of Caspase
IFN : Interféron
Ig : Immunoglobuline
IL : Interleukine
IBM : IAP Binding Motif
LB : Lymphocyte B
LF : Lymphome Folliculaire
LT : Lymphocyte T
LT® : Ligand Tracer
LTh : Lymphocytes T auxiliaires
MM : Myélome Multiple
NER : Réparation par Excision de Nucléotides
NFkB : Nuclear Factor kappa B
NHC : Carbène-N-Hétérocycliques
NK : Natural Killer
MAPK : Mitogen Activated Protein Kinase
OPG : Osteoprotégérine
PEI : Polyéthylèneimine
PEG : polyethylene glycol
PI3K : Phosphoinositide 3-Kinase
PLAD : Pre Ligand Assembly Domain
PSAM : Prostate Specific Membrane Antigen
rTRAIL/rCD40 : molécule recombinante de TRAIL/CD40
RE : Réticulum Endoplasmique
RL : Radeaux Lipidiques
ROS : Reactive Oxygen Species
scFV : single chain variable Fragment
SMAC : Second Mitochondria derived Activator of Caspases
SPR : resonance plasmonique de Surface
THD : TNF Homology Domain
TM : domaine transmembranaire
TNF/TNF-R : Tumor Necrosis Factor/Tumor Necrosis Factor-Receptor
TRADD : TNF-Receptor Associated Death Domain
TRAF : TNF Receptor Associated Factor
TRAIL/TRAIL-R : TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand/ TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand-Receptor
VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor
UV : ultra violet

PREAMBULE

A. GENERALITES SUR LES CANCERS

1. Les cancers

Le cancer est un terme employé pour regrouper les pathologies qui se caractérisent par une prolifération anormale et une survie prolongée des cellules. Une tumeur est non seulement le produit d'une accumulation d'anomalies génétiques, hormonales et environnementales, d'une série de défaillances du système immunitaire mais aussi d'un assemblage très hétérogène de cellules qui évoluent dans un micro-environnement instable (Colditz et al., 2006). S'ajoute à cela, une capacité des cellules cancéreuses à acquérir de nouvelles fonctions qui vont favoriser leur développement et vont être à l'origine de résistances aux traitements cliniques. Dans ce cadre, Weinberg et Hanahan ont proposé un schéma de 8 altérations essentielles de la physiologie cellulaire qui dictent la progression tumorale (**Figure 1**) (Hanahan and Weinberg, 2000, 2011). Ces cellules cancéreuses peuvent apparaître dans de nombreux types tissulaires puis s'étendre à d'autres tissus lors d'un processus métastatique. Ces caractéristiques font du cancer une pathologie extrêmement complexe et variable d'un individu à l'autre.

En 2008, le cancer affectait dans les pays développés 5,6 millions d'individus dont 2,8 millions en mourraient (Jemal et al., 2011). En France, en 2012 le nombre de nouveaux cas de cancer était estimé à 355 000 (dont 200 000 cas pour les hommes et 155 000 pour les femmes (source : Fondation Arc). Aujourd'hui le cancer fait l'objet d'un enjeu important soutenu par des programmes nationaux tels que « Plan Cancer » en France. Un des axes développé dans ce plan 2014-2019 est de mieux comprendre la biologie des cancers dans le but d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques et donc de nouveaux traitements.

2. Stratégies de traitements du cancer

Le traitement du cancer peut soit prévenir son apparition, soit enlever la tumeur primaire et l'ensemble des tumeurs résiduelles et métastatiques, soit prolonger et améliorer les conditions de vie du patient lorsque le cancer est à un stade avancé. Il existe plusieurs stratégies qui s'appuient sur les 8 capacités acquises des cellules cancéreuses **(Figure 1)**. Les traitements décrits ci-dessous peuvent être utilisés seuls mais leur efficacité est augmentée lorsqu'ils sont combinés entre eux.

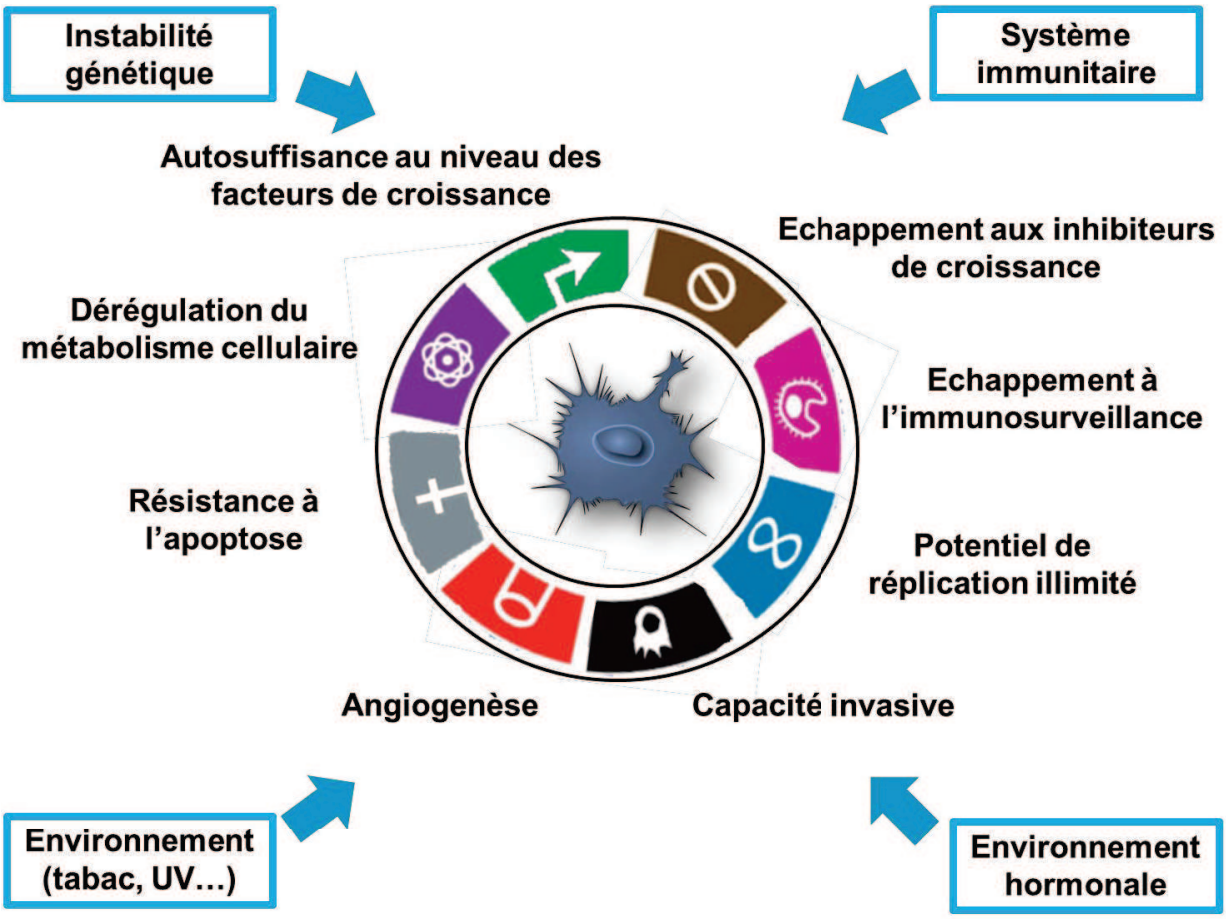


Figure 1: Les 8 capacités acquises des cellules tumorales. D'après Hanahan D. et Weinberg R.A. (2011). Cette figure illustre les pressions (environnement tabac, ultra violet (UV)), environnement hormonal, instabilité génétique et anomalies du système immunitaire) qui agissent sur les cellules cancéreuses. On y voit les 8 capacités acquises par les cellules tumorales qui vont dicter collectivement la progression tumorale et la survenue des métastases.

2.1. Les traitements conventionnels

a) La chirurgie

La chirurgie est la première stratégie à avoir été développée et reste le traitement de référence pour les tumeurs primaires localisées (370 000 patients ayant un cancer subissent une chirurgie, source : Fondation ARC). Grâce à l'avènement de nouvelles technologies telles que la chirurgie robotisée qui guide le praticien, l'imagerie médicale qui permet de visualiser les métastases, et la combinaison avec la chimiothérapie et/ou la radiothérapie, la chirurgie devient un acte mois invasif et joue également un rôle important dans le traitement des tumeurs secondaires et métastatiques. La chirurgie peut aussi être utilisée dans un cadre préventif comme pour le cancer du sein où si le patient s'avère posséder les gènes de susceptibilité BRCA1 ou BRCA2 mutés, il peut bénéficier d'une mastectomie bilatérale prophylactique.

b) La radiothérapie

La radiothérapie est une thérapie localisée qui consiste à exposer les cellules cancéreuses à des radiations ionisantes qui vont endommager l'ADN et induire leur mort par apoptose (Suciu, 1983). Actuellement environ 50% des patients développant un cancer ont recourt à la radiothérapie. Les résultats sont souvent encourageants comme pour le cancer primaire du pharynx où 90% des cas sont éliminés par radiothérapie. De plus, la radiothérapie peut avoir un effet palliatif en réduisant la douleur chez 80% des patients souffrants de métastases osseuses (Daly-Schveitzer, 1999). Elle est aussi utilisée en thérapie adjuvante après exérèse de la tumeur et limite le risque de récurrence locale. La radiothérapie peut aussi être utilisée de manière systémique par le biais d'iode radioactif pour le traitement des cancers de la tyroïde. Cependant, la radiothérapie peut affecter aussi bien les cellules cancéreuses que les cellules saines ce qui est à l'origine de nombreux effets secondaires sévères.

c) La chimiothérapie

La chimiothérapie est un traitement systémique qui affecte les cellules en phase de multiplication active donc principalement les cellules cancéreuses. Il existe plusieurs classes de drogues de chimiothérapie dont les dérivés du platine qui feront l'objet de la partie B dde l'introduction, du présent document. En 2012 en France, 268 677 personnes ont eu recourt à la chimiothérapie pour traiter leur cancer (source : Fondation ARC). La chimiothérapie peut être utilisée seule (traitement des lymphomes ou leucémies) ou en combinaison avec plusieurs classes de chimiodrogues afin de limiter le risque d'apparition de résistance. Elle peut être proposée avant une chirurgie pour diminuer la taille de la tumeur et faciliter l'opération, ou après la chirurgie pour limiter le risque de récidive.

2.2. Les thérapies ciblées

Une des limitations de la chimiothérapie et de la radiothérapie est leur manque de spécificité qui engendre de sévères effets secondaires. Pour pallier à cette limitation et pour élargir l'arsenal de traitements anticancéreux, de nouveaux médicaments plus spécifiques ont vu le jour. Ils s'inscrivent dans la catégorie des thérapies ciblées qui correspondent à des médicaments ciblant des molécules qui interviennent dans le développement, la prolifération ou la propagation des cellules cancéreuses.

Le développement de ces traitements implique donc d'identifier de bonnes cibles thérapeutiques. Plusieurs types de thérapies peuvent être regroupés sous ce terme (source : National Cancer Institute).

- La **thérapie hormonale** qui a un effet antitumorale en bloquant la synthèse ou l'action de certaines hormones de l'organisme pour éviter qu'elles ne stimulent les cellules cancéreuses. Elle ne concerne donc que les cancers hormonaux dépendants du sein et de la prostate.
- Il est possible de bloquer la vascularisation d'une tumeur en utilisant des **inhibiteurs de l'angiogenèse** et ainsi limiter la prolifération tumorale. Par exemple l'Avastin® est un anticorps monoclonal spécifique du VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) et empêche la formation de nouveaux vaisseaux sanguins.
- **Les inhibiteurs des signaux de transduction** interfèrent avec les molécules intervenant dans la transduction du signal intracellulaire. Le plus connu est le Glivec® qui est analogue de l'ATP et empêche ainsi l'activation de la cascade des protéines kinases intervenant dans la prolifération cellulaire. Il est utilisé notamment dans le traitement de certains cancers de l'estomac, de l'intestin, de la peau ainsi que des leucémies.
- **L'immunothérapie anticancéreuse** met en jeu le système immunitaire du patient. Le but est d'induire ou de moduler la réponse immunitaire antitumorale. On distingue 2 stratégies : **l'immunothérapie passive** et **l'immunothérapie active**. **L'immunothérapie passive** consiste en l'injection d'effecteurs de la réponse immunitaire antitumorale. Elle regroupe notamment l'utilisation de molécules effectrices comme *i)* des anticorps monoclonaux (Acm) spécifiques de marqueurs tumoraux (comme par exemple le Rituximab® qui est un Acm anti-CD20 utilisé dans le traitement des leucémies et lymphomes B), *ii)* des cytokines recombinantes à propriétés antitumorales (comme l'interleuline 2 (IL-2) (Rosenberg et al., 2014)) ou *iii)* des bloquants des cytokines protumorales (comme l'IL-10 (Sato et al., 2011)). Cette thérapie inclue également le transfert adoptif de lymphocytes effecteurs activés *ex vivo*. A l'inverse, **l'immunothérapie active** vise à induire ou à augmenter la réponse immunitaire antitumorale par exemple par le biais de la vaccination. L'avantage de cette stratégie est la génération d'une mémoire immunitaire qui peut, dans certains cas, éviter l'apparition de tumeurs secondaires après exérèse d'une tumeur par chirurgie. De plus, l'immunothérapie peut aussi agir comme adjuvant et ainsi amplifier l'efficacité du traitement lorsqu'elle est associée à un traitement de chimiothérapie classique (Mellman et al., 2011).
- **Les inducteurs d'apoptose** sont un autre moyen, plus spécifique que la chimiothérapie ou la radiothérapie, pour induire l'apoptose des cellules cancéreuses. Dans ce cas, il est nécessaire de développer des molécules qui vont activer les récepteurs de mort que les cellules cancéreuses expriment. Cette partie sera détaillée dans la partie A de l'introduction

Cette liste n'est bien sûr pas exhaustive et il est possible d'imaginer encore bien d'autres cibles thérapeutiques.

Les thérapies ciblées sont très efficaces, mais leur action peut être limitée dans le temps à cause d'apparition de résistance. En effet, les cellules cancéreuses peuvent soit développer

des mutations au niveau de la cible thérapeutique et ainsi ne plus interagir avec le médicament, soit emprunter une voie de signalisation alternative et ainsi éviter l'effet bénéfique du traitement. De plus, ces thérapies peuvent présenter des effets secondaires tels que l'hypertension artérielle, des douleurs abdominales et des événements thromboemboliques (Aissi et al., 2012) mais qui restent moins sévères que ceux causés par la chimiothérapie et radiothérapie.

2.3. Vers une médecine personnalisée

Afin d'améliorer l'efficacité des traitements, la médecine personnalisée est une voie prometteuse pour la thérapie des cancers. Elle consiste à traiter chaque patient de façon individualisée en fonction des spécificités génétiques et biologiques de son cancer et en tenant compte de l'environnement du patient. Pour cela, les scientifiques s'efforcent d'identifier les signatures de chaque type de tumeurs et de recenser ces informations dans des catalogues tumoraux. Ces informations permettraient d'adapter le traitement et de connaître l'évolution probable de la maladie, comme l'apparition de métastases, pour adapter le suivi.

3. L'apoptose : une cible pour la thérapie des cancers

La seconde stratégie apparue après la chirurgie pour lutter contre les cancers consistait à induire directement la mort, généralement par apoptose, des cellules tumorales grâce à des drogues qui agissent directement sur leur cycle cellulaire. Il s'en est suivi l'apparition de la radiothérapie qui met en jeu des rayons ionisants qui induisent eux aussi l'apoptose des cellules en cycle. Par ailleurs, l'apoptose peut également être initiée par l'activation de certains récepteurs de la superfamille du **TNF-R** (Tumor Necrosis Factor-Receptor) qui constituent une nouvelle approche en thérapie ciblée des cancers. Parmi eux, les récepteurs de mort **TRAIL-R** (Tumor Necrosis Factor Receptor Apoptosis Inducing Ligand-Receptor, TNFSF10) apparaissent comme une cible prometteuse car ils induisent l'apoptose des cellules cancéreuses en épargnant les cellules saines (partie A de l'introduction, paragraphe 2,5). Le récepteur **CD40,** un autre membre de la famille du TNF-R à la fois activateur de la réponse immunitaire et inducteur d'apoptose des cellules cancéreuses, suscite également un grand intérêt pour le traitement des cancers (partie A de l'introduction, paragraphe 3) De plus, l'association des thérapies conventionnelles telle que la chimiothérapie avec la thérapie utilisant des agonistes des récepteurs de mort peut augmenter l'efficacité des traitements conventionnels décrits ci-dessus.

Dans ce cadre, mes travaux de thèse ont consisté à développer des stratégies pour induire efficacement l'apoptose des cellules cancéreuses. Pour cela nous avons développés des ligands multivalents d'un des récepteurs pro-apoptotique de TRAIL (TRAIL-R2) (Chapitre 1). Nous nous sommes également intéressés au récepteur CD40 qui comme décrit ci-dessus peut aussi induire l'apoptose des cellules cancéreuses (Chapitre 2).
L'interaction entre les ligands de la superfamille du TNF et les récepteurs de la superfamille du TNF-R est quelque peu complexe. Afin d'optimiser au mieux le développement de ligands synthétiques, nous avons entrepris des études pour tenter de caractériser au mieux ces interactions à la surface de la cellule et de mesurer l'impact de ces interactions sur la signalisation intracellulaire (Chapitre 2).
Enfin, nous avons développé et évalué le potentiel anti-tumoral de dérivés de platine dont le but est d'améliorer la stabilité et la sélectivité du platine déjà utilisé en thérapie des cancers (Chapitre 3).
L'objectif à terme est de combiner ses traitements afin d'optimiser leur efficacité.

B. L'APOPTOSE EN THERAPIE DU CANCER

1. Voies moléculaires de l'apoptose

1.1. Caractéristiques de l'apoptose

L'apoptose est une mort cellulaire dite "programmée" qui joue un rôle essentiel dans le développement embryonnaire, le développement du système immunitaire et le maintien de l'homéostasie des tissus adultes chez les métazoaires (Lockshin and Zakeri, 2007). Un dysfonctionnement de l'apoptose peut être à l'origine de sévères pathologies et plus particulièrement l'absence d'apoptose favorise la survie et l'accumulation de cellules anormales qui peuvent conduire au développement de tumeurs (Hanahan and Weinberg, 2000). Classiquement, une mort cellulaire est dite « programmée » lorsqu'elle est due à une séquence d'étapes moléculaires contrôlées menant à une destruction cellulaire transitoire et localisée. A l'opposé, on distingue la mort cellulaire par nécrose, qui initialement définissait par défaut, un processus de mort cellulaire survenant de façon accidentelle et qui ne présente pas les modifications morphologiques caractéristiques de l'apoptose. Pendant longtemps l'apoptose était considérée comme la seule mort cellulaire programmée mais récemment, des études ont montré que la mort par nécrose ainsi que la mort au cours du mécanisme d'autophagie peuvent également dans certains cas être programmées et impliquées dans la pathogenèse du cancer (Ouyang et al., 2012).

Les cellules apoptotiques se caractérisent par une compaction de la chromatine, une convolution des membranes plasmiques et nucléaires suivie par une condensation cytoplasmique et la fragmentation du noyau. Des corps apoptotiques, des fragments cellulaires entourés de membranes plasmiques, sont ensuite phagocytés par des macrophages ou des cellules dendritiques, sans déclencher de réaction inflammatoire (**Figure 2**).

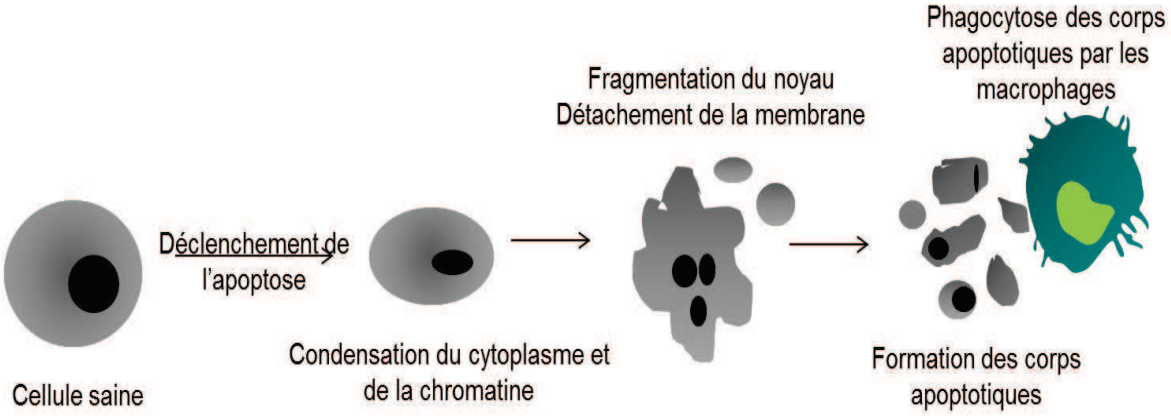


Figure 2 : Caractéristiques morphologiques de l'apoptose. Cette figure illustre les changements morphologiques au cours de l'apoptose d'une cellule. Les corps apoptotiques seront ensuite éliminés par des cellules phagocytaires limitant ainsi l'inflammation.

Au niveau moléculaire, l'apoptose est orchestrée par des protéases appelées **caspases** (cysteinyl-aspartate-cleaving proteases) (**Figure 3**) (Riedl and Shi, 2004). Les caspases ont une structure très conservée comprenant, un pro domaine N-terminal, et deux domaines qui deviendront après clivage la grande sous-unité (qui porte le centre actif) et la petite sous-unité. Les caspases sont impliquées dans l'initiation, l'exécution et la régulation de l'apoptose. On distingue les **caspases effectrices** (caspases 3, 6 et 7) et les **caspases initiatrices** (caspases 2, 8, 9 et 10) qui sont responsables de l'initiation de la cascade protéolytique (**Figure 3**). Ces dernières possèdent au niveau du pro-domaine, des motifs d'interaction protéine-protéines tel que le motif CARDs (Caspases Recruitment Domains) ou DEDs (Death Effector Domain). Ces domaines permettent aux caspases de se lier aux différentes molécules de transduction du signal apoptotique. Les caspases sont produites sous forme inactive et sont activées soit par clivage protéolytique (caspase 3) soit lorsqu'elles sont oligomérisées dans un complexe multimérique (caspases 8 et 9).

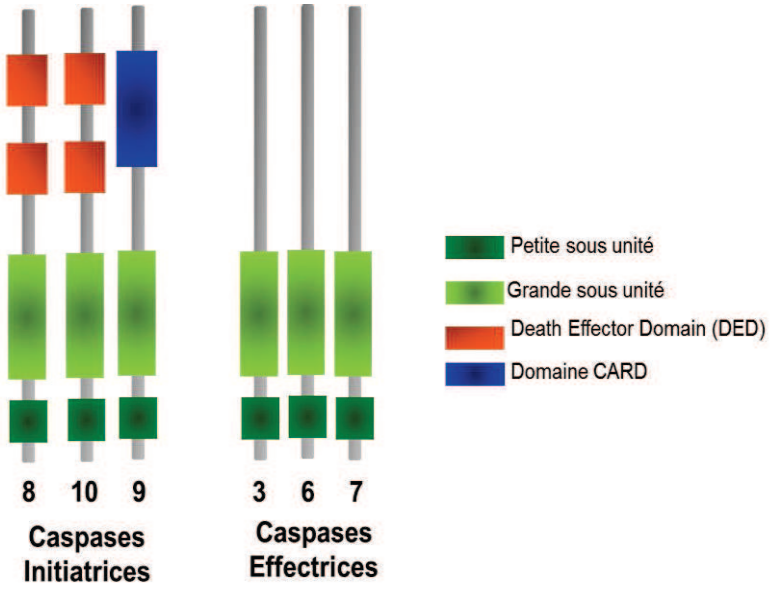


Figure 3 : Les caspases initiatrices et effectrices, chefs d'orchestre de l'apoptose. Les caspases initiatrices possèdent au niveau de la région N-term, des domaines CARD et DED nécessaires à leur oligomérisation et leur activation et qui leur permettent d'interagir avec les molécules pro-apoptotiques.

Les protéines **IAP** (Inhibitor of Apoptosis) régulent également l'apoptose en inhibant l'activité des caspases (Salvesen and Duckett, 2002) (**Figure 4**). Huit IAPs ont été identifiés chez les mammifères : c-IAP1, c-IAP2, la survivine, XIAP, ILP2, MLIAP, NAIP, et BRUCE. Les IAPs se caractérisent par la présence de 1 à 3 domaines BIR (Baculoviral IAPs Repeat) qui peuvent se lier au domaine IBM (IAP Binding Motif) présent sur les caspases 3, 7 et 9 ainsi que sur les protéines Smac/DIABLO (*cf.* signalisation intrinsèque, paragraphe **1.2**) et ainsi bloquer leur activité. Sur les 8 IAPs, 5 contiennent à leur extrémité C-terminale un domaine d'interaction protéine-protéine contenant un atome de zinc (RING finger). Les protéines c-IAP1 c-IAP2 et NAIP contiennent en plus un domaine CARD.

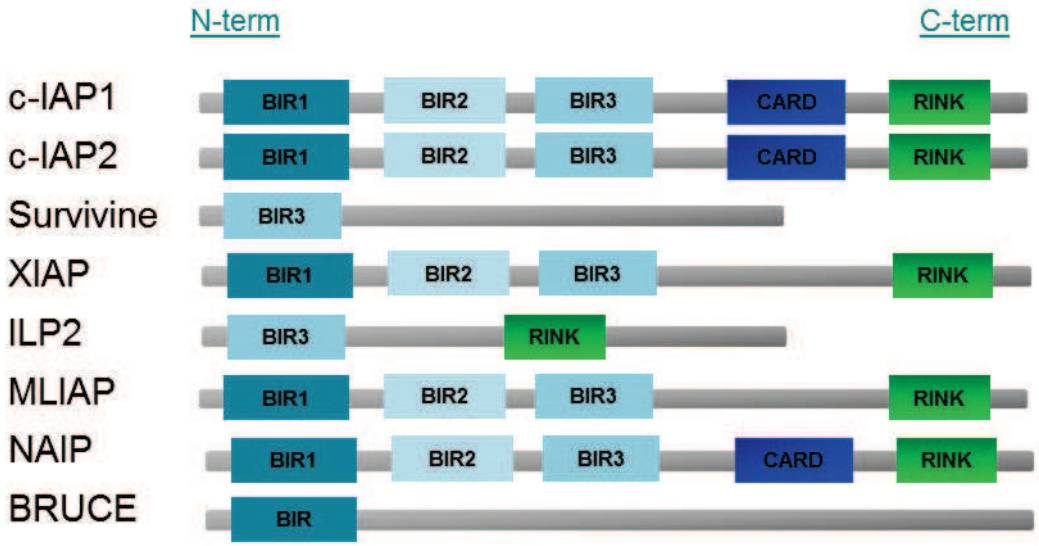


Figure 4 : Les protéines IAPs. Représentation schématique de la famille des protéines IAPs caractérisée par la présence d'un à trois domaines BIR au niveau de leur région N-terminale.

1.2. Deux voies de signalisations pour induire l'apoptose

Selon la nature de l'élément activateur, l'apoptose peut emprunter 2 voies de signalisations différentes.

a) La voie intrinsèque

La voie intrinsèque, ou encore appelée mitochondriale, est orchestrée par des protéines de la famille **Bcl2** (**Figure 5**). Ces protéines clés, se caractérisent par la présence d'1 à 4 domaines BH (BH1, BH2, BH3 et BH4) pour Bcl2 Homology Domain et d'un domaine transmembranaire (TM) qui leur permet de s'ancrer dans la membrane mitochondriale. On distingue dans cette famille 3 sous groupes de molécules, classées en fonction de leur structure et de leur fonction. Un premier groupe rassemble les protéines ne possédant qu'un domaine BH3 (**BH3 only protein** : Bid, Bik, Bad, Bim, Bmf, Bnip3, Puma et Noxa) impliquées dans les fonctions **pro-apoptotiques**. Elles contrôlent les interactions avec les molécules du second et troisième groupe ayant plusieurs domaines BH (**BH multiple domain**) qui peuvent soit être **pro-apoptotiques** (Bax, Bak, Bok) soit **anti-apoptotiques** (Bc-L2, Bcl-XL, McL-1).

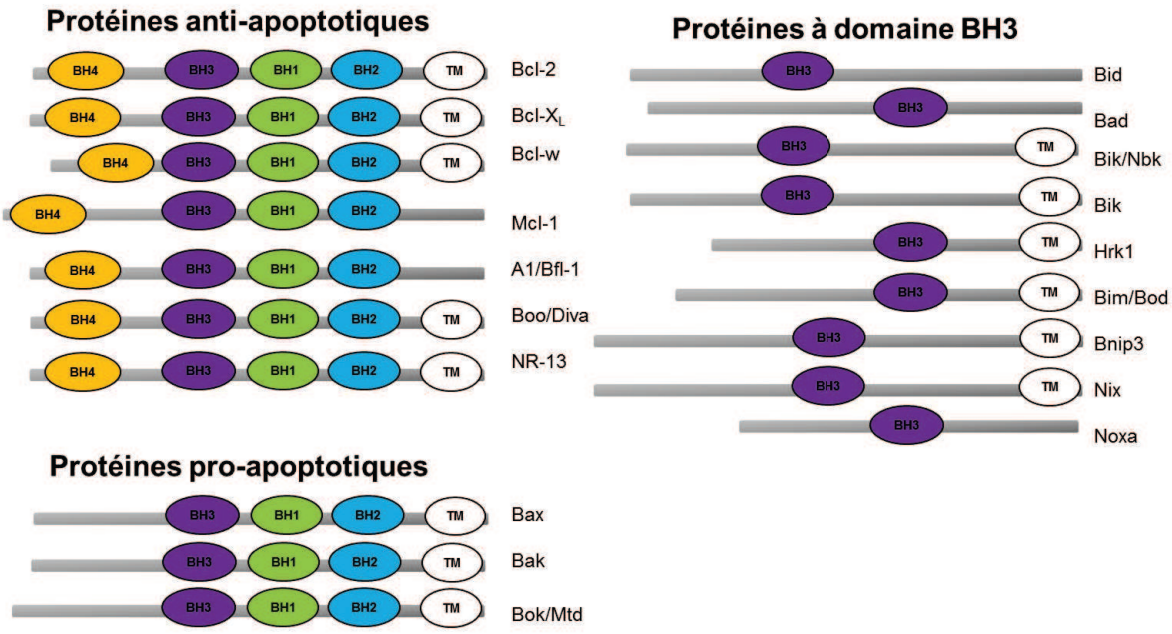


Figure 5 : Les protéines de la famille Bcl-2. Cette figure illustre les 3 sous-groupes de protéines de la famille Bcl-2. La majorité de ces protéines contiennent en plus un domaine transmembranaire (TM).

La voie intrinsèque de l'apoptose est initiée suite à un stress chimique ou physique (radiations, UV, choc osmotique, hypoxie, choc thermique) qui active le facteur de transcription appelé suppresseur de tumeur, **p53** et induit l'expression des protéines pro-apoptotiques de la famille Blc2, **Puma et Noxa** (BH3 domain only) (**Figure 6**) qui vont l'activation des protéines **Bax et Bak** (BH multiple domain). La protéine Bax subit alors un changement conformationnel induisant sa relocalisation au niveau de la mitochondriale et son oligomérisation ce qui lui permet d'enclencher le processus de perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie (MOMP), libérant ainsi le cytochrome c dans le cytoplasme (Shamas-Din et al., 2013).

Le cytochrome c forme ensuite un complexe, appelé apoptosome, avec la protéine adaptatrice Apaf 1, la pro-caspase 9, et de l'ATP. L'apoptosome active alors la caspase 9 qui elle-même va activer les caspases effectrices 3/7 conduisant à la mort de la cellule. En parallèle, les protéines Smac/DIABLO (Second Mitochondria-derived Activator of Caspases) libérées de la mitochondrie inhibent les protéines IAPs.

Une caractéristique importante des membres de la famille Bcl-2 est de pouvoir former des homo ou des hétérodimères. Il semblerait que la régulation entre la survie et l'apoptose au niveau de la cellule, soit influencée par le type et la proportion de dimères anti ou pro-apoptotiques formés. Par exemple, lorsque la protéine pro-apoptotique Bax est préférentiellement exprimée, des homodimères Bax/Bax se formeraient en majorité et favoriseraient ainsi l'apoptose. En revanche, lorsque des protéines anti-apoptotique telles Bcl-2 sont majoritairement exprimées, des homodimères Bcl2/Bcl2 se formeraient en majorité et favoriseraient ainsi la survie cellulaire. Il a également proposé que les protéines anti-apoptotiques puissent former des hétéromères avec les protéines pro-apoptotique et limiter l'induction de l'apoptose par ces dernières (Shamas-Din et al., 2013).

b) La voie extrinsèque

La voie extrinsèque est initiée par l'activation des récepteurs de mort cellulaire appartenant à la famille du TNF-R (**Figure 6**). Ces récepteurs peuvent être activés par leurs ligands présentés à la surface de cellules telles que les Natural Killer (NK) ou les lymphocytes T cytotoxiques ou par la forme sécrétée de ces ligands. L'interaction entre le ligand et son récepteur de mort va former au niveau de la membrane plasmique un complexe macromoléculaire multimérique appelé DISC (Death Inducing Signaling Complex) (*cf* partie A de l'introduction, paragraphe 2,3) incluant la pro-caspase 8. Dans ce complexe, la pro-caspase 8 est clivée pour former une caspase 8 active qui va soit activer les caspases effectrices 3/7 pour induire l'apoptose dans les cellules dites de type I, soit initier une boucle d'amplification mitochondriale dans les cellules dites de type II. Dans ce cas, la caspase 8 va cliver la protéine Bid, (membre de la famille des protéines Bcl2) pour obtenir une forme tronquée (Bibt) qui va interagir avec les protéines Bax et Bak (membres de la famille des protéines Bcl2) au niveau de la mitochondrie. Comme précédemment, Bax et Bak induisent la libération du cytochrome c et des protéines Smac/DIABLO. Grâce à cette boucle d'amplification, le signal induit par les récepteurs de mort est amplifié à travers la formation et l'activation de l'apoptosome qui va augmenter l'activation des caspases effectrices 3/7. En plus des protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 et des IAPs, la voie extrinsèque de l'apoptose peut être inhibée par la protéine anti-apoptotique c-FLIP qui bloque la formation du DISC.

Il existe une troisième voie de signalisation apoptotique qui suscite de plus en plus d'intérêt. Il s'agit de la voie du stress du réticulum endoplasmique (RE). Diverses conditions, qui altèrent l'intégrité des protéines, peuvent générer un stress oxydatif et la libération de

calcium au niveau du (RE) et ainsi conduire à l'induction de l'apoptose. Brièvement, la libération du calcium (Ca^{2+}) entraîne l'activation des calpaïnes (protéases à cystéines) qui vont activer par clivage protéolytiques la pro-caspase 4 (caspase 12 chez les rongeurs) présente au niveau du RE. La caspase 4 va activer les caspases effectrices 3/7 pour induire l'apoptose. L'apoptose peut aussi être induite au niveau du RE par TRAF2 qui active la voie JNK (Sano and Reed, 2013).

INTRODUCTION

A. ELIMINER LES CELLULES CANCEREUSES EN INDUISANT LEUR APOPTOSE PAR LES RECEPTEURS DE LA FAMILLE DU TNF-R

PARTIE I : Les récepteurs TRAIL-R et CD40 en thérapie des cancers

1. Les récepteurs de la famille du TNF-R

1.1. Description

Les ligands de la superfamille du TNF (Tumor Necrosis Factor) et les récepteurs de la superfamille du TNF-R (TNF Receptor) régulent la croissance des cellules en agissant soit sur l'apoptose soit sur la prolifération et la survie. Ils ont un rôle central dans la réponse immunitaire (revue dans (Locksley et al., 2001)).

a) Les récepteurs de la famille du TNF-R

Les récepteurs de cette famille au nombre de 26, sont principalement des glycoprotéines transmembranaires de type I à l'exception de BCMA, TACI, BAFFR et XEDAR qui n'ont pas de peptide signal et sont donc des protéines transmembranaires de type III (**Figure 7**). Les récepteurs présentent des homologies dans leur région extracellulaire, caractérisées par la présence de 1 à 6 **domaines riches en cystéines** (CRD). Ces motifs répétés contiennent 6 cystéines engagées dans 3 ponts disulfures. L'arrangement de ces CRD permet de stabiliser le récepteur au niveau de sa région extracellulaire (Bodmer et al., 2002) (**Figure 7**).

On peut ainsi distinguer 3 sous-familles de récepteurs :

Les **récepteurs** qui peuvent recruter des molécules de signalisation appelées TRAF (TNF-Receptor Associated Factor) et qui, de manière générale, favorisent la prolifération. Dans ce sous-groupe, on retrouve le fameux récepteur CD40, chef d'orchestre de la réponse immunitaire (*cf.* point 3 de cette partie) mais aussi les récepteurs BAFF-R et TACI impliqués dans la maturation des lymphocytes B et dont on reparlera dans le chapitre 2 de la partie résultats.

Le second sous-groupe correspond aux **récepteurs de mort** qui possèdent des domaines dits de « mort » dans leur région intracellulaire, nécessaires au recrutement de protéines initiant l'apoptose.

Le troisième sous-groupe inclue les **récepteurs membranaires inhibiteurs** antagonistes de certains récepteurs des 2 sous-groupes précédents.

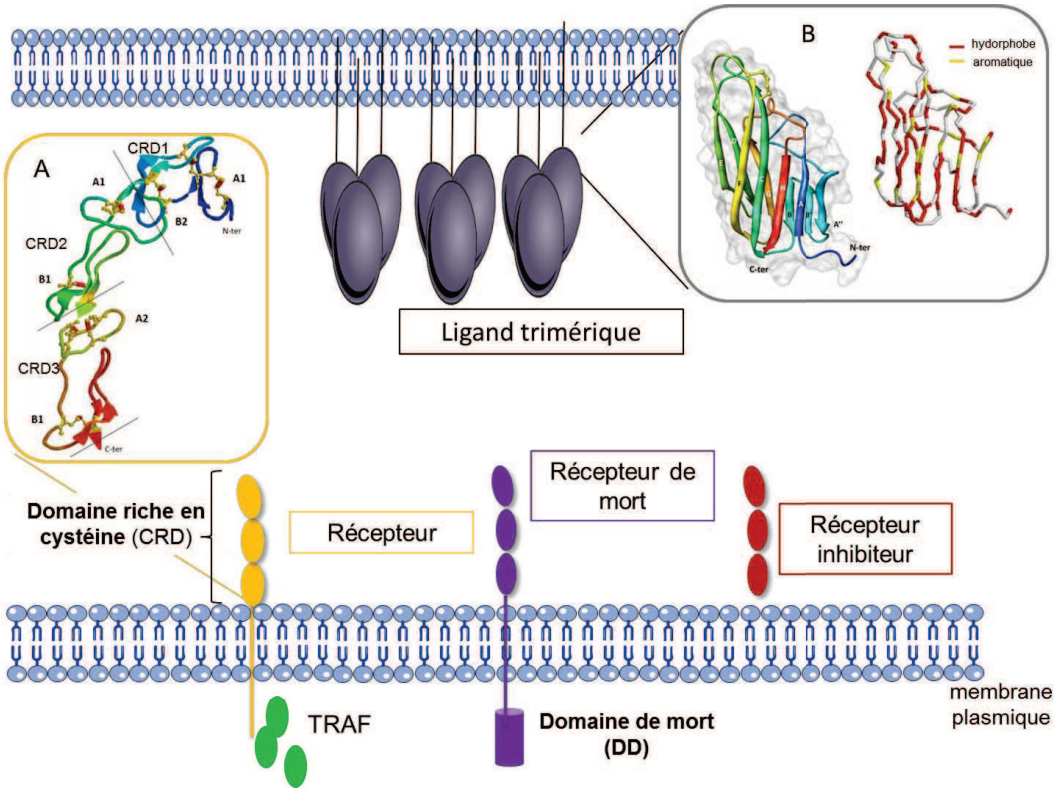


Figure 7 : Les récepteurs et les ligands de la superfamille du TNF-R. Les récepteurs de la superfamille du TNF-R peuvent être divisés en 3 sous-groupes : *i)* les récepteurs qui favorisent généralement la prolifération cellulaire en recrutant des protéines TRAF (en jaune), *ii)* les récepteurs de mort (en violet) qui possèdent un domaine de mort dans leur région intracellulaire et *iii)* les récepteurs inhibiteurs (en rouge). Le domaine extracellulaire des récepteurs est constitué de 1 à 4 domaines riches en cystéines. Le schéma A représente la structure 3D du domaine extracellulaire du récepteur CD40 composé de 3 CRD (Bajorath and Aruffo, 1997). Les ligands de la famille du TNF trimériques, peuvent être solubles ou membranaires. Le schéma représente la structure 3D du domaine d'homologie au TNF du ligand CD40L (Karpusas et al., 1995).

b) Les ligands de la famille du TNF

Les ligands des récepteurs de la superfamille du TNF-R, au nombre de 19, sont des protéines transmembranaires de type II (à l'exception de LT-α) caractérisées par un domaine d'homologie au TNF au niveau de leur région extracellulaire (revue dans (Locksley et al., 2001)). Le domaine **d'homologie au TNF** (THD) est composé d'une séquence conservée de 150 acides aminés aromatiques et hydrophobes. Ces ligands membranaires deviennent des ligands solubles trimériques après clivage protéolytique. Cette structure homotrimérique qui oligomérise les récepteurs, est nécessaire à l'induction de la signalisation intracellulaire. Néanmoins, l'activation des récepteurs peut varier en fonction de

la nature du ligand. Par exemple, le récepteur de mort Fas (CD95, APO-1, TNFRSF6) n'est pratiquement pas activé par son ligand Fas-L (CD95L) sous forme trimérique soluble mais est, en revanche, fortement activé par sa forme membranaire. Par ailleurs, certains ligands peuvent lier plusieurs récepteurs comme TRAIL qui lie 5 récepteurs de la famille du TNF-R ou BAFF qui lie BAFF-R, TACI et BCMA (**Figure 8**). Il existe aussi une interaction inter-espèce possible entre les ligands et récepteurs (Bossen et al., 2006). Par exemple CD40L murin reconnaît les récepteurs murins et humains alors que le récepteur CD40 murin n'est pas reconnu par le CD40L humain.

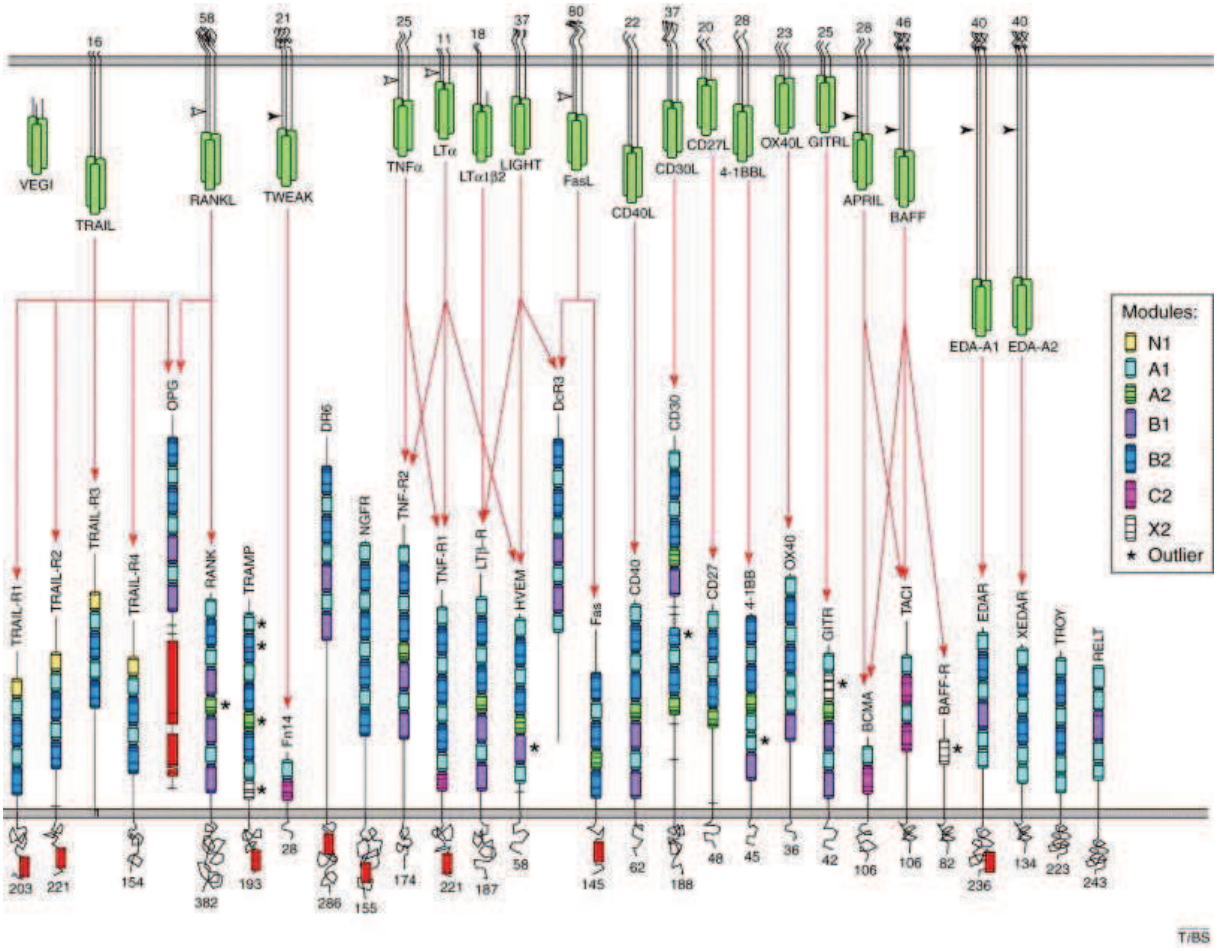


Figure 8 : Interactions entre les ligands et les récepteurs de la superfamille du TNF. Les différentes interactions entre ligands et récepteurs sont représentées par une flèche rouge (Bodmer et al., 2002).

1.2. Les récepteurs de mort

A ce jour, 8 récepteurs de mort ont été identifiés TNF-R1, Fas, TRAIL-R1, TRAIL-R2, TRAMP, DR6, EDAR, p75NGFR (**Tableau 1**). Après liaison de leurs ligands, ils sont

capables d'induire la voie extrinsèque de l'apoptose (*cf*. partie A du préambule, **Figure 6**) en recrutant au niveau de leur domaine de mort, des molécules de transduction. Le domaine de mort contient 3 régions impliquées dans le recrutement des molécules apoptotiques : une région DED (Death Effector Domain), un domaine de recrutement des caspases CARD (Caspase Recruitment Domain) et un domaine PYrine (PYD). Cependant, les récepteurs de mort peuvent également induire d'autres signaux, tels que des signaux de survie principalement médiés par l'activation de NFkB, et ainsi bloquer l'apoptose. Les récepteurs Fas, TNFR1 et TRAIL-R sont des cibles préconisées pour la thérapie des cancers (Micheau et al., 2013).

a) Le TNF

Le TNF est le premier récepteur de mort à avoir été évalué en essais cliniques en 1987. Malheureusement, l'administration systémique de son ligand le TNF-α était associé à de nombreux effets secondaires sévères associés à une réponse anti tumorale partielle (Blick et al., 1987). Malgré ses débuts difficiles, le TNF-R suscite toujours l'intérêt. Aujourd'hui, il existe plusieurs molécules recombinantes TNF-α qui ont été modifiées pour limiter la cytotoxicité contre les cellules non tumorales. Ces molécules s'avèrent être efficaces dans le traitement de certains sarcomes (Deroose et al., 2012) et du cancer pancréatique inopérable (Senzer et al., 2004).

b) Fas-L

L'utilisation de molécules recombinantes FasL ou d'anticorps monoclonaux dirigés contre Fas entraîne chez la souris une hépatotoxicité sévère (Shimizu et al., 1996). Comme pour le TNF-R, plusieurs stratégies pour éviter la toxicité ont été entreprises mais aucune ne s'est révélée efficace. Cependant, une forme recombinante hexamérique de FasL, appelée l'APO010, obtenue par la fusion de 2 ligands trimériques FasL, présente une activité apoptotique très forte *in vitro* et *in vivo*. Cette molécule prometteuse est actuellement évaluée en phase I d'essais cliniques (Verbrugge et al., 2009).

c) TRAIL

Les récepteurs de TRAIL, apparaissent comme une cible très attractive pour la thérapie des cancers car TRAIL induit l'apoptose des cellules cancéreuses et ne présente pas de toxicité envers les cellules non tumorales. TRAIL et ses récepteurs sont l'objet de la partie suivante.

Récepteurs de mort	Ligands de mort
TNF-R1 (p55/CD120a/TNFRSF1a)	TNF-α
Fas (CD95/Apo-1/TNFRSF6)	FasL (CD95L)
TRAIL-R1 (DR4/TNFRSF10A/Apo-2)	TRAIL
TRAIL-R2 (DR5/TNFRSF10B/KILLER)	TRAIL
TRAMP (Apo3/DR3/TNFRSF25/WSL1/LARD)	Apo3L (Tweak)
DR6 (TR-7/TNFRSF21)	N-APP
EDAR (HRM1)	EDA
p75NGFR (TNFRSF16)	NGF

Tableau 1 : Les récepteurs de mort et leurs ligands

2. TRAIL : un inducteur d'apoptose spécifique des cellules cancéreuses

2.1. Les récepteurs de TRAIL

Chez l'homme, le ligand TRAIL (TNF-R Apoptosis Inducing Ligand, ApoL/2) membre de la famille du TNF peut se lier à 5 récepteurs de la famille du TNF-R dont 2 récepteurs de mort, TRAIL-R1 et TRAIL-R2, permettant l'induction de l'apoptose et 3 récepteurs TRAIL-R3, TRAIL-R4 et l'ostéoprotégérine agissant comme des récepteurs inhibiteurs (**Figure 9**).

a) Les récepteurs agonistes humains TRAIL-R1 et TRAIL-R2

TRAIL-R1 (DR4, TNFRSF10A) (Pan et al., 1997) est le premier récepteur de TRAIL identifié juste avant **TRAIL-R2** (DR5, TNFRSF10B) (Chaudhary et al., 1997). Ce sont les récepteurs agonistes de TRAIL. Ils possèdent au niveau de leur région intracellulaire le domaine de mort qui leur permet d'initier la signalisation apoptotique. Au niveau extracellulaire, ces récepteurs sont composés de 3 CRD. TRAIL-R1 possède un site potentiel de N-glycosylation en position 156, alors que TRAIL-R2 n'en a pas.

Trois isoformes de TRAIL-R2, différant dans le domaine transmembranaire, ont été identifiées : une isoforme longue (TRAIL-R2$_L$) et 2 isoformes courtes (TRAIL-R2$_S$), mais aucune étude n'indique une fonction particulière de ces isoformes.
Il n'existe pas à ce jour de réelle distinction entre la fonction des 2 récepteurs agonistes. La contribution de TRAIL-R1 ou TRAIL-R2 dans l'induction de l'apoptose n'est cependant pas équivalente et semble être dépendante du contexte et de la cellule cancéreuse sur laquelle ils sont exprimés. D'après la littérature, TRAIL-R2 semble être le principal récepteur

agoniste de TRAIL notamment sur les cancers colorectaux et du sein (Kelley et al., 2005). TRAIL-R1 induirait l'apoptose principalement au niveau des leucémies chroniques lymphocytaires (MacFarlane et al., 2005).

De plus, ces 2 récepteurs non pas la même sensibilité à TRAIL. En effet, TRAIL sous sa forme trimérique soluble et membranaire peut activer TRAIL-R1. En revanche, TRAIL-R2 nécessiterait un ligand présentant un degré de valence plus important et ne peut être activé que par la forme membranaire de TRAIL ou par des ligands synthétiques héxamériques (Wajant et al., 2001). A l'avenir, si l'on souhaite utiliser TRAIL en thérapie cancéreuse, il sera indispensable de caractériser plus précisément la fonction de ces 2 récepteurs.

b) Les récepteurs inhibiteurs humains TRAIL-R3, TRAIL-R4 et OPG

Les récepteurs **TRAIL-R3** (DcR1, TNFRS10C) (Degli-Esposti et al., 1997) et **TRAIL-R4** (DcR2, TNFRS10D) (Marsters et al., 1997) sont considérés comme les récepteurs inhibiteurs de TRAIL. Contrairement aux autres récepteurs, TRAIL-R3 n'est pas une protéine transmembranaire de type I, ne possède donc pas de domaine de mort et est maintenu à la membrane par une ancre GPI. De plus, TRAIL-R3 possède 5 sites de glycosylation. TRAIL-R4 possède un domaine de mort tronqué non fonctionnel et 3 sites potentiels de N-glycosylation. Par conséquent, ces récepteurs sont incapables de transmettre la signalisation apoptotique. L'**ostéoprotégérine** (OPG, TNFRSF11B) est également considéré comme un récepteur inhibiteur de TRAIL (Emery et al., 1998). L'OPG a d'abord été décrit comme un récepteur inhibiteur de RANKL (Receptor Activator of Nuclear Factor kB) dont le récepteur agoniste est RANK. Dans ce cas, l'OPG produite sous forme soluble séquestre RANKL et l'empêche de se fixer sur RANK et bloque ainsi la différenciation des ostéoclastes (Min et al., 2000). Pour TRAIL, le rôle de l'OPG n'est pas encore bien établi. Des études ont montré par exemple, la présence d'OPG dans le microenvironnement tumoral qui séquestrerait TRAIL et empêcherait son action antitumorale.

c) Les récepteurs de TRAIL chez la souris

TRAIL existe également chez la souris mais ne se lie qu'à un seul récepteur apoptotique nommé mTRAIL-R (mDR5), qui est un homologue des récepteurs humains TRAIL-R1 et TRAIL-R2. Comme chez l'homme, deux récepteurs inhibiteurs ont été identifiés : il s'agit de mDcR1 et mDcR2 (qui possède 2 isoformes dont une membranaire $mDcR2_L$ et une soluble $mDcR2_S$) (Lawrence et al., 2001; Schneider et al., 2003). Ces différences compliquent l'étude de TRAIL et des TRAIL-R dans le modèle murin.

d) Expression tissulaire des différents TRAIL-R et de TRAIL

Les récepteurs de TRAIL sont exprimés sur la majorité des cellules saines et malignes (Daniels et al., 2005). L'expression des TRAIL-R peut être régulée par le facteur de transcription p53 (Sheikh et al., 1998).

On retrouve l'expression d'ARNm de TRAIL dans de nombreux tissus (la rate, le thymus, la prostate, les ovaires, le colon, le placenta, les poumons, les reins, le pancréas, les muscles squelettiques, l'intestin grêle et le cerveau). Mais la protéine TRAIL est principalement exprimée, après activation, à la surface des cellules immunitaires incluant les Natural Killer (NK), les lymphocytes LTCD4+ et LTCD8+, les monocytes/macrophages, les cellules dendritiques (DC) et les neutrophiles (Daniels et al., 2005).

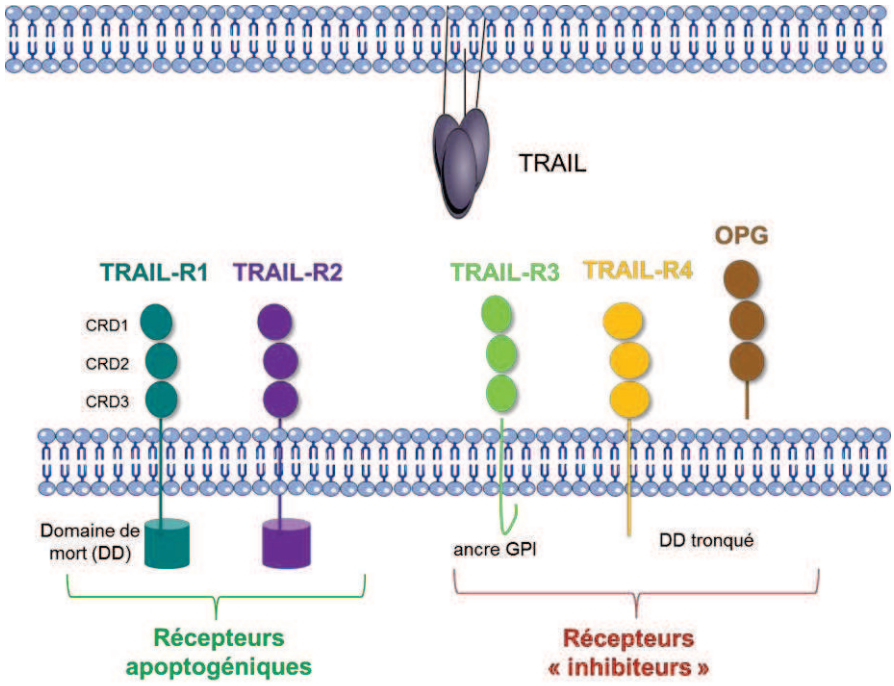


Figure 9 : Les récepteurs de TRAIL. Représentation schématique des récepteurs de TRAIL. Les récepteur TRAIL-R1 (bleu) et TRAIL-R2 (violet) possèdent un domaine de mort qui permet d'initier l'apoptose. Le récepteur TRAIL-R3 (vert) a une ancre GPI à la place du domaine de mort et le récepteur TRAIL-R4 (jaune) possède un domaine de mort tronqué. Ces 2 récepteurs régulent négativement l'apoptose induite par TRAIL. L'OPG (brun) est également considéré comme un récepteur inhibiteur de TRAIL.

2.2. Les fonctions biologiques de TRAIL

Malgré son intérêt en oncologie, les fonctions biologiques de TRAIL ne sont pas encore bien identifiées. Plusieurs études récentes suggèrent une implication de TRAIL et ses récepteurs dans les fonctions du système immunitaire. Le paragraphe suivant résume

très brièvement les implications physiologiques de TRAIL et de ses récepteurs (Falschlehner et al., 2009).

2.2.1. Rôle de TRAIL dans l'homéostasie et la différenciation des LT

Les travaux de Janssen et ses collaborateurs (Janssen et al., 2005) ont montré que TRAIL est impliqué dans l'homéostasie et la différenciation des LTCD8+ et LTCD4+. En effet, les LTCD8+ cytotoxiques activés en présence de LTCD4+ auxiliaires sont capables de subir une nouvelle expansion clonale après une seconde stimulation. A contrario, les LTCD8+ activés en l'absence de LTCD4+ ne peuvent se multiplier une seconde fois, et sont éliminés par apoptose induite par TRAIL. Leurs résultats indiquent également qu'après stimulation avec un anticorps anti-CD3, les LTCD4+ peuvent se différencier en LT auxiliaires de type 1 (LTh1) qui surexpriment FasL ou en LT auxiliaires de type 2 (LTh2) qui surexpriment TRAIL. Les LTh1 peuvent être éliminées par TRAIL alors que les LTh2 sont résistants (due à une production de c-FLIP après stimulation avec un anticorps anti-CD3) (Janssen et al., 2005).

2.2.2. Rôle de TRAIL dans le développement de l'auto-immunité

Des études ont rapporté la présence de quantité élevée de TRAIL dans le sérum de patients souffrant de lupus érythémateux disséminé ou de sclérose en plaque soulevant l'implication de TRAIL dans les pathologies auto-immunes. Dans la majorité des cas, comme par exemple dans le diabète de type I ou l'arthrite induite au collagène, TRAIL participe à la diminution des symptômes en prévenant l'activation des cellules autoréactives ou en induisant l'apoptose des cellules inflammatoires (Lamhamedi-Cherradi et al., 2003; Mi et al., 2003). En revanche, TRAIL peut, comme dans le lupus érythémateux disséminé, promouvoir la pathologie en diminuant l'activité cytotoxique des LTCD8+ qui pourrait bloquer les LB autoréactifs (Nguyen et al., 2009).

2.2.3. Rôle de TRAIL dans la réponse immunitaire anti-infectieuse

TRAIL est également exprimé sur les cellules immunitaires impliquées dans la défense contre les pathogènes. Comme précédemment TRAIL peut avoir deux effets opposés. Par exemple, les travaux de Steinwede (Steinwede et al., 2012) montrent que lors d'une infection par *S. pneumoniae* chez la souris, les neutrophiles exprimant TRAIL sont rapidement recrutés au niveau des poumons et libèrent la protéine TRAIL soluble. Les

molécules TRAIL libérées par les neutrophiles vont ensuite induire l'apoptose des macrophages alvéolaires infectés. L'apoptose des macrophages infectés par la bactérie est très utile car elle limite la propagation de l'infection et de l'inflammation. TRAIL a aussi été décrit comme favorisant la réponse des LTCD8+ qui éliminent les cellules infectées lors d'une infection grippale (Brincks et al., 2011).

Cependant TRAIL peut aussi avoir un effet immunosuppresseur comme dans le cadre d'une infection virale par la rougeole. Lors de cette infection TRAIL exprimé sur les DC induit l'apoptose des LTCD8+, effecteurs de la réponse antivirale et par conséquent empêche l'élimination du virus (Vidalain et al., 2000a).
TRAIL peut donc en fonction de la pathologie avoir un effet bénéfique ou contribuer à la sévérité de celle-ci en agissant sur la survie des cellules immunitaires.

2.2.4. Rôle de TRAIL dans la réponse immunitaire anti-tumorale

a) Implication de TRAIL dans la réponse anti-tumorale

TRAIL suscite un grand intérêt dans la communauté scientifique pour ses propriétés antitumorales. En effet, l'inactivation de TRAIL ou de son récepteur chez la souris favorise l'apparition et le développement de tumeurs induites ou spontanées (Sedger et al., 2002). L'action anti-tumorale de TRAIL implique les cellules cytotoxiques NK et/ou les LTCD8+ qui expriment TRAIL et peuvent directement induire l'apoptose des cellules cancéreuses qui expriment les récepteurs de TRAIL (Takeda et al., 2002). Il a été montré *in vitro* que les NK activés par l'IFNγ peuvent secréter le ligand TRAIL sous sa forme soluble et ainsi éliminer les cellules cancéreuses. De plus, TRAIL intervient également dans le contrôle de la progression tumorale et des métastases (Cretney et al., 2002; Takeda et al., 2002). En effet, les souris déficientes pour l'expression du récepteur mTRAIL-R, développent plus de métastases que les souris sauvages. Dans ce cas, les cellules cancéreuses résistantes à l'apoptose induite par TRAIL deviendraient sensibles lorsqu'elles se détachent du site primaire.
De plus, TRAIL possède la caractéristique d'induire l'apoptose des cellules cancéreuses tout en épargnant les cellules saines. L'origine de cette caractéristique unique de TRAIL n'est pas encore établie et est malheureusement peu étudiée. Plusieurs hypothèses ont été développées mais aucune n'est vraiment confirmée.

b) Pourquoi TRAIL ne tue pas les cellules saines ?

La première hypothèse était que les cellules non cancéreuses sur-exprimaient les récepteurs inhibiteurs TRAIL-R3 et TRAIL-R4 (Degli-Esposti et al., 1997; Sheridan et al., 1997) mais ces observations n'ont pas été confirmées *in vivo.*

Le consensus actuel serait que les cellules saines sont protégées de l'apoptose induite par TRAIL suite à l'accumulation de plusieurs mécanismes de résistance. Dans une étude récente (van Dijk et al., 2013), les auteurs montrent que les fibroblastes et les cellules musculaires humaines, utilisées comme modèle de cellules saines, sur-expriment en même temps, plusieurs molécules anti-apoptotiques, Bcl-2, c-FLIP, et XIAP. L'expression de ces 3 protéines anti-apoptotiques serait responsable de l'absence de sensibilité à l'apoptose induite par TRAIL dans ces cellules saines. Ils ont ensuite démontré que l'inhibition d'une de ces molécules n'est pas suffisante pour sensibiliser les cellules à TRAIL. Il est nécessaire d'inhiber à la fois c-FLIP, Bcl-2 et XIAP pour sensibiliser les cellules saines à l'apoptose induite par TRAIL. Les auteurs se sont ensuite intéressés au cas des cellules tumorales qui perdent leur sensibilité à TRAIL. Dans ce cas, les cellules tumorales surexpriment fréquemment des molécules anti-apoptotiques et l'inhibition d'une seule molécule est suffisante pour restaurer la sensibilité à TRAIL. Ces observations sont rassurantes car ils suggèrent que l'utilisation d'inhibiteurs de molécule anti-apoptotique dans le cadre d'une thérapie anti cancéreuse sera peut être suffisante pour restaurer la sensibilité des cellules cancéreuses à TRAIL et surtout n'affectera pas celle des cellules saines qui seront toujours insensibles.

Par ailleurs quelques études suggèrent que l'activation de protéines oncogènes comme c-Myc (Ricci et al., 2004) ou Ras (Nesterov et al., 2004) dans les cellules lors de leur transformation cancéreuses participerait à l'acquisition de la sensibilité à l'apoptose induite par TRAIL. En effet, ces protéines sont des éléments régulateurs aussi bien de la prolifération cellulaire que de l'apoptose des cellules. Lors de la transformation cancéreuse ces oncogènes sont surexprimés et favorisent l'apoptose induite par TRAIL en permettant l'expression de TRAIL-R2, le recrutement de la caspase 8 ainsi que l'expression de molécules pro-apoptotiques de la voie intrinsèque de l'apoptose (Hoffman and Liebermann, 2008; Nesterov et al., 2004; Wang et al., 2005). Néanmoins comme ces oncogènes régulent également les voies de prolifération cellulaire, leur rôle exact dans la sélectivité des cellules cancéreuses à l'apoptose induite par TRAIL doit encore être étudié (Oikonomou and Pintzas, 2013).

2.3. Voies de signalisation induites par TRAIL

2.3.1. Les voies pro-apoptotiques

a) La voie principale de l'apoptose induite par TRAIL : la voie extrinsèque

La voie extrinsèque est enclenchée lorsque le ligand TRAIL se lie à un de ses récepteurs agonistes TRAIL-R1 ou TRAIL-R2. Cette étape d'interaction entre le ligand et le récepteur est déterminante pour l'induction de la signalisation intracellulaire. De manière générale, les ligands de la famille du TNF ont une structure homotrimérique qui oligomérise les récepteurs à la surface de la cellule. Cette oligomérisation est nécessaire à l'induction de la signalisation intracellulaire (Bodmer et al., 2002).

Importance de l'oligomérisation dans la signalisation

En 1999, Hymowitz et ses collaborateurs proposent pour la première fois la structure cristallographique de TRAIL interagissant avec son récepteur TRAIL-R2 (Hymowitz et al., 1999) (**Figure 10**). Cette structure indique que le ligand trimérique TRAIL se lie à 3 récepteurs TRAIL-R2 au niveau des CRD2 et CRD3.

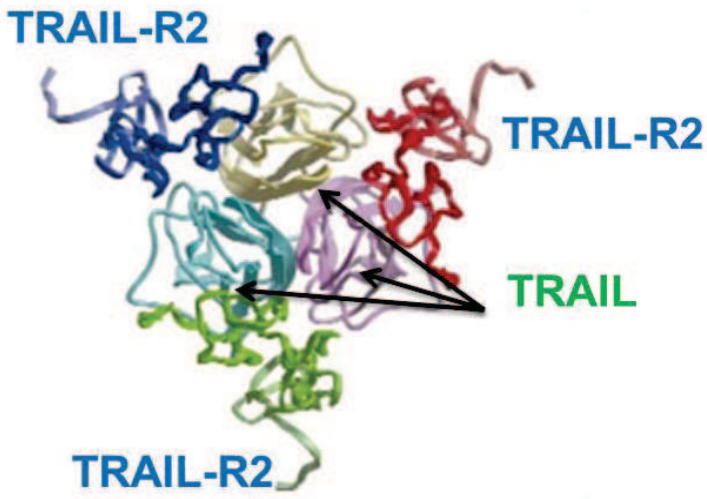


Figure 10: Structure cristallographique de TRAIL et TRAIL-R2.
La structure cristallographie indique que le ligand trimérique TRAIL se lie à 3 récepteurs TRAIL-R2 (Hymowitz et al., 1999)

Suite à cette observation, il a d'abord été proposé que les récepteurs de la famille du TNF-R étaient présents sous forme de monomère à la surface de la cellule et que le ligand trimérique recrutait et oligomérisait 3 récepteurs. Cependant, par la suite, des études ont montré que les récepteurs étaient en fait, pré-oligomérisés à la membrane en l'absence du ligand (Chan, 2007a). Cette pré-oligomérisation se fait au niveau du CRD1 des récepteurs aussi appelé domaine **PLAD** (Pre-Ligand Assembly Domain). Le ligand viendrait recruter les récepteurs pré-oligomérisés ce qui permettrait la formation d'un complexe macromoléculaire entre les ligands et les récepteurs.

Les données cristallographiques suggèrent que le ligand TRAIL trimérique lierait 1 trimère de récepteurs TRAIL-R2 pré-oligomérisés. Cependant, certaines études citées ci-dessous laissent envisager que TRAIL-R2 en l'absence de TRAIL se pré-oligomériserait en dimère et non en trimère. En effet, l'étude de la stœchiométrie d'interaction entre des éléments du DISC (FADD, et la caspase 8) suggère que l'apoptose serait initiée par des interactions dimériques ou tétramériques plutôt que trimériques (Yan et al., 2013). De plus, il a été montré que certains récepteurs de la famille du TNF-R comme le TNF-R1, Fas ou CD40 (Buneker et al., 2009; Sanlioglu et al., 2005) forment des homodimères en absence de leurs ligands et non des trimères comme proposé. L'existence d'une forme pré-oligomérisée des récepteurs de TRAIL en l'absence de TRAIL doit être encore vérifiée (**Figure 11**). La pré-dimérisation ou pré-trimérisation des récepteurs ne conduirait pas à la même organisation des récepteurs en présence du ligand. Il s'emblerait que la pré-dimérisation permette de former des réseaux de récepteurs plus grands que si les récepteurs sont pré-trimérisés.

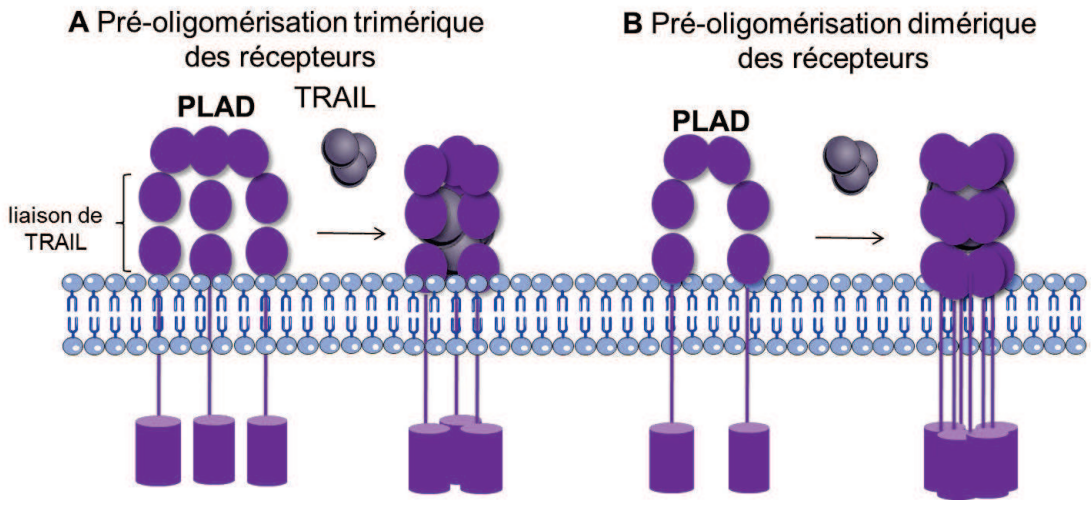


Figure 11 : Modèle de pré-oligomérisation du récepteur TRAIL-R2 à la surface de la cellule en l'absence de TRAIL. (A) les récepteurs sont pré-trimérisés au niveau de leur domaine PLAD, en l'absence de TRAIL. Lorsque TRAIL se lie au niveau des CRD2/3 des récepteurs pré-trimérisés, se forme un complexe trimérique stable. (B) la liaison de TRAIL à des récepteurs pré-dimérisés entraine la formation d'un complexe de récepteurs macromoléculaire stable. D'après (Kimberley and Screaton, 2004).

La difficulté d'analyser ses réseaux de récepteurs dans les conditions natives et le manque d'informations ne nous permet pas de proposer un modèle unique d'interaction. Il semblerait que ces 2 modèles de pré-oligomérisation des récepteurs (pré-trimère *vs* pré-dimère) soient possibles et que les récepteurs TRAIL-R2 peuvent être trimériques ou dimériques en l'absence de leur ligand.

Récemment, l'étude de Valley et ses collaborateurs (Valley et al., 2012) montrent que la liaison de TRAIL à TRAIL-R2 induit une réorganisation des récepteurs pour former un réseau macromoléculaire hautement structuré de récepteurs. Selon leur modèle, TRAIL induirait la dimérisation des récepteurs pré-oligomérisés via leur domaine transmembranaire (TM) (Valley et al., 2012). Ce système permettrait ainsi de concentrer les récepteurs et d'induire efficacement la signalisation intracellulaire.

Par ailleurs, il n'y a pas d'informations concernant l'état d'oligomérisation du récepteur TRAIL-R1.

En conclusion, il est probable que la nature du ligand (divalent, trivalent, hexavalent…) impact sur l'oligomérisation des récepteurs et crée ainsi des réseaux de récepteurs différents. Ces paramètres peuvent être importants et doivent être pris en compte lors de l'ingénierie de nouveaux ligands synthétiques des TRAIL-R. Ils seront rediscutés dans la suite du manuscrit (chapitres 1 et 2).

Signalisation intracellulaire

Une fois engagé par TRAIL, les récepteurs oligomérisés adoptent donc une conformation qui permet le recrutement puis la liaison des molécules de transduction de l'apoptose. Les DD des récepteurs recrutent la molécule FADD (Fas-Associated protein with Death Domain) et la pro-caspase 8/10 (**Figure 12**). En résulte la formation d'un complexe macromoléculaire appelé DISC (Death Inducing Signaling Complex). Dans le DISC, la molécule FADD et les pro-caspases sont également présentes sous forme de dimères ou de trimères (Kuwana et al., 1998; Muzio et al., 1998a; Muzio et al., 1998b). Au sein de ce complexe, les pro-caspases 8 ou 10 sont clivées en caspases initiatrices fonctionnelles et vont enclencher la cascade de signalisation apoptotique (*cf* Partie A de l'introduction, paragraphe 2.3). Ces étapes de la signalisation sont soumises à des mécanismes de régulation qui vont moduler le signal apoptotique.

b) La voie d'amplification de l'apoptose : la voie intrinsèque

La signalisation apoptotique induite par TRAIL peut prendre 2 orientations possibles après l'activation du DISC. Dans les cellules de type I, le DISC est assez stable pour activer la caspase 8 ou 10 et induire l'apoptose par la voie extrinsèque. En revanche dans les cellules de type II, le DISC n'est pas suffisant pour induire directement l'apoptose et nécessite une boucle d'amplification du signal, *via* la mitochondrie, pour induire l'apoptose (Scaffidi et al., 1998). Dans ce cas, la caspase 8 activée au niveau du DISC va cliver la protéine Bid en une forme tronquée active. Bidt déclenche ensuite la voie intrinsèque de l'apoptose détaillée dans le préambule.

Chez la souris, les voies de signalisations empruntées sont les mêmes que chez l'homme à l'exception de la caspase 10 absente chez la souris (Wu et al., 1999).

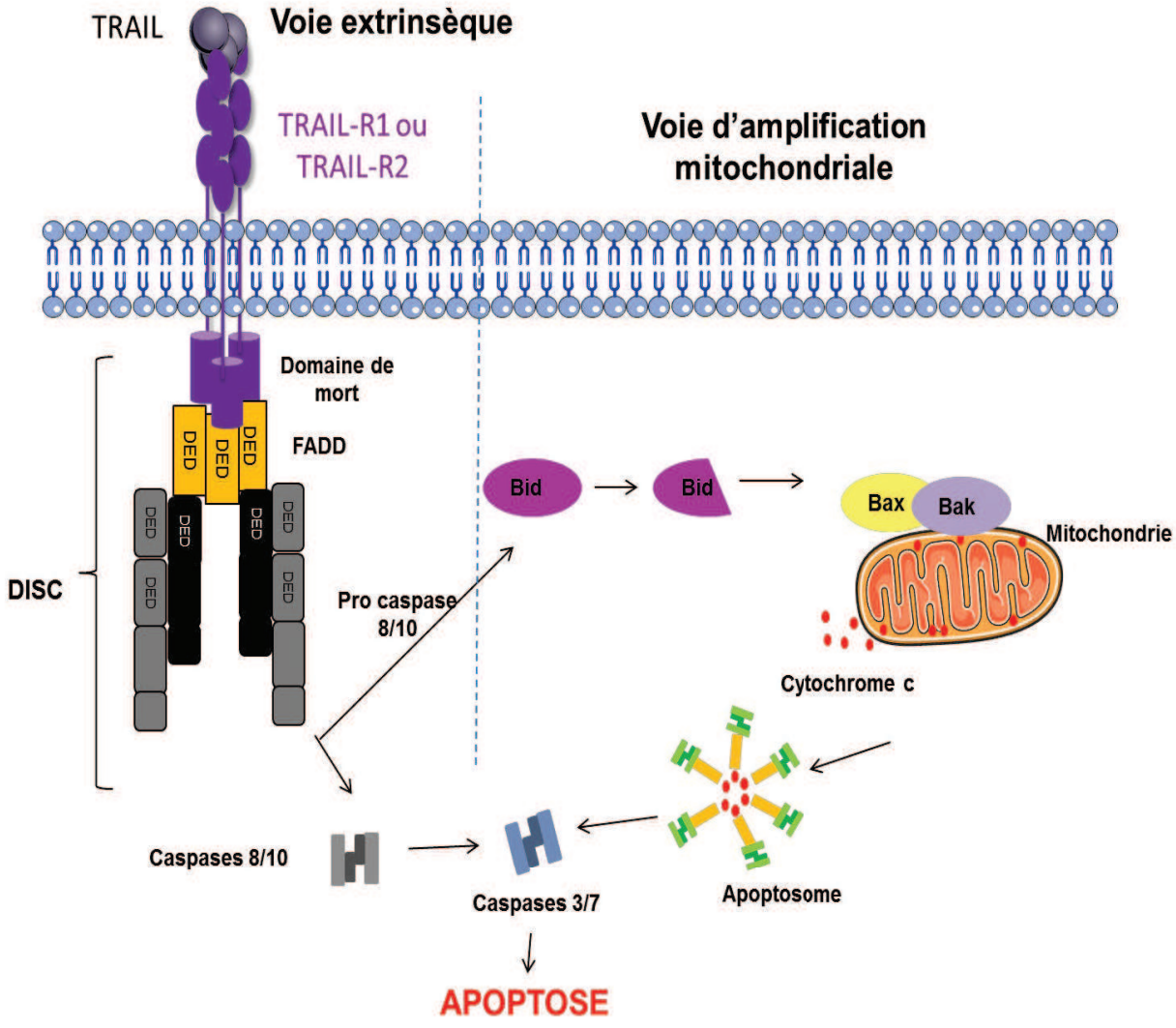


Figure 12 Les voies apoptotiques induites par TRAIL. La signalisation apoptotique induite par TRAIL peut prendre 2 orientations possibles après l'activation du DISC. Dans les cellules de type I, le DISC est assez stable pour activer la caspase 8 ou 10 et induire l'apoptose par la voie extrinsèque. En revanche dans les cellules de type II, le DISC n'est pas suffisant pour induire directement l'apoptose et nécessite une boucle d'amplification du signal, *via* la mitochondrie, pour induire l'apoptose.

c) La nécroptose

Dans certains cas, TRAIL peut induire la mort des cellules tumorales par un autre mécanisme de mort cellulaire, et cela indépendamment des caspases. Il s'agit de la mort par nécroptose ou encore appelée nécrose programmée (Jouan-Lanhouet et al., 2012). La nécroptose se caractérise au niveau morphologique par le gonflement de la cellule puis à l'éclatement de la membrane conduisant à une inflammation.

L'orientation de la signalisation de mort cellulaire vers la voie apoptotique ou vers la nécrose programmée dépend de l'environnement intracellulaire et est très dynamique. La nécrose programmée est fréquemment engagée lorsque la voie de l'apoptose est bloquée notamment en l'absence de la caspase 8, de faible quantité d'ATP (Adénosine Triphosphate) ou encore lors de résistances induites par la protéine c-FLIP et ses isoformes ou les IAPs au niveau du DISC. Une étude récente montre même que des cellules cancéreuses du foie cultivées *in vitro* dans un environnement ayant un pH acide meurent par nécrose programmée plutôt que par apoptose, après activation des TRAIL-Rs (Jouan-Lanhouet et al., 2012).

La signalisation de la nécrose programmée est initiée suite à l'oligomérisaton des TRAIL-Rs par leur ligand, qui recrutent au niveau de leur DD, une série de protéines dont TRADD (TNF-R Associated Death Domain) et FADD, les kinases sérine thréonine RIP1 et RIP3, et la protéine adaptatrice TRAF 2 pour former un complexe appelé nécrosome ou complexe I. Les kinases RIP1 et RIP3 sont déterminantes dans l'activation de la nécrose programmée. Lorsque la caspase 8 est recrutée au niveau du DD des récepteurs de TRAIL, elle va cliver les kinases RIP1 et RIP3 et ainsi les empêcher l'induction de la nécroptose. A l'opposé lorsque la caspace 8 n'est pas présente ou est inhibée au niveau du DISC, les kinases RIP1 et RIP3 peuvent initier la nécroptose selon 2 mécanismes. RIP1 au sein du nécrosome *i)* peut activer la voie Akt qui active la voie JNK, conduisant à la nécroptose ou/et *ii)* induire un dysfonctionnement de la mitochondrie (Nikoletopoulou et al., 2013).

En effet, il a été proposé que ce dysfonctionnement ne soit pas systématique dans toutes les cellules et peut être due à l'activation directe de la PARP1 par RIP1, qui va diminuer la concentration cellulaire en ATP conduisant à la mort de la cellule par nécrose programmée. Dans d'autres cas RIP3, peut recruter puis phosphoryler les pseudokinases MLKL (Mixed Lineage Kinase domain-Like). Le rôle de cette pseudokinase n'est pas encore bien défini mais il semblerait qu'elle soit recrutée au niveau de la membrane mitochondriale qu'elle perfore induisant ainsi la perméabilisation de la mitochondrie et la libération de ROS (Espèces Réactives à l'Oxygène). Dans ce cas, les ROS activeraient la PARP1 conduisant ensuite à la nécroptose.

Par ailleurs, RIP3 peut être utilisé comme marqueur de sensibilité des cellules cancéreuses à la nécrose programmée. Les récepteurs de mort TNF-R1 et Fas sont également capables d'induire la nécroptose (Holler et al., 2000; Cai et al., 2014).

d) Les voies de prolifération

De manière paradoxale, TRAIL peut également activer des voies de signalisation de survie et de prolifération cellulaire médiées par NFKB, PI3K/Akt et les MAP kinases JNK, P38 et Erk1/2 (revue dans (Ashkenazi et al., 2008)).L'activation de ces voies est observée dans les cellules tumorales résistantes à TRAIL. Ces signalisations sont initiées au niveau du DISC classique (complexe I) auquel s'associent les molécules RIP1, TRAF2, TRADD, NEMO pour former le complexe II. Le rôle de ces voies alternatives n'est pas clairement défini. Elles sembleraient intervenir dans un mécanisme de régulation de l'apoptose induite par TRAIL au même titre que le récepteur TRAIL-R4 dont le domaine intracellulaire tronqué peut initier la voie de signalisation de la prolifération. D'autres études suggèrent au contraire que l'activation des voies de prolifération permettrait de sensibiliser les cellules à l'apoptose induite par TRAIL (Falschlehner et al., 2007) (**Figure 13**).

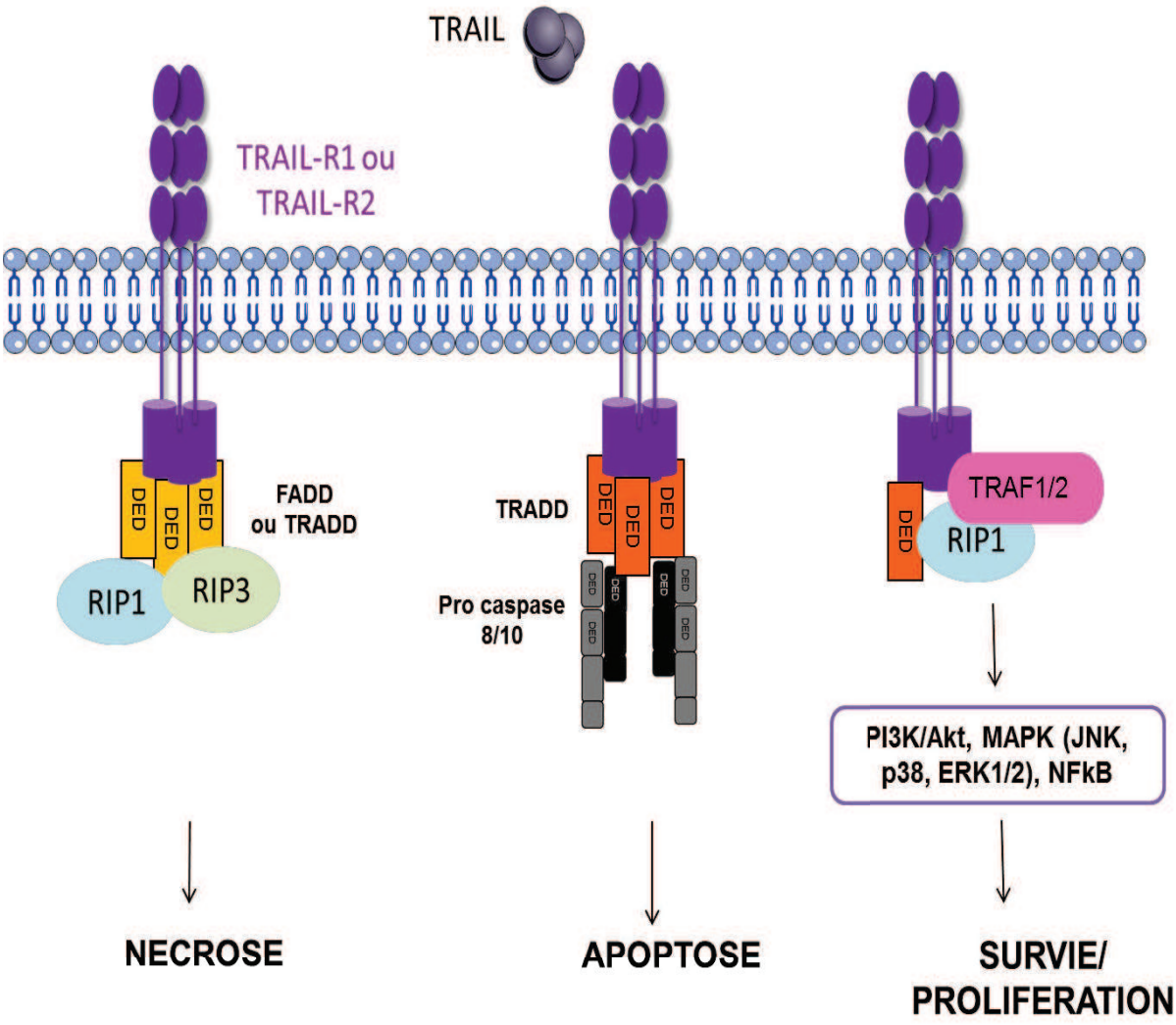


Figure 13 : Les différentes voies de signalisations induites par TRAIL. TRAIL peut initier l'apoptose ou la nécrose programmée. Dans certains cas TRAIL peut également activer des voies de prolifération.

2.4. Mécanismes de régulation de la signalisation apoptotique induite par TRAIL

La signalisation apoptotique induite par TRAIL est soumise à divers mécanismes de régulation. Une modification de ces éléments de régulation peut générer des résistances à l'apoptose induite par TRAIL et même dans certains cas induire un signal de survie des cellules tumorales. Ces mécanismes de régulation peuvent être classés en 3 catégories : régulation au niveau membranaire, régulation au niveau du DISC et régulation au niveau intracellulaire.

2.4.1. Régulation de l'apoptose induite par TRAIL au niveau membranaire

a) Rôle des récepteurs antagonistes

Les récepteurs membranaires inhibiteurs de TRAIL, TRAIL-R3 et TRAIL-R4, sont les premiers éléments de régulation de TRAIL. Les premières études suggéraient que les récepteurs inhibiteurs avaient une meilleure affinité pour TRAIL que les récepteurs agonistes mais ce n'est pas le cas (Truneh et al., 2000). Les études plus récentes suggèrent que les 2 récepteurs antagonistes se comportent de manière différente pour inhiber TRAIL. TRAIL-R3 qui possède une ancre GPI à la place de son DD agit en compétiteur des récepteurs TRAIL-R1 et TRAIL-R2 pour la liaison à TRAIL. Quant à TRAIL-R4, il va séquestrer les récepteurs agonistes et ainsi limiter la liaison de TRAIL à ces récepteurs. En effet, des études montrent que la molécule TRAIL recombinante (rTRAIL), peut recruter des hétéromères composés de TRAIL-R4 et du récepteur pro-apoptotique TRAIL-R2 (Merino et al., 2006). Comme TRAIL-R4 a un domaine de mort tronqué, les hétéromères vont former un DISC non fonctionnel qui ne permet pas d'initier la cascade de signalisation apoptotique. Il a été proposé que le DISC ainsi formé ne puisse pas cliver la pro-caspase 8. De plus, la liaison de TRAIL sur TRAIL-R4 peut activer des voies de signalisation anti apoptotiques telles que NFkB ou Akt (Lalaoui et al., 2011) et ainsi réguler dès le niveau membranaire l'apoptose. De la même manière, une étude récente montre que TRAIL-R4 peut réguler TRAIL-R1 en formant des hétéromères en l'absence de TRAIL (Neumann et al., 2014). Nous rediscuterons ces points dans la partie « résultats » (chapitre 2).

Il a été proposé que la sensibilité à TRAIL, puisse s'expliquer par la balance d'expression entre les récepteurs agonistes et les récepteurs antagonistes. La résistance à l'apoptose serait dans cas due à une surexpression des récepteurs inhibiteurs (Buneker et al., 2009; Sanlioglu et al., 2005). Alors que plusieurs études confirment cette hypothèse, d'autres soulignent un manque de corrélation entre l'expression des récepteurs antagonistes et la sensibilité à TRAIL (Kim et al., 2000; Lincz et al., 2001). Il est, en effet, difficile en fonction du type de cellule tumorale de corréler l'expression des récepteurs à la sensibilité car la localisation et l'expression des récepteurs varie en fonction de l'exposition à TRAIL.

b) Variation du niveau d'expression des récepteurs

L'expression membranaire des récepteurs agonistes et antagonistes de TRAIL peut être modulée. En effet, plusieurs mutations au niveau des gènes codant les TRAIL-R ont été identifiées, qui vont soit conduire à la surexpression des récepteurs régulateurs de TRAIL soit conduire à la sous expression des récepteurs apoptotiques. Il est fréquent de retrouver une hyper méthylation des promoteurs des gènes codant pour TRAIL-R1 et TRAIL-R2 qui inhibe leur transcription (Horak et al., 2005). La transcription des gènes codant pour les

TRAIL-R peut être également inhibée par certains facteurs de transcription qui favorisent la prolifération cellulaire tels que p53 ou NFkB (Sheikh et al., 1998).

c) Modifications post-traductionnelles des récepteurs

Diverses modifications post traductionnelles peuvent affecter l'activité des TRAIL-R. Récemment des études ont montré que la sensibilité à l'apoptose induite par TRAIL dépend de la glycosylation des récepteurs TRAIL-R1 et TRAIL-2 (Wagner et al., 2007). En effet, des altérations des profils de glycosylation sont souvent identifiées chez les patients atteints d'un cancer et dont les cellules tumorales sont résistantes à l'apoptose induite par des ligands des TRAIL-R.

Les travaux de Wagner et ses collaborateurs (Wagner et al., 2007) ont mis en évidence une corrélation entre la sensibilité à TRAIL et une forte expression d'enzymes intervenant dans la O-glycosylation (ajout d'un sucre au niveau des résidus thréonine ou sérine) telles que GALNT14 et GALNT3 (Mazurek et al., 2012).La sous expression de ces enzymes est associée à une résistance à TRAIL alors que la surexpression de celles-ci peut restaurer la sensibilité à TRAIL. Les O-glycosylations ont lieu au niveau du domaine extracellulaire des TRAIL-R et favorisent l'oligomérisation des récepteurs pour former un DISC efficace. La O-glycosylation n'est pas observée sur Fas ou TNF-R1 et semble spécifique des récepteurs à TRAIL.

Des N-glycosylations (liaisons de sucre sur un résidu asparagine) sont décrites sur le récepteur TRAIL-R1 mais pas sur TRAIL-R2 qui ne possède pas de site de N-glycosylations (Yoshida et al., 2007). En revanche ces mêmes modifications ont été observées sur le récepteur Fas.

Parmi les modifications post traductionnelles, on retrouve également la palmitoylation qui consiste en l'ajout d'acide palmitique sur les cystéines de la région intracellulaire des récepteurs. Cette palmitoylation est présente uniquement sur TRAIL-R1 (TRAIL-R2 ne possédant pas le triplé de cystéines qui permet cette modification). Cette modification favoriserait la localisation du récepteur dans les radeaux lipidiques et ainsi l'oligomérisation de ce dernier (Rossin et al., 2009).

d) Internalisation des récepteurs

On sait aujourd'hui que l'internalisation du récepteur TNF-R1 est importante pour l'activation de la signalisation apoptotique (Kohlhaas et al., 2007). En revanche, cette évidence est beaucoup moins claire pour TRAIL et ses récepteurs. Il existe plusieurs études qui démontrent l'importance de l'internalisation dans la signalisation (Zhang et al., 2009) et d'autres qui, au contraire, affirment que ce mécanisme n'est pas nécessaire (Kohlhaas et

al., 2007). Il est désormais démontré que le récepteur est internalisé mais il semblerait que l'importance de cette internalisation pour son activité dépende du type de cellules. Dans les cellules de type I, la liaison de TRAIL sur ses récepteurs induit, en même temps, l'internalisation de TRAIL-R1 et TRAIL-R2 (*via* un mécanisme clathrine dépendant) et la formation du DISC. Néanmoins, le blocage de cette internalisation n'inhibe pas l'induction de l'apoptose mais bien au contraire l'amplifie. A l'opposé, dans les cellules de type II, où le DISC n'est pas suffisant pour induire l'apoptose, la liaison de TRAIL sur les récepteurs induit l'internalisation des récepteurs agonistes qui se retrouvent endocytés dans des lysosomes. Dans ce cas, le blocage de l'internalisation inhibe l'apoptose (Austin et al., 2006).

e) Rôle des radeaux lipidiques

Certains récepteurs comme Fas (Gajate and Mollinedo, 2011) sont localisés au niveau de régions membranaires appelées radeaux lipidiques (RL), enrichies en cholestérol et sphingolipides. Ces micro-domaines très fluides, interviennent dans la signalisation cellulaire en permettant la concentration des récepteurs. Cependant, l'importance de la concentration des récepteurs au niveau de ces RL dans la signalisation induite par TRAIL est controversée. La majorité des études suggèrent que le regroupement des TRAIL-R dans les RL est important pour l'induction de l'apoptose. Une étude montre, par exemple, que la présence de TRAIL-R2 dans les RL contribue à la sensibilité des cellules Jurkat à l'apoptose induite par TRAIL (Min et al., 2009). Dans cette étude, les auteurs montrent que lorsque les récepteurs TRAIL-R2 ne sont pas regroupés dans les RL, les cellules Jurkat sont moins sensibles à TRAIL. Une autre étude plus récente suggère que l'absence de regroupement des TRAIL-R dans les RL contribue à la résistance acquise des cellules tumorales à l'apoptose induite par TRAIL (Ouyang et al., 2013). De plus, plusieurs études s'accordent à dire que le traitement de chimiothérapie permet de restaurer la sensibilité à l'apoptose à TRAIL en permettant la redistribution des récepteurs TRAIL-R1 et TRAIL-R2 au sein de ces RL (Xu et al., 2011; Xu et al., 2009). Les TRAIL-R à l'exception de TRAIL-R3 ne seraient pas présents de manière constitutive dans les RL, et c'est le ligand (et les drogues de chimiothérapie) qui permettrait de relocaliser les récepteurs.

Cependant, d'autres auteurs affirment que le regroupement des récepteurs des TRAIL-Rs au niveau de ces RL existent mais n'est pas toujours déterminant pour la formation du DISC (Song et al., 2007).

2.4.2. Régulation de l'apoptose induite par TRAIL au niveau du DISC

L'interaction entre TRAIL et ses récepteurs agonistes conduit à la formation du DISC un complexe macromoléculaire au niveau intracellulaire, déterminant dans l'induction de la signalisation apoptotique (revue dans (Safa, 2012)) (*cf* paragraphe 2.3.1 et Figure 12). La protéine anti-apoptotique c-FLIP peut réguler négativement l'apoptose en empêchant la formation du DISC. C-FLIP est très certainement la protéine anti apoptotique la plus souvent surexprimée dans les cellules tumorales résistantes à l'apoptose induite par les récepteurs de mort. Elle possède un domaine DED similaire aux caspases initiatrices qui lui permet de se lier à FADD et ainsi d'entrer en compétition avec la caspase 8/10. Il existe 3 isoformes de c-FLIP plus ou moins exprimées en fonction du type cellulaire: deux courtes (c-$FLIP_S$ et c-$FLIP_R$) qui n'ont pas de domaine caspase-like et une isoforme plus longue (c-$FLIP_L$) qui possède un domaine caspase like. L'isoforme c-$FLIP_L$ agit différemment de c-FLIP et de ses 2 isoformes courts, en formant des hétéromères avec la pro-caspase 8 au niveau du DISC qui conduisent au clivage de celle-ci. Cependant, ce clivage n'est que partiel et la caspase 8 reste séquestrée au niveau du DISC. Il existe d'autres molécules qui peuvent réguler l'apoptose au niveau du DISC référencer dans la revue (Shirley et al., 2011). De manière générale, ces molécules anti-apoptotiques vont bloquer la caspase 8 ou la molécule FADD.

Par ailleurs, de récentes études soulignent l'importance de l'ubiquitination, une modification post traductionnelle, dans la régulation de l'activité du DISC. La ligase E3 Cullin3 est recrutée au niveau du DISC où elle poly-ubiquitine la caspase 8. Ceci conduit au recrutement de la protéine p62 qui va à son tour stabiliser la caspase 8 activée et ainsi favoriser l'activation du DISC (Jin et al., 2009). Le DISC peut également être régulé négativement pas l'ubiquitination. Dans ce cas la protéine TRAF2 est recrutée sur le DISC où elle va permettre l'attachement d'une chaîne ubiquitine à la caspase 8, conduisant celle-ci à la dégradation par le protéasome.

2.4.3. Régulation de l'apoptose induite par TRAIL au niveau cellulaire

Cette régulation est la plus détaillée dans la littérature et reste souvent la première explication proposée pour expliquer la résistance des cellules tumorales à TRAIL (revue dans (Indran et al., 2011). Elle concerne la voie d'amplification mitochondriale et met en jeu deux familles de protéines : les protéines de la famille Bcl-2 et les protéines IAPs (*cf* partie A du préambule).

a) Les protéines de la famille Bcl2

Les molécules Bak et Bax (protéines pro-apoptotiques permettant la libération du cytochrome c) peuvent être inhibées par les protéines anti-apoptotiques membres de la famille Bcl-2 (Bcl-2, Bcl-XL, Mcl-1, Bcl-w, Bcl-B et A1). Ces protéines anti-apoptotiques sont soit localisées dans le cytoplasme soit ancrées sur la membrane mitochondriale. Elles ont une forte affinité pour Bax et Bak auxquelles elles se lient pour les séquestrer, empêchant ainsi l'activation de la voie mitochondriale. A noter que les drogues de chimiothérapie induisent l'apoptose par la voie intrinsèque et que l'inactivation de Bcl-2 ou Bcl-XL pourrait restaurer la sensibilité de certaines cellules tumorales à l'apoptose induite par la chimiothérapie mais aussi par TRAIL.

b) Les IAPs

Les IAPs sont surexprimées dans de nombreux cancers et sont à l'origine de résistance à l'apoptose (revue dans (Hassan et al., 2014)). Elles contrôlent, à la fois, la voie extrinsèque et la voie intrinsèque. Le mécanisme proposé des IAPs, dont XIAP, cIAP1, cIAP2 et la survivine est qu'elles inhiberaient l'activation des caspases initiatrices et effectrices en se liant à elles *via* leur domaine BIR. Les IAPs 1 et 2 inactivent les caspases indirectement en leur ajoutant une chaîne ubiquitine grâce à leur activité de polyubiquitination (Vaux and Silke, 2005).

L'activité des IAPs peut être bloquée par les protéines pro-apoptotiques, Smac/Diablo qui sont relarguées de la mitochondrie. Ces deux protéines peuvent se lier aux domaines BIR des IAPs, ce qui entraîne la libération des caspases séquestrées. Cependant, la protéine Smac/DIABLO peut être à son tour inhibée par les protéines Bcl-2 anti-apoptotiques (**Figure 14**).

2.5. TRAIL en thérapie des cancers

Sa sélectivité envers les cellules tumorales a fait de TRAIL et de ses récepteurs une cible très prometteuse pour la thérapie des cancers. Aujourd'hui des molécules humaines TRAIL recombinantes (rTRAIL) et des anticorps monoclonaux (Acm) ciblant soit le récepteur TRAIL-R1 soit le récepteur TRAIL-R2 sont évalués en essais cliniques (revue dans (Micheau et al., 2013), **Tableau 2**).

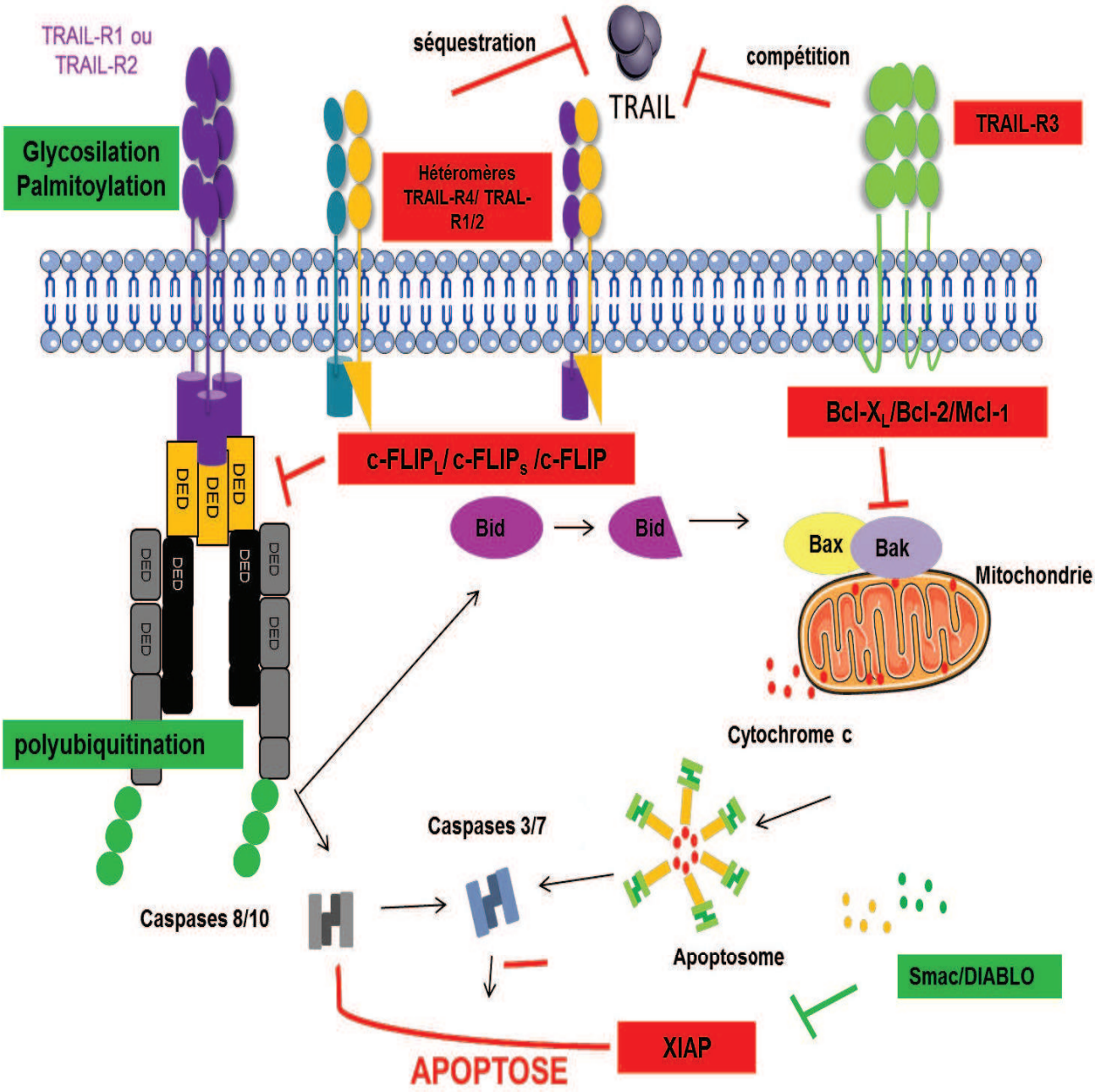


Figure 14 : Les éléments de régulations de la signalisation induite par TRAIL

Les éléments qui favorisent la signalisation induite par TRAIL sont en vert. A l'opposé, les éléments qui inhibent la signalisation induite par TRAIL apparaissent en rouge.

2.5.1. TRAIL recombinant

La première molécule TRAIL recombinante évaluée en essais cliniques a été produite par la société Genentech. Cette molécule appelée Dulanermin® (ou APO2L/TRAIL.0) correspond à la séquence humaine de TRAIL (114-281 acides aminés) et est produite en système procaryote. Comme le ligand naturel TRAIL est un trimère, le Dulanermin® contient un atome de zinc central qui permet de stabiliser la protéine trimérique et d'augmenter son efficacité biologique. De plus, le Dulanermin® ne présente aucune toxicité envers les cellules non tumorales. Cependant, cette molécule relativement petite est rapidement éliminée de l'organisme par les reins (demi-vie de l'ordre d'une trentaine de minutes) et nécessite des injections répétées pour obtenir un effet thérapeutique (Herbst et al., 2010). Malheureusement, les résultats des premiers essais cliniques indiquent que le Dulanermin® seul ou en association avec d'autres molécules anticancéreuses ne permet pas d'induire efficacement l'apoptose dans plusieurs types de cancers (Pan et al., 2011).

Plus récemment, une nouvelle forme recombinante de TRAIL appelée « Circularly Permuted TRAIL (CPT) » est évaluée en essais cliniques. Cette forme correspond à la fusion des acides aminés (aa) 135 à 280 aux aa 122 à 135 de la séquence de TRAIL. Cette fusion change l'ordre des aa dans la séquence peptidique de TRAIL mais ne modifie pas sa conformation. Le CPT est notamment évalué en phase II dans le traitement de myélomes multiples réfractaires en association avec le Thalidomide®. Le bilan de ces résultats est encourageant car cette association n'induit pas de toxicité sur les cellules saines et permet d'augmenter les propriétés anti tumorale du CPT (Geng et al., 2014).

Une des limitations du développement des molécules rTRAIL est qu'elles peuvent à la fois se lier aux récepteurs agonistes et aux récepteurs antagonistes ce qui va diminuer leur efficacité thérapeutique. Pour éviter ce phénomène, plusieurs groupes ont développé des anticorps monoclonaux ciblant les récepteurs agonistes de TRAIL.

2.5.2. Anticorps monoclonaux agonistes de TRAIL-R1 ou de TRAIL-R2

Il n'existe qu'un anticorps agoniste de TRAIL-R1, le Mapatumuab (TRM1, HGS-ETR1) qui est évalué en phase I pour le traitement les tumeurs solides et des cancers avancés et en phase II pour le traitement des lymphomes non hodgkiniens et du cancer colorectal. Le Mapatumuab est bien toléré et ne présente pas de toxicité chez les patients. Il a une demi-vie plus longue que les rTRAIL (une vingtaine de jours).

En revanche, il existe sur le marché, 5 Acm agonistes de TRAIL-R2 (Drozitumumab, Conatumumab, Lexatumumab, Tigatuzumumab et LBY-135) dont l'efficacité thérapeutique

est évaluée en phase I et II. A l'exception du Drozitumumab à l'origine de toxicité hépatique, tous ces Acm sont bien tolérés par les patients.

Le Mapatumumab, le Lexatumumab, le Conatumumab et le Drozitumab Tigatuzumab sont des anticorps monoclonaux humanisés et le LBY135 est un anticorps IgG1 chimérique (humain/murin). Les IgG1 peuvent, en plus de leur effet pro-apoptotique, stimuler la reconnaissance et l'élimination des cellules tumorales par le système immunitaire par le mécanisme de cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps (ADCC). Cependant, ces anticorps ne peuvent pas passer la barrière hémato-encéphalique et ne peuvent donc pas être prescrits dans le traitement de cancer cérébral (revue dans (Micheau et al., 2013)).

2.5.3. Bilan des essais cliniques

Malgré tous les espoirs placés dans le développement de molécules agonistes de TRAIL-R, les premiers résultats des essais cliniques sont quelques peu décevants. Dans la majorité des cas rTRAIL où les Acm ne sont pas toxiques et ne présentent pas d'effets secondaires hormis quelques vomissements, nausées, et fièvre chez les patients, ce qui est plutôt encourageant. Cependant, ces traitements ne s'avèrent pas efficaces pour éliminer complétement le cancer (Lemke et al., 2014). En effet, l'utilisation de rTRAIL ou des Acm en monothérapie induit fréquemment des résistances à l'apoptose induite par TRAIL. Ces résistances sont dues aux différentes molécules intervenant dans la régulation de la signalisation induite par TRAIL (*cf* paragraphe 2.4) et peuvent être multiples (Prasad et al., 2014).

Une des limitations de l'utilisation de TRAIL en thérapie des cancers serait également due à la nature des ligands synthétiques utilisés. Les Acm ou rTRAIL ne seraient pas des ligands suffisamment puissants pour induire l'apoptose des cellules tumorales. Par exemple, les anticorps ont souvent une activité pro-apoptotique plus faible que les molécules recombinantes. Cela serait dû au fait qu'ils présentent un degré de valence trop faible pour recruter et oligomériser suffisamment de récepteurs pour induire efficacement l'apoptose. Plusieurs études montrent, en effet, que l'utilisation de ligands synthétiques multivalents de TRAIL-R2 augmente significativement la capacité à induire l'apoptose (Berg et al., 2007; Pavet et al., 2010; Reis et al., 2010).

Dans ce cadre, plusieurs groupes tentent de développer de nouvelles formes multivalentes de TRAIL qui peuvent recruter plus de récepteurs et induire un signal apoptotique puissant. Cet axe correspond à une partie de mes travaux de thèse (*cf.* chapitre 1) où nous avons développés des ligands peptidiques multimériques agonistes de TRAIL-R2.

2.6. Vers une optimisation des traitements

2.6.1. Les ligands multivalents

Au sein de la famille du TNF-R, certains récepteurs comme le TNFR-1 et TRAIL-R1 peuvent être fortement activés par leurs ligands sous forme membranaire ou sous forme soluble. En revanche, l'engagement des récepteurs Fas ou TRAIL-R2 par leurs ligands trimériques solubles n'induit qu'une activation partielle. Ces récepteurs doivent être activés par les formes membranaires ou des molécules recombinantes au moins héxamériques (Wajant et al., 2001). Ce phénomène n'est pas encore bien expliqué mais une des hypothèses les plus probables est que ces récepteurs doivent être fortement oligomérisés par leur ligand afin de créer un réseau macromoléculaire stable à la surface de la cellule pour initier la formation du DISC (Valley et al., 2012) (*cf* chapitre 1 et 2).

2.6.2. Sensibilisateurs à la mort induite par TRAIL

Une seconde stratégie très prometteuse est d'associer les traitements de type TRAIL (rTRAIL ou Acm) avec d'autres agents anticancéreux. Cela permet *i)* d'augmenter l'action des agonistes de TRAIL *ii)* de limiter l'apparition de résistance à TRAIL et /ou *iii)* re-sensibiliser les cellules devenues résistantes à l'apoptose induite par TRAIL. Les thérapies combinées agissent de façon synergique et réduisent le nombre de cellules tumorales résistantes (**Tableau 2**).

a) TRAIL et la radiothérapie

La combinaison de la radiothérapie aux anticorps Mapatumumab ou Lexatumumab permet d'augmenter l'efficacité de ces derniers (revue dans (Niemoeller and Belka, 2013)). Des études montrent qu'un prétraitement des cellules tumorales à la radiothérapie peut augmenter l'expression des récepteurs TRAIL-R1 et TRAIL-R2 des cellules tumorales résistantes à l'apoptose induite par TRAIL et ainsi re-sensibiliser les cellules à TRAIL. Une des explications serait que les radiations activent le facteur de transcription p53 qui peut contrôler l'activation des gènes codant pour les récepteurs agonistes de TRAIL. Cependant, ce traitement serait réservé aux patients n'ayant pas de mutation au niveau du gène p53. Les radiations favoriseraient également i) la signalisation apoptotique extrinsèque en renforçant le DISC par un recrutement plus rapide les caspases initiatrices ii) et dans d'autres cas la signalisation intrinsèque en stimulant Bax et Bak (Niemoeller and Belka, 2013).

b) TRAIL et la chimiothérapie

Les agonistes des TRAIL-R ont rapidement été associé à des traitements classiques de chimiothérapie incluant entre autre les dérivés de platine (le Cisplatine, le Carboplatine, et l'Oxaliplatine), des anti-métabolites comme la Gemcitabine ou le 5-FU, ainsi que des anthracyclines comme la Doxorubicine (Tableau 2, pour mode d'action *cf*. partie B de l'introduction).

De manière générale, il a été proposé que les molécules de chimiothérapie agissent de façon synergique avec les agonistes de TRAIL-R (Hellwig and Rehm, 2012). Comme TRAIL induit la voie extrinsèque de l'apoptose indépendamment de la protéine p53, et la (Newsom-Davis et al., 2009; Ravi et al., 2004).

Un des grand succès de l'association de TRAIL à la chimiothérapie est qu'elle permet aussi, dans certains cas de restaurer la sensibilité des cellules tumorales à l'apoptose induite par TRAIL.

Plusieurs mécanismes à différents niveaux de la signalisation apoptotique ont été proposés pour expliquer l'action bénéfique de ces associations. Par exemple une étude récente d'imagerie en temps réel montre que le pré-traitement de glioblastomes résistants à TRAIL avec différentes chimiodrogues induit la surexpression des récepteurs TRAIL-R1 et /ou TRAIL-R2 et restaure ainsi la sensibilité à TRAIL (Bagci-Onder et al., 2013). D'autres auteurs ont montré que la chimiothérapie incluant le cisplatine, la doxorubicine et le 5-FU, permet des restaurer la sensibilité à l'apoptose induite par TRAIL de cellules issues d'un carcinome colorectal, en augmentant la stabilité du DISC et ainsi en favorisant notamment le recrutement de la pro-caspase 8 et de la molécule FADD (Lacour et al., 2003). Les mêmes auteurs précisent par la suite, que la résistance de cellules cancéreuses due à la surexpression du récepteur inhibiteur TRAIL-R4, peut être surmontée par la chimiothérapie qui stabilise le DISC (Morizot et al., 2011).

Outre son effet bénéfique sur la formation du DISC, la chimiothérapie peut également favoriser la diminution de l'expression des protéines anti-apoptotiques telles que c-FLIP, Bcl-2, Mcl-1 ainsi que les IAPs (El Fajoui et al., 2011) et/ou l'augmentation de l'expression des (Haswell et al., 2001) protéines pro-apoptotique telle que Bim (Dimberg et al., 2013). Les molécules de chimiothérapie peuvent, par ailleurs, directement diminuer les voies de signalisation de la prolifération (NFkB, PI3K/Akt, JAK/STAT). Même si le mécanisme mis en jeu dépend de la classe pharmacologique du traitement utilisé, du type cellulaire et de l'environnement tumoral, l'association de la chimiothérapie aux agonistes de TRAIL reste, cependant, très prometteuse.

c) TRAIL et les thérapies ciblées

Les agonistes de TRAIL peuvent être également associés à des molécules de la thérapie ciblée (**Tableau 2**). Par exemple, en essais cliniques dans le traitement des cancers solides et hématologiques, TRAIL a été associé au Bortezomib, un inhibiteur du protéasome qui empêche l'activation de NFkB en limitant la dégradation d'IkB. Les résultats sont encourageants et une étude montre même que l'utilisation d'inhibiteur du protéasome peut restaurer la sensibilité des cellules tumorales à l'apoptose induite par TRAIL (Menke et al., 2011).

TRAIL est aussi combiné avec des Acm spécifiques d'antigènes tumoraux comme le Rituximab. Le Rituximab se lie au marqueur CD20 exprimé sur les lymphomes et est donc utilisé avec TRAIL dans le traitement des lymphomes non Hodgkinien (Daniel et al., 2007).

Les inhibiteurs de kinases comme le Sorafenib vont empêcher la phosphorylation qui inhibe l'activité des molécules proapoptotique telles que Bid (protéine kinase CK2), pro caspase. Ces molécules sont associées à des traitements avec TRAIL avec succès.

2.6.3. Identification de marqueurs de sensibilité à TRAIL

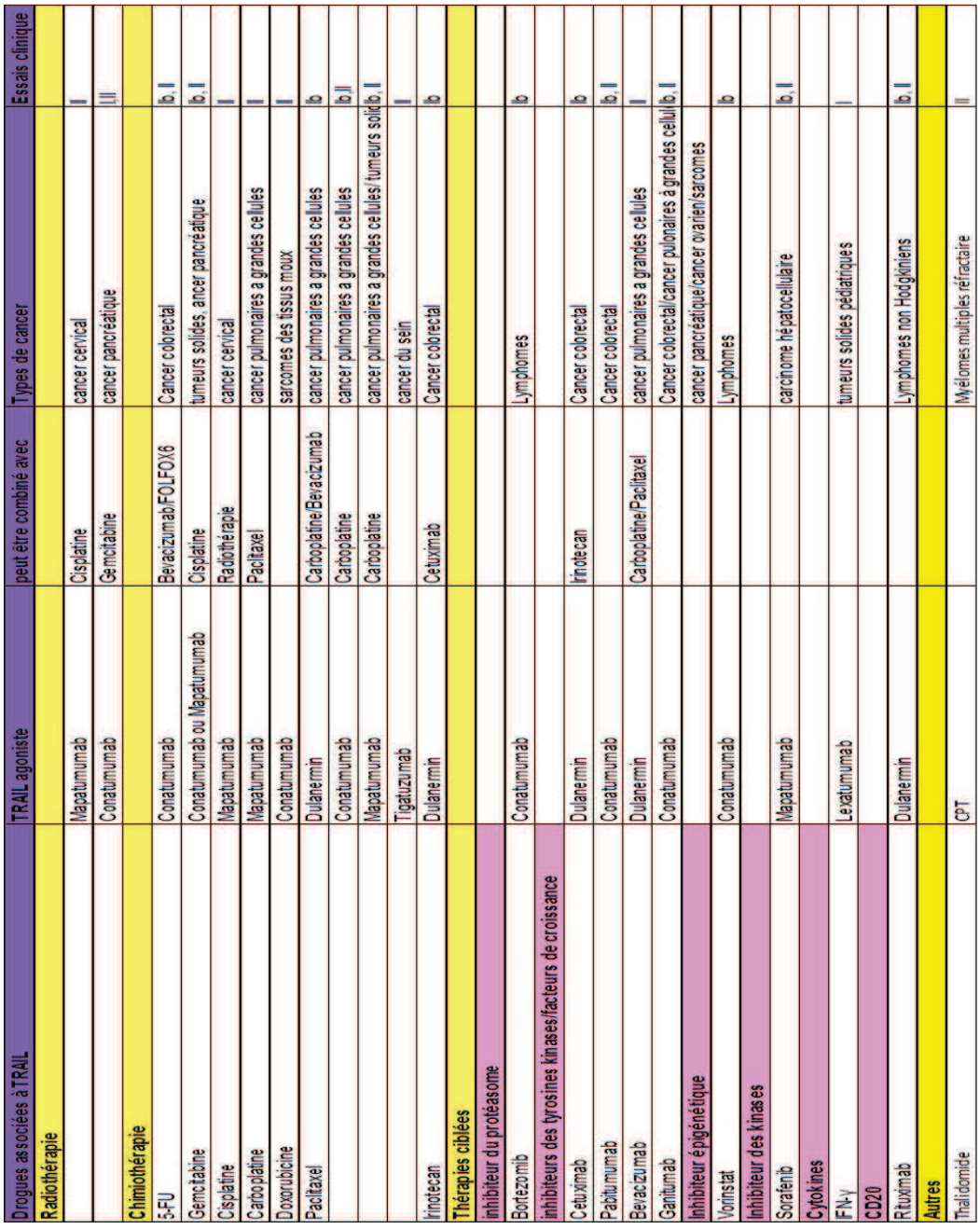
Une autre approche pour améliorer l'efficacité des traitements par TRAIL est d'identifier les marqueurs de sensibilité à l'apoptose induite par TRAIL pour chaque patient. Environ 1/3 des tumeurs répondent de manière modérée aux traitements ciblant les TRAIL-R et 1/3 des tumeurs sont résistantes à l'apoptose induite par TRAIL (Buchsbaum et al., 2006).

Il est tout d'abord possible de vérifier l'expression des TRAIL-Rs lors d'une biopsie de la tumeur suivie par des analyses histochimiques. Cet élément peut être intéressant mais n'indique pas s'il existe des résistances intracellulaires.

Une étude a identifié une expression élevée de l'enzyme GALNT14 intervenant dans l'O-glycosylation des TRAIL-R comme marqueur de sensibilité à TRAIL. La présence de GALNT14 est corrélée à la sensibilité à TRAIL au niveau du cancer des poumons à petites cellules (NSCLC), du cancer pancréatique et mélanomes. De la même manière, la présence des enzymes GALNT3, FUT3 et FUT6 est associée avec une sensibilité à TRAIL au niveau du cancer colorectal (Wagner et al., 2007).

La présence de l'oncogène c-myc est également identifié comme un marqueur potentiel de la sensibilité à l'apoptose induite par TRAIL (Ricci et al., 2004). Certaines cellules tumorales sont plus sensibles à l'apoptose médiée par le récepteur TRAIL-R1 et d'autres par TRAIL-R2. Dans ce cas, il est intéressant de pouvoir prédire cette sensibilité pour choisir le bon agoniste. L'expression des gènes STK17B, SP140L, CASP8, et AIM1

varie significativement dans les cellules sensibles ou résistantes à l'apoptose médiée par TRAIL-R1. La mesure du taux d'expression de ces 4 gènes serait donc un nouveau marqueur de sensibilité à TRAIL (Araki et al., 2010).



Drogues associées à TRAIL	TRAIL agoniste	peut être combiné avec	Types de cancer	Essais clinique
Radiothérapie				
	Mapatumumab	Cisplatine	cancer cervical	I
	Conatumumab	Gemcitabine	cancer pancréatique	I,II
Chimiothérapie				
5-FU	Conatumumab	Bevacizumab/FOLFOX6	Cancer colorectal	Ib, II
Gemcitabine	Conatumumab ou Mapatumumab	Cisplatine	tumeurs solides, ancer pancréatique	Ib, II
Cisplatine	Mapatumumab	Radiothérapie	cancer cervical	I
Carboplatine	Mapatumumab	Paclitaxel	cancer pulmonaires a grandes cellules	I
Doxorubicine	Conatumumab		sarcomes des tissus moux	I
Paclitaxel	Dulanermin	Carboplatine/Bevacizumab	cancer pulmonaires a grandes cellules	Ib
	Conatumumab	Carboplatine	cancer pulmonaires a grandes cellules	Ib,II
	Mapatumumab	Carboplatine	cancer pulmonaires a grandes cellules/ tumeurs solid	Ib, II
	Tigatuzumab		cancer du sein	I
Irinotecan	Dulanermin	Cetuximab	Cancer colorectal	Ib
Thérapies ciblées				
inhibiteur du protéasome				
Bortezomib	Conatumumab		Lymphomes	Ib
inhibiteurs des tyrosines kinases/facteurs de croissance				
Cetuximab	Dulanermin	Irinotecan	Cancer colorectal	Ib
Pâbitumumab	Conatumumab		Cancer colorectal	Ib, II
Bevacizumab	Dulanermin	Carboplatine/Paclitaxel	cancer pulmonaires a grandes cellules	I
Ganitumab	Conatumumab		Cancer colorectal/cancer pulonaires à grandes cellul	Ib, II
inhibiteur épigénétique			cancer pancréatique/cancer ovarien/sarcomes	
Vorinstat	Conatumumab		Lymphomes	Ib
Inhibiteur des kinases				
Sorafenib	Mapatumumab		carcinome hépatocellulaire	Ib, II
Cytokines				
IFN-γ	Lexatumumab		tumeurs solides pédiatriques	I
CD20				
Rituximab	Dulanermin		Lymphomes non Hodgkiniens	Ib, II
Autres				
Thalidomide	CPT		Myélomes multiples réfractaire	II

Tableau 2 : Les agonistes de TRAIL associés avec d'autres médicaments anticancéreux et évalués en essais cliniques. D'après (Micheau et al., 2013).et (Lemke et al., 2014).

3. CD40 : une cible de choix pour éliminer les cellules cancéreuses

CD40 est un récepteur de la famille du TNF-R connu comme chef d'orchestre de la réponse immunitaire. Il est, en effet, exprimé sur plusieurs cellules du système immunitaire et son engagement par son ligand CD40L conduit à l'activation de la réponse immunitaire adaptative humorale et cellulaire. De ce fait, CD40 a très tôt été choisi comme cible pour la thérapie des cancers afin de stimuler la réponse immunitaire anti-tumorale. Cependant, CD40 apparaît comme une cible d'autant plus attractive qu'il est aussi exprimé sur plus de 70% des cellules cancéreuses dont 100% des lymphomes et peut, dans certains cas, directement induire leur apoptose.

3.1. Le récepteur CD40 et son ligand CD40L

3.1.1. Le récepteur CD40

CD40 (TNFRSF5) est un récepteur transmembranaire de type I de 277 acides aminés. Son domaine extracellulaire est composé de 4 CRD (CRD1, CRD2, CRD3 et CRD4) et son domaine intracellulaire ne possède pas d'activité tyrosine kinase. Il a d'abord été découvert sur les lymphocytes B (Paulie et al., 1985) puis sur d'autres cellules du système immunitaire essentiellement sur des cellules présentatrices de l'antigène comme les DC, les monocytes/macrophages mais aussi sur les basophiles et les éosinophiles. CD40 est également exprimé sur une grande variété des cellules dont les plaquettes, les cellules endothéliales, les cellules neuronales mais aussi sur de nombreuses cellules tumorales. L'expression de CD40 sur les cellules saines est constitutive et peut être régulée par plusieurs cytokines dont l'IFNγ, l'IL-1, l'IL-3, l'IL-4, le TNFα et le GM-CFS (Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor) (Schonbeck et al., 2000).

3.1.2. Le CD40L

Le ligand naturel de CD40 est CD40L (CD154, TNFRSF5). C'est une protéine transmembranaire de type II appartenant à la famille des ligands du TNF. CD40L est exprimé de manière transitoire sur les LTCD4+ activés et de manière persistante et inductible sur d'autres leucocytes incluant les basophiles, éosinophiles, monocytes et macrophages, sur les plaquettes ainsi que sur des cellules non hématopoïétiques (cellules musculaires lisses, cellules endothéliales et cellules épithéliales) (Schonbeck et al., 2000).

3.1.3. Les autres ligands de CD40 et les autres récepteurs de CD40L

Le récepteur CD40 peut également se lier à d'autres ligands comme la protéine C4bP du complément qui induit l'activation et la prolifération les LB, l'expression à leur surface des molécules CD54 et CD86 et la production d'IgE en présence d'IL-4 (Brodeur et al., 2003). L'interaction entre CD40 et la protéine C4bP semblerait participer à l'activation des LB au niveau des sites d'inflammation. La protéine mycobactérienne de choc thermique HSP70 peut également se lier à CD40 ce qui induit l'internalisation du complexe CD40-HSP70 puis l'activation de la voie des MAPKs. (Wang et al., 2001).

De la même manière, le ligand CD40L peut se lier à l'intégrine αIIbβ3 à la surface des plaquettes par l'intermédiaire du motif de reconnaissance RGD. Cette interaction a été la source de thrombus artériels lors de traitements avec une molécule CD40L recombinante (rCD40L) (Andre et al., 2002).L'intégrine α5β1 a également été décrite comme un récepteur de CD40L (Leveille et al., 2007). L'interaction entre CD40L et cette intégrine à la surface de cellules humaines monocytaires (lignée U937) conduit à l'activation de la voie de signalisation MAPKs.

3.2. Signalisation induite par le pontage de CD40 par son ligand CD40L

La signalisation induite par CD40L conduit à l'activation de diverses voies de signalisation dépendantes de l'environnement intra et extra cellulaire.

3.2.1. Rôle des protéines TRAF

Comme le domaine cytoplasmique de CD40 est dépourvu d'activité enzymatique intrinsèque, la transduction du signal est principalement médiée par des protéines TRAFs (TNF Receptor Associated Factors) (**Figure 14**). Les TRAFs sont des protéines adaptatrices qui possèdent un domaine TRAF au niveau de la région C-terminale, qui est subdivisé en deux sous-domaines TRAF-N et TRAF-C. Le sous-domaine TRAF-N est impliqué dans l'interaction avec d'autres protéines alors que le sous-domaine TRAF-C permet l'interaction entre les différentes TRAFs pour former des complexes multimériques (Arron et al., 2002). Il existe 6 molécules TRAF nommées de TRAF1 à TRAF6, chez les mammifères. Toutes les molécules TRAFs à l'exception de TRAF4 peuvent se lier à CD40 (Bishop et al., 2007).

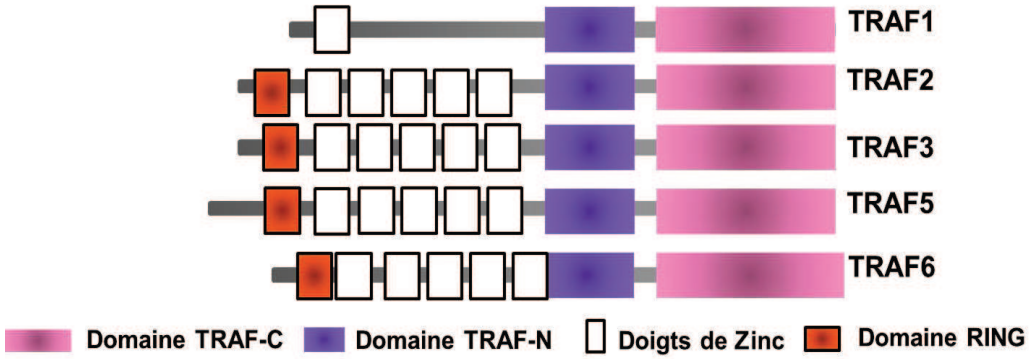


Figure 15 : Les protéines TRAF. Le domaine cyoplasmique du récepteur CD40 peut recruter les protéines TRAF 1, 2, 3, 5 et 6 pour activer différentes voies de signalisations.

3.2.2. Type de signalisation induite par CD40

Prolifération cellulaire

L'activation de CD40 conduit principalement à l'activation des voies de signalisation impliquées dans la survie et la prolifération, dont NFkB, JNK et MAPKs. Ces voies de prolifération sont très bien documentées dans la littérature (revue dans (Elgueta et al., 2009)). De plus, la région cytoplasmique de CD40 possède un domaine de liaison à la protéine JAK3. Ce domaine permet d'activer en l'absence des TRAFs, le facteur de transcription STAT5 conduisant à la production de cytokines pro-inflammatoires (TNFα, IFNγ, IL-6) (Hanissian and Geha, 1997) (Figure 16).

Induction de l'apoptose

Outre l'activation des voies de prolifération, l'engagement de CD40 par son ligand CD40L peut conduire dans certains cas à l'apoptose. Les mécanismes conduisant à l'apoptose induite par CD40L sont malheureusement peu décrits dans la littérature. Cette capacité d'induire l'apoptose dépend du contexte cellulaire et de la nature du ligand qui active CD40. Il semblerait, en effet, que seules les cellules cancéreuses et en particulier certains lymphomes et carcinomes soient sensibles à l'apoptose induite par CD40L.Des ligands de faible valence comme des anticorps monoclonaux favoriseraient un signal de prolifération cellulaire alors que des ligands de plus forte valence comme CD40L exprimé à la surface de cellules, induiraient un signal apoptotique (Haswell et al., 2001).

Ce sont essentiellement les travaux de Georgopoulos (Georgopoulos et al., 2006) puis de Elmetwali (Elmetwali et al., 2010) et leurs collaborateurs qui ont permis d'éclaircir un peu plus l'impact de la valence de ligands sur l'induction de l'apoptose par CD40 et la cascade de molécules en découlant.

Dans leurs travaux ils démontrent l'impact de la valence du ligand en utilisant un ligand trimérique soluble (ligand faiblement valent) et un modèle de ligand multivalent, à savoir le CD40L membranaire exprimé à la surface de cellules normales (Georgopoulos et al., 2006) ou de cellules transfectés avec un adénovirus codant pour CD40L(Elmetwali et al., 2010). Ils montrent ainsi le ligand trimérique ne tue pas des cellules cancéreuses issues d'un carcinome de la vessie. En revanche, le ligand multivalent induit efficacement l'apoptose de ces cellules cancéreuses. Les travaux de Georgopoulos et de ses collaborateurs montrent pour la première fois que le ligand multivalent induit la surexpression des protéines TRAF1 et TRAF3. A l'opposé, le ligand trimérque n'induit pas de surexpression de ces protéines. Les protéines TRAF1 et TRAF3 sont rapidement recrutées au niveau du domaine cytoplasmique de CD40. TRAF3 conduit à l'activation d'une voie apoptotique dépendant de JNK (Georgopoulos et al., 2006) qui phosphoryle les protéines c-Jun, Bcl-2 et Bcl-xL qui perdent ainsi leur activité anti- apoptotique. L'inactivation de Bcl-2 et Bcl-xL permet la perte du potentiel mitochondrial et la libération du cytochrome c, qui active les caspases 9 et 3/7(Elmetwali et al., 2010). Ils montrent également que le ligand multivalent n'induit pas une forte expression de la caspase 8 limitant ainsi son implication dans l'induction de l'apoptose induite par CD40 (Elmetwali et al., 2010). Ces résultats accentuent l'importance de la voie intrinsèque dans l'induction de l'apoptose induite par CD40 (Elmetwali et al., 2010).

Les travaux de Georgopoulos (Georgopoulos et al., 2006) montrent également que dans les cellules urothéliales cancéreuses, la protéine TRAF3 est continuellement synthétisée et dégradé par le protéasome mais dès l'engagement de CD40 par un ligand multivalent, TRAF3 est recrutée au niveau de la région intracellulaire de CD40 et n'est plus dégradée.

De manière intéressante, ils montrent également que le ligand multivalent induit une diminution de l'expression de la protéine TRAF6 qui active la voie de prolifération PI3K/Akt. Dans ce cas, le ligand multivalent favorise le recrutement des TRAF3 et 1 qui activent la voie intrinsèque de l'apoptose via JNK et limite le recrutement de la TRAF6, empêchant ainsi l'activation des voies de survie PI3K/Akt qui pourraient contrecarrer le signal apoptotique (Elmetwali et al., 2010).

Ils montrent enfin que leur ligand multivalent tue uniquement les cellules cancéreuses urotéliales et n'ont pas d'effet apoptotique sur les cellules urothéliales non cancéreuses (Elmetwali et al., 2010).

De plus, ces 2 études montrent que la protéine TRAF1 est surexprimée mais son rôle n'est pas défini dans l'induction de l'apoptose suite à l'engagement de CD40 par un ligand multivalent.

Cependant, une étude plus récente de Jundi et ses collaborateurs (Jundi et al., 2012) conteste le rôle de la protéine TRAF6 dans l'apoptose induite par CD40. Dans leurs travaux, ils montrent qu'au contraire, l'engagement de CD40 par un anticorps monoclonal induit l'apoptose d'un lymphome de Burkitt (Raji), via le recrutement de la protéine TRAF6 et serait indépendante de la protéine TRAF3 et des caspases.

Ces résultats accentuent la difficulté d'analyser la signalisation ,ou plutôt les signalisations, apoptotiques induites par l'engagement de CD40. L'orientation de la signalisation intracellulaire est donc bien dépendante de la nature du ligand de CD40 et de l'environnement intracellulaire.

Pour l'heure, les voies moléculaires induites par CD40 et conduisant à l'apoptose dans les cellules tumorales reste encore à élucider.

3.2.3. Initialisation de la signalisation induite par CD40 au niveau membranaire

Comme tous les membres de la famille du TNF, CD40L est présent sous forme membranaire ou sous forme de trimère soluble. En 2011, est publiée la structure cristallographique du complexe CD40-CD40L (An et al., 2011) (**Figure 17**). On y voit que CD40L se fixe au niveau des CRD2 et CRD3 du récepteur. De manière surprenante, le trimer de CD40L se fixe à 2 récepteurs CD40 et non 3 comme attendus. Ces complexes de stœchiométrie 3 (monomères du ligand) : 2 (récepteurs) se forment aussi bien en solution qu'en cristal. J'ai participé à des travaux sur cette thématique qui seront exposés dans le chapitre 2.

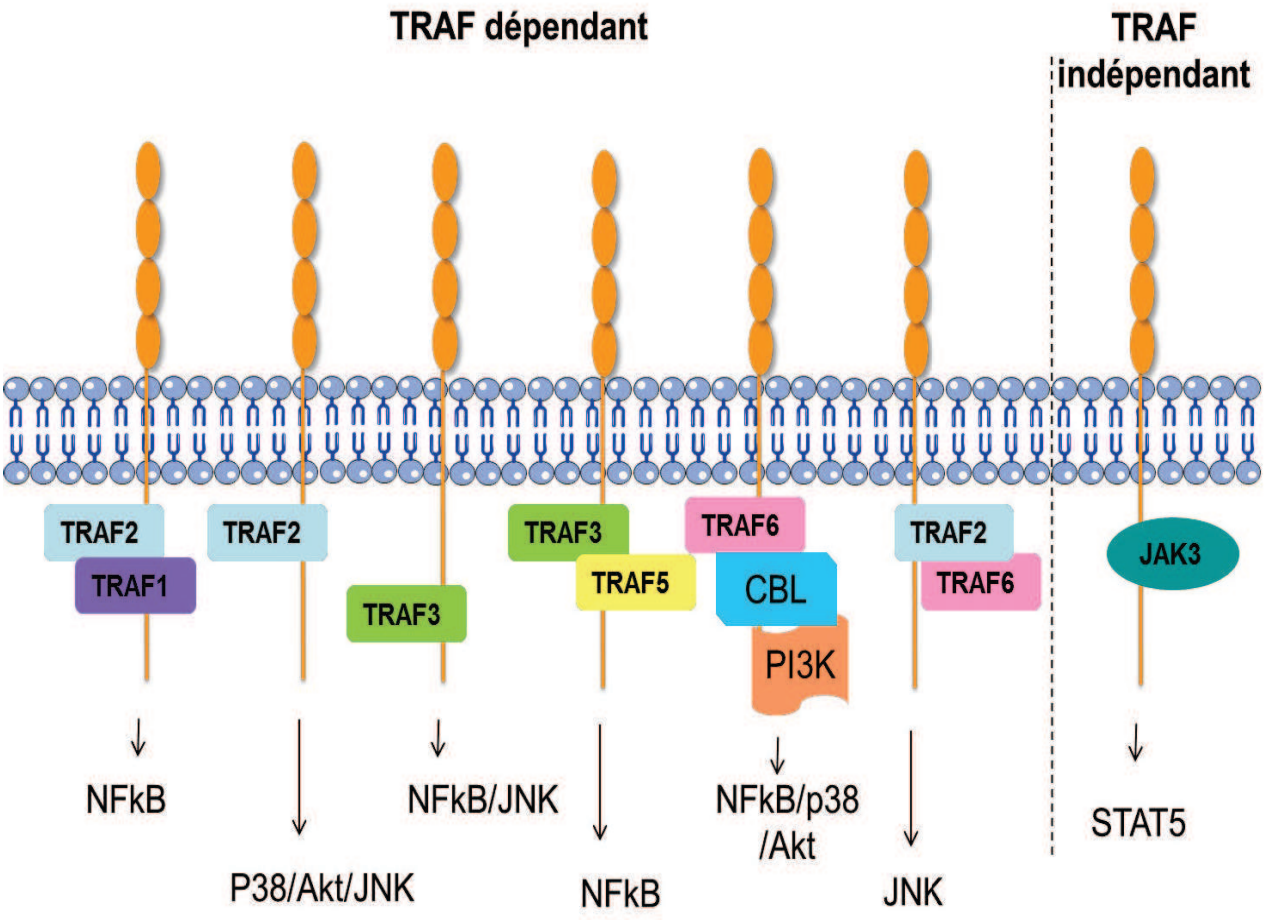


Figure 16 : Les différentes voies de signalisation induites par CD40. Figures issue de la publication suivante : (Elgueta et al., 2009). L'engagement de CD40 par son ligand naturel CD40L ou des ligands synthétiques peut conduire à l'activation de diverses voies de signalisation principalement médiées par des protéines TRAF.

Parmi les hypothèses développées par les auteurs pour expliquer cette interaction de stœchiométrie 3:2, il a été proposé un rôle central des interactions électrostatiques entre CD40L et CD40 (An et al., 2011). La liaison d'un troisième récepteur serait empêchée par des répulsions électrostatiques des deux autres récepteurs recrutés par le ligand trimérique. Cette interaction multivalente conduit à l'agrégation de nombreux récepteurs à la surface de la cellule et est indispensable pour induire la signalisation intracellulaire.

De plus, quelques études ont montré que CD40 est présent dans les radeaux lipidiques et que la relocalisation de CD40 au niveau de ces micro-domaines est indispensable pour induire la signalisation intracellulaire (Kaykas et al., 2001; Vidalain et al., 2000b). Enfin, il n'existe pas d'étude qui précise clairement si l'internalisation de CD40 est importante pour sa signalisation. Peu d'études montrent que CD40 est internalisé suite à

son activation dans les cellules endothéliales et permet ainsi l'induction de la voie NFkB (Chen et al., 2007; Chen et al., 2006).

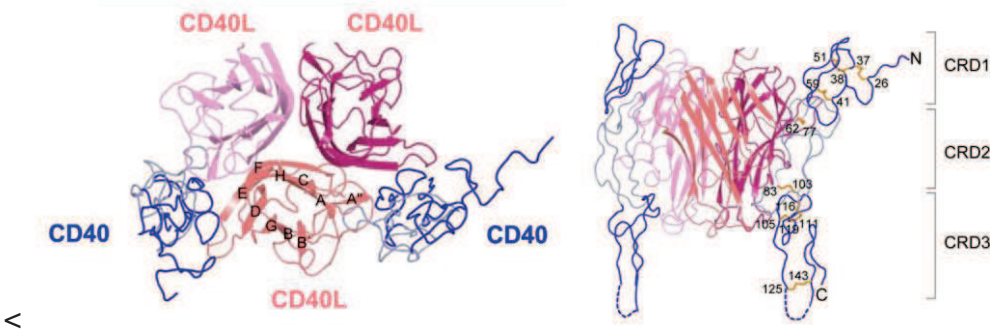


Figure 17 : Structure cristallographique du récepteur CD40 et son ligand CD40L. Le ligand trimérique CD40L se fixe au niveau des CRD2 et CRD3 du récepteur CD40 et recrute 2 récepteurs. (An et al., 2011).

3.3. CD40, le chef d'orchestre de la réponse immunitaire

Les travaux présentés dans ce manuscrit concernent le rôle de CD40 dans l'induction de l'apoptose des cellules tumorales. L'interaction CD40-CD40L est aussi centrale dans la mise en place de la réponse immunitaire adaptative cellulaire et humorale. N'étant pas essentiel pour la compréhension de mes travaux et très bien documenté dans les écrits universitaires, ce rôle ne sera que très brièvement décrit dans la partie suivante (**Figure 17**).

a) Développement et différenciation des lymphocytes B

Le premier rôle immunitaire attribué à CD40 concerne le développement et l'activation des lymphocytes B (LB) lors de l'interaction entre CD40L et CD40 portés respectivement par un LT et un LB. Ce rôle a été démontré principalement par 3 approches clés. Premièrement, il a été montré que l'activation de CD40 par une molécule CD40 recombinante ou par des anticorps ciblant CD40, induit l'activation des LB qui se traduit par une surexpression de molécules de co-stimulation, une production de cytokines (incluant l'IL-6, le TNF-α et l'IL-10), l'expression des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de type I et II (CMH) et des molécules d'adhésion. De plus, l'activation de CD40 sur les LB est suffisante pour induire leur prolifération. Cette prolifération est d'autant plus importante lorsque l'on active à la fois CD40 et le récepteur des LB (BCR) par un anticorps anti-immunoglobuline (Ig).

Deuxièmement, plusieurs études révèlent l'absence de centres germinatifs dans des souris qui n'expriment pas CD40 (CD40-/-). Les patients souffrants d'une immunodéficience

de type syndrome d'hyper IgM ont fréquemment des centres germinatifs de très petite taille (Hirbod-Mobarakeh et al., 2014). Les centres germinatifs sont des sites privilégiés au sein desquelles les LB subissent les étapes de sélection pour produire des anticorps de haute affinité ainsi que la commutation de classe qui leur permet de produire des anticorps de différents isotypes (Fuleihan et al., 1993). C'est également le lieu de différenciation des LB en LB mémoire.

Troisièmement, les patients souffrants du syndrome d'hyper IgM due à une protéine CD40L non fonctionnelle, présentent une concentration élevée d'anticorps d'isotype IgM et ne possèdent pas d'autres isotypes d'anticorps reflétant un défaut dans le processus de commutation de classe (Hirbod-Mobarakeh et al., 2014). Finalement, l'inhibition de l'interaction CD40L/CD40 par un Acm bloquant CD40 altère la réponse des LB mémoires.
En conclusion, la liaison de CD40L à son récepteur est donc essentielle dans le contrôle de la prolifération des LB, de la production des Ig, de la commutation de classe des Ig, la formation des centres germinatifs ainsi que le développement de la réponse B mémoire (revue dans (Wennhold et al., 2013)).

b) Différenciation des lymphocytes T

L'interaction CD40L/CD40 est également importante dans l'activation des LT par les DC. La liaison de CD40L à la molécule CD40, exprimée par les DC active ces cellules et leur permet d'activer les LTCD8$^+$ et d'induire leur différenciation en lymphocytes T cytotoxiques. Cette activation se traduit, d'une part par une augmentation de l'expression de molécules de co-stimulation et d'autre part, par une production accrue de cytokines comme l'IL-12, un facteur de différenciation des cellules T. L'interaction CD40L/CD40 est ainsi essentielle pour activer efficacement les DC et la réponse cellulaire T cytotoxique (Elgueta et al., 2009). Pour note, la réponse T cytotoxique est centrale dans la réponse immunitaire anti-tumorale.

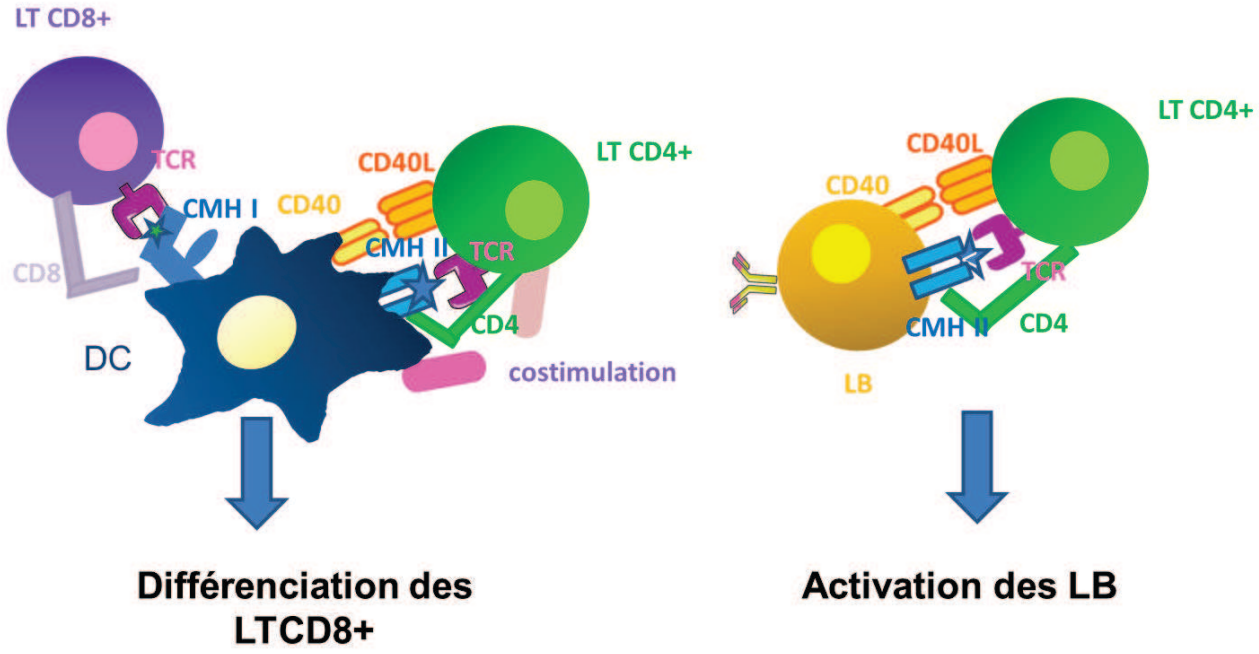


Figure 18 : Rôle de CD40 dans la l'activation et la différenciation des LB et LT. (A) La liaison de CD40L à la molécule CD40, exprimée par les DC, active ces cellules et leur permet d'activer les LTCD8$^+$ et d'induire leur différenciation en lymphocytes T cytotoxiques, essentiels dans la réponse immunitaire antitumorale. (B) L'interaction entre CD40L et CD40 portés respectivement par un LTh et un LB, permet d'activer et de différencier les LB.

3.4. Rôle en thérapie des cancers

L'interaction entre CD40 et CD40L peut avoir un effet anti tumorale important soit *i)* en activant la réponse anti tumorale, soit *ii)* en induisant directement l'apoptose des cellules tumorales.

a) L'interaction CD40L/CD40L est centrale dans la réponse immunitaire anti tumorale

L'importance de CD40 dans la réponse antitumorale a été mise en évidence dans des souris déficientes pour CD40 qui sont incapables de générer une réponse antitumorale (Brunekreeft et al., 2014; Mackey et al., 1997). L'effet peut être dû à plusieurs mécanismes :

1) Le traitement ciblant CD40 (rCD40L ou Acm) peut induire une forte activation des DC (van Mierlo et al., 2002) qui permet une expansion rapide des LTCD8+ cytotoxiques spécifiques de la tumeur conduisant *i)* à l'élimination de la tumeur *ii)* et à une protection prolongée contre une nouvelle stimulation tumorale (Weiss et al., 2014). De plus, l'engagement de CD40 exprimé à la surface de lymphomes ou de certains carcinomes peut

induire la surexpression du CMHI et de protéines intracellulaires qui facilitent la présentation d'antigène tumoraux (TAP1) aux LT cytotoxiques. Par cette action sur les tumeurs, la lyse cytotoxique induite par les LTCD8+, peut donc être favorisée.

2) En plus d'activer les DC, le traitement ciblant CD40 peut aussi activer les macrophages. Une récente étude montre à la fois chez des patients atteints d'un cancer pancréatique et dans un modèle murin présentant des carcinomes pancréatiques, que l'anticorps ciblant CD40 (CP-870,893) active les macrophages ce qui conduit à l'élimination de tumeur pancréatique probablement par libération de molécules cytotoxiques (Beatty et al., 2011).

b) CD40 induit l'apoptose des cellules cancéreuses

L'activation de CD40 exprimé sur les cellules tumorales peut dans certains cas induire (*cf.* paragraphe 3.5.2) directement l'apoptose de ces dernières et ainsi conduire à l'élimination de la tumeur.

En effet, CD40 est exprimé sur un grand nombre de cellules tumorales et son expression diminue généralement lors de la progression tumorale (Bereznaya and Chekhun, 2007). CD40 est largement exprimé sur les mélanomes, les cellules du cancer de la prostate et des poumons ainsi que sur plusieurs carcinomes incluant les carcinomes du nasopharynx, de la vessie, des cervicales et des ovaires (Altenburg et al., 1999; Cooke et al., 1998; Gallagher et al., 2002). On retrouve également CD40 à la surface des nombreux lymphomes tels que lymphomes non Hodgkinien, les lymphomes de Hodgkin, et sur d'autres tumeurs hématologiques comme les leucémies lymphocytaires, les lymphomes multiples, les myélomes et les leucémies myéloïdes aigües (PellatDeceunynck et al., 1996; Teoh et al., 2000).

L'activation de CD40 sur des carcinomes ainsi que sur des lymphomes de Burkitt, des lymphomes B de haut grade et des myélomes multiples conduit à une diminution de la prolifération de ces cellules puis à leur apoptose (Eliopoulos et al., 2000). De manière intéressante, l'induction de l'apoptose par CD40 semble restreinte aux cellules cancéreuses. En effet, l'activation de CD40 sur des cellules non cancéreuses comme sur les LB non malins (Kornbluth et al., 2012) ou sur des cellules cancéreuses issues d'un carcinome de la vessie (Elmetwali et al., 2010), ne conduit pas à leur apoptose.

L'effet pro-apoptotique de CD40 est médié principalement par 2 mécanismes.

1) Comme décrit dans le paragraphe 3.2.2, même si CD40 ne possède pas de domaine de mort, l'engagement de CD40 par un ligand CD40L multivalent peut directement activer la voie intrinsèque de l'apoptose via la potéineTRAF3 qui active la voie JNK (Georgopoulos et al., 2006).

2) Les premières études sur l'apoptose des cellules cancéreuses induites par CD40, montrent que CD40 peut induire indirectement l'apoptose des cellules cancéreuses en favorisant l'expression des récepteurs de mort à la surface de celles-ci. En effet, l'activation de CD40 sur certaines cellules cancéreuses peut conduire à l'activation de la voie NFkB (Kaltschmidt et al., 2000) qui induit l'expression des ligands FasL (Holtz-Heppelmann et al., 1998) et TRAIL (Yoshida et al., 2001) à la surface de la tumeur qui vont alors agir de façon autocrine ou/et paracrine sur leurs récepteurs respectifs Fas et TRAIL-R également surexprimés (Eliopoulos et al., 2000) (**Figure 19**).

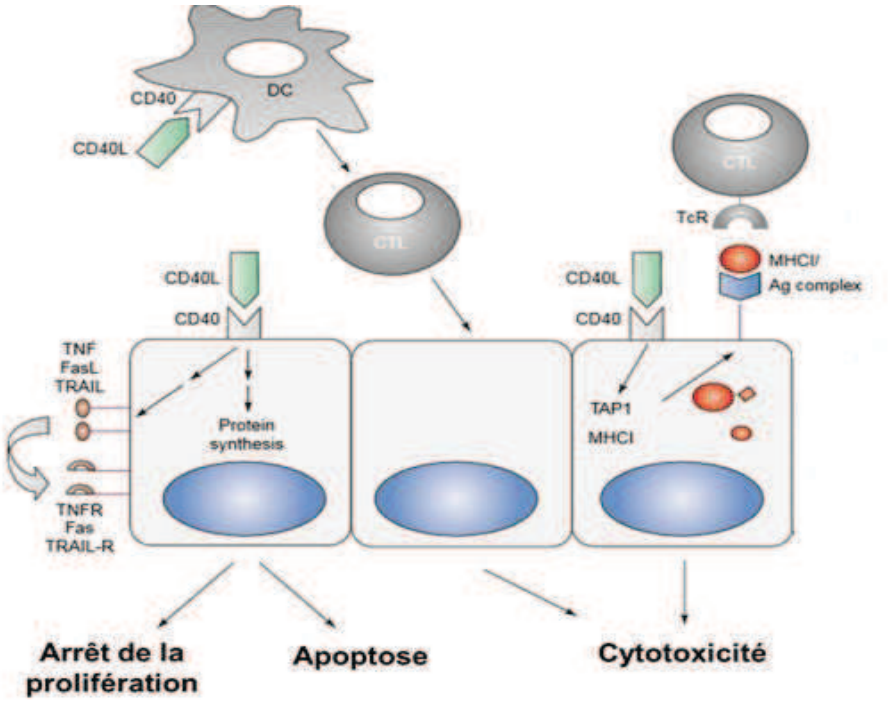


Figure 19 : Les différents mécanismes anti apoptotiques induits par CD40. Figure issue de (Elmetwali et al., 2010) CD40 peut directement induire l'arrêt de la prolifération et l'apoptose *via* la molécule TRAF3 ou/et en augmentant l'expression des ligands de mort FasL et TRAIL à la surface de la tumeur qui vont alors agir de façon autocrine ou/et paracrine sur leurs récepteurs respectifs Fas et TRAIL-R également surexprimés. L'engagement de CD40 exprimé à la surface de lymphomes ou certains carcinomes peut induire la surexpression du CMHI et de protéines intracellulaires qui facilitent la présentation d'antigènes tumoraux (TAP1) favorisant ainsi la réponse immunitaire des LTCD8+ cytotoxiques.

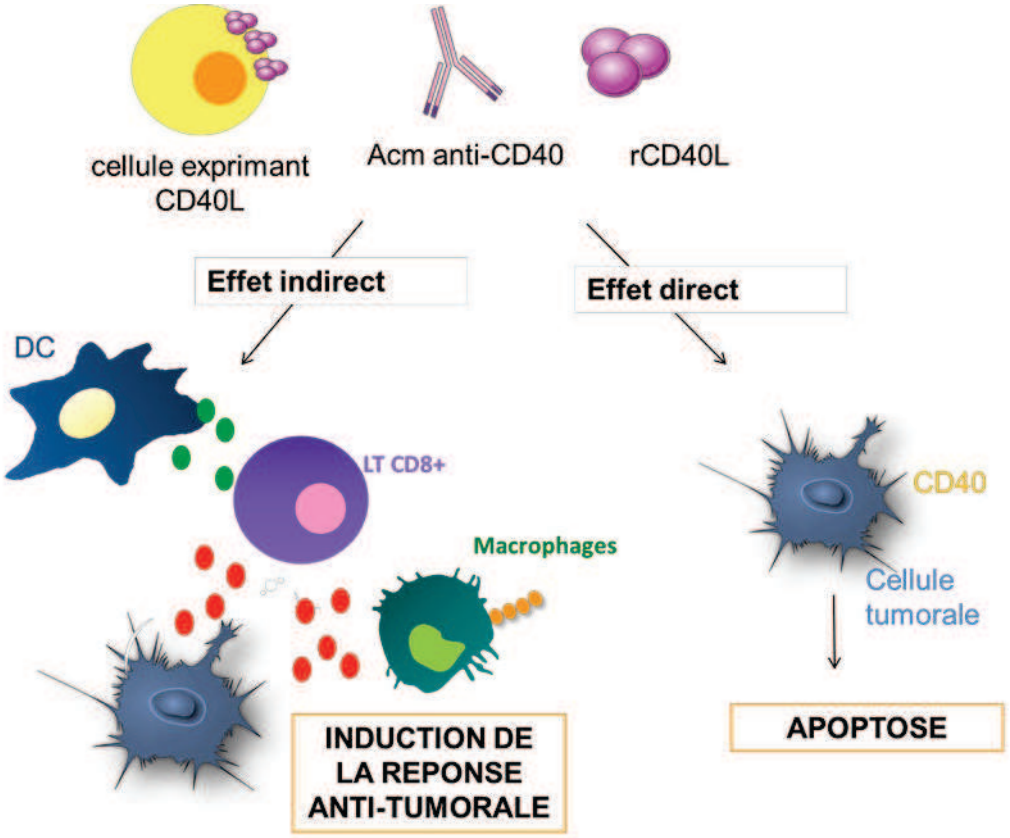


Figure 20: Les effets anti tumoraux induits par CD40. L'activation de CD40 par des rCD40L, des Acm ciblant CD40 ou des cellules sur-exprimant CD40L peut conduire à l'élimination des cellules cancéreuses en induisant leur apoptose ou/et stimulant la réponse immunitaire anti-tumorale. Dans ce cas le traitement ciblant CD40 peut efficacement activer les DC conduisant à l'activation des LTCD8+ cytotoxiques ou à l'activation des macrophages qui éliminent la tumeur via la sécrétion de molécules cytotoxiques.

c) CD40 et ses limites

Malgré ses effets anti tumoraux, le ciblage de CD40 en oncologie peut aussi avoir des effets opposés qui vont favoriser le développement et la progression tumorale. En effet, dans certains cas, l'activation de CD40 va favoriser la prolifération et la survie des cellules cancéreuses. En effet, si le traitement avec un Acm CD40 ou rCD40 de carcinomes, lymphomes de Burkitt, lymphomes B de haut grade et des myélomes multiples exprimant CD40, conduit à leur apoptose, à l'opposé, le même traitement induit chez lymphomes de bas grade, les CLL, les lymphomes folliculaires et les leucémies à tricholeucytes un signal de survie (Andersen et al., 2000). En général, ces signaux de survie sont médiés par l'induction des voies de prolifération NFkB, PI3K/Akt. Par exemple, il a été montré que l'activation de CD40 (par un Acm) sur des cellules d'un cancer des poumons induit

l'activation des voies de signalisation PI3K-Akt rendant ainsi les cellules cancéreuses résistantes à l'apoptose (Lu et al., 2013).

Une étude plus récente montre que les LT activés présents dans les organes lymphoïdes secondaires interagissent avec les leucémies lymphoïdes chroniques (CLL) et contribuent à leur prolifération *via* une signalisation induite par le BCR, CD40 et l'IL-21. Dans ce cas, le traitement des CLL avec des agonistes de CD40 favoriserait leur survie plutôt que leur mort (Pascutti et al., 2013).

Par ailleurs, la progression tumorale et le développement de métastase dépend de l'angiogenèse (processus de néo vascularisation à partir de vaisseaux sanguins préexistants) initiée par différentes facteurs solubles libérés par la tumeur. La liaison de CD40L à CD40 exprimé sur les cellules endothéliales peut conduire à une expression accrue de facteurs pro angiogéniques tels que le VEGF qui vont promouvoir l'angiogenèse (Bergmann and Pandolfi, 2006).

3.5. CD40 en clinique pour la thérapie des cancers

3.5.1. Les agonistes de CD40

a) CD40L recombinant

Une seule forme recombinante de CD40L a été développée et évaluée en essais cliniques. Cette molécule appelée rhuCD40L est trimérisée grâce un motif isoleucine zipper (Vonderheide et al., 2001). Les premiers résultats des essais cliniques montrent un effet thérapeutique intéressant qui conduit à une rémission complète du cancer chez les patients souffrants d'un cancer avancé de la tête et du cou. Malheureusement, cette efficacité n'a pas été observée chez des patients présentant d'autres tumeurs solides ou de lymphomes non Hodgkiniens de haut ou de bas grade. Les résultats indiquent que la molécule devient toxique à des doses faibles (0,1mg/kg en 5 doses/jours) et ne conduit pas à une amélioration du cancer chez ces patients. Les premiers résultats de l'utilisation de rhuCD40 en monothérapie ne sont pour le moment pas très encourageants.

b) Anticorps anti-CD40 agonistes

Contrairement aux résultats mitigés obtenus avec le CD40L recombinant, les anticorps monoclonaux agonistes de CD40 apparaissent comme une stratégie prometteuse (revue dans (Khalil and Vonderheide, 2007; Vonderheide and Glennie, 2013)). Il existe 3 anticorps évalués en clinique dans le cadre des traitements du cancer:

- Le SGN-40 est un anticorps humanisé de type IgG1 capable d'induire l'apoptose des lymphomes B, mais son activité agoniste est partielle.
- L'anticorps HCD112, aussi d'isotype IgG1 humain, est un anticorps antagoniste de CD40 qui bloque efficacement la prolifération des cellules tumorales lors d'évaluations de phase I dans le traitement des CLL et des myélomes multiples (MM). Une des caractéristiques des anticorps d'isotype IgG1 est qu'ils peuvent à la fois activer leur cible et engager leur domaine Fc pour activer les mécanismes d'ADCC (Antibody Dependant Cell Cytotoxicity). La liaison de ces anticorps via leur domaine Fc sur les cellules cancéreuses, va ainsi induire leur lyse par les cellules NK.

Des études récentes mais controversées suggèrent que l'action des anticorps agonistes de CD40 serait due à la liaison de leur domaine Fc aux récepteurs FcγRIIB exprimés sur les cellules cancéreuses. Dans ce cas, cette liaison *via* les récepteurs FcγRIIB permettrait de rapprocher les anticorps entre eux pour leur permettre de recruter plus facilement les récepteurs CD40 pour amplifier le signal intracellulaire (White et al., 2011). Une autre étude montre, au contraire, que l'activité des Acm ciblant CD40 ne requiert pas l'engagement du domaine Fc via les récepteurs FcγRIIB (Richman and Vonderheide, 2014). Il est donc possible que l'engagement du domaine Fc via les récepteurs FcγRIIB potentialise l'effet des Acm agonistes de CD40, mais ne soit pas indispensable pour leur activité. En effet, le CP-870,893 qui est un anticorps d'isotype IgG2 humain et qui donc, ne se lie pas aux récepteurs FcγRIIB possède une activité thérapeutique très efficace. Ce troisième anticorps, le CP-870,893 a une forte activité agoniste et suscite donc le plus grand intérêt. Il est évalué en phase I dans le traitement de tumeurs solides. Il peut activer les DC, les LB, et même les macrophages pour augmenter la réponse anti tumorale (Beatty et al., 2011).
Ces différents anticorps ne sont, dans la plupart des cas pas toxiques pour les cellules saines et sont bien tolérés par les patients à l'exception de quelques effets secondaires moindres observés tels que de rapides libérations de cytokines dans le sang induisant de la fièvre et des nausées.
La plus grande limitation pour l'utilisation des anticorps anti-CD40 est l'expression de CD40 à la surface des plaquettes sanguines. En effet, il a été observé que l'utilisation d'agonistes de CD40 pouvait entraîner l'apparition de thromboses artérielles (Gavins et al., 2011).

3.5.2. Variation de la signalisation intracellulaire induite par les agonistes de CD40 : le rôle de l'oligomérisation de CD40

Comme nous l'avons déjà décrit, le pontage de CD40 peut induire soit la survie soit l'apoptose des cellules tumorales (Korniluk et al., 2014) (*cf* paragraphe 3.4). Les premières explications données à ces observations étaient que la signalisation induite par CD40 dépendait de l'environnement intra et extracellulaire (présence de molécules anti apoptotiques, état de différenciation de la tumeur...). Même si ces modèles restent justes, des études récentes suggèrent, qu'en plus de l'environnement cellulaire, l'état d'oligomérisation de CD40 induit par son ligand peut également orienter la réponse cellulaire. Une des hypothèses proposées est que des ligands qui induisent la formation d'un petit réseau de récepteurs favoriseraient l'induction d'une signalisation de survie (Reyes-Moreno et al., 2004) alors que des ligands qui engagent plus de récepteurs induiraient préférentiellement l'apoptose (**Figure 21**). Dans le même ordre d'idée, une étude montre qu'une forte concentration de CD40L induit l'arrêt de la prolifération de lymphome de Burkitt alors qu'une faible concentration favorise sa survie (Challa et al., 2002). D'autres études montrent également que l'augmentation de la valence de CD40L favorise la prolifération et la survie des LB sains (Haswell et al., 2001).

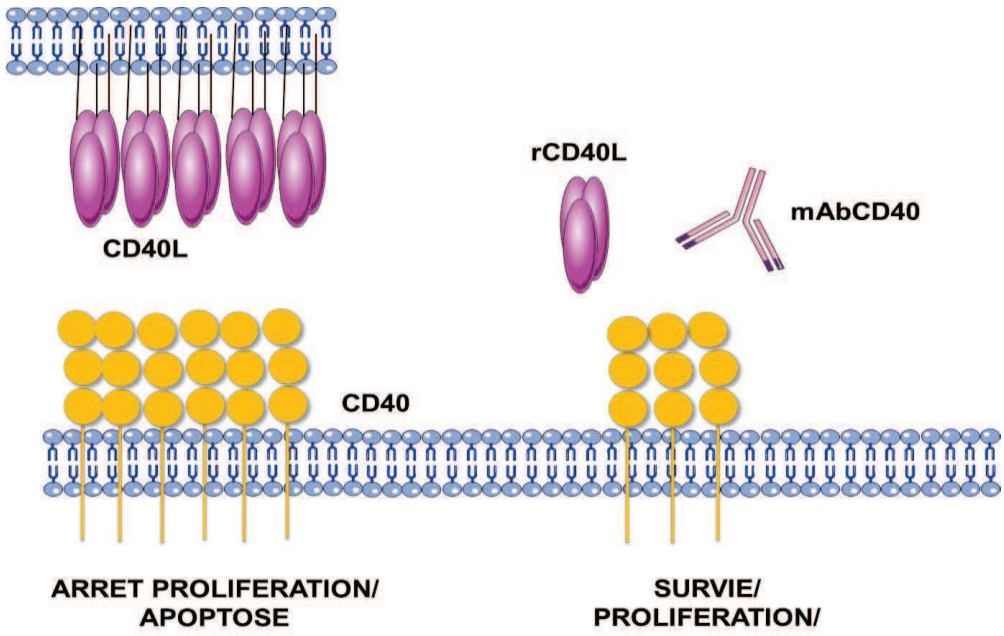


Figure 21 : Impact de l'oligomérisation de CD40 sur l'orientation de la réponse cellulaire. Des ligands de faible valence comme les anticorps induiraient la formation d'un petit réseau de récepteurs qui favoriseraient l'induction d'une signalisation de survie. A l'opposé, des ligands de plus forte valence engageraient plus de récepteurs et induiraient préférentiellement l'apoptose.

La formation de petits ou de grands réseaux de récepteurs influencerait le nombre et/ou le type de molécules anti-apoptotiques recrutées au niveau du domaine intracellulaire de CD40. En effet, il semblerait que la trimérisation de CD40 soit suffisante pour recruter les protéines TRAF2, 3 et 1 avec une affinité plus forte pour TRAF2 alors qu'un dégrée d'oligomérisation supplémentaire serait nécessaire pour recruter TRAF6 (Pullen et al., 1999). Cette observation est en adéquation avec l'étude de Mourad et collaborateurs qui montre que CD40 nécessite le recrutement de TRAF6 pour induire la mort des cellules HEK exprimant CD40 (Jundi et al., 2012). Dans ce cas, TRAF6 induit l'apoptose en activant la caspase 8 *via* un domaine RING (He et al., 2006).

Néanmoins, le mécanisme est sans doute plus complexe. En effet, les résultats de Elmetwali et ses collaborateurs montrent que l'apoptose induite par CD40 dans les carcinomes est médiée par le recrutement de TRAF3 et non de TRAF6 (Elmetwali et al., 2010). Dans ce cas, TRAF3 activerait la voie PI3K/Akt.

Quoi qu'il en soit, la multimérisation du ligand semble avoir un impact non négligeable sur l'orientation de la signalisation intracellulaire induite par CD40. Néanmoins cet impact serait modulé en fonction de l'environnement intracellulaire.

3.5.3. Thérapies combinées

Comme pour TRAIL, l'activation (ou l'inhibition) de CD40 peut être combinée à d'autres traitements anticancéreux.

L'activation de CD40 par des Acm peut être associée à de la chimiothérapie. Plusieurs études montrent que le traitement des cellules cancéreuses avec des agents de chimiothérapie telles que le 5-FU, la gemcitabine et le *cis*platine agissent comme *i)* adjuvant de la réponse immunitaire et *ii)* peuvent augmenter significativement l'action pro-apoptotique de CD40 (Hill et al., 2005).

a) Augmentation de la réponse immunitaire anti-tumorale

L'activité adjuvante de la chimiothérapie peut être due à l'induction d'une mort immunogène des cellules cancéreuses. Cette mort "immunogène" peut activer la réponse immunitaire anti-tumorale par différents mécanismes comme la libération d'antigènes tumoraux qui peuvent être capturés par les DC ou encore la production de molécules de stress cellulaire (les DAMP) qui vont envoyer un signal de danger à la DC et ainsi permettre sa maturation. Les DC matures vont alors activer la différenciation de LTCD8+ cytotoxiques spécifiques de la tumeur et permettre sa destruction. L'addition d'agonistes de CD40 va

permettre d'augmenter la maturation des DC et donc de potentialiser la réponse cytotoxique antitumorale (Liljenfeldt et al., 2014).

De plus, de récentes études montrent que la chimiothérapie entraîne une diminution du nombre des cellules myéloïdes suppressives levant ainsi l'inhibition de la réponse antitumorale locale induite par ces cellules (Tomihara et al., 2014). En effet, Les cellules myéloïdes suppressives sont des cellules généralement localisées à proximité des tumeurs qui inhibent les réponses immunitaires antitumorales.

a) Augmentation de l'effet pro-apoptotique de CD40

La chimiothérapie augmente également l'effet pro-apoptotique de CD40 en augmentant l'expression de récepteurs de mort à la surface des cellules cancéreuses. Par exemple, l'étude récente de Liljenfeldt et ses collaborateurs montre que la combinaison du 5-FU avec un adénovirus exprimant CD40L induit la surexpression du récepteur de mort Fas ce qui conduit à l'élimination des tumeurs de la vessie dans un modèle murin immunocompétent (Liljenfeldt et al., 2014).

b) Chirurgie et activation de CD40

Récemment une nouvelle stratégie consiste à associer un traitement visant à activer CD40 par des Acm lors d'une exérèse de la tumeur par chirurgie. Dans ce cas, les premières expériences chez la souris montrent que le traitement post chirurgical de souris, avec des anticorps agonistes de CD40 empêche le développement local et distal de nouvelles tumeurs (Byrne and Vonderheide, 2013). Cette observation très encourageante est évaluée maintenant en essai clinique.

4. Peut-on combiner des traitements ciblant les récepteurs CD40 et TRAIL-R dans une stratégie anti tumorale ?

A la vue du potentiel thérapeutique de TRAIL-R et de CD40, nous nous sommes demandé s'il est possible de combiner les molécules agonistes des TRAIL-Rs et de CD40 dans une stratégie anti tumorale.

4.1. Induction de la mort cellulaire par une synergie entre CD40 et TRAIL-R

Nous avons vu dans la partie précédente que le traitement de CLL avec un anticorps agoniste de CD40 ou une molécule rCD40L pouvait induire un arrêt de croissance de la tumeur et même son apoptose. Les CLL deviennent sensibles à l'apoptose induite par Fas ou TRAIL entre 3 à 5 jours après l'activation de CD40 (Chu et al., 2002). Les ligands de mort surexprimés agissent de façon paracrine ou autocrine sur les récepteurs de mort également surexprimés (Dicker et al., 2005; Eliopoulos et al., 2000).Le prétraitement des cellules cancéreuses avec un agoniste de CD40 pourrait donc être utilisé comme adjuvant à un second traitement avec des ligands synthétiques agonistes des récepteurs de mort

4.2. Augmentation de la réponse immunitaire anti-tumorale par association entre CD40 et TRAIL-R

L'équipe de Wajant (El-Mesery et al., 2013) a développé une protéine bi-fonctionnelle, qui consiste en la fusion de la région extracellulaire du variant soluble de TRAIL avec un fragment scFv (single chain variable fragment) provenant d'un anticorps anti-CD40. Dans leur étude, ils montrent que ce système permet d'activer les DC *via* un signal CD40 et d'induire l'apoptose des cellules tumorales. On peut imaginer ici que TRAIL en tuant les cellules tumorales va induire une mort immunogène qui augmentera la réponse immunitaire anti-tumorale en synergie avec le scFV anti-CD40 qui induit la maturation des DC. Cette capacité adjuvante de CD40 nous offre la possibilité de développer de nombreuses stratégies antitumorales très prometteuses (*cf.* discussion et perspectives).

4.3. Les limites de l'association entre CD40 et TRAIL-R

Plusieurs études ont montré que l'activation de CD40 pouvait protéger de l'apoptose induite par TRAIL dans une série de lymphomes. L'une d'elle montre par exemple, que l'activation de CD40 avec une molécule rCD40L protège les lymphomes folliculaires (LF) de l'apoptose induite par TRAIL en activant la voie de signalisation NFkB et la production de

protéines anti apoptotiques Bcl-xL et c-FLIP (Travert et al., 2008). Dans d'autres travaux, les auteurs ont étudié l'action de CD40 sur l'apoptose induite par TRAIL au niveau de trois lignées de lymphomes folliculaires correspondant à trois niveaux de maturation différents (Nuutinen et al., 2009). Leurs résultats indiquent que CD40 protège deux des LF contre l'apoptose induite par TRAIL. De manière surprenante dans la troisième lignée de LF, CD40 favorise l'apoptose. L'explication proposée est que l'action pro ou anti apoptotique de CD40 dépendrait de l'état de maturation des LF. Si les LF sont issus de centrocytes (LB des centres germinatifs où CD40 va induire la survie), l'activation de CD40 conduira à la survie de ces cellules. En revanche si les LF sont issus de LB où le signal CD40 favorise l'apoptose, l'utilisation d'agonistes de CD40 induit la mort cellulaire. En conclusion l'activité directe de CD40 semble dépendre de l'état physiopathologique de la cellule qui l'exprime. De plus nous avons vu précédemment que la valence du ligand semble orienter la réponse cellulaire et permettrait d'expliquer en partie l'hétérogénéité de la réponse induite par CD40 (*cf* paragraphe 3.5).

4.4. Association physique entre TRAIL-R et CD40 ?

L'activation de CD40 peut donc influencer la sensibilité à l'apoptose induite par TRAIL en activant des voies de signalisation de prolifération ou en produisant des molécules anti apoptotiques. Par ailleurs dans la littérature, nous avons vu que certains des récepteurs de la famille du TNF-R peuvent se lier entre eux et moduler la signalisation (Bossen et al., 2006). C'est le cas du récepteur TRAIL-R1 qui peut former des hétéromères avec TRAIL-R4 et bloquer l'apoptose induite par TRAIL. De plus certains ligands peuvent se lier à plusieurs récepteurs, il ne serait donc pas impossible que des récepteurs différents puissent former des hétéromères. C'est pour cette raison que nous avons étudié la possibilité que les récepteurs CD40 et TRAIL-R puissent interagir physiquement au niveau de la membrane plasmique et ainsi réguler la signalisation intracellulaire. Nous tenterons de répondre à cette question dans le chapitre 2.

<u>Partie 2</u> : Importance des interactions multivalentes entre ligands et récepteurs : la résonance plasmonique de surface et un biocapteur basé sur la fluorescence (Fluorescence-based biosensing) comme outils de mesure pour caractériser les interactions ligand-récepteur

En fonction de la nature du ligand qui peut engager plus ou moins de récepteurs, la valence de l'interaction ligand-récepteur peut changer et ainsi réguler la signalisation cellulaire induite. Une grande partie des travaux de ce manuscrit tend à caractériser ces interactions multivalentes. C'est pourquoi, il m'a semblé intéressant de résumer dans la partie suivante le principe de la Résonance Plasmonique de Surface (SPR) qui mesure les interactions dans des conditions acellulaires et le Ligand Tracer® qui permet de les mesurer à la surface des cellules vivantes.

1. La résonance plasmonique de surface comme outil de mesure pour caractériser les interactions entre récepteurs et ligands

1.1. Principe de la Résonance Plasmonique de Surface (SPR) (source : Biacore™ Assay Handbook)

Cette méthode d'analyse nécessite un instrument analytique (classiquement le Biacore®). Elle permet de calculer les vitesses d'association et de dissociation entre deux partenaires et d'en déduire la constante d'affinité caractéristique de l'interaction. Un des grands avantages de cette technique est qu'aucun des partenaires ne doit être marqué.
Pour mesurer les paramètres cinétiques, une surface « sensor » composée d'une matrice de dextran et d'une couche de verre, séparées par une fine couche métallique (le plus souvent de l'or) est utilisée (**Figure 22**). Un des deux partenaires est fixé dans la matrice de dextran. Il existe plusieurs moyens de fixer ce partenaire 1 par des liaisons covalentes, présentation *via* un anticorps, couplage biotine-streptavidine etc... Une solution du partenaire 2 est injectée en flux continu. Pour visualiser les interactions entre le ligand immobilisé et l'analyte en solution, le Biacore® utilise le principe de la SPR que je vais vous résumer ci-dessous de manière très simplifiée.

Un faisceau de lumière polarisée monochromatique est appliqué sur la surface « sensor », formée d'une fine couche d'or située entre deux milieux d'indice de réfraction différents (verre et liquide). Toute la lumière est réfléchie, il n'y a alors pas de réfraction mais

une composante électromagnétique de la lumière, l'onde évanescente se propage perpendiculairement à l'interface.

Sous certaines conditions, il y a résonance entre les électrons de l'or et l'onde évanescente ce qui se traduit par une diminution de l'intensité du faisceau réfléchi à un angle précis que l'on nomme **angle de résonance**. Un changement de masse sur la surface « sensor » va décaler la position de l'angle de résonance. La fixation d'un analyte sur un ligand porté par la surface va induire un changement de masse, la variation de l'angle de résonance qui en résulte sera directement proportionnelle à la quantité d'analyte fixée sur le ligand immobilisé.

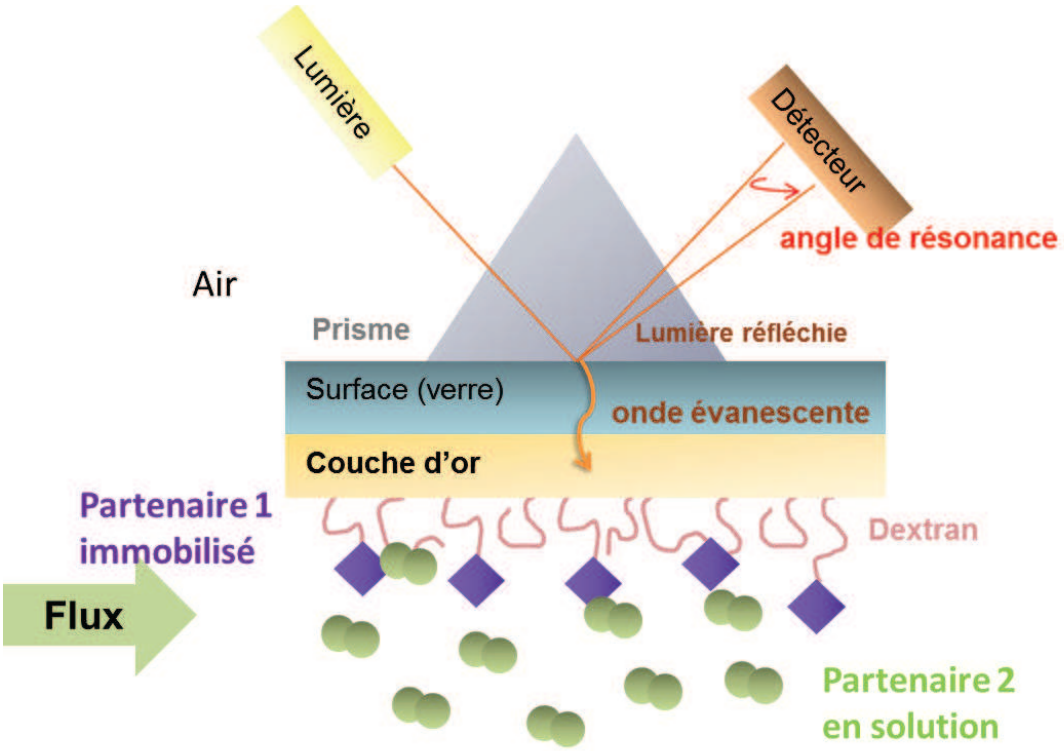


Figure 22 : Principe de la SPR. La SPR permet de calculer les vitesses d'association et de dissociation entre un partenaire immobilisé sur une surface « sensor » et l'autres partenaire injecté en solution, et d'en déduire la constante d'affinité caractéristique de l'interaction.

La mesure en temps réél des variations de l'angle de résonance par l'appareil, permet d'obtenir des courbes d'interactions appelées "sensorgrammes". La réponse (*R*) est exprimée en RU (Resonance Unit) en fonction du temps. La réponse peut être normalisée en fonction du poids moléculaire de l'analyte et est alors exprimée en fmol/mm² où 1 RU = 1pg/mm² dans le cas de protéines (**Figure 23**).

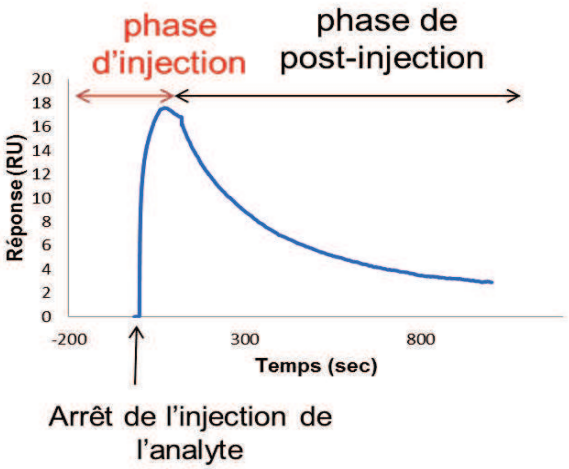


Figure 23 : sensogramme

1.2. Modélisations des interactions monovalentes et multivalentes et obtention des constantes cinétiques

Les cinétiques des sensogrammes sont analysées selon différents modèles mathématiques qui décrivent les interactions.

a) Interaction monovalente

Le modèle d'interaction le plus simple est un modèle 1 : 1 (Langmuir), par exemple entre un ligand [L] et un récepteur [R] monovalents. La formation du complexe [LR] est réversible et se caractérise donc par deux constantes cinétiques: la constante de vitesse de formation du complexe notée k_{on} (M^{-1} s^{-1}) et la constante de vitesse de dissociation du complexe notée k_{off} (s^{-1}). Le rapport de ces deux constantes de vitesse permet de calculer la constante de dissociation à l'équilibre KD : **$KD = [L].[R]/[LR] = k_{off}/k_{on}$.**

Le KD (M) reflète la concentration de ligand nécessaire pour occuper 50% des sites des récepteurs à l'équilibre. Cette valeur est classiquement utilisée pour décrire la force de liaison entre un L monovalent et R monovalent. Plus le KD sera petit meilleure sera l'affinité entre L et R.

Pour obtenir les constantes cinétiques et ainsi l'affinité d'une interaction ligand/récepteur, il faut ajuster par régression les valeurs de ces paramètres (k_{on}, k_{off}, ainsi que R_{max}) aux courbes expérimentales, réalisées pour différentes concentrations en ligand injecté. Dans le modèle de "Langmuir", la vitesse de l'interaction est décrite par l'équation:

$$dR/dt = k_{on}CR_{max}-(k_{on}C+k_{off})R$$

où R est la réponse à un temps donné (RU), C correspond à la concentration molaire de la molécule injectée et R_{max} est la réponse maximale de la surface en RU (chaque molécule immobilisée a fixé une molécule injectée).

b) Interaction multivalente

Une interaction multivalente est définie comme une interaction entre un ligand multivalent et un récepteur multivalent. D'autre part, une interaction multivalente peut aussi être observée entre un ligand multivalent et un récepteur monovalent fixé sur une surface. Dans le cas d'interactions multivalentes, les courbes cinétiques permettront d'évaluer l'avidité de l'interaction et non son affinité. L'avidité, est une mesure de la force de liaison entre l'ensemble des sites de reconnaissance de l'analyte et du ligand. Contrairement à une interaction de stœchiométrie 1 : 1, il y a de multiples possibilités de liaison entre L et R ce qui rend l'étude plus complexe. Effectivement, il est possible que les ligands multivalents se lient de manière partiellement multivalente et partiellement monovalente aux récepteurs immobilisés. De plus, prenons l'exemple d'une interaction entre un ligand et un récepteur, tous deux divalents. Les deux sites du ligand peuvent lier les deux sites d'un même récepteur (interaction intra-moléculaire) ou de deux récepteurs différents (interaction inter-moléculaire) (**Figure 24**). Ces interactions intermoléculaires peuvent conduire à la formation d'un complexe macromoléculaire dans lesquels les récepteurs sont oligomérisés. Les liaisons ne suivent pas nécessairement un réseau simple car des combinaisons de liaisons intra- et intermoléculaires sont également possibles.

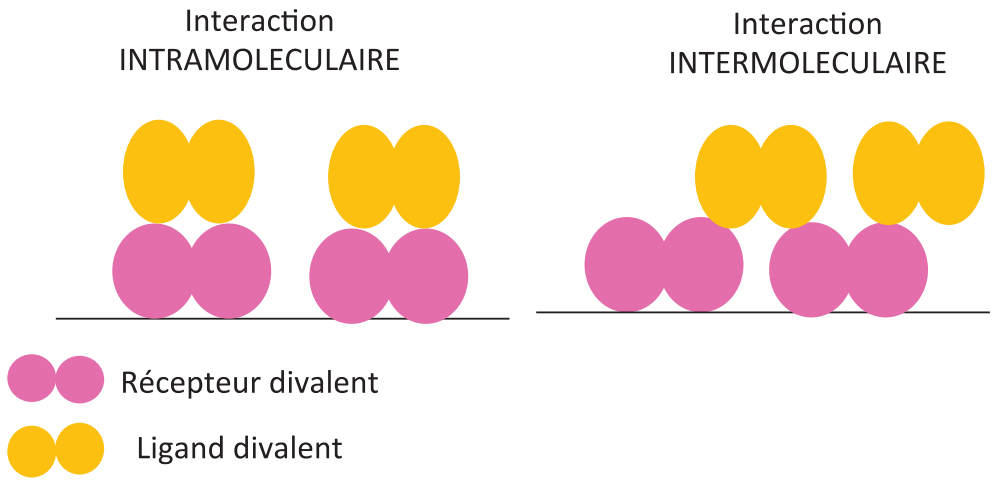


Figure 24 : Interactions intra et intermoléculaires. Les deux sites du ligand peuvent lier les deux sites d'un même récepteur (interaction intramoléculaire) ou de deux récepteurs différents (interaction intermoléculaire).

Il existe très peu de modèles mathématiques qui peuvent modéliser ces interactions multivalentes. Par défaut, les courbes d'interaction expérimentales sont souvent analysées avec un modèle simple d'interaction 1:1. Pour caractériser les interactions multivalentes dans nos études, nous avons aussi utilisé les modèles d'analyse « d'analyte bivalent » et « de ligand hétérogène » (BIAevaluation_Handbook, GE Healthcare). Le modèle d'analyte bivalent considère une interaction bivalente entre le partenaire immobilisé et le partenaire bivalent en solution (comme un anticorps par exemple). Ce modèle considère les interactions formées par les deux sites de la molécule injectée comme dépendantes, c'est-à-dire que la première interaction facilite la seconde. Le modèle d'interaction « hétérogène » décrit l'interaction entre une solution moléculaire homogène et deux molécules différentes immobilisées. Dans ce cas les interactions sont considérées indépendantes les unes des autres.

Dans la partie expérimentale de ce manuscrit, afin de caractériser au mieux les interactions entre nos ligands multivalents développés et le récepteur TRAIL-R2, nous avons à chaque fois évalué les courbes expérimentales avec le modèle de Langmuir ainsi qu'avec les modèles plus complexes. La valeur du Chi² est utilisée comme indicateur de confiance. Cependant, lorsqu'aucun de ces modèles ne permettait de modéliser parfaitement les courbes expérimentales (valeur de Chi²> 1), nous avons procédé à une modélisation (1:1) uniquement sur les phases de post injection.

2. Mesure des interactions L/R à la surface de la cellule, à l'aide d'un biocapteur basé sur la fluorescence

La SPR est un outil privilégié pour caractériser les interactions entre L et R. Cependant beaucoup de biologistes cellulaires s'interrogent sur la pertinence des informations obtenues par SPR. En effet, les constantes cinétiques et l'affinité sont obtenues sur des interactions « artificielles » où un récepteur recombinant est immobilisé sur une surface. Cette interaction peut ne pas refléter les interactions à la surface de la cellule. Pour tenter de répondre à cette problématique, nous avons utilisé une nouvelle technologie appelée Ligand Tracer® (Ridgeview Instruments AB) qui permet d'obtenir les constantes cinétiques d'interaction entre un ligand et les récepteurs directement exprimés à la surface des cellules vivantes. Cette technologie nécessite que le ligand soit marqué (radioactivement ou grâce à un fluorochrome).

Dans cette technique, les cellules vivantes sont immobilisées sur des lamelles collées localement dans une boîte de Pétri. Il est donc possible de faire les mesures d'interaction du

ligand sur plusieurs types cellulaires localisés à des endroits différents d'une même boite de Petri. La boîte de Petri contenant les cellules dans leur milieu nutritif est insérée dans un dispositif de rotation incliné puis le ligand marqué est ajouté dans le milieu (**Figure 25**). Le dispositif de rotation incliné permet de mettre en contact les cellules avec le ligand selon un intervalle de temps défini par l'expérimentateur. Un détecteur placé au-dessus du dispositif permet de capturer le signal fluorescent (ou radioactif) des ligands liés (les ligands non liés à la surface de la cellule sont éliminés du champ du détecteur par la rotation de l'appareil).

Ce système nous permet de mesurer la vitesse d'interaction entre L et R membranaire en temps réel. Pour observer la dissociation des complexes, il suffit de remplacer la solution de ligand marqué par du tampon pour mesurer la vitesse de dissociation des complexes. Ces informations nous donnent ensuite accès aux constantes cinétiques et à l'affinité du complexe L/R directement mesurée à la surface des cellules vivantes. Dans ce cas, ces valeurs cinétiques tiennent compte du nombre de récepteurs exprimés à la surface de la cellule et des potentiels mouvements membranaires des récepteurs. Cet avantage peut être aussi une limite car il ajoute un degré de complexité encore non maitrisé lors de l'interprétation des constantes cinétiques.

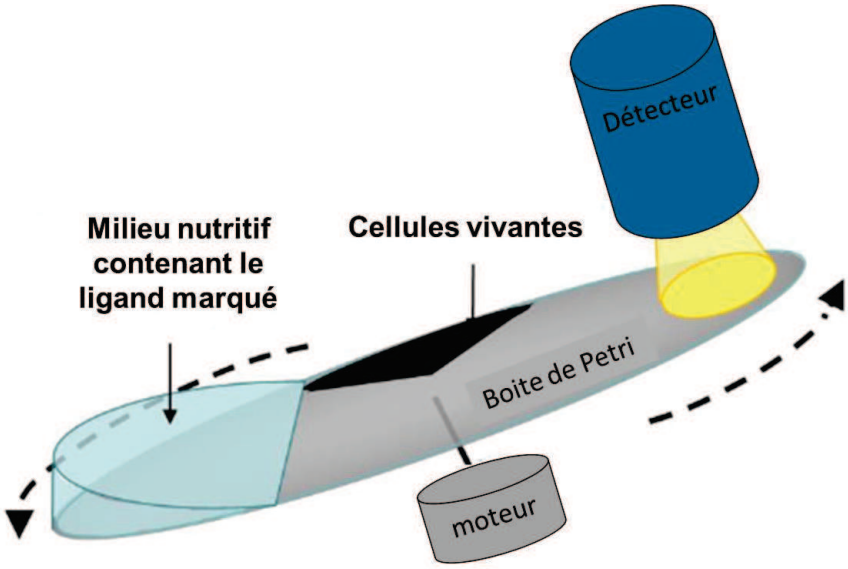


Figure 25 : Principe du Ligand Tracer : Les cellules vivantes sont immobilisées sur des lamelles collées localement dans une boîte de Pétri. La boîte de Petri contenant les cellules dans leur milieu nutritif est insérée dans un dispositif de rotation incliné puis le ligand marqué est ajouté dans le milieu. Le dispositif de rotation incliné permet de mettre en contact les cellules avec le ligand selon un intervalle de temps défini par l'expérimentateur. Un détecteur placé au-dessus du dispositif permet de capturer le signal fluorescent des ligands liés. Figure issue de la publication de (Bjorke and Andersson, 2006).

Les données cinétiques peuvent être analysées par régression non linéaire comme pour la SPR. Cependant nous avons utilisé un nouvel outil mathématique, « Interaction Map® » (Ridgeview Diagnostics AB) approprié pour analyser des données cinétiques dont la complexité résulte de l'existence de plusieurs interactions parallèles (par exemple un ligand liant avec des affinités différentes, différents récepteurs ou différentes formes du récepteur). Cet outil permet de décomposer les données cinétiques en ses composants individuels. L'analyse fournit des cartes d'interaction ($\log(k_{on})$ vs $\log(k_{off})$), où chaque pic représente l'un des composants de l'interaction entre la molécule fluorescente et les cellules. Il pourrait être adapté pour analyser l'hétérogénéité des interactions multivalentes.

B. ELIMINER LES CELLULES CANCEREUSES EN INDUISANT LEUR APOPTOSE PAR CHIMIOTHERAPIE A BASE DE PLATINE

1. La chimiothérapie

La chimiothérapie conventionnelle correspond aux médicaments chimiques cytotoxiques dont le mode d'action principal a pour cible les mécanismes impliqués dans la multiplication cellulaire, qu'elle soit normale ou néoplasique. Les drogues de chimiothérapie exercent leur action cytotoxique sur les cellules en phase de multiplication active. Il existe plusieurs classes pharmacologiques de chimiothérapie.

1.1. Les différentes familles de molécules de chimiothérapie

La classification suivante est issue de la classification thérapeutique du Vidal.

1.1.1. Les agents alkylants et apparentés

Les agents alkylants sont des composés très réactifs qui ont un effet cytotoxique en créant des liaisons covalentes avec un ou les 2 brins de l'ADN bloquant ainsi l'action des enzymes impliquées dans sa réplication. On retrouve dans ce groupe le fameux gaz de moutarde qui est le premier anticancéreux chimique découvert dans les années 1950 (Goodman et al., 1946).

On trouve également des dérivés du platine qui se fixent sur l'ADN et entraînent une modification de la structure de la double hélice induisant ainsi une inhibition de la réplication de l'ADN. Ce point sera discuté en détail dans le paragraphe 2.

1.1.2. Les inhibiteurs mitotiques

On retrouve dans ce groupe les vinca alkaloids et les taxanes. Les deux molécules typiques de la famille des vinca alkaloids sont la vinblastine et la vincristine, issues de la pervenche de Madagascar (*Catharanthus roseus).* Ce sont des poisons mitotiques qui empêchent la formation du fuseau mitotique en agissant sur les microtubules pendant la métaphase. Les taxanes dérivés de l'if (*Taxus baccata*) comme le Paclitaxel (Taxol®), empêchent la dépolymérisation de la tubuline.

1.1.3. Les anti-métabolites

Les anti-métabolites sont des analogues structuraux des métabolites impliqués dans la synthèse de l'ADN et de l'ARN. Par leur mode d'action, les anti-métabolites vont agir durant la phase S du cycle cellulaire. On retrouve dans ce groupe le fluorouracile (5-FU) qui se substitue à l'uracile ou le gemcitabine (Gemzar®) analogue des pyrimidines.

1.1.4. Les inhibiteurs de topoisomérase (dérivés de camptothécine ou d'étoposide)

Les inhibiteurs de topoisomérases vont bloquer l'action des topoisomérases qui sont des enzymes qui régulent le super-enroulement de la double hélice de l'ADN. Ils empêchent les cellules tumorales d'entrer en phase G2 du cycle cellulaire. Il existe des inhibiteurs de la topoisomérase I (Campto®) et de la topoisomérase II (Vepeside®).

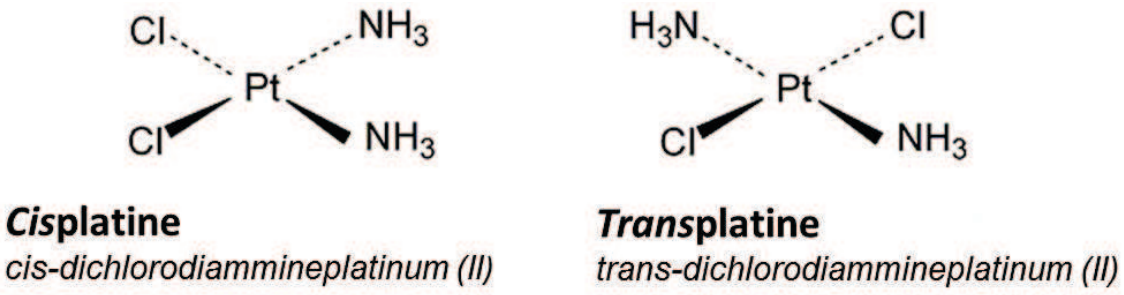
1.2. Les combothérapies

La chimiothérapie peut être utilisée de manière exclusive comme dans le traitement des lymphomes et des leucémies. Mais, le plus souvent les différentes classes de chimiothérapie, sont associées dans un même traitement. Ceci pour plusieurs raisons : *i)* cela permet de tuer un maximum de cellules tumorales sans atteindre le seuil de toxicité toléré pour chaque drogue par le patient, *ii)* cela limite les phénomènes de résistance *iii)* certaines drogues peuvent agir de manière synergiques et donc augmenter l'efficacité du traitement. La chimiothérapie peut être associée à d'autres stratégies anti-tumorales comme la chirurgie. En effet, elle peut être proposée avant une chirurgie (chimiothérapie néo-adjuvante) pour diminuer la taille de la tumeur et faciliter l'opération, ou après la chirurgie (chimiothérapie adjuvante) pour diminuer le risque de récidives locales ou distales. Des études ont également montré que la chimiothérapie peut augmenter la sensibilité des tumeurs à la radiothérapie. Par exemple, le *cis*platine empêche la réparation des dommages à l'ADN causés par la radiothérapie. Finalement, la radiothérapie est de plus en plus associée avec des thérapies ciblées.

2. Les dérivés du platine

2.1. Le *cis*platine

Le *cis*platine ou cis-diamminedichloroplatinium (II) est la première des molécules dérivées du platine à avoir été approuvée par la FDA (Food and Drug Administration's) en 1978, et commercialisée sous le nom de Platinol® (Lippman et al., 1973). Il est utilisé dans le traitement de nombreux cancers incluant les cancers ovariens, utérins, testiculaires, de la vessie, pulmonaires, des cervicales, des cellules squameuses, de la tête et du cou ainsi que les lymphomes non Hodgkiniens (Kelland, 2007). Le *cis*platine est un complexe organométallique contenant du platine qui possède un isomère le *trans*platine (**Figure 26**). Il peut se solubiliser dans l'eau et reste stable quelques heures à température ambiante.



***Cis*platine**
cis-dichlorodiammineplatinum (II)

***Trans*platine**
trans-dichlorodiammineplatinum (II)

Figure 26 : Le *cis*platine et le *trans*platine

a) Mécanisme d'action

De nombreuses études ont porté sur le mécanisme d'action du *cis*platine mais rien n'est encore très établi. Le mécanisme le plus probable est le suivant (**Figure 27**) : lors de l'injection, le *cis*platine reste stable dans les voies de circulation sanguines où la concentration en ions chlorure est relativement forte (100 mM), et empêche l'hydrolyse du composé (Kelland, 2007). Le *cis*platine entre ensuite dans la cellule selon trois voies *i)* par diffusion passive à travers la membrane *ii)* grâce à des transporteurs organiques cationiques ou/et *iii)* grâce aux protéines de transport du cuivre (Puckett et al., 2010). La diminution de la concentration en ions chlorure facilite alors l'hydrolyse du *cis*platine en un complexe très réactif.

Action sur les acides nucléiques

Ce complexe entre ensuite dans le noyau et interagit par substitution d'une molécule d'eau avec une des bases de l'ADN. Les liaisons avec l'ADN double brin forment des adduits. Dans la majorité des cas, les adduits sont formés au niveau de l'atome N7 de guanines adjacentes et quelques fois au niveau de l'atome N7 de l'adénine (les autres atomes étant

moins accessibles) (Jamieson and Lippard, 1999). Les adduits ADN-*cis*platine sont relativement stables, entraînent une distorsion de la double hélice qui perturbe la réplication et la transcription de l'ADN, bloquent le cycle cellulaire en phase S et G2 et enclenche la voie intrinsèque de l'apoptose (p53 dépendant). De plus, le *cis*platine peut également lier l'ARN et interférer dans la transcription, ce qui pourrait participer à l'effet cytotoxique du *cis*platine (Chapman and DeRose, 2010).

Action sur les protéines

Par ailleurs, plusieurs groupes s'interrogent quant à la possibilité d'autres cibles cellulaires du *cis*platine et de ses analogues. Récemment, des physiciens ont montré que l'isomère du *cis*platine, le *trans*platine peut se lier sur les protéines notamment sur l'albumine et la transferrine, qui sont des protéines présentes dans le sérum mais aussi sur des protéines impliquées dans la détoxification des métaux comme les métallothionéines (Casini and Reedijk, 2012; Cubo et al., 2010). Cependant la liaison des dérivés du platine aux protéines doit être confirmée *in vitro* et leurs mécanismes d'actions élucidés.

Action sur les mitochondries

Il ne serait pas impossible que le *cis*platine agisse également sur la membrane mitochondriale puisqu'il peut se lier aux phospholipides et phosphatidylsérines des membranes. En effet, des récentes études suggèrent que l'effet toxique du cisplatine serait également dû à une accumulation du platine dans la mitochondrie qui induit la libération d'espèces réactives à l'oxigène (ROS) conduisant à un dysfonctionnement de la mitochondrie puis à l'apoptose.

Type de mort cellulaire induite

Il est classiquement admis que le mécanisme de mort cellulaire mis en jeu par les dérivés du platine est l'apoptose (Gonzalez et al., 2001). Cependant, quelques études indiquent que les cellules tumorales traitées au *cis*platine peuvent mourir par nécrose. Il semblerait que la décision de la voie de mort cellulaire empruntée soit dépendante de la concentration du *cis*platine. En effet, des cellules murines primaires du tube proximal meurent par nécrose quelques heures après traitement avec de hautes doses de *cis*platine (800 µM) alors que ces mêmes cellules meurent par apoptose après plusieurs traitements au *cis*platine à faible concentration (8 µM) (Gonzalez et al., 2001). De plus, lorsque les cellules sont résistantes à l'apoptose, de fortes doses de cisplatine pourraient conduire à la mort des cellules par nécrose (Xu et al., 2014).

De plus, en se fixant aux phospholipides et phosphatidylsérines des membranes, le *cis*platine pourrait également induire le stress du RE en déstabilisant les protéines intracellulaires et conduire à la mort des cellules.

En conclusion, la cytotoxicité du *cis*platine ne semble pas être uniquement provoquée par les dommages à l'ADN mais également par des dommages au niveau des protéines (Martins et al., 2011) et de la mitochondrie. De plus, en fonction de la fréquence et de la dose des traitements, le *cis*platine induirait la mort des cellules par apoptose ou nécrose. Il n'est pas non plus impossible que le *cis*platine tue les cellules *via* la nécrose programmée mais aucune étude n'a encore été réalisée.

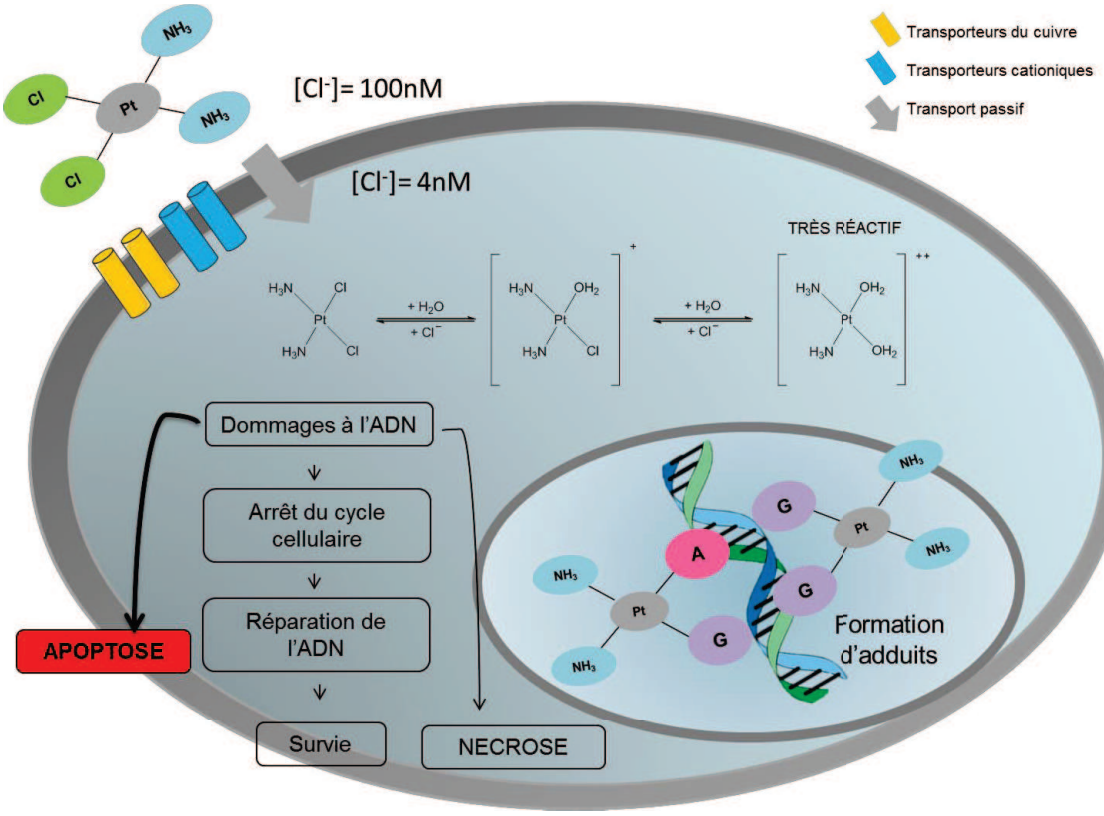


Figure 27 : Mécanisme d'action du *cis*platine Le *cis*platine entre dans la cellule selon trois voies *i)* par diffusion passive à travers la membrane *ii)* grâce à des transporteurs organiques cationiques *iii)* grâce aux protéines de transport du cuivre, puis est hydrolysé en un complexe très réactif. Ce complexe entre ensuite dans le noyau et interagit par substitution d'une molécule d'eau avec une des bases de l'ADN entraînant une distorsion de la double hélice qui perturbe la réplication et la transcription de l'ADN, bloque le cycle cellulaire en phase S et G2 et enclenche la voie intrinsèque de l'apoptose.

b) Résistances des cellules cancéreuses au cisplatine

Certaines cellules cancéreuses peuvent être résistantes au *cis*platine ou acquérir des résistances pendant les traitements. Les mutations génétiques, les modifications épigénétiques et l'épissage alternatifs fréquents dans les cellules cancéreuses sont souvent à l'origine des résistantes acquises aux drogues de chimiothérapie. Ces résistances peuvent apparaître à plusieurs niveaux cellulaires (revue dans (Galluzzi et al., 2012)).

La première résistance possible peut être l'incapacité du *cis*platine à atteindre le noyau cellulaire, et ceci *via* plusieurs types de mécanismes. Par exemple, dans certaines cellules cancéreuses, des protéines transmembranaires de transport prenant en charge le *cis*platine peuvent être mutées et ainsi limiter l'entrée du *cis*platine dans la cellule (Ishida et al., 2010; Nakayama et al., 2002). Dans d'autres cas, les mécanismes qui vont permettre la détoxification des métaux au sein de la cellule peuvent être impliqués. Dans ce cas, une fois dans la cellule, le *cis*platine peut être complexé avec le glutathion ou les métallothioneines (qui sont impliqués dans les mécanismes de détoxification des métaux lourds) et être ainsi éliminé de la cellule. Il a, en effet, été montré que certaines cellules cancéreuses résistantes au *cis*platine ont une concentration de glutathion particulièrement élevé (Hrubisko et al., 1993).

Un second niveau de résistance peut avoir lieu au niveau de l'ADN. Les adduits ADN-platine, engendrent l'activation des mécanismes de réparation de l'ADN incluant la réparation par excision de nucléotides (NER) suivi de la réparation par recombinaison homologue (HR) lorsqu'elle est nécessaire. Le NER est un mécanisme qui permet de reconnaître les torsions de l'ADN qui peuvent être induites par des éléments de notre alimentation, de notre environnement mais aussi par le *cis*platine. L'ADN est déroulé au niveau de la torsion par un mécanisme qui fait intervenir des endonucléases qui vont inciser l'ADN de part et d'autre de la torsion puis re-synthétiser et lier le fragment manquant. Cette réparation permet de restaurer le cycle cellulaire.

Une troisième niveau de résistance est associé à des dérégulations des voies de signalisation de la prolifération cellulaire telles que MAP/Erk ou bien évidemment des dérégulations au niveau de l'apoptose (Brozovic and Osmak, 2007; Wang et al., 2000; Yeh et al., 2002). La mutation la plus répandue de la voie d'apoptose affecte le facteur de transcription p53 (50% des cellules cancéreuses sont mutées sur P53) qui est activé suite à l'arrêt du cycle cellulaire dû aux adduits et qui va initier la voie intrinsèque de l'apoptose (Kirsch and Kastan, 1998; Vousden and Lane, 2007). L'altération des facteurs de la voie intrinsèque et/ou extrinsèque de l'apoptose (Bcl2, caspases…) va aussi déterminer la sensibilité des cellules cancéreuses à la mort par le *cis*platine (Janson et al., 2010; Tajeddine et al., 2008) (**Figure 28**).

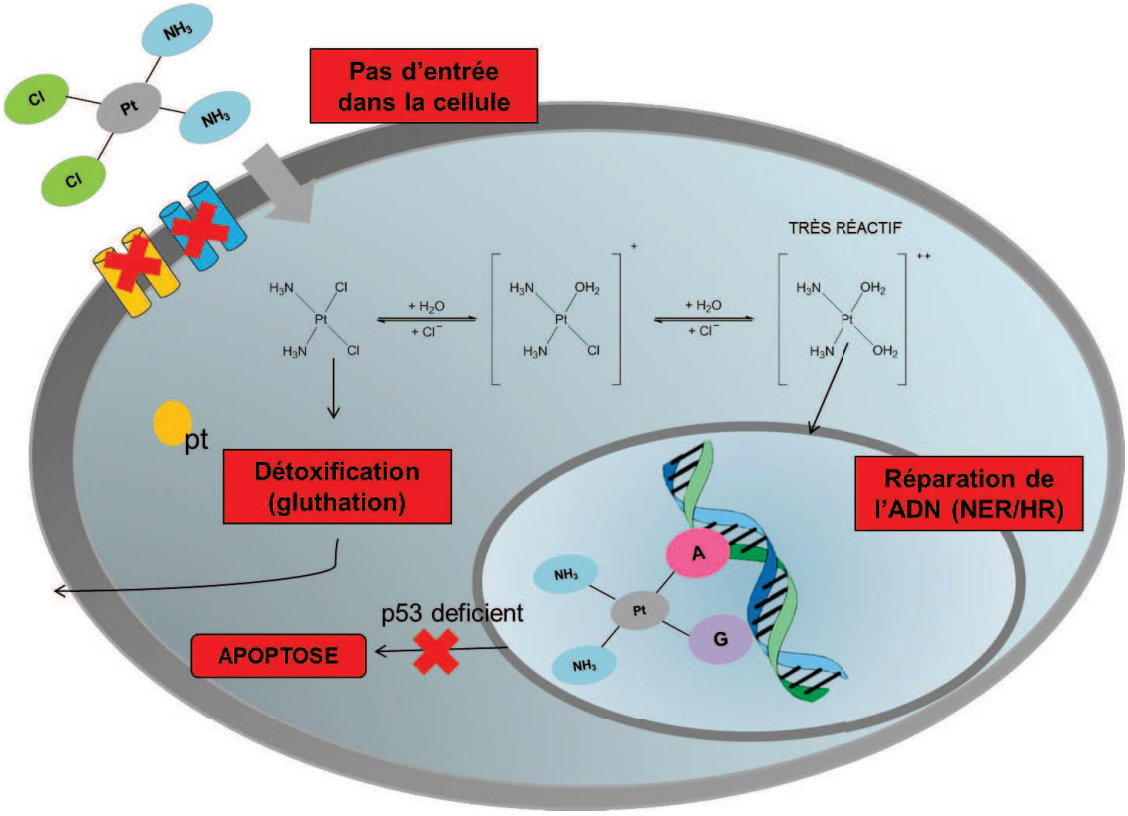


Figure 28 : Mécanisme de résistance au *cis*platine. Illustrations des principales dérégulations dans les cellules cancéreuses conduisant à une résistance au *cis*platine.

2.1.2. Analogues du *cis*platine utilisés en cancérologie

Afin d'améliorer le traitement à base de platine, les chercheurs ont développé de nombreux analogues du cisplatine. Les plus utilisés aujourd'hui en clinique sont le carboplatine et l'oxaliplatine (**Figure 29**).

a) Le carboplatine

Le carboplatine correspond à la seconde génération de dérivés du platine. Il a été produit dans le but *i)* de pallier à la résistance cellulaire au *cis*platine *ii)* d'élargir les types de cancers à traiter *iii*) de diminuer la toxicité du *cis*platine. La structure du carboplatine (Paraplatin®) diffère de celle du *cis*platine par la présence d'un ligand bidentate cyclobutane-di-carboxylate qui permet de limiter l'action de détoxification *via* le glutathion dans la cellule. Il peut être administré à de plus fortes doses que le *cis*platine (300-450 mg/mm² vs 20-120mg/mm² pour le *cis*platine) sans induire de toxicité pour les cellules saines. Il forme les mêmes adduits que le *cis*platine et soigne les mêmes types de cancers à l'exception du cancer ovarien où le carboplatine est le dérivés du platine le plus prescrit (Laurie et al., 2010).

b) L'oxaliplatine

L'oxaliplatine est un dérivé du platine de troisième génération et la première drogue à surmonter les résistances cellulaires au *cis*platine (Stordal et al., 2007). Il forme des adduits intra-brin au niveau des séquences CpG et évite ainsi les mécanismes de réparation de l'ADN (Kasparkova et al., 2008). Son spectre d'activité est plus large que celui du *cis*platine. Il est utilisé couramment dans le traitement adjuvant ou métastatique des cancers colorectaux (en combinaison avec le 5-FU et l'acide folinique).

D'autres analogues du *cis*platine sont commercialisés comme le Nedaplatin® utilisé au Japon, le Lobaplatin® en Chine, et l'Heptaplatin® en Corée. Des dizaines de drogues dérivés du platine sont évaluées aujourd'hui en essais cliniques (Wheate et al., 2010).

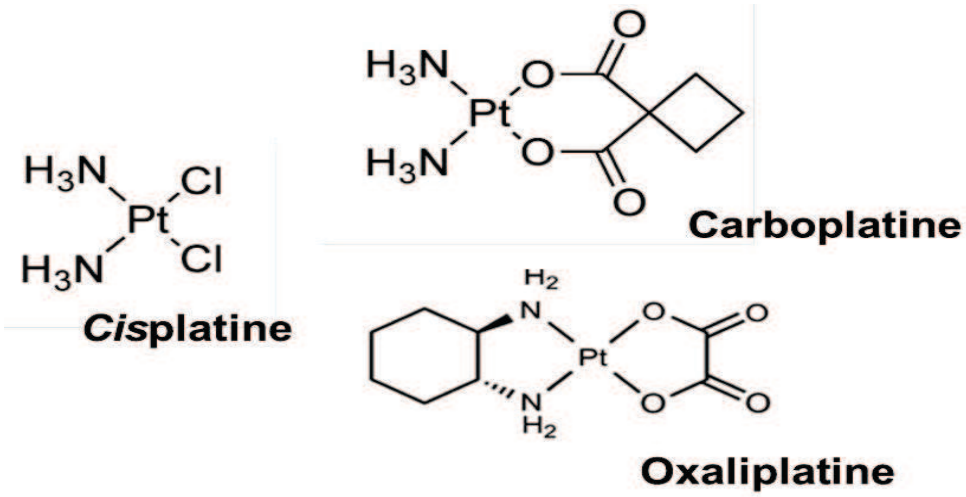


Figure 29 : Les analogues du *cis*platine

2.1.3. Les avantages et les limites de l'utilisation des dérivés du platine en cancérologie

Les dérivés du platine comme les autres drogues de chimiothérapie sont indispensables en thérapie des cancers. En 2014, en France 287 825 personnes ont eu une hospitalisation pour/avec chimiothérapie antitumorale, soit une hausse de 2,1% par rapport à 2011 (source Fondation ARC). La chimiothérapie est un traitement peu coûteux (15% des dépenses des anticancéreux, source : Fondation ARC) et efficace pour de nombreux types de cancer. De plus, les dérivés du platine restent très utiles en combinaison avec la chirurgie, la radiothérapie et les thérapies ciblées. Ils permettent par exemple de restaurer la sensibilité des cellules cancéreuses à l'apoptose induite par TRAIL dont il est question dans la partie A de l'introduction.

L'utilisation des dérivés du platine en oncologie est néanmoins limitée. En effet, la chimiothérapie affecte les cellules à forte capacité proliférative et de ce fait, n'est pas un traitement spécifique des cellules cancéreuses mais peut également affecter des cellules saines telles que les cellules germinales, les cellules de la moelle osseuse, les cellules des muqueuses... Cet effet sur les cellules saines est à l'origine de nombreux effets secondaires incluant la myélosuppression, la stérilité, des diarrhées et des vomissements. De plus, le *cis*platine présente une néphrotoxicité, une neurotoxicité, et une ototoxicité sévère (Kelland, 2007). L'utilisation des dérivés du platine peut être aussi limitée par les phénomènes de résistances intrinsèques ou acquises développés ci-dessus (2.1.1 b). Cependant, les dérivés du platine de seconde et troisième génération comme l'oxaliplatine présentent moins de toxicité et peuvent éviter certains mécanismes de résistance au *cis*platine (Stordal et al., 2007).
Enfin, ces limitations peuvent être palliées grâce à l'identification de marqueurs de sensibilité ou de résistance chez le patient avant de choisir le traitement (Zitvogel et al., 2011).

2.2. Développement de nouveaux dérivés de platines vectorisés

De nombreux laboratoires tentent de développer de nouveaux dérivés du platine plus stables et moins toxiques. Pour cela, plusieurs stratégies sont possibles qui vont "vectoriser" le *cis*platine pour améliorer sa stabilité et sa solubilité et/ou ajouter des agents de ciblage des cellules cancéreuses pour limiter les toxicités sur les cellules saines (revue dans (Butler and Sadler, 2013; Oberoi et al., 2013; Wang and Guo, 2013)).

a) Incorporation dans des vecteurs

Dans ce cadre, le *cis*platine ou ses analogues sont incorporés au niveau de vecteurs polymériques (liposomes, nanotubes de carbones ou nanoparticules) par encapsulation, liaisons covalentes ou complexation. Des carbohydrates, du bis-phosphonate et bien d'autres polymères peuvent également servir de vecteur. Du polyéthylène glycol (PEG) est souvent ajouté sur ces vecteurs pour augmenter la solubilité des complexes mais aussi pour réduire la rétention dans le système réticulo-endothéliale du foie et de la rate (Dancey and Chen, 2006). Chaque vecteur, de par ses caractéristiques biologiques, va moduler la solubilité, la biodistribution et la toxicité du platine. Par exemple, le Lipoplatin® aujourd'hui évalué en phase III d'essais cliniques annonces des résultats très encourageants (**Figure 30**). Dans la formulation du Lipoplatin®, le *cis*platine est encapsulé dans le cœur d'un liposome. Le liposome est composé de dipalmitoyl phosphatidyl glycerol qui est chargé négativement et permet la fusion avec la membrane cellulaire. Ainsi le Lipoplatin® rentre dans la cellule par fusion et évite donc les résistances liées aux transporteurs. Le liposome contient également des groupements PEG qui augmentent sa biodistribution. Enfin, de par sa taille (100 nM), le Lipoplatin® peut infiltrer les tumeurs. Le Lipoplatin® semble avoir moins d'effets toxiques sur les cellules saines et a, de plus, l'avantage de traverser la barrière hémato-encéphalique ce qui permet d'envisager le traitement des cancers de la tête particulièrement difficiles à atteindre (Jehn et al., 2007).

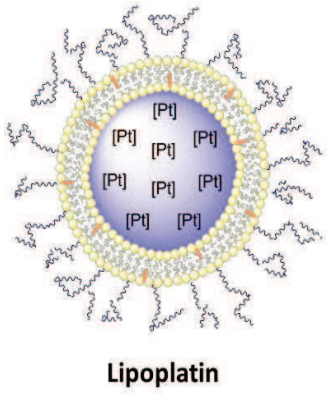


Figure 30 : Le lipoplatine®

b) Ciblage des cellules tumorales

Par ailleurs, un des avantages des vecteurs développés, est qu'ils peuvent être fonctionnalisés avec des molécules de ciblage des cellules tumorales. Plusieurs cibles ont été proposées dans la littérature. Il est possible, par exemple, d'ajouter un anticorps spécifique de l'antigène PSMA (Prostate Specific Membrane Antigen) surexprimé à la surface des cellules tumorales de la prostate (Ross et al., 2003). De la même manière, les récepteurs à l'œstrogène sont surexprimés dans 40% des cancers hormonaux dépendants chez la femme, tels que le cancer du sein (60-70%), de l'utérus (70-73%) et des ovaires (61%) (Jemal et al., 2010). Il existe aussi des peptides dont la séquence RGD (Arg-Gly-Asp) lie les intégrines $\alpha_V\beta_3$ et $\alpha_V\beta_5$ qui sont surexprimées sur la membrane cellulaires de nombreuses cellules cancéreuses et sont directement impliquées dans l'angiogenèse (Marelli et al., 2013).

3. Les complexes de Platine/Carbène-N-hétérocycliques comme agent antitumorale

3.1. Les carbènes-N-hétérocycliques

Parmi les nombreux ligands récemment développés en chimie organométallique, les carbènes N-hétérocycliques (NHCs) sont très prometteurs pour la thérapie des cancers. Les NHCs sont des ligands neutres possédant un carbone divalent à six électrons de valence, compris dans un cycle comprenant au moins un azote. Il existe plusieurs familles de NHCs (imidazolydenne, imidazolinylidene, benzimidazolylidene, triazolylidene…) (**Figure 31**). Ils peuvent se coordonner avec des métaux de transition pour former des complexes NHC-métal très stables (Bourissou et al., 2000; Marion et al., 2009). Ces complexes ont été développés dans un premier temps pour la catalyse en chimie organométallique. Les premières applications dans le domaine biologique concernent des complexes NHC-(Ag, Au, Ru ou Rh) possédant des propriétés antimicrobiennes et antifongiques (Cetinkaya et al., 1996).

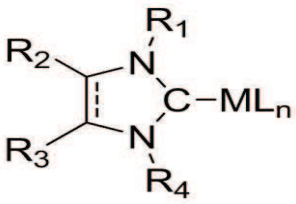


Figure 31 : Les carbènes-N-hétérocycliques. Les NHCs sont des ligands neutres possédant un carbone divalent à six électrons de valence, compris dans un cycle comprenant un azote. Ils peuvent se coordonner avec des métaux de transition (**M**) pour former des complexes NHC métal stables. Il est possible de fonctionnaliser les NHCs au niveau des groupements **R**.

3.2. Les complexes Platine/Carbène-N-hétérocycliques en thérapie des cancers

3.2.1. Activité anti-tumorales des NHC-Pt (II)

Récemment, plusieurs études ont montré le potentiel antitumoral des complexes NHC-métal. Plusieurs métaux ont été étudiés comme l'or, l'argent le cuivre, le palladium, le ruthénium et le platine. Parmi tous ces complexes, ceux contenant de l'or ou du platine sont les plus développés (Aher et al., 2014). L'équipe de Marinetti (Skander et al., 2010), a montré *in vitro* une cytotoxicité d'une série de complexes *trans*platine-NHC (Pt(II)-NHC) de formule générale $NHCPtX_2(L)$ (où L= amine, iode ou bromide) sur différentes lignées tumorales. Ils ont montré que ces complexes induisent la mort des cellules de la lignée leucémique CCRF-CEM et du cancer pulmonaire NCl-H460 sensible au *cis*platine de manière équivalente ou plus efficace que le *cis*platine (de l'ordre du µM). Les complexes NHCPtX2(L) où L = iode ont une meilleure activité cytotoxique que les autres. De plus, ces composés sont capables de tuer les cellules tumorales résistantes au traitement classique de *cis*platine (SKOV3, CH1/DDP, A2780/DDP). Les composés Pt(II)-NHC présentent une géométrie *trans* et non *cis* imposée par le ligand carbène. De manière étonnante ces composés ont une cytotoxicité cellulaire alors que l'isomère *trans* du platine seul n'en a pas (Coluccia and Natile, 2007).

3.2.2. Mode d'action des NHC-Pt (II)

Très peu d'études ont été réalisées sur les mécanismes d'action des complexes Pt(II)-NHC et elles sont généralement incomplètes. Il semblerait que ces complexes utilisent les mêmes mécanismes que le *cis*platine mais ils formeraient des adduits différents qui seraient moins bien reconnus par les mécanismes de réparation de l'ADN ce qui pourrait expliquer l'activité cytotoxique de ces complexes sur les cellules résistante au *cis*platine. Il sera indispensable à l'avenir de caractériser les mécanismes d'action des complexes Pt(II)-NHC dont les propriétés semblent être dépendantes de la nature du métal et de la famille de NHC. Quelques exemples sont cités ci-dessous :

- La cyclométallation du Pt (II) (en d'autres termes la formation de ponts au niveau du Pt (II)) sur le complexe Pt(II)-NHC change radicalement le mécanisme d'action du platine. Ce composé va se loger préférentiellement dans le cytoplasme où il inhibe l'activité de la survivine (un inhibiteur de l'apoptose appartenant à la famille des IAPs) et active la polymérase (ADPribose) (PARP) pour induire l'apoptose. Ce composé injecté à 3 mg/kg inhibe la croissance de cellules tumorales NCI-H460 implantées dans un modèle de souris immunodéficientes (Sun et al., 2011).

- Les complexes NHC couplés au *trans*platine, développés par l'équipe de Marietti (Chtchigrovsky et al., 2013), induisent de manière surprenante, l'apoptose des cellules d'un carcinome ovarien (A2780) non pas par la voie classique intrinsèque induite par les drogues de chimiothérapie mais par une voie caspase indépendante en libérant le facteur IAF (Inducing Apoptosis Factor) (Cande et al., 2004). Le facteur AIF est une des molécules apoptogènes libérées de la mitochondrie vers le cytosol puis vers le noyau.

3.2.3. Les complexes NHC-Pt (II) pour cibler les cellules tumorales?

Les complexes NHC-métal permettent de stabiliser le platine, et sont des ligands non toxiques fonctionnalisables (Chardon et al., 2011). Il est, en effet, possible de greffer sur l'hétérocycle des molécules de ciblage des cellules cancéreuses et/ou des molécules qui favorisent la solubilité. L'équipe du Dr Stéphane Bellemin-Laponnaz avec qui nous travaillons a par exemple fonctionnalisé un complexe Pt(II)-NHC avec un œstrogène afin de cibler les cellules cancéreuses œstrogène dépendantes (Chardon et al., 2011). L'ajout d'un élément fluorescent ou d'un élément radioactif au niveau de ces structures permettrait des applications en imagerie médicale dans le traitement de cellules cancéreuses (Chardon et al., 2013). Dans le chapitre 3, nous décrivons des travaux au cours desquels nous avons ajouté des polyethyimines (PEI) afin d'augmenter la solubilité des complexes Pt(II)-NHC et évalué leur potentiel antitumoral *in vitro* et *in vivo*.

CONTEXTE ET OBJECTIFS DU PROJET DE THESE

La majorité des traitements anticancéreux actuels sont efficaces mais ne sont pas spécifiques des cellules tumorales et engendrent de lourds effets secondaires. Les ligands de la super famille du TNF et leurs récepteurs qui régulent la prolifération et la mort des cellules constituent des molécules idéales pour une thérapie ciblée des cancers. Parmi ces ligands, la molécule TRAIL est très intéressante car elle induit l'apoptose des cellules tumorales en épargnant les cellules saines. TRAIL interagit avec 2 récepteurs de mort TRAIL-R1 et TRAIL-R2 pour induire l'apoptose et avec 2 récepteurs qui agissent comme des inhibiteurs, TRAIL-R3 et TRAIL-R4. La molécule CD40L, membre de la même superfamille, est aussi très prometteuse. En effet, outre son rôle clé dans l'activation de la réponse immunitaire adaptative, CD40L peut également induire l'apoptose des cellules cancéreuses qui expriment le récepteur CD40.

Actuellement, des stratégies utilisant des anticorps ciblant les TRAIL-R ou CD40 ou encore des molécules TRAIL ou CD40L recombinantes, sont évaluées en essais cliniques de phase II. Malgré leur intérêt thérapeutique certain, l'utilisation de TRAIL et de CD40L s'est avérée complexe. En effet, ces ligands sont trimériques et interagissent de manière multivalente avec leurs récepteurs à la surface de la cellule. Cette interaction multivalente est déterminante pour la modulation de la signalisation intracellulaire et par conséquent, pour la réponse cellulaire. Par exemple, il a été montré que, selon le degré de multivalence de l'interaction, CD40L peut induire soit la mort des cellules tumorales soit leur prolifération. Plusieurs études démontrent que des ligands de faible valence comme les Ab anti-CD40 (divalents) ou les molécules CD40L recombinantes trimériques induisent la prolifération cellulaire. A contrario, des molécules recombinantes à forte valence telles que des molécules recombinantes trimériques, dimérisées par pontage moléculaire (hexamères), favorisent l'apoptose. L'apoptose induite par TRAIL est également dépendante de la valence du ligand car la molécule TRAIL doit être au minimum hexamèrique pour induire l'apoptose via le récepteur TRAIL-R2.

Par ailleurs, certaines cellules cancéreuses peuvent être résistantes à l'apoptose induite par TRAIL. Mais ce phénomène peut être pallié en associant une thérapie TRAIL (rhTRAIL ou mAb) avec des agents de chimiothérapie tels que l'oxaliplatine et le carboplatine.

Mon équipe de thèse, en collaboration avec une équipe de chimistes (UMR 5248, IECB, Bordeaux), développe de nouveaux ligands peptidiques synthétiques multivalents spécifiques des récepteurs de TRAIL et de CD40L dont la multivalence peut être finement contrôlée. Ces ligands pourront, d'une part, nous permettre de comprendre la relation entre la multivalence et l'effet cellulaire et d'autre part, être utilisés comme de nouveaux médicaments anticancéreux pour une thérapie ciblée. En parallèle, une seconde équipe de chimistes spécialisée dans la chimie des métaux (UMR 7504, IPCMS, Strasbourg), développe des dérivés du platine qui pourront être utilisé en association avec les peptides de TRAIL-R.

Dans ce cadre, mon projet de thèse avait pour objectif de développer des ligands ciblant les récepteurs TRAIL-R2 et CD40 pour induire efficacement l'apoptose des cellules cancéreuses. Ce projet a consisté à caractériser les interactions entre les récepteurs TRAIL-R2 ou CD40 au niveau de la membrane à l'aide de ligands synthétiques multivalents, pour comprendre l'impact de l'oligomérisation des récepteurs dans l'induction de la signalisation intracellulaire. Ce projet s'est divisé en 3 objectifs dont les résultats sont présentés dans les chapitres 1, 2 et 3.

Objectif 1 : Développer et évaluer l'activité anti tumorale de nouveaux ligands synthétiques multivalents du récepteur TRAIL-R2

Lors de mon arrivée, des peptides cycliques spécifiques du récepteur humain TRAIL-R2 venaient d'être identifiés. Notre équipe en collaboration avec des chimistes avaient dimérisé et trimérisé ces peptides puis les avait évalués pour leur efficacité anti-tumorale *in vitro* et *in vivo* dans un modèle murin de xénogreffe (Pavet et al., 2010). Cependant, ces peptides trimériques n'étaient pas apoptogéniques sur toutes les lignées cellulaires qui étaient sensibles à la molécule TRAIL recombinante. Nous avons émis l'hypothèse que cela était dû au faible degré d'oligomérisation du ligand synthétique qui ne recrutait pas le nombre de récepteurs TRAIL-R nécessaires à l'induction de l'apoptose **(Chapitre 1, article 2 en préparation)**.

J'ai donc utilisé deux types de plateformes chimiques pour augmenter l'oligomérisation des peptides ligands de TRAIL-R2 et donc augmenter leur efficacité biologique : *i)* une plateforme "adamentane" qui permettait d'obtenir un ligand hexamèrique **(Chapitre 1, article 3** publié dans Biochemestry en 2013) et *ii)* une plateforme d'hélices oligourées qui permettent de fixer nos peptides selon une géométrie choisie **(Chapitre 1, article 4 en préparation)**.

Par ailleurs dans le but d'améliorer la stabilité des peptides cycliques *in vivo*, nous avons développé un analogue des peptides décrit dans (Pavet et al., 2010) qui présente l'avantage d'être cyclisé par une liaison thioéther à la place des ponts disulfures et serait donc moins sensible à la réduction en milieu intracellulaire. Ces résultats sont décrits dans le Chapitre 1, article 1.

Objectif 2 : Caractériser les interactions entre les récepteurs TRAIL-R2/CD40 et leurs ligands et comprendre leur effet sur la signalisation intracellulaire

Le second objectif de ma thèse est de comprendre comment les interactions multivalentes à la surface de la cellule peuvent moduler la signalisation cellulaire et donc l'effet biologique. Dans ce but j'ai travaillé sur 2 aspects de la problématique :

1) sous quelle forme est présent le récepteur au niveau de la membrane cellulaire ?

2) comment caractériser les interactions multivalentes entre ligand et récepteur à la surface de la cellule et quel est leur impact sur la signalisation cellulaire ?

1) Analyser l'état d'oligomérisation des récepteurs à la surface cellulaire

Sachant que le dégré d'oligomérisation de CD40 était crucial dans la signalisation induite par son pontage, nous nous sommes tout d'abord interrogés sur l'état d'oligomérisation du récepteur CD40 à la surface cellulaire à l'état physiologique. Nous souhaitions savoir si CD40 est déjà oligomérisé à la membrane, en absence de son ligand, et si cela peut avoir un effet sur la signalisation intracellulaire. Ces travaux sont détaillés dans le **chapitre 2 article 5** (publié dans The Journal of Biological Chemistry en 2013).

Au cours de ces recherches, nous avons également montré qu'il existait des interactions entre les récepteurs de la famille du TNF-R. En effet, le récepteur CD40, en l'absence de CD40L peut former des hétéro-oligomères à la surface de la cellule avec les récepteurs de mort TRAIL-R ou Fas. De plus, nos résultats indiquent que ces hétéro-oligomères modulent la signalisation intracellulaire induite par CD40L. Ces travaux nous ont montré l'intérêt d'analyser les interactions entre les ligands et les récepteurs directement à la surface cellulaire et sont détaillé dans le **chapitre 2, article 4 (en révision et resoumis dans cell death and differentiation)**.

2) Caractérisation des interactions entre les ligands peptides de TRAIL-R2 et le récepteur TRAIL-R2

Cet objectif tentait de caractériser les interactions entre les peptides ligands de TRAIL-R2 et TRAIL-R2 pour comprendre l'impact des ligands multivalents sur l'oligomérisation de TRAIL-R2 et la corrélation entre cette oligomérisation et la réponse intracellulaire. Pour caractériser les interactions entre ligands et récepteurs, j'ai utilisé la technique de Résonance Plasmonique de Surface (SPR) qui permet d'obtenir les constantes cinétiques d'interactions entre les ligands peptidiques en solution et le récepteur TRAIL-R2 immobilisés sur une surface ainsi qu'une technologie récente appelée Ligand Tracer® (LT), qui permet d'analyser les interactions directement à la surface des cellules vivantes. Ces analyses ont été corrélées avec une étude de l'activité pro-apoptotique des ligands. Ces travaux sont détaillés dans le chapitre **2 article 6 (en préparation).**

Objectif 3 : Evaluer le potentiel thérapeutique de dérivés innovants de platine en vue d'une combo thérapie avec les peptides spécifiques de TRAIL-R2

Les dérivés du platine représentent un des traitements les plus utilisés pour la thérapie des cancers mais sont limités par leur instabilité, leur manque de solubilité et engendrent beaucoup d'effets secondaires. Dans ce cadre, l'équipe du Dr Stéphane Bellemin-Laponnaz

(UMR 7504, Cronenbourg) avec qui nous collaborons, développent des molécules dérivées de platine. Ils utilisent des carbènes N-hétérocycliques (NHC) qui ont la caractéristique de créer des liaisons covalentes très stables avec les métaux comme le platine. Durant ma thèse j'ai évalué le potentiel thérapeutique de ces ligands en vue d'une thérapie combinée avec les peptides ligands de TRAIL-R2. Ces travaux font l'objet **du chapitre 3 et de l'article 7 en préparation**.

RESULTATS

CHAPITRE 1

Développement de ligands peptidiques multivalents spécifiques du récepteur TRAIL-R2 pour induire efficacement l'apoptose

Lors de mon arrivée, des peptides cycliques **1**, **2** et **3**, spécifiques du récepteur humain TRAIL-R2 venaient d'être identifiés par phage display (Li et al., 2006). Notre équipe en collaboration avec des chimistes avaient dimérisé et trimérisé ces peptides puis les avait évalués pour leur efficacité anti tumorale *in vitro* et *in vivo* dans un modèle murin de xénogreffe portant des tumeurs d'un cancer colorectal humain (Pavet et al., 2010).

Dans le but d'améliorer la stabilité des peptides cycliques *in vivo*, les chimistes ont réussi à synthétiser un analogue du peptide **1** qui présente l'avantage d'être cyclisé par une liaison thioéther à la place des ponts disulfures et serait donc moins sensible à la réduction en milieu intracellulaire. Mon premier travail exposé dans l'article 1 : **Thioether Analogues of Disulfide-bridged Cyclic Peptides Targeting Death Receptor 5 : Conformational Analysis, Dimerization and Consequences for Receptor Activation** (in press ChemBioChem 2014), a consisté à comparer l'activité de cet analogue (**2a**) et de ses 2 diastereoisomères (**2b** et **2c**) par rapport au peptide cyclique de référence (**1**). Mes résultats indiquent que le diastéréoisomères **2a**, se lie à TRAIL-R2 avec une affinité proche de celle obtenue avec le peptide **1**. En revanche, les diastéréoisomères **2b** et **2c** ne se lient pas à TRAIL-R2. Les peptides **2a** et **1** ont ensuite été dimérisés pour évaluer leur activité pro apoptotique car les peptides monovalents ne sont pas apoptogéniques (Pavet et al., 2010). De la même manière le peptide dimérique de type **2a** se lie à TRAIL-R2 avec une affinité proche de celle du peptide dimérique **1** et est capable d'induire l'apoptose de lymphome B (BJAB) dans les mêmes proportions que le peptide **1**.
En conclusion, la cyclisation du peptide **1** par un pont thioéther plutôt qu'un pont disulfure et selon la configuration du diastéréoisomère **2a** permet de mimer les propriétés de liaison à TRAIL-R2 ainsi que les propriétés apoptogénique du peptide **1** de référence.

Par ailleurs, les peptides **1**, **2** et **3** trimériques n'étaient pas apoptogéniques sur toutes les lignées cellulaires qui étaient sensibles à la molécule TRAIL recombinante. Nous avons émis l'hypothèse que cela était dû au faible degré d'oligomérisation du ligand synthétique qui ne recrutait pas le nombre de récepteurs TRAIL-R nécessaire à l'induction de l'apoptose.
Cette hypothèse a été vérifiée dans l'article 2 : **The degree of Death Receptor 5 oligomerization required to induce apoptosis differs according to tumor cell lines and and is independent of ligand internalization** (en préparation). Dans ces travaux nous avons utilisé le peptide **2** décrit dans (Pavet et al., 2010) et la lignée de lymphome B (BJAB) et de lymphome T (Jurkat) sensibles à l'apoptose induite par rTRAIL. Cependant, alors que les peptides divalents

induisent efficacement l'apoptose des cellules BJAB, ils n'ont aucun effet sur les cellules Jurkat. Nous avons montré que les cellules Jurkat deviennent sensibles à la mort induite par TRAIL-R si les anticorps anti TRAIL-R2 sont pontés et deviennent donc partiellement tétramériques. Nous avons donc dimérisé le peptide divalent pour obtenir un ligand tétramérique mais malheureusement le tétramère de peptide *i)* n'induit pas l'apoptose des cellules Jurkat et *ii)* n'a pas un meilleur effet que le peptide divalent sur les cellules BJAB certainement à cause d'une orientation des peptides qui ne leur permettent pas de tous se lier à TRAIL-R2. Nous avons également démontré que notre peptide divalent comme la molécule rTRAIL, sont internalisés aussi bien dans les cellules Jurkat que BJAB excluant ainsi l'impact de l'internalisation dans l'absence de sensibilité au peptide divalent. De plus, nous avons montré que le peptide divalent peut agir comme antagoniste de la molécule rTRAIL.

Pour favoriser l'oligomérisation des récepteurs TRAIL-R2, nous avons utilisé 2 types de plateformes chimiques pour augmenter la valence des peptides ligands de TRAIL-R2 et donc augmenter leur efficacité biologique.

La première décrite dans l'article 3 : **Multimerization of an Apoptogenic TRAIL-Mimicking Peptide by Using Adamantane-Based Dendrons** (publié dans Biochemestry en 2013), est une plateforme de type "adamentane" qui permet d'obtenir un ligand hexamèrique. J'ai montré par des expériences de résonance plasmonique de surface que ce ligand avait une affinité 20 000 fois supérieure à celle du monomère. De plus, ce ligand est capable d'induire l'apoptose de lymphomes de Burkitt (BJAB) exprimant le récepteur TRAIL-R2 et pas celle des cellules déficientes pour l'expression de ce récepteur. Cependant, de manière surprenante, l'hexamère de peptides n'a pas une activité pro apoptotique beaucoup plus efficace que le peptide trimérique décrit dans la publication précédente de l'équipe (Pavet et al., 2010). Cela peut être dû à l'encombrement stérique occasionné par la plateforme adamentane qui limiterait la liaison des 4 peptides sur le récepteur à la surface cellulaire.

C'est pourquoi nous avons développé une autre plateforme d'hélices oligourées qui permettent de fixer nos peptides selon une géométrie choisie. Les résultats sont détaillés dans l'article 4 : **Effect of various strategies for the presentation of TRAIL-R2 specific peptides on helical oligourea foldamer scaffold on their binding parameters and proapototic activity** (en préparation). Les chimistes ont synthétisés 2 types d'hélices qui présentent les peptides selon une orientation 3.5 *cis* ou 3.4 *trans*. J'ai montré que l'orientation 3.5 *cis* permet de d'augmenter l'efficacité apoptotique des peptides divalents par rapport à ceux présentés selon l'orientation 3.5 *trans*. Ces travaux ont par ailleurs permis de mettre en évidence un comportement différents des peptides **1**, **2** ou **3** présentés sur les hélices et qui est corrélés avec l'activité biologique.

CHAPITRE 1

Article 1: Thioether Analogues of Disulfide-bridged Cyclic Peptides Targeting Death Receptor 5: Conformational Analysis, Dimerization and Consequences for Receptor Activation

Karolina Pulka-Ziach, Valeria Pavet, Neila Chekkat, Karine Estieu-Gionnet, Roman Rohac, Marie-Charlotte Lechner, Cristian R. Smulski, Gabrielle Zeder-Lutz, Danièle Altschuh, Hinrich Gronemeyer, Sylvie Fournel, Benoit Odaert and Gilles Guichard

(accepté ChemBioChem 2014)

DOI: 10.1002/cbic.200((will be filled in by the editorial staff))

TRAIL peptide mimics

Thioether Analogues of Disulfide-bridged Cyclic Peptides Targeting Death Receptor 5 : Conformational Analysis, Dimerization and Consequences for Receptor Activation

Karolina Pulka-Ziach,[a] Valeria Pavet,[b] Neila Chekkat,[c] Karine Estieu-Gionnet,[a] Roman Rohac,[a] Marie-Charlotte Lechner,[a,d] Cristian R. Smulski,[d] Gabrielle Zeder-Lutz,[e] Danièle Altschuh,[e] Hinrich Gronemeyer,[b] Sylvie Fournel,[c] Benoit Odaert[f] and Gilles Guichard*[a]

*Peptide **1** is a disulfide-bridged 16-mer peptide that bind to Death Receptor 5 (DR5, TRAIL-R2). Upon covalent oligomerization, it recapitulates the function of the TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand (TRAIL) both in vitro and in vivo by selectively triggering the DR5 cell death pathway in DR5+ cells. In this report, we have evaluated the properties of analogues of **1** containing a thioether bridge. The native DR5-binding peptide and its desulfurized analog **2a** have been compared for their structural (NMR conformational analysis) and biological properties (affinity to DR5 and signalling pathways). Surface plasmon resonance (SPR) data suggest that both peptides bind DR5 with comparable affinities. The same holds true for dimeric versions of these peptides (**Dim1** and **Dim2a**) with **Dim2a** being able to induce DR5-mediated apoptosis of BJAB lymphoma and tumorigenic BJELR cells albeit at a slightly lower extent compared to its disulfide homologue. NMR analysis of **1** and **2a** points to subtle variations in the conformation of the two peptides and suggests that the thioether peptide is slightly less folded than its disulfide homologue. These observations could account for the different potency of dimers of **1** and **2a** to cluster DR5 receptors on cells and to trigger apoptosis. Nevertheless, the more redox-stable linkage in **Dim2a** suggests that this compound is potential candidate for evaluation in vivo in animal models.*

Introduction

Targeting proapoptotic death receptors (DRs) to trigger apoptosis in cancer cells is considered a new and attractive therapeutic approach.[1] TRAIL (TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand) is a transmembrane homotrimeric protein belonging to the TNF family. It binds to its cognate receptors on the cell surface and triggers tumour cell apoptosis independently of the p53 tumor-suppressor gene. Unlike other apoptosis-inducing TNF family members, soluble TRAIL appears to be largely inactive against normal healthy tissue and to induce apoptosis of tumor cells selectively. TRAIL can bind two proapoptotic DRs, DR4 (TRAIL-R1 or TNFRSF10A) and DR5 (TRAIL-R2 or TNFRSF10B), two additional cell-bound receptors incapable of transmitting an apoptotic signal, DcR1 and DcR2 and a soluble receptor osteoprotegerin. Current strategies to exploit the cancer selectivity of the TRAIL/DR death pathway include the use of recombinant human TRAIL and agonistic antibodies against DR4 and DR5, either alone or in combination with chemotherapeutic drugs.[2] Though these therapies proved to be safe and well tolerated, recent clinical trials also pointed to the need of both agonists with improved potency and biomarkers of apoptosis that would help in predicting tumour response to these molecules.[3]

[a] *Dr K. Pulka-Ziach[¶], Dr K. Estieu-Gionnet, R. Rohac, Dr M.C. Lechner, Dr G.Guichard*
Université de Bordeaux, CNRS, Institut Polytechnique de Bordeaux, UMR5248 CBMN, Institut Européen de Chimie et Biologie,
2 rue Robert Escarpit, 33607 Pessac, France
E-mail: g.guichard@iecb.u-bordeaux.fr
[¶] *Present Address : Faculty of Chemistry, University of Warsaw Pasteura 1, 02-093 Warsaw, Poland*
[b] *Dr Valeria Pavet, Dr Hinrich Gronemeyer*
Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC), Equipe Labellisée Ligue Contre le Cancer, Centre National de la Recherche Scientifique UMR 7104, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U964, University of Strasbourg, Illkirch, France
[c] *N. Chekkat, Dr S. Fournel*
UMR 7199 CNRS-Université de Strasbourg, Faculté de Pharmacie
74 Route du Rhin- BP 60024- 67401 Illkirch Cédex- France
[d] *Dr. M.C. Lechner, Dr C. Smulski*
CNRS, Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Laboratoire d'Immunopathologie et Chimie Thérapeutique,
15 rue René Descartes, 67084 Strasbourg, France
[e] *Dr G. Zeder-Lutz, Dr D. Altschuh*
Biotechnologie et signalisation cellulaire, Université de Strasbourg, CNRS. ESBS,
300, Boulevard Sébastien Brant BP10413, 67412 Illkirch, France
[f] *Dr B. Odaert*
Université de Bordeaux, CNRS, Institut Polytechnique de Bordeaux, UMR 5248 CBMN,
All. Geoffroy Saint-Hilaire 33600 Pessac, France.

Supporting information for this article is available on the WWW under http://www.chembiochem.org or from the author.

Multiple levels of receptor oligomerization and clustering are required for productive death-inducing signaling complex (DISC) formation and effective apoptotic signalling by DR family members. Current efforts to develop more potent TRAIL mimics include engineering of multivalent proteins (e.g. fibronectin type III domain or human tetranectin)[4] for high affinity binding to TRAIL DRs. Concurrently; oligomeric peptides that bind to DR5 and activate the TRAIL signalling pathway have also been reported.[5-7] Though these peptides are generally less potent than oligomeric proteins targeting TRAIL receptors, they present some features that make them worth being studied: high modularity, chemical accessibility, easier characterization and storage, reduced immunogenicity.

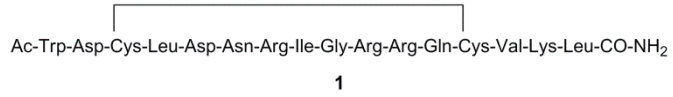


Figure 1. Sequence of the DR5-binding 16-mer cyclopeptide **1**.

The disulfide bridged cyclic 16-mer peptide **1** (Figure 1) has been identified by phage display and binds selectively to human DR5 with submicromolar affinities.[5a, 7a] Oligomeric versions of this macrocyclic peptide display a dramatic increase in binding avidity to the receptor (nM to pM range) and are potent activators (either alone or in combination with chemotherapeutic agents) of the TRAIL apoptotic pathway both *in vitro* and *in vivo*.[5a, 7a] The relationship between oligomerization state, binding affinity, and propensity to induce apoptosis has been explored using several multimerization platforms such as the diglycolic acid for dimer formation, [5a, 7a] 2,2',2''-nitrilotriacetic acid[5b] and tri-substituted adamantanes with succinic acid derived linkers for trimer and hexamer formation.[7a, 7c] Alternatively, more elaborated multivalent ligands with controlled distance and topology based on PNAs have been used to investigate distance-dependent multivalent ligand.[7b] SPR data generated from monomeric, dimeric and trimeric forms of peptide **1** suggest a correlation between the stability of peptide/DR5 complexes and their capacity to induce apoptosis of human DR5 positive cancer cells.

Peptide **1** contains a disulfide bridge between residues 3 and 13 that is essential for its activity. However, disulfide bonds are susceptible to reduction and scrambling *in vivo* by glutathione as well as redox enzymes potentially resulting in the loss of the desired biological activity. Disulfide bridge engineering is a promising approach to identify more stable peptide analogues which can retain overall potency. Among alternative linkages with increased redox stability, lanthionines, in which one of the sulfur atoms of the disulfide bond is removed, have previously been introduced into biologically active peptides with some success.[8] More recently thioether peptides have attracted considerable attention in the context of the flexible in vitro translation (FIT) system, a general approach that allow display of macrocyclic peptides obtained by spontaneous head-to-side chain thioether macrocyclization of ribosomally expressed peptides.[9] Alternatively, isosteric disulfide bond replacements,[10] among which carba,[11] diselenide,[12] selenylsulfide,[12] ditelluride,[12] cystathionine[12,13] and more recently selenocystathionine[14] bonds, have also been employed into biologically active cyclic peptides.

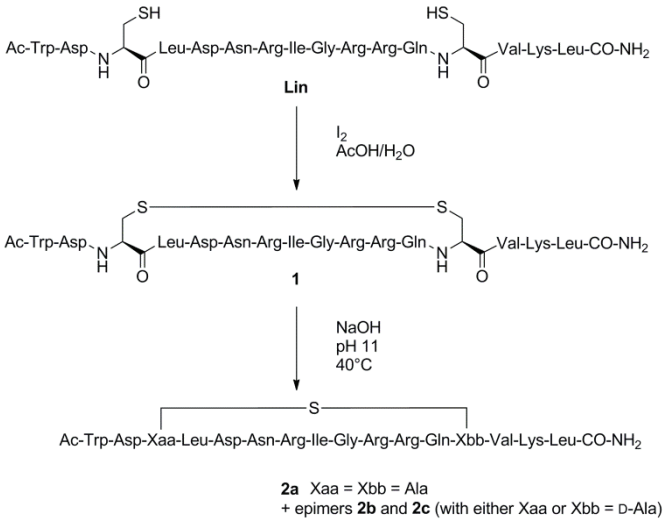
Herein, we have investigated the effect of substituting a thioether for the disulfide bridge in **1** on both the conformation and functional properties. Covalent dimers prepared by chemoselective attachment of the cyclopeptides to the diglycolic acid linker have been assayed for their ability to bind DR5 and to activate the DR5 cell death pathway *in vitro* in BJAB lymphoma and tumorogenic BJELR cells.

Results and Discussion

Synthesis of Thioether peptide analogues by desulfurization of 1

The linear precursor (**Lin**) of the DR5-binding peptide **1** was readily synthesized using standard Fmoc chemistry on Rink amide resin.[15] After concomitant side-chain protection removal and resin cleavage, peptide **Lin** was oxidized with iodine in $AcOH/H_2O$ (4:1) (Scheme 1) to give **1** in 13% overall yield after reverse phase HPLC purification (see Figures S1 and S2 in supporting information).

Various synthetic approaches have been developed to access thioether peptides containing lanthionine bridges.[16] These include (*i*) installation of suitably protected preformed lanthionine derivatives in the peptide main chain on solid support,[17] (*ii*) intramolecular S_N2-substitution of a β-halo-alanine by cysteine,[18] (*iii*) Michael addition of cysteine on a dehydroalanine residue and (*iv*) desulfurization reactions. All these methods have different advantages and drawbacks. In the present work, we selected a desulfurization method which in principle could afford the expected lanthionine derivative in one step from cyclopeptide **1**. It is well known that disulfides can undergo a β-elimination, followed by a stereorandom Michael addition to give a thioether linkage when treated with aminophosphines[19] or under alkaline conditions. Base-assisted desulfurization of disulfide-bridged peptides has been occasionally used.[20]



Scheme 1. Synthesis of cyclic peptide **1** and its desulfurization to thioether peptide analogues **2**.

Base-induced desulfurization of **1** was performed in the presence of 0.5M NaOH, to give a mixture of three major products which were isolated by C_{18} RP HPLC and identified as the three predictive diastereoisomeric (LL, LD and DL) lanthionine peptides **2a-c** (see Figure S3 in supporting information). The kinetics of the reaction was found to be sensitive to both the temperature and the pH. Whereas at pH9 and 25°C, the reaction

was very slow leading to full conversion of **1** only after 14 days, the reaction proceeded in less than 6.5 hours at pH11 and 40°C. Under these conditions, the thioether peptides **2** were recovered in a total yield of 43% from **1**. The average ratio of peptides **2** based on RP-HPLC (linear gradient 20-50 % MeCN) of the crude product was **2a** (t_R = 4.58 min, 44%), **2b** (t_R = 4.90 min, 16%) and **2c** (t_R = 5.20 min, 40%).

Desulfurized peptide 2a binds to DR5

We have next explored the ability of lanthionine and disulfide-bridged peptides to bind to human DR5 using surface plasmon resonance (SPR). Recombinant human DR5 was immobilized on a sensor surface and the peptides were flushed at different concentrations over empty and DR5 surfaces. The receptor RANK, another TNF-receptor superfamily member, was used as a negative control. The double-referenced kinetic curves were normalized with respect to the molecular weight of each peptide by expressing the responses in fmol/mm² (1000 RU= 1mg/mm²).

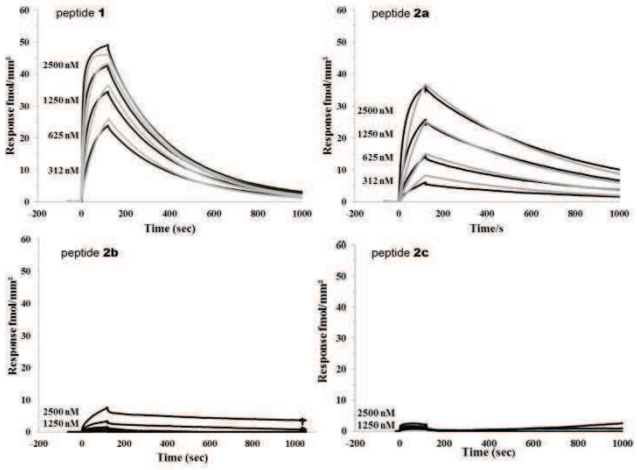


Figure 2. Kinetic curves of disulfide-bridged cyclic peptides **1** and desulfurized peptide **2a**-**2c** binding to immobilized human DR5 (density of DR5 is 65 fmol/mm²). All compounds were tested at concentrations 5000, 2500, 1250, 625 and 312 nM. The response is expressed in fmol/mm² (1000RU= 1mg/mm²). The fitted curves are in grey.

Table 1. Kinetic parameters of peptides binding to DR5, as derived from Surface Plasmon Resonance experiments

Analyte	k_{on} ($M^{-1}.s^{-1}$)	k_{off} (s^{-1})	K_D (M)	apparent k_{off} (s^{-1})
1[a]	$(2.8\pm1.3)\times10^{4}$	$(3.49\pm0.05)\times10^{-3}$	$(1.2\pm0.8)\times10^{-7}$	-
2a[a]	$(5.4\pm2.3)\times10^{3}$	$(1.6\pm0.4)\times10^{-3}$	$(3\pm3.2)\times10^{-7}$	-
Dim1[b]	-	-	-	$(5.3\pm0.1)\times10^{-4}$
Dim2a[b]	-	-	-	$(3.2\pm0.4)\times10^{-4}$

[a] Kinetic parameters for monovalent peptides were obtained by global fitting of the curves shown in Figure 1. [b] the apparent k_{off} was evaluated by fitting the post-injection phase of the curves shown in Figure 7. The Langmuir binding model was used in both cases. Values are the mean of three experiments.

Lanthionine peptide **2a** but not diastereomers **2b** and **2c** was able to bind to DR5 (Figure 2). Unspecific binding of peptide **2a** to the human RANK receptor was not observed (see Figure S5 in supporting information).

To further characterize the binding profile of **1** and **2a**, kinetic parameters were calculated by global fitting of the kinetic curves using a Langmuir binding model. The equilibrium constant (K_D) was calculated as the ratio of dissociation (k_{off}) over association rate constant (k_{on}). The lanthionine peptide **2a** was found to bind DR5 with an equilibrium constant (K_D = 3 x 10^{-7} M) very similar to that of the cognate disulfide bridged peptide **1** (K_D = 1.2 x 10^{-7}M). This result suggests that the lanthionine bridge in **2a** allows the peptide to closely mimic the conformation of **1** for binding to DR5.

NMR analysis of 1 and comparison with lanthionine-bridged peptides 2

We have next compared the structural properties of peptides **1**, **2a**, **2b**, **2c** in aqueous solution using Nuclear Magnetic Resonance. The frequencies of all ^{1}H and ^{13}C atoms were assigned using homonuclear TOCSY and NOESY and heteronuclear experiments (Tables S1-S5). Cyclic peptide **1** shows a disperse $^{1}H^{15}N$ HSQC indicative of a well-defined conformation (Figure 3a). The presence of strong intensity $\alpha N(i,i+1)$ sequential NOEs in the segments 1-6 and 9-15, long-range NOEs such as $\alpha\alpha(1,15)$, $\alpha\alpha(3,13)$ and $\alpha\alpha(5,11)$ connectivities, and strong intensity NHNH(i,i+1) in the segment 6-9 suggest the formation of a regular β hairpin. Its formation seems to be intimately linked to the presence of the disulphide bridge C3/C13, as no hydrogen bond has been identified due to the fast exchange of the amide protons in the presence of 100% D_2O. In addition, the aromatic-aliphatic region of the NOESY spectrum (Figure 3b) displays numerous connectivities between the resonances of the side-chains of the tryptophan (W1) and of the lysine (K15) suggesting the formation of a hydrophobic cluster between terminal residue side chains.

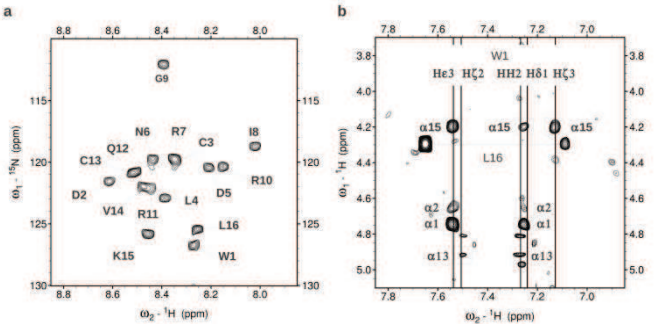


Figure 3. NMR analysis of **1**. a) Annotated $^{1}H^{15}N$ HSQC spectrum of **1** acquired at 293K, pH 5.85 in 95% H_2O/5% D_2O. The assignment of the peaks is indicated with the amino acid one letter code followed by the residue number. b) Aromatic-backbone proton region of a 300 ms NOESY spectrum acquired at 293K, pH 5.85 in 95% H_2O/5% D_2O. Straight lines along the F1 dimension indicate the aromatic side-chain proton resonances of the tryptophan W1. NOE cross peaks with the backbone residue protons are boxed and assigned. The C-terminal amide group of the residue L16 is identified by a horizontal line

To gain insight into the conformation of the peptide, NMR structure calculation has been performed using the CNS software suite[21] by taking into account 78 interresidual NOEs and 32 dihedral backbone angle restraints. Peptide **1** was found to adopt a regular β-hairpin conformation comprised of two short strands

(residues 1 to 5 and residues 10 to 15) connected by a turn motif encompassing residues N6 to G9 (Figure 4a). The side-chains of the residues W1 and K15 form a tight cluster (Figure 4b) stabilized by hydrophobic and possibly cation-π interactions. Such a cluster is likely to stabilize the β hairpin by locking its termini.

A comparative NMR analysis has been performed with the thioether peptides **2a**, **2b** and **2c**. All lanthionine peptides show the same well-disperse $^{1}H^{15}N$ HSQC spectrum (Figure 5a, and Figures S6a and S6b in supporting information) and NOEs indicative of a β-hairpin type structure. The presence of the thioether linkage is assessed by a 5 ppm upfield shift of the Cβ resonances (Figure 5b). The major differences of the backbone chemical shifts are found at the cysteine positions 3 and 13 (Figure 5c and 5d).

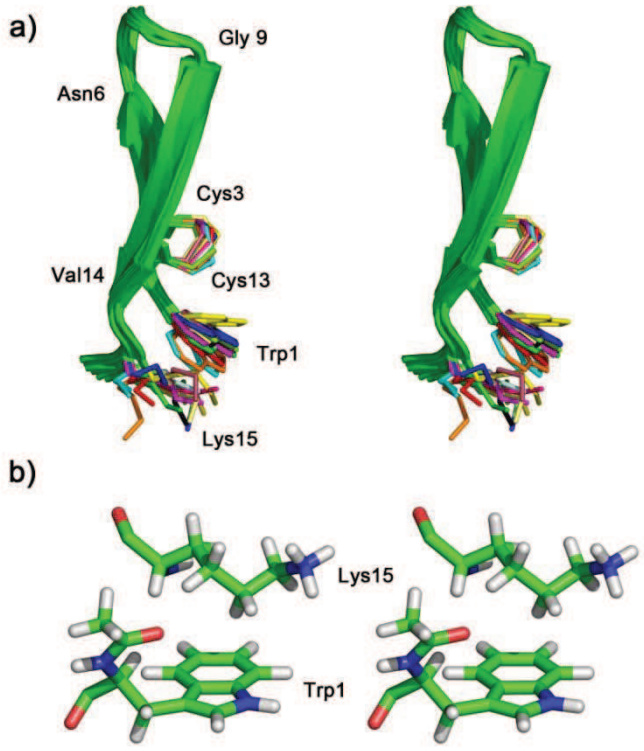


Figure 4. NMR-derived molecular model of peptide **1**. a) Stereoview of the ten superimposed lowest energy structures. The strands of the β-hairpin structure are shown as green ribbons. The side chains of the disulphide bridge C3/C13 and of the hydrophic cluster W1/K15 are shown as lines. b): Stereoview of the hydrophobic cluster between the side-chains of the tryptophan W1 and the lysine K15.

Though it was not possible to determine unambiguously the stereochemistry of the cysteine residues by NMR analysis, peptide **2a** was tentatively assigned to the LL enantiomer, as it is structurally the closest to the peptide **1**. Indeed, it possesses the hydrophobic cluster W1/K15 which is absent in peptides **2b** and **2c**. This stereochemical assignment of the lanthionine residue in **2a** was further confirmed by chiral GC/MS analysis after 6M HCl hydrolysis of **2a**, derivatization to the corresponding trimethylsilylamine methyl esters and comparison with corresponding DL and LL lanthionine standards (see supporting information for details). Closer examination of the chemical shift changes of **2b** and **2c** with **2a** (Figures S6c and S6d in supporting information) suggests that **2b** may be the DL enantiomer and **2c** the LD enantiomer, as the major changes occur at the N-terminus and C-terminus, respectively.

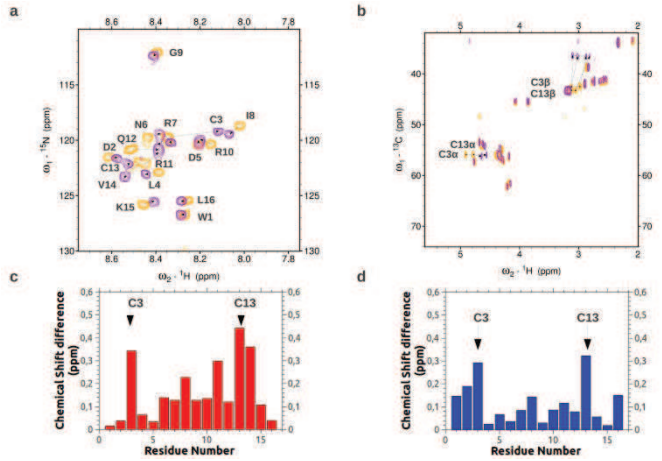
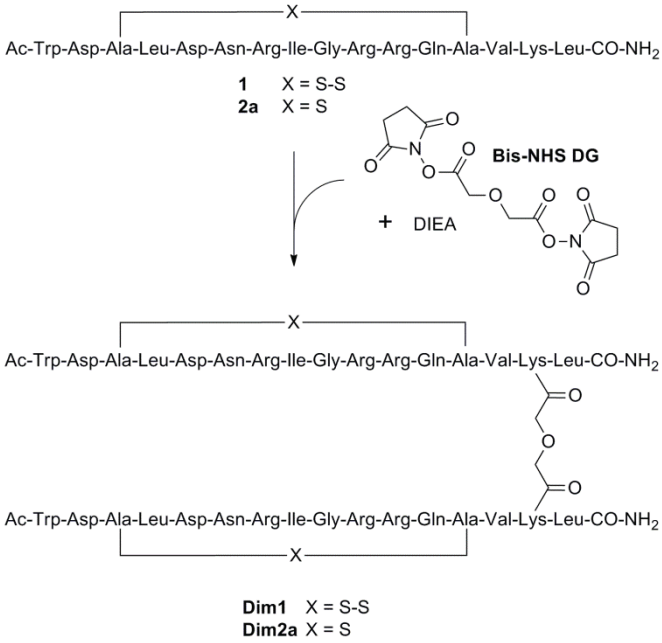


Figure 5. Comparison of **1** with **2a**. Superposition of the $^{1}H^{15}N$ HSQC (a) and $^{1}H^{13}C$ HSQC (b) spectra of **1** (yellow) and **2a** (purple). Plots of the combined chemical differences between **1** and **2a** versus the residue number, in backbone amide ^{1}HN and ^{15}N (c), as well as in backbone $^{1}H_{\alpha}$ and $^{13}C_{\alpha}$ (d). The combined ^{1}HN and ^{15}N shift changes were calculated as $\Delta\omega$ (ppm) = $((\Delta^{1}HN)^{2}+0.1(\Delta^{15}N)^{2})^{1/2}$. The combined $^{1}H_{\alpha}$ and $^{13}C_{\alpha}$ shift changes were calculated as $\Delta\omega$ (ppm) = $((\Delta^{1}H_{\alpha})^{2}+0.25(\Delta^{13}C_{\alpha})^{2})^{1/2}$. The arrows indicate the chemical shift perturbations induced by the desulfurization of **1** to **2a**.

Chemoselective dimerization of 1 and 2a and binding to DR5

Dimerization has been shown to significantly enhance both the avidity for DR5 and ability to trigger apoptosis of TRAIL peptide mimics. Covalent dimeric version of peptides **1** and **2a** were prepared by chemoselective amide bond formation onto a bifunctional linker as previously described,[5a, 7a, 14] by taking advantage of the presence of a single amino group (Lys side chain) in the sequence of the peptides.



Scheme 2. Dimerization of cyclic peptides **1** and **2a** with the diglycolic linker **Bis-NHS DG**.

Peptides **1** and **2a** were treated with bis-*N*-hydroxy succinimidyl diglycolic (**Bis-NHS DG**) linker in the presence of

DIEA in DMF at a concentration of 10^{-1} M to give **Dim1** and **Dim2a** in 51% and 63% yield respectively, after HPLC purification and lyophilization (Figure S4 in supporting information and Figure 6). NMR spectra of monomer **1** and **Dim1** are overall very similar except variations in chemical shift for the Lys side chain linked to the diglycolic linker (see Figure S7 in supporting information), supporting the view that dimerization has hardly any effect on the conformation of the cyclopeptides.

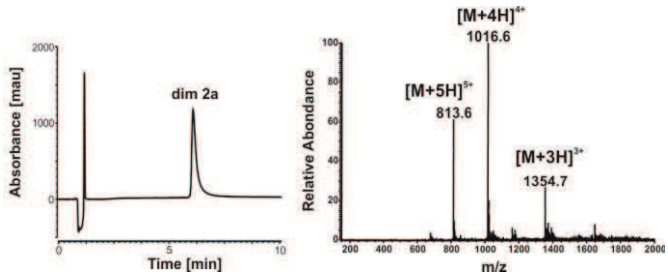


Figure 6. C_{18} HPLC trace and ESI-MS analysis of **Dim2a**.

The divalent peptides **Dim1** and **Dim2a** were tested in SPR under the conditions used to evaluate monomers. Both peptides **Dim1** and **Dim2a** were found to bind DR5 (Figure 7).

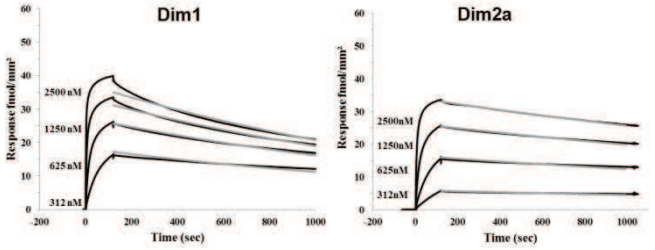


Figure 7. Kinetic curves of disulfide-bridged cyclic peptides **Dim1** and desulfurized peptide **Dim2a** binding to immobilized human DR5 (density of 65 fmol/mm²). Compounds were injected at concentrations 5000, 2500, 1250, 625 and 312 nM. The response is expressed in fmol/mm² (1000RU= 1mg/mm²). The fitted post-injection phases are in grey.

However the interactions between DR5 and the divalent peptides **Dim1** and **Dim2a** were complex. We evaluated an apparent k_{off} from the post-injection phases using the Langmuir binding model. The resulting smaller apparent k_{off} compared to that calculated with the monomers (Table 1) indicates that peptide dimerization stabilizes the ligand/receptor complex, most likely because of avidity effects. As observed with the monovalent peptides, the dissociation rate constants of disulfide-bridged or desulfurized peptides on DR5, were similar, confirming that the desulfurization of cyclic peptide **1** had a moderate effect on the interaction with DR5 receptor.

Cell biology: Dim2a triggers apoptosis in vitro in a DR5 dependent fashion

The efficiency and specificity of the monomer **2a** and its dimer (**Dim2a**) to trigger apoptosis in a DR5 dependent manner was analyzed by using an in vitro model of Burkitt lymphoma (BJAB). This model comprises BJAB cells expressing both DR5 and DR4 receptors (BJAB) or displaying endogenous levels of DR4 but lacking DR5 expression (BJAB-DR5 DEF).[22] BJAB and BJAB DR5-DEF cells were incubated with equimolar doses (20 µM) of either **2a** or **Dim2a**; **Dim1** was included as positive control. Whereas a significant apoptosis of BJAB cells was observed upon treatment with **Dim2a** and **Dim1**, no cell death was induced in response to the desulfurized monomer **2a** in BJAB cells or to any of the three molecules in BJAB DR5-DEF cells. Together, these results reveal the DR5 selectivity of **Dim2a** to trigger apoptosis and supported the relevance of the multimerization of the molecule for induction of the TRAIL-apoptotic cascade (Figure 8a). Western blot analysis confirmed that **Dim2a** induces the activation of initiator (casp-8, casp-9) and executor (casp-3) caspases and resulting in substrate (PARP) cleavage in DR5-expressing but not in DR5-DEF cells (Figure 8b). Finally, dose-response and treatment time-response experiments were performed in BJAB cells treated with increasing doses of either **Dim2a** or **Dim1** peptide during 20 and 40 hrs. **Dim2a** triggered dose dependent apoptosis, albeit with reduced efficiency as compared to that seen with equimolar **Dim1** doses at both time points. This indicates that the apoptotic response triggered by the desulfurized dimer is indeed reduced rather than delayed as compared to that observed in response to **Dim1** (Figure 8c). To determine the tumor-selective action of **Dim2a**, we used a stepwise tumorigenesis model in which primary normal foreskin fibroblasts (BJ) have been transformed into tumorigenic cells (BJELR) by overexpression of defined oncogenic elements.[23] Normal and tumor cells were exposed to **Dim2a** or **Dim1** either as single agents or in combination with resveratrol as sensitizer, as previously described.[7a] While normal BJ cells were resistant either to the single agents or the combined treatment an apoptotic response was observed in BJELR cells supporting the tumor-selectivity of **Dim2a** for inducing cell death (Figure 8d).

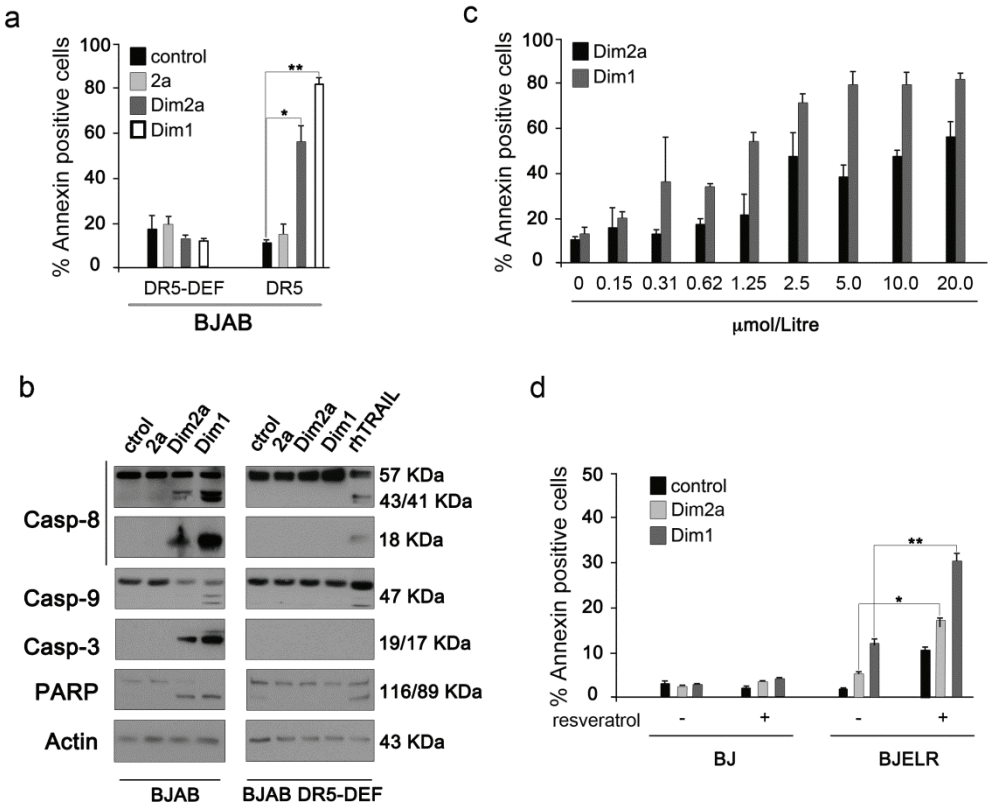


Figure 8. **Dim2a** triggers tumor-selective apoptosis through DR5 receptor. a) BJAB or BJAB DR5-DEF cells were treated with the indicated peptides at 20µM during 20 hrs. Apoptosis was determined as percentage of Annexin V positive cells by FACS analysis. Results represent mean and standard deviation from three independent biological replicates. b) BJAB or BJAB DR5-DEF cells were treated with the indicated peptides (**2a**: desulfurized monomer, **Dim2a**: desulfurized dimer, **Dim1**) at 10µM during 20hrs, and total cell extracts were processed for Western blot. Caspase-8 (full length and cleaved), Caspase-9 (full length), Caspase-3 (cleaved) and PARP (cleaved) were detected using specific antibodies. Samples treated with recombinant human TRAIL (rhTRAIL: 200 ng/ mL) were included as positive control in BJAB DR5-DEF cells : note that residual Caspase 8 cleavage, due to the action of DR4, can be seen on longer exposures, in keeping with the increase of Caspase-9 and PARP cleavage. c) BJAB cells were treated with the indicated doses of **Dim2a** and **Dim1** during 20hrs and apoptosis was determined as the percentage of Annexin V positive cells. Results represent the mean +/- standard deviation for at least two independent biological replicas. d) Normal BJ cells and tumorigenic BJELR cells were treated either with **Dim2a** (20µM) or **Dim1** (20µM) as single agent or in combination with resveratrol (100µM). Apoptosis was determined as percentage of cells displaying positive labeling for APO 2.7 as determined by FACS analysis. Results represent the mean +/- standard deviation for three independent biological replicas.*p<0.05; **p,0.005 as calculated by unpaired Student's t test

Conclusion

Synthetic multimeric peptide ligands for the human TRAIL receptors such as **Dim1** provide a basis for developing new anti-cancer treatment by exploiting the tumor selectivity of the TRAIL signalling pathway. Because of their modularity in terms of design, such peptides represent useful tools to scrutinize the TRAIL pathway and define the pro- and anti-apoptotic roles of the individual receptors in cancer models in vitro and in vivo. As shown previously, several elements in the structure of the peptide can be varied to optimize receptor aggregation, oligomerization of intracellular death domains, and induction of apoptosis, i.e., the sequence of the peptide, the nature of the multimeric platform, the position and mode of attachment of the peptides to the platform. DR5-binding peptide **1** contains a disulfide bridge between residues 3 and 13, closing a loop of 11 residues that is essential for binding to DR5. We have now focused our efforts on modification of the disulfide bridge. We have investigated the synthesis, conformation, and biological properties of lanthionine derivatives of peptides **1** and **Dim1**. Surface plasmon resonance (SPR) experiments revealed that the covalently dimerized version of this peptide (**Dim2a**) binds human DR5 with similar avidity to that of cognate **Dim1**. NMR analysis confirms that the two peptides adopt a similar hairpin type conformation stabilized by a hydrophobic cluster involving terminal exocylic residues. **Dim2a** was found to trigger the TRAIL apoptotic pathway in various cancer cell lines but the slightly reduced potency compared to that of **Dim1** suggests some subtle differences in recognizing and aggregating DR5 at the surface of the cells. Although the structure of the complex between TRAIL and DR5 has been solved at atomic resolution, the peptide binding sites at the surface of DR5 have not been mapped and the precise bioactive conformation of DR5-binding peptides remains unknown. Such information would be particularly useful to further compare disulfide- and thioether-bridged peptides **1** and **2a** and explain the structure-activity relationship in this series. In vivo experiments could also bring additional insight on the relative potency of the two peptides as their stability in biological fluids might significantly differ.

Experimental Section

Materials: Resin, protected amino acids and coupling reagents were purchased from Polypeptide group and Iris biotech. Chemical reagents were purchased from Sigma-Aldrich and Alfa-aesar.

General: Analytical reverse-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) was performed with Dionex Ultimate 3000 system, on Nucleodur C_{18} column (3µm, 4.6x100mm), by using a linear gradient of A (0.1% TFA in H_2O) and B (0.1% TFA in ACN) at a flow rate of 1 mL/min with UV detection at 220 nm. Preparative reverse-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) were performed with Gilson system, on Nucleodur C_{18} column (5µm, 10x250mm) for semi-preparative HPLC and (5µm, 20x250mm) for preparative HPLC, by using a linear gradient of A (0.1% TFA in H2O) and B (0.1% TFA in ACN) at a flow rate of 6 and 20 mL/min respectively with UV detection at 220 nm. Electrospray Ionization (ESI) mass spectra were recorded with a Thermo Finnigan LCQ Advantage/LC Surveyor apparatus. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time-of-Flight (MALDI-TOF) analysis was performed with a reflectron Bruker Reflex III MALDI-TOF instrument using α-cyano-4-hydroxycinnamic acid as matrix.

Linear peptide synthesis: Linear peptide **Lin** was prepared manually using standard Fmoc chemistry starting from Rink amide resin[15] and with DIC/HOBT (1:1) as a coupling agent. Fmoc Rink amide MBHA resin (0.7 mmol/g; 1.5 g) was swelled in 30 mL of DMF during 15 min. After filtration, the resin was first deprotected by treatment with 20% piperidine in DMF (10 mL / g resin). After 5 min of shaking, the resin was filtrated, washed with DMF and treated a second time with 20% piperidine in DMF. After 30 min of shaking, the resin was filtrated and washed 4 times with DMF. Completeness of Fmoc deprotection was checked by qualitative ninhydrin (Kaiser) test.[24] Peptidyl-resin was then treated twice at room temperature during 30 min by a solution (0.2 M) of the desired Fmoc-Xaa-OH/DIC/HOBT (1:1:1; 3 equiv) in DMF. After filtration, the peptidyl-resin was washed 4 times with DMF. Coupling completeness was determined by Kaiser test. Deprotection and coupling steps were repeated for each amino acids and after the Fmoc-deprotection of the last amino acid, the *N*-terminus was acetylated. For this purpose, peptidyl-resin was treated twice with 2.6 mL DIEA (15 equiv), 945 µL of Ac_2O (10 equiv) in 25 mL DMF at room temperature during 30 min. After filtration and DMF washings, ninhydrin test was performed giving colorless beads. The peptidyl-resin was washed 4 times with DCM and dried in vacuo overnight. The peptide was cleaved from the resin and simultaneously deprotected by treatment with 20 mL of a solution of TFA/TIS/DTT/H_2O (88:25:5:5) at room temperature for 3h. After filtration, the resin was washed with DCM and the filtrate was concentrated in vacuo. The crude peptide **Lin** was precipitated with cold diethyl ether, filtered and washed with Et_2O. Purification of **Lin** was performed by preparative HPLC using a linear gradient from 20 to 50 % B in 20 minutes. After lyophilisation, 1.2g of linear peptide Lin was recovered (54% yield). HPLC (linear gradient 20-50 % B; 10 min): t_R= 5.38 min. MALDI-TOF m/z calculated for $C_{85}H_{142}N_{30}O_{23}S_2$: 2015.03; found $[M+H]^+$ = 2015.87

Cyclo-peptide 1: Lin (100 mg; 0.04mmol; M=2472 g/mol - as a TFA salt) was dissolved in 100 mL of AcOH/H_2O (8:2). 3 equiv (30.5 mg) of I_2 were added. The reaction mixture was stirred at room temperature and controlled by analytical HPLC using a linear gradient from 20 to 50 % B in 10 minutes. After 45 min. there was not any substrate. 100 mL of H_2O was added and the mixture was extracted three times with CH_2Cl_2 to remove I_2 (the emulsion was formed). The aqueous phase was concentrated and lyophilized. The crude product was purified by preparative HPLC using a linear gradient from 20 to 50 % B in 20 minutes. After lyophilisation, 24 mg of cyclic peptide **1** was recovered as a TFA salt (25% yield). HPLC (linear gradient 20-50 % B; 10 min): t_R = 4.37 min. MALDI-TOF m/z calculated for $C_{85}H_{140}N_{30}O_{23}S_2$: 2013.01; found $[M+H]^+$ = 2013.77. ^1H and ^{13}C chemical shifts are reported in Table S1 (supporting information)

Thioether Peptides by Desulfurization of 1: The TFA salt of Peptide **1** (57.9 mg; 23.4 µmoles) was dissolved in 57 mL (1 mg/mL) of distilled water and warmed to 40°C. 0.5M NaOH solution was then added to obtain pH = 11 (checked with pH paper and maintained by addition of 0.5M NaOH every hour). Progress of the reaction and consumption of **1** was monitored by analytical HPLC using a (linear gradient from 22 to 40 % B in 10 minutes). After 6.5 h, the reaction was quenched by addition of AcOH to pH 4. The reaction mixture was concentrated (~10mL) and the crude product was purified by semi-preparative HPLC using a linear gradient from 22 to 40 % B in 20 minutes. Lyophilisation of pure fractions afforded thioether peptide **2a** together with two epimers **2b** and **2c**.

2a (12.2 mg, 22% yield). HPLC (linear gradient 20-50 % B; 10 min): t_R = 4.58 min. MALDI-TOF m/z calculated for $C_{85}H_{140}N_{30}O_{23}S$: 1981.04; found $[M+H]^+$ = 1981.92. ^1H and ^{13}C chemical shifts are reported in Table S2 (supporting information)

2b (5.6 mg, 10% yield) HPLC (linear gradient 20-50 % B; 10 min): t_R = 4.90 min. MALDI-TOF m/z calculated for $C_{85}H_{140}N_{30}O_{23}S$: 1981.04; found $[M+H]^+$ = 1981.67. ^1H and ^{13}C chemical shifts are reported in Table S3 (supporting information)

2c (6.4 mg, 11% yield). HPLC (linear gradient 20-50 % B; 10 min): t_R = 5.20 min. MALDI-TOF m/z calculated for $C_{85}H_{140}N_{30}O_{23}S$: 1981.04; found $[M+H]^+$ = 1981.62. ^1H and ^{13}C chemical shifts are reported in Table S4 (supporting information)

Bis-NHS DG linker: Diglycolic acid (2g, 15 mmol) and N-hydroxysuccinimide (3.45 g, 30 mmol) were dissolved in dry dioxane (25 mL) under argon. The reaction mixture was cooled to 0°C and 6.15 g of DCC (30 mmol; 2 equiv) were added. After 12h at 0°C, the formed urea was removed by filtration and the filtrate evaporated to dryness leading to 4.9 g of crude compound. Two successive recrystallizations from isopropanol yielded 4.2 g of pure product as white crystalline solid (86% yield).^1H NMR (300 MHz, [D_6]DMSO): δ = 2.84 (s, 4H); 4.78 (s, 2H).^{13}C NMR (75 MHz, [D_6]DMSO): δ = 25.9; 66.2; 166.1; 170.4. ESI m/z calculated for $C_{12}H_{12}N_2O_9$: 328.05; found $[M+H]^+$ = 329.1; $[M+Na]^+$ = 351.0.

Dimerization of 1 and 2a: Cyclic **1** (130 mg; 52.6 µmoles; 2470 g/mol – as a TFA salt) or **2a** (10.8 mg; 4.43 µmol; 2438 g/mol – as a TFA salt) was dissolved in DMF (10 µl/µmole). **Bis-NHS DG** linker (0.45 equiv) was then added, followed by DIEA (1 equiv), to reach pH 9 and the mixture was stirred vigorously. The progress of the reaction was monitored by analytical HPLC using a linear gradient from 20 to 50 % B in 10 minutes. Upon completion (~30 min), water (2 mL) was added, the mixture was directly purified by semi-preparative HPLC using a linear gradient from 20 to 50 % B in 20 minutes and pure fractions lyophilized.

Dim1 (62 mg, 51% yield) HPLC (linear gradient 20-50 % B; 10 min): t_R = 5.89 min. MALDI-TOF for dim1 m/z calculated for $C_{174}H_{284}N_{60}O_{49}S_4$: 4126.05; found [M]+ = 4126.57. ^1H and ^{13}C chemical shifts are reported in Table S5 (supporting information)

Dim2a (6.3 mg, 63% yield) was recovered. HPLC (linear gradient 20-50 % B; 10 min): t_R = 6.08 min. ESI for dim2a m/z calculated for $C_{174}H_{284}N_{60}O_{49}S_2$: 4062.10; found $[M+3H]^{3+}$ = 1354.7; $[M+4H]^{4+}$ = 1016.6, $[M+5H]^{5+}$ = 813.6.

NMR conformational analyses of peptides: Experiments were performed on a Bruker Avance III 700 MHz spectrometer equipped with a 5 mm diameter BBI Gradient probe. In all experiments, water suppression was achieved with a watergate sequence.[25] Experiments were processed with the Bruker software (Bruker BioSpin, Courtaboeuf, France). Resonance assignment was done with the Sparky program (University of California San Francisco, Thomas L. Goddard). The different peptides (**1**, **2a**, **2b**, **2c** and **Dim1**) were dissolved in 95% H_2O/5% D_2O or in 100% D_2O solution (100 mM sodium phosphate, pH 5.85) to obtain a final concentration of 2.5 mM. For each peptide, a complete series of 2D homonuclear and

heteronuclear spectra was acquired at 293K and 303K. A number of scans of 16, 8, 32 were used respectively for COSY-DQF, TOCSY, ROESY and NOESY experiments. The mixing times were set up to 60 and 120 ms for TOCSY and 300 ms for ROESY and NOESY experiments. The 2D homonuclear spectra were acquired with 512 increments in F1 dimension and 2048 points in F2 dimension. The heteronuclear $^{1}H^{15}N$ and $^{1}H^{13}C$ HSQC spectra were acquired respectively with 38 and 128 increments in F1 dimension and with a number of scans of 1k and 128. The ^{1}H, ^{15}N and ^{13}C spectral width were set up respectively to 14, 22 and 120 ppm. Molecular modelling under NMR restraints was performed using the CNS ~~program~~ software suite by taking into account 78 interresidual NOEs and 32 dihedral backbone angle restraints.

Surface Plasmon Resonance: Biosensor assays were performed on a Biacore T200™, at 25°C. The running buffer was HBS-EP buffer [10mM HEPES (pH 7.4) containing 0.15M NaCl, 3.4mM EDTA and 0.005% (v/v) Tween P20]. The human DR5 and RANK (Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY) receptors were immobilized on a sCM5 sensor chip (GE Healthcare) using the standard amine coupling procedure. The receptors were diluted in 10mM acetate buffer (pH 5.0) at a concentration of 5µg/mL. The density of receptors immobilized on the sensor chip was 65 fmol/mm² for DR5 and 92 fmol/mm² for RANK. Peptides were injected at a flow rate of 5µL/min for 120s and allowed to dissociate for an additional of 420s. Channels were then regenerated for 5s with 25mM HCl. The RANK protein was considered as negative control. All binding curves were double-referenced (i-e subtraction of the data of the empty flow cell followed by the subtraction of the data from a run buffer injection cycle). Kinetic parameters for the monovalent peptides were obtained by global fitting of the corrected curves to the 1:1 Langmuir binding model (BIAevaluation version 4.1.1). The Langmuir model was also used to fit the post-injection phases of divalent peptides **Dim1** and **Dim2a** .

Apoptosis measurement: Apoptosis was determined by flow cytometry either by detection of phosphatidylserine externalization after co-labelling with Annexin V-FITC/ Propidium Iodide or by APO2.7 immunostaining according to manufacturer's instructions. Annexin V-FITC was purchased from BD Pharmigen and APO2.7-PE from Beckman Coulter. Apoptosis is displayed as the percentage of cells presenting a positive staining upon rhTRAIL or synthetic peptide treatment compared with non-treated cells as control. Results are displayed as the mean+/- SD of at least three independent biological replicates.

Western blot assays: BJAB cells were treated during 20hrs with 10µM of peptides or with or 200ng/ml rhTRAIL as positive control. Samples were harvested in RIPA buffer, separated by SDS-PAGE and electrotransferred onto nitrocellulose membranes. Antibodies were purchased from Cell Signalling (anti-caspase-8, anti-caspase-3 antibodies, anti-caspase-9 and anti-PARP) and Santa Cruz (anti-βactin).

Acknowledgements

This work was supported by the Agence Nationale de la Recherche : grant ANR-07-PCVI-0031-01 (H.G & S.F.) and ANR-08-PCVI-0034-01 (G.G.), Association pour la Recherche sur le Cancer, La Ligue contre le cancer (H.G., Laboratoire Labellisé and postdoctoral fellowship to V.P.), La Ligue Contre le Cancer, Comités de Dordogne et de Gironde (G.G.) and European Union (Marie Curie PEOPLE-2010-IEF-273224-FOLDAPOP, postdoctoral fellowship to K.P.Z.). We are grateful to Andrew Thorburn, Bert Vogelstein and William Hahn for providing cell lines, to Katell Bathany for mass spectrometry measurements and Bartlomiej Witkowski for his help with derivatization of lanthionine and peptide-hydrolysate and for GC/MS measurements.

Keywords: Cyclic peptides· Disulfide bridges · desulfurization· Anticancer agents · Death Receptor ·

[1] (a) R. W. Johnstone, A. J. Frew, M. J. Smyth, *Nat. Rev. Cancer* **2008**, *8*, 782-798; (b) A. Ashkenazi, P. Holland, S. G. Eckhardt, *J Clin Oncol* **2008**, *26*, 3621-3630.

[2] V. Pavet, M. M. Portal, J. C. Moulin, R. Herbrecht, H. Gronemeyer, *Oncogene* **2011**, *30*, 1-20.

[3] M. W. den Hollander, J. A. Gietema, S. de Jong, A. M. E. Walenkamp, A. K. L. Reyners, C. N. A. M. Oldenhuis, E. G. E. de Vries, *Cancer Lett.* **2013**, *332*, 194-201.

[4] (a) J. S. Swers, L. Grinberg, L. Wang, H. Feng, K. Lekstrom, R. Carrasco, Z. Xiao, I. Inigo, C. C. Leow, H. Wu, D. A. Tice, M. Baca, *Mol. Cancer Ther.* **2013**, *12*, 1235-1244; (b) J. E. Allen, R. Ferrini, D. T. Dicker, G. Batzer, E. Chen, D. I. Oltean, B. Lin, M. W. Renshaw, A. Kretz-Rommel, W. S. El-Deiry, *Mol. Cancer Ther.* **2012**, *11*, 2087-2095.

[5] (a) Y. M. Angell, A. Bhandari, A. Chakrabarti, M. N. De Francisco, A. N. Duguay, B. T. Frederick, K. Leu, K. Leuther, X. F. Li, K. Penta, S. Piplani, R. Sana, E. A. Whitehorn, P. J. Schatz, K. Yin, C. P. Holmes, in *19th American Peptide Symposium* (Ed.: S. E. Blondelle), Springer, San Diego, CA, **2005**, pp. 405-406; (b) Y. M. Angell, A. Bhandari, M. N. De Francisco, B. T. Frederick, J. M. Green, K. Leu, K. Leuther, R. Sana, P. J. Schatz, E. A. Whitehorn, K. Wright, C. P. Holmes, in *Peptides for Youth, Vol. 611* (Eds.: S. DelValle, E. Escher, W. D. Lubell), **2009**, pp. 101-103.

[6] B. Li, S. J. Russell, D. M. Compaan, K. Totpal, S. A. Marsters, A. Ashkenazi, A. G. Cochran, S. G. Hymowitz, S. S. Sidhu, *J. Mol. Biol.* **2006**, *361*, 522-536.

[7] (a) V. Pavet, J. Beyrath, C. Pardin, A. Morizot, M. C. Lechner, J. P. Briand, M. Wendland, W. Maison, S. Fournel, O. Micheau, G. Guichard, H. Gronemeyer, *Cancer Res.* **2010**, *70*, 1101-1110; (b) K. Gorska, J. Beyrath, S. Fournel, G. Guichard, N. Winssinger, *Chem Commun (Camb)* **2010**, *46*, 7742-7744; (c) G. Lamanna, C. R. Smulski, N. Chekkat, K. Estieu-Gionnet, G. Guichard, S. Fournel, A. Bianco, *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 1762-1768.

[8] (a) H. Zheng, D. Fink, H. Li, X. Jiang, S. Aebi, P. Law, M. Goodman, S. B. Howell, *Clin. Cancer. Res.* **1997**, *3*, 1323-1330; (b) G. Melacini, Q. Zhu, G. Osapay, M. Goodman, *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 2252-2258.

[9] (a) T. Passioura, T. Katoh, Y. Goto, H. Suga, *Annu. Rev. Biochem.* **2014**, *83*, 727-752; (b) T. Passioura, H. Suga, *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 6530-6536.

[10] (a) L. Moroder, *J. Pept. Sci.* **2005**, *11*, 187-214; (b) M. Muttenthaler, P. F. Alewood, *J. Pept. Sci.* **2008**, *14*, 1223-1239.

[11] C. A. MacRaild, J. Illesinghe, B. J. v. Lierop, A. L. Townsend, M. Chebib, B. G. Livett, A. J. Robinson, R. S. Norton, *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 755-762.

[12] M. Muttenthaler, A. Andersson, A. D. de Araujo, Z. Dekan, R. J. Lewis, P. F. Alewood, *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 8585-8596.

[13] (a) A. D. de Araujo, M. Mobli, G. F. King, P. F. Alewood, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 10298-10302; (b) P. J. Knerr, A. Tzekou, D. Ricklin, H. Qu, H. Chen, W. A. van der Donk, J. D. Lambris, *ACS Chem. Biol.* **2011**, *6*, 753-760; (c) Z. Dekan, I. Vetter, N. L. Daly, D. J. Craik, R. J. Lewis, P. F. Alewood, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 15866-15869.

[14] A. D. de Araujo, M. Mobli, J. Castro, A. M. Harrington, I. Vetter, Z. Dekan, M. Muttenthaler, J. Wan, R. J. Lewis, G. F. King, S. M. Brierley, P. F. Alewood, *Nat. Commun.* **2014**, *5*.

[15] H. Rink, *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 3787-3790.

[16] A. B. Tabor, *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 7606-7628.

[17] A. C. Ross, S. M. K. McKinnie, J. C. Vederas, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 2008-2011.

[18] J. P. Mayer, J. W. Zhang, S. Groeger, C. F. Lu, M. A. Jarosinski, *J. Pept. Res.* **1998**, *51*, 432-436.

[19] D. N. Harpp, J. G. Gleason, *J. Org. Chem.* **1971**, *36*, 73-&.

[20] A. K. Galande, J. O. Trent, A. F. Spatola, *Biopolymers* **2003**, *71*, 534-551.

[21] A. T. Brunger, P. D. Adams, G. M. Clore, W. L. DeLano, P. Gros, R. W. Grosse-Kunstleve, J.-S. Jiang, J. Kuszewski, M. Nilges, N. S. Pannu, R. J. Read, L. M. Rice, T. Simonson, G. L. Warren, *Acta Cryst.* **1998**, *D54*, 905-921.

[22] L. R. Thomas, R. L. Johnson, J. C. Reed, A. Thorburn, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 52479-52486.
[23] W. C. Hahn, R. A. Weinberg, *Nat. Rev. Cancer* **2002**, *2*, 331-341.
[24] E. Kaiser, R. L. Colescott, C. D. Bossinger, P. I. Cook, *Anal Biochem* **1970**, *34*, 595-598.
[25] M. Piotto, V. Saudek, V. Sklenar, *J. Biomol. NMR* **1992**, *2*, 661-665.

Received: ((will be filled in by the editorial staff))
Published online: ((will be filled in by the editorial staff))

Fig. S1. HPLC and MALDI-TOF analyses of **Lin** S2

Fig.S2. HPLC and MALDI-TOF analyses of **1** S2

Fig.S3. HPLC and MALDI-TOF analyses of crude and purified diastereoisomers obtained after desulfurization of **1**. S3

Fig.S4. HPLC and MALDI-TOF analyses of **Dim1**. S3

Fig.S5. Disulfide-bridged peptides and cognate desulfurized peptides do not bind to the negative control RANK receptor. S4

Table S1. ^{1}H and ^{13}C chemical shifts of compound **1** at 2.5 mM S5

Table S2. ^{1}H and ^{13}C chemical shifts of compound **2a** at 2.5 mM S6

Table S3. ^{1}H and ^{13}C chemical shifts of compound **2b** at 2.5 mM S7

Table S4. ^{1}H and ^{13}C chemical shifts of compound **2c** at 2.5 mM S8

Table S5. ^{1}H and ^{13}C chemical shifts of compound **Dim1** at 2.5 mM S9

Fig.S6. Comparison of NMR data of **2b** and **2c** with that of **2a**. S10

Fig.S7. Comparison of NMR data of **1** and **Dim1.** S11

Preparation of Lanthionine standards for GC-MS analysis S12

Scheme S1. Synthesis of hydrochloride of *R,R*-lanthionine dimethylester S12

Derivatization procedures S14

Scheme S2. Derivatization of lanthionines S14

GC/MS results S15

Fig. S8: a) Chromatograms of derivatized samples; b) Superimposition of all chromatograms showing the peaks of lanthionine-derivatives; c) MS (EI) spectrum of lanthionine-derivatives S16

Fragmentation analysis S16

Fig.S9. Lanthionine derivative high resolution mass spectrum S17

Table S6. Structural elucidation of the fragmentation ions shown in Fig. S9 ..... S17

Fig. S10: Fragmentation analysis S18

Fig.S11. Desulfurized **M1d** triggers dose-dependent apoptosis through DR5 receptor. S19

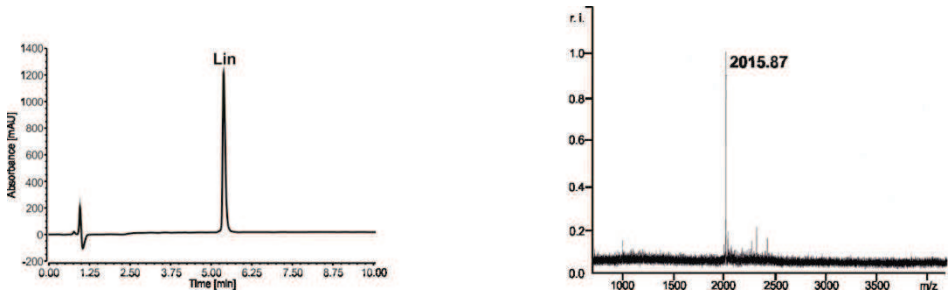


Fig. S1. HPLC and MALDI-TOF analyses of **Lin**

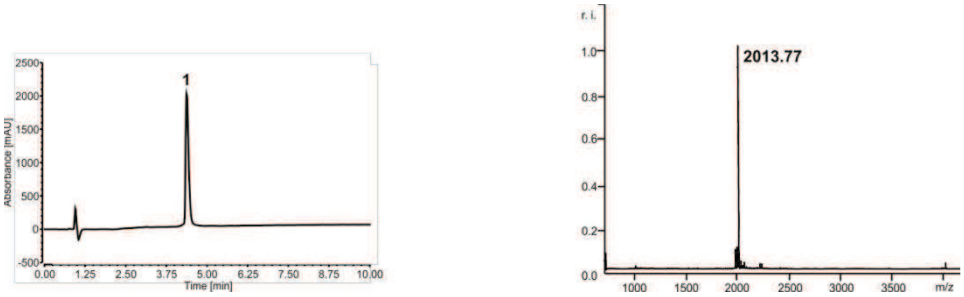


Fig.S2. HPLC and MALDI-TOF analyses of **1**

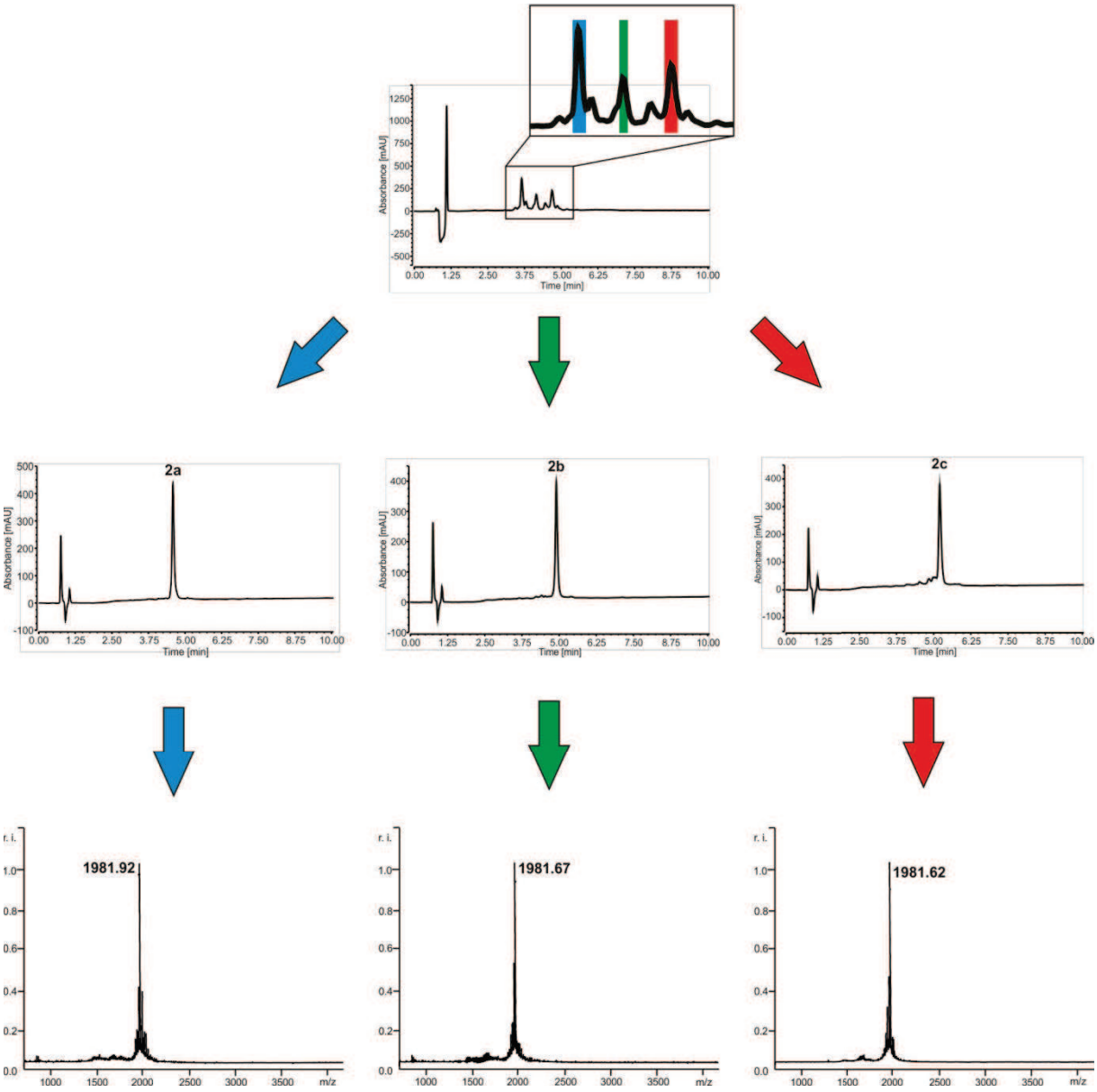


Fig.S3. HPLC and MALDI-TOF analyses of crude and purified diastereoisomers obtained after desulfurization of **1**.

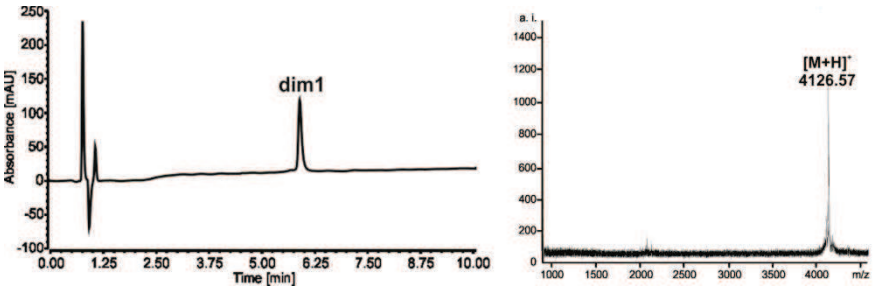


Fig.S4. HPLC and MALDI-TOF analyses of **Dim1**.

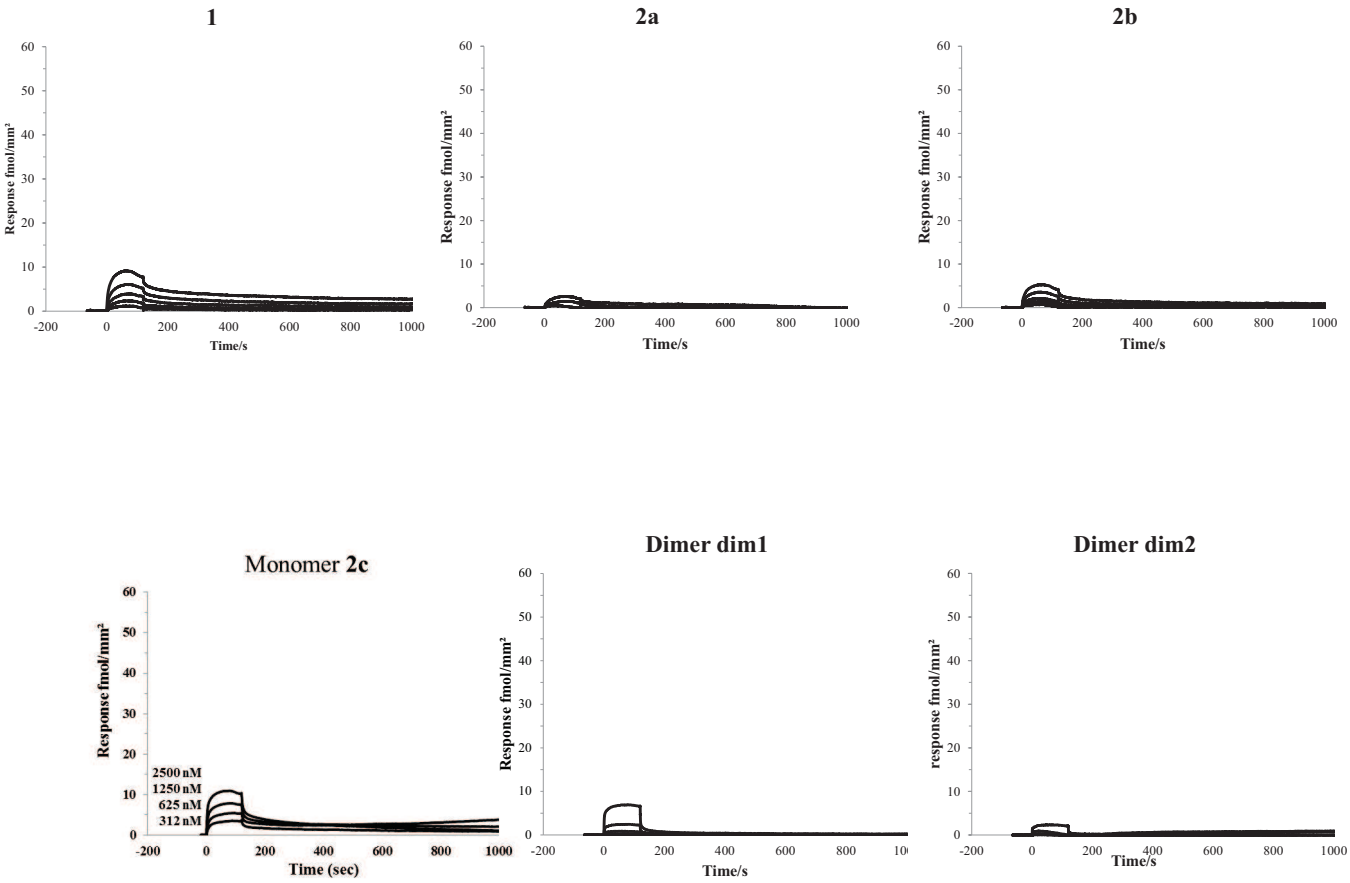


Fig.S5. Disulfide-bridged peptides and cognate desulfurized peptides do not bind to the negative control RANK receptor. Binding of cyclic peptides **1**, **Dim1** and desulfurized peptide **2a-2c**, **Dim2a** was analyzed on human RANK (density of RANK is 92 fmol/mm²) receptor considered as a negative control. All compounds were tested at the following concentrations: 5000, 2500, 1250, 625 and 312 µM. The interaction response was expressed in fmol/mm² (1000RU= 1ng/mm²).

Table S1. ^{1}H and ^{13}C chemical shifts of compound **1** at 2.5 mM in 95% H_2O: 5% D_2O, pH 5.85 (700 MHz, 293 K)

Residue	HN	Hα	Hβ	Hγ1	Hγ2	Hδ1	Hδ2	Hδ2	Hε	Hε1
	N	Cα	Cβ	Cγ1	Cγ2	Cδ1	Cδ2	Nδ2	Cε	Nε1
Trp1	8,27	4,75	3,28/3.15	1,99	7,25	7,54	7,25	7,51	7,13	10,17
	126,7	57,5	30,6	AcCH3	Hδ1	Hε3	HH2	HZ2	HZ3	Hε1
				24,9	127,1	121,0	125,0	114,9	122	129,3
				AcCH3	Cδ1	Cε3	CH2	CZ2	CZ3	Nε1
Asp2	8,62	4,66	2,57/2.54							
	121,6	54,2	41,4							
Cys3	8,35	4,78	3.15/2.98							
	120,0	55,9	42,4							
Leu4	8,39	4,36	1,70/1,70	1,62		0,93	0,88			
	122,9	55,4	42,7	27,4		25,2	23,5			
Asp5	8,21	4,64	2,77/2,62							
	120,4	54,2	41,6							
Asn6	8,44	4,68	2,87/2,87					7,62/6,88		
	119,8	53,7	38,8					112,2		
Arg7	8,35	4,28	1,89/1,85	1,66/1,66		3,22/3,18				7,49
	119,8	57,2	30,8	27,2		43,5				84,7
Ile8	8,02	4,19	1,94	1,47/1,20	0,92	0,88				
	118,7	61,5	38,7	27,6	17,6	13,2				
Gly9	8,39	4,07/3,86								
	112,0	45,7								
Arg10	8,15	4,37	1,88/1,76	1,61/1,61		3,17/3,17				7,26
	120,4	56,2	30,9	27,3		43,5				85,1
Arg11	8,48	4,33	1,83/1,78	1,62/1,62		3,16/3,16				7,26
	122,0	56,8	30,9	27,3		43,5				84,6
Gln12	8,51	4,40	2,07/1,98	2,33/2,33						7,54/6,90
	120,8	56,2	29,7	34,0						112,2
Cys13	8,52	4,91	3,13/3,06							
	120,8	55,9	43,1							
Val14	8,45	4,21	2,08	0,96	0,93					
	122,2	62,2	33,5	21,2	21,0					
Lys15	8,46	4,19	1,73/1,58	1,26/1,26		1,58/1,56			2,91/2.91	
	125,8	56,4	33,0	24,8		29,2			42,3	
Leu16	8,26	4,30	1,61/1,61	1,54		0,91	0,86		7,65/7,09	(CO)NH2
	125,4	55,1	42,67	27,2		25,17	23,54		108,6	(CO)NH2

Table S2. ^{1}H and ^{13}C chemical shifts of compound **2a** at 2.5 mM in 95% H_2O: 5% D_2O, pH 5.85 (700 MHz, 293 K)

Residue	HN	Hα	Hβ	Hγ1	Hγ2	Hδ1	Hδ2	Hδ2	Hε	Hε1
	N	Cα	Cβ	Cγ1	Cγ2	Cδ1	Cδ2	Nδ2	Cε	Nε1
Trp1	8,29	4,77	3,34/3,16	1,99	7,26	7,57	7,24	7,50	7,14	10,16
	126,7	57,2	30,6	AcCH3	Hδ1	Hε3	HH2	HZ2	HZ3	Hε1
				24,9	127,2	121,1	125,0	114,9	122,2	129,3
				AcCH3	Cδ1	Cε3	CH2	CZ2	CZ3	Nε1
Asp2	8,58	4,63	2,57/2.54							
	121,6	53,8	41,1							
Cys3	8,12	4,56	3,02/2,88							
	119,2	56,3	36,7							
Leu4	8,45	4,33	1,67/1,67	1,62		0,92	0,86			
	123,0	55,4	42,5	27,2		25,0	23,2			
Asp5	8,20	4,58	2,75/2,64							
	120,3	54,1	41,5							
Asn6	8,38	4,67	2,84/2,84					7,60/6,89		
	119,4	53,8	38,8					112,4		
Arg7	8,33	4,28	1,89/1,82	1,65/1,65		3,18/3,22				7,47
	120,2	57,0	30,9	27,2		43,6				84,7
Ile8	8,07	4,16	1,91	1,48/1,20	0,87	0,90				
	119,4	61,8	38,6	27,6	17,6	13,1				
Gly9	8,41	4,07/3,87								
	112,4	45,6								
Arg10	8,20	4,34	1,90/1,77	1,61/1,61		3,18/3,18				7,27
	120,0	56,0	30,9	27,2		43,6				84,6
Arg11	8,39	4,31	1,86/1,78	1,62/1,62		3,15/3,15				7,24
	121,1	56,6	31,1	27,2		43,6				84,6
Gln12	8,39	4,37	2,08/1,98	2,34/2,34						7,57/6,90
	120,8	56,0	29,7	34,1						112,4
Cys13	8,53	4,63	3,10/2,83							
	122,2	56,3	36,4							
Val14	8,54	4,20	2,08	0,95	0,93					
	123,3	62,3	33,4	21,2	21,1					
Lys15	8,41	4,18	1,70/1,52	1,22/1,22		1,58/1,56			2,90/2,90	
	125,5	56,4	33,1	24,9		29,2			42,1	
Leu16	8,28	4,33	1,61/1,61	1,52		0,89	0,85		7,64/7,13	(CO)NH2
	125,5	54,8	42,5	27,1		25,0	23,2		108,1	(CO)NH2

Table S3. ^{1}H and ^{13}C chemical shifts of compound **2b** at 2.5 mM in 95% H_2O: 5% D_2O, pH 5.85 (700 MHz, 293 K)

Residue	HN	Hα	Hβ	Hγ1	Hγ2	Hδ1	Hδ2	Hδ2	Hε	Hε1
	N	Cα	Cβ	Cγ1	Cγ2	Cδ1	Cδ2	Nδ2	Cε	Nε1
Trp1	8,18	4,70	3,34/3,21	1,97	7,27	7,62	7,23	7,49	7,14	10,15
	126,7	57,4	30,0	AcCH3	Hδ1	Hε3	HH2	HZ2	HZ3	Hε1
				24,8	127,2	121,4	125,0	114,9	122,1	129,3
				AcCH3	Cδ1	Cε3	CH2	CZ2	CZ3	Nε1
Asp2	8,38	4,57	2,57/2,56							
	121,7	54,3	41,6							
Cys3	8,17	4,38	3,04/2,92							
	118,8	56,1	36,5							
Leu4	8,30	4,31	1,65/1,65	1,59		0,91	0,86			
	122,1	55,2	42,7	27,2		25,1	23,5			
Asp5	8,25	4,59	2,76/2,64							
	120,1	54,3	41,5							
Asn6	8,38	4,66	2,82/2,82					7,60/6,90		
	120,3	53,5	38,8					112,4		
Arg7	8,35	4,26	1,88/1,84	1,65/1,65		3,17/3,21				7,52
	120,3	57,1	30,8	27,2		43,6				84,6
Ile8	8,04	4,17	1,93	1,47/1,20	0,91	0,88				
	119,0	61,6	38,5	27,7	17,7	13,1				
Gly9	8,37	4,07/3,87								
	111,9	45,6								
Arg10	8,17	4,36	1,89/1,77	1,61/1,61		3,16/3,16				7,23
	120,1	56,1	30,8	27,2		43,6				84,6
Arg11	8,42	4,35	1,87/1,77	1,61/1,61		3,16/3,16				7,22
	121,6	56,3	30,8	27,2		43,7				84,8
Gln12	8,43	4,37	2,08/1,99	2,35/2,35						7,58/6,90
	121,0	56,1	29,7	34,0						112,2
Cys13	8,56	4,56	2,99/2,88							
	122,0	56,2	36,2							
Val14	8,39	4,12	2,06	0,94	0,94					
	123,2	62,5	33,2	21,0	21,2					
Lys15	8,44	4,33	1,81/1,73	1,42/1,37		1,66/1,66			2,96/2,96	
	125,7	56,3	33,2	24,9		29,1			42,2	
Leu16	8,37	4,32	1,66/1,57	1,63/1,63		0,92	0,87		7,66/7,10	(CO)NH2
	125,2	55,2	42,8	27,3		25,1	23,2		108,5	(CO)NH2

Table S4. ^{1}H and ^{13}C chemical shifts of compound **2c** at 2.5 mM in 95% H_2O: 5% D_2O, pH 5.85 (700 MHz, 293 K)

Residue	HN	Hα	Hβ	Hγ1	Hγ2	Hδ1	Hδ2	Hδ2	Hε	Hε1
	N	Cα	Cβ	Cγ1	Cγ2	Cδ1	Cδ2	Nδ2	Cε	Nε1
Trp1	8,22	4,66	3,32/3,21	1,98	7,28	7,62	7,24	7,50	7,15	10,16
	126,9	57,5	30,0	AcCH3	Hδ1	Hε3	HH2	HZ2	HZ3	Hε1
				24,7	127,2	121,4	125,0	114,9	122,1	129,2
				AcCH3	Cδ1	Cε3	CH2	CZ2	CZ3	Nε1
Asp2	8,36	4,53	2,51/2,43							
	121,0	54,1	41,3							
Cys3	8,16	4,48	3,01/2,84							
	119,4	56,1	35,2							
Leu4	8,43	4,34	1,65/1,65	1,61		0,92	0,86			
	123,5	55,8	42,7	27,2		25,1	23,4			
Asp5	8,08	4,59	2,78/2,61							
	120,0	54,2	41,6							
Asn6	8,41	4,69	2,85/2,85					7,62/6,90		
	120,1	53,3	38,8					112,4		
Arg7	8,33	4,29	1,88/1,85	1,66/1,66		3,19/3,22				7,57
	120,6	56,7	30,8	27,2		43,6				84,7
Ile8	8,15	4,13	1,91	1,50/1,22	0,92	0,89				
	120,3	61,8	38,6	27,7	17,6	13,0				
Gly9	8,50	4,11/3,88								
	112,6	45,6								
Arg10	8,21	4,39	1,90/1,78	1,62/1,62		3,18/3,18				7,28
	120,3	56,1	30,8	27,2		43,6				84,6
Arg11	8,43	4,34	1,89/1,79	1,62/1,62		3,18/3,18				7,25
	121,1	56,3	30,8	27,2		43,7				84,6
Gln12	8,46	4,32	2,12/2,01	2,34/2,34						7,51/6,89
	119,4	56,1	29,6	34,0						112,2
Cys13	8,46	4,54	3,11/2,93							
	120,3	56,0	35,6							
Val14	8,33	4,12	2,10	0,97	0,93					
	121,3	62,4	33,0	21,0	21,2					
Lys15	8,37	4,27	1,79/1,70	1,40/1,36		1,65/1,65			2,96/2,96	
	125,1	56,5	32,9	25,0		29,0			42,0	
Leu16	8,31	4,32	1,65/1,57	1,62/1,62		0,92	0,88		7,65/7,11	(CO)NH2
	125,0	54,9	42,8	27,3		25,1	23,4		108,5	(CO)NH2

Table S5. ^{1}H and ^{13}C chemical shifts of compound **Dim1** at 2.5 mM in 95% H_2O: 5% D_2O, pH 5.85 (700 MHz, 293 K)

Residue	HN	Hα	Hβ	Hγ1	Hγ2	Hδ1	Hδ2	Hδ2	Hε	Hε1
	N	Cα	Cβ	Cγ1	Cγ2	Cδ1	Cδ2	Nδ2	Cε	Nε1
Trp1	8,16	4,76	3,24/3,10	1,97	7,20	7,50	7,17	7,44	7,07	10,04
	126,6	57,5	30,6	AcCH3	Hδ1	Hε3	HH2	HZ2	HZ3	Hε1
				24,9	127,2	120,9	124,8	114,9	122,1	129,1
				AcCH3	Cδ1	Cε3	CH2	CZ2	CZ3	Nε1
Asp2	8,58	4,69	2,62/2,56							
	121,5	54,2	41,4							
Cys3	8,32	4,79	3,08/2,95							
	119,8	55,9	42,3							
Leu4	8,33	4,35	1,69/1,62	1,62		0,91	0,85			
	122,7	55,4	42,4	27,4		25,1	23,5			
Asp5	8,14	4,65	2,76/2,62							
	120,5	54,2	41,6							
Asn6	8,38	4,67	2,86/2,86					7,56/6,83		
	120,1	53,7	38,8					112,1		
Arg7	8,34	4,27	1,88/1,86	1,66/1,66		3,19/3,22				7,48
	119,8	57,2	30,8	27,2		43,5				84,9
Ile8	7,94	4,20	1,95	1,46/1,19	0,91	0,86				
	118,2	61,6	38,7	27,5	17,7	13,2				
Gly9	8,30	4,07/3,86								
	111,8	45,7								
Arg10	8,09	4,37	1,86/1,75	1,60/1,60		3,17/3,17				7,26
	120,4	56,2	30,9	27,3		43,5				84,9
Arg11	8,41	4,35	1,83/1,77	1,60/1,60		3,15/3,15				7,24
	121,8	56,9	30,9	27,3		43,5				84,8
Gln12	8,44	4,43	2,06/1,98	2,32/2,32						7,46/6,84
	120,7	56,2	29,8	34,0						111,8
Cys13	8,44	4,92	3,06/3,00							
	120,7	55,9	43,5							
Val14	8,39	4,25	2,09	0,93	0,94					
	121,2	62,4	33,6	21,1	20,9					
Lys15	8,27	4,20	1,69/1,52	1,18/1,18		1,37/1,37	4,00	8,01	3,12/3,12	
							COCH2O	Hζ		
	125,1	56,5	33,1	25,3		30,7	72,7	121,0	41,7	
							COCH2O	Nζ		
Leu16	8,09	4,29	1,61/1,57	1,54/1,54		0,88	0,84		7,5/7,01	(CO)NH2
	124,4	55,2	42,4	27,2		25,2	23,5		107,5	(CO)NH2

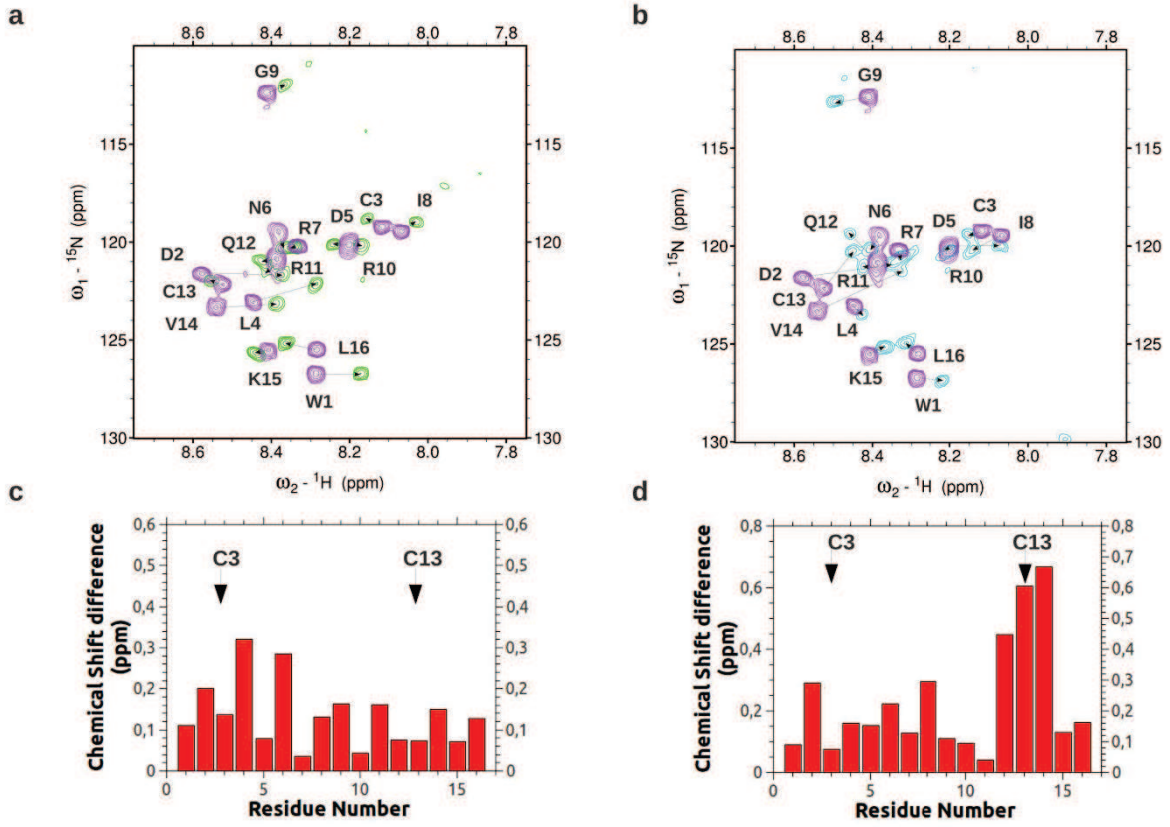


Fig.S6. Comparison of NMR data of **2b** and **2c** with that of **2a**. Superimposition of the $^{1}H^{15}N$ HSQC spectra of a) **2b** (green) and b) **2c** (cyan) onto the spectrum of **2a** (purple). The arrows indicate the chemical shift pertubations induced by the cysteine isomerization of **2a** to **2b** and to **2c**. Plots of the combined chemical differences between c) **2a** and **2b** and d) **2a** and **2c** versus the residue number in backbone amide $^{1}H_N$ and ^{15}N. The combined $^{1}H_N$ and ^{15}N shift changes were calculated as $\Delta\omega$ (ppm) = $((\Delta^{1}H_N)^2+0.1(\Delta^{15}N)^2)^{1/2}$.

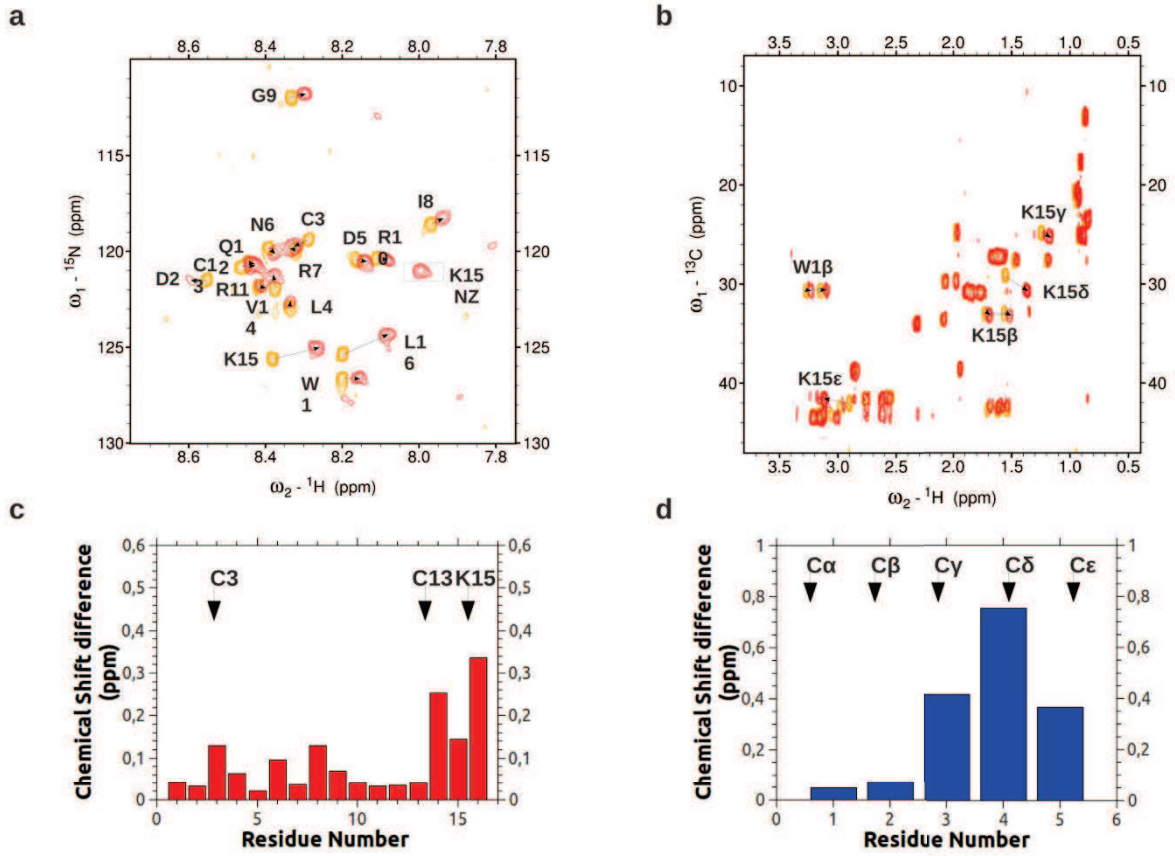
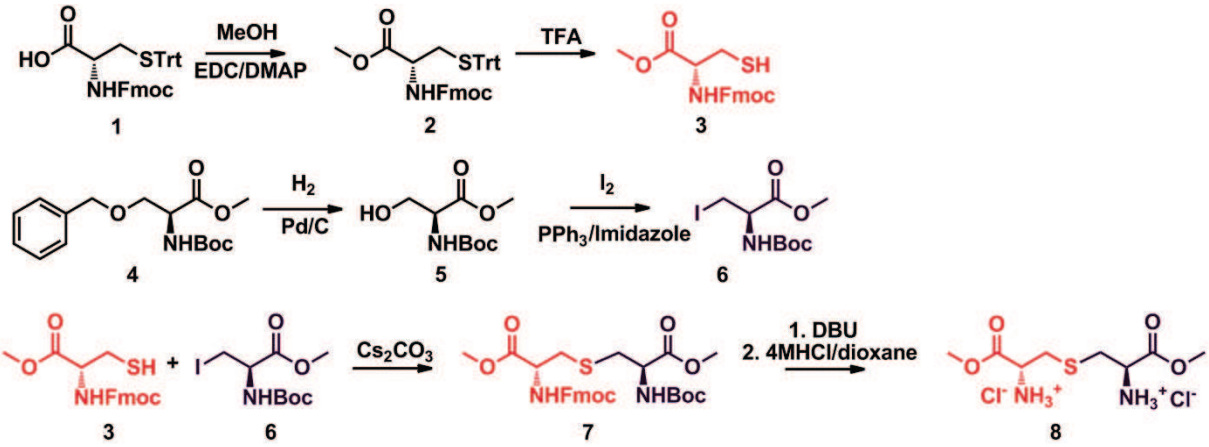


Fig.S7. Comparison of NMR data of **1** and **Dim1.** a) Superimposition of the $^{1}H^{15}N$ HSQC and b) $^{1}H^{13}C$ HSQC spectra of **1** (yellow) and **Dim1** (red). The arrows indicate the chemical shift pertubations induced by the dimerization of **1** to **Dim1**. Plots of the combined chemical differences between **1** and **Dim1**, in backbone amide $^{1}H_N$ and ^{15}N. c) versus the residue number, as well as in backbone ^{1}H and ^{13}C resonances of the branching lysine 15. d). The combined ^{1}HN and ^{15}N shift changes were calculated as $\Delta\omega$ (ppm) = $((\Delta^{1}H_N)^2+0.1(\Delta^{15}N)^2)^{1/2}$. The combined ^{1}H and ^{13}C shift changes were calculated as $\Delta\omega$ (ppm) = $((\Delta^{1}H)^2+0.25(\Delta^{13}C)^2)^{1/2}$.

Preparation of Lanthionine standards for GC-MS analysis

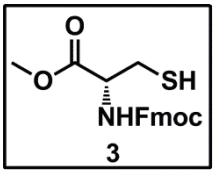
The sample of meso-lanthionine (containing approximately 30 % of *R,R* lanthionine) was a gift from professor Jesús M. Peregrina (Departamento de Química, Universidad de La Rioja, Centro de Investigación en Síntesis Química, Logroño, Spain)[1]

The *R,R*-lanthionine dimethyl ester was prepared according to the procedure given in Scheme S1. Individual steps were not optimized.



Scheme S1. Synthesis of hydrochloride of *R,R*-lanthionine dimethylester

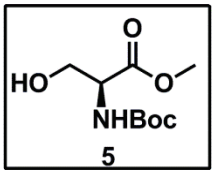
Esterification procedure - synthesis of Fmoc-L-Cys(Trt)-OMe (1) and Boc-L-Ser(Bzl)-OMe (4): Fmoc-L-Cys(Trt) or Boc-L-Ser(Bzl) (1mmol) was suspended in DCM (5mL). DMAP (12.2 mg, 0.1mmol) and dry MeOH (0.049mL, 1.2mmol) were added. The reaction mixture was cooled in ice/water bath and after 10 min. EDC (0.19 g, 1mmol) was added. The reaction was finished after 6h. The mixture was diluted with DCM (15mL) and washed with $NaHCO_3$ sat. (3x15mL), 1M $KHSO_4$ (1x15mL), brine (1x15mL), dried over Na_2SO_4. Fmoc-L-Cys(Trt)-OMe (**1**) (yield 99%) was obtained as a white foam and was taken to the next step without purification. Boc-L-Ser(Bzl)-OMe (**4**) was purified by silica gel chromatography (cH:EtOAc, 8:2); the product was obtained as transparent oil (yield 89%).



Trt-deprotection - synthesis of Fmoc-L-Cys(SH)-OMe (3): Fmoc-L-Cys(Trt)-OMe **1** (0.297 g, 0.49mmol) was dissolved in TFA (5mL) and cooled in ice/water bath. The reaction mixture became dark orange. Triisopropylsilane TIS (0.12mL, 0.59mmol) was added and the reaction mixture was stirred under N_2. The white precipitation appeared. The progress of reaction was checked by TLC. When the reaction was finished, TFA was evaporated and the residue was co-evaporated (1x) with cyclohexane. The product was purified by column chromatography (cH:EtOAc 9:1, 8:2). **Fmoc-L-Cys(SH)-OMe (3):** White solid; yield 80%; ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 7.81 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H), 7.65 (d, *J* = 7.3 Hz, 2H),

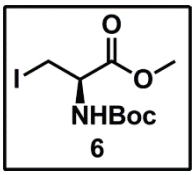
[1] C. Aydillo, A. Avenoza, J. H. Busto, G. Jiménez-Osés, J. M. Peregrina, M. M. Zurbano, *Org. Lett.* **2011**, *14*, 334-337.

7.45 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 7.36 (tt, *J* = 7.4, 1.3 Hz, 2H), 5.71 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 4.71 (dt, *J* = 7.7, 4.0 Hz, 1H), 4.54 – 4.40 (m, 2H), 4.27 (t, *J* = 6.8 Hz, 1H), 3.84 (s, 3H), 3.04 (dd, *J* = 8.8, 2.8 Hz, 2H).



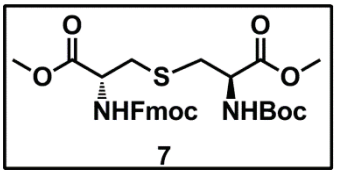
5

Bn deprotection - synthesis of Boc-L-Ser(OH)-OMe (5): Boc-L-Ser(Bn)-OMe **4** (0.55g, 1.77mmol) was dissolved in MeOH (15mL) and Pd/C was added (10% (w/w)). The reaction mixture was stirred under H_2 atmosphere (balloon) overnight. After filtration over Millipore paper filter, the solvent was evaporated and the product was purified by flash chromatography (cH:EtOAc 6:4). **Boc-L-Ser(OH)-OMe (5):** Oil; yield 93%; ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 5.46 (s, 1H), 4.42 (s, 1H), 4.05 – 3.89 (m, 2H), 3.82 (s, 3H), 2.26 (s, 1H), 1.49 (s, 9H).



6

Iodination procedure - synthesis of Boc-Ser(I)-OMe (6)[2]: PPh_3 (0.302g, 1.15mmol) and imidazole (0.0782g, 1.15mmol) were dissolved in dry DCM (12mL) and cooled in ice/water bath. I_2 (0.292g, 1.15mmol) was added and the reaction mixture was warmed to RT, stirred 10 min. and re-cooled again in ice/water bath. Boc-L-Ser(OH)-OMe **5** (0.2g, 0.92 mmol) in dry DCM (8 mL) was added dropwise. The reaction mixture was stirred at 0°C for 30 min. and then left overnight at RT. Next, the reaction mixture was concentrated, the white solid was filtered off and washed with small amount of DCM. Filtrate was evaporated, adsorbed on silica gel and purified by column chromatography (cH:EtOAc 9.5:0.5, 9:1). **Boc-Ser(I)-OMe (6):** Oil, solidified in the freezer (-20°C); yield 40% (purity ~90%); ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 5.38 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 4.56 (dt, *J* = 7.6, 3.8 Hz, 1H), 3.84 (s, 3H), 3.67 – 3.54 (m, 2H), 1.50 (s, 9H).



7

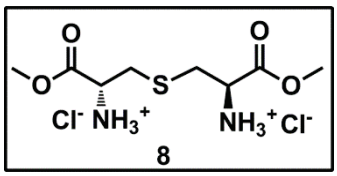
Protected R,R- lanthionine synthesis (7):[3,4] Boc-Ser(I)-OMe **6** (0.12g, 0.36mmol) was dissolved in dry DMF (5mL). Fmoc-Cys(SH)-OMe **3** (0.129g, 0.36mmol) was dissolved in dry DMF (5mL) and was added to Boc-Ser(I)-OMe **6** solution. Cs_2CO_3 (0.117g, 0.36mmol) was added in one portion and the reaction mixture was stirred under N_2 at RT for 2h. The progress of reaction was checked by HPLC. After 2h the reaction mixture was dilluted with EtOAc (150mL) and washed with 5% citric acid (2x50mL), H_2O (6x50mL), dried over Na_2SO_4. The product was purified by column chromatography (DCM:EtOAc, 9.5:0.5, 9:1). **Protected R,R-lanthionine 7:** White foam; yield 58%; ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 7.80 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H), 7.65 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H), 7.44 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 7.39 – 7.31 (m, 2H), 5.73 (d, *J* = 6.6 Hz, 1H), 5.38 (d, *J* = 6.5 Hz, 1H), 4.73 – 4.60 (m, 1H), 4.55 (bs, 1H), 4.45 (d, *J* = 7.0 Hz, 2H), 4.28 (t, *J* = 7.0 Hz, 1H), 3.82 (s, 3H), 3.78 (s, 3H), 3.14 – 2.94 (m, 4H), 1.48 (s, 9H); ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 171.23, 170.97, 155.79, 155.19, 143.82, 143.75, 141.34, 127.77, 127.12, 125.14, 120.02, 80.47, 67.33, 53.78, 53.36, 52.81, 52.68, 47.13, 35.40, 35.19, 28.31. ESI MS: 581 [M+Na]+, 1139 [2M+Na]+

Fmoc-deprotection of dimethyl ester of lanthionine: Compound **7** (0.092g, 0.16mmol) was dissolved in Et_2O (4 mL) and DBU (31µL, 0.2mmol) was added. The reaction was completed after 10 min. The reaction mixture was evaporated to dryness. Some byproduct was formed during the evaporation, but was not characterized. The product was purified by column chromatography (DCM:MeOH,

---

[2] B. M. Trost , M. T. Rudd, *Org Lett* **2003**, 5, 4599-4602
[3] H. Shao, S. H. H. Wang, C.-W. Lee, G. Osapay, M. Goodman, *J. Org. Chem.* **1995**, 60, 2956-2957
[4] B. Mothia, A. N. Appleyard, S. Wadman, A. B. Tabor, *Org Lett* **2011**, 13, 4216-4219

9.8:0.2) and was obtained as a white foam (yield 84%, purity ~85%). The product was taken to the next step without any further purification.



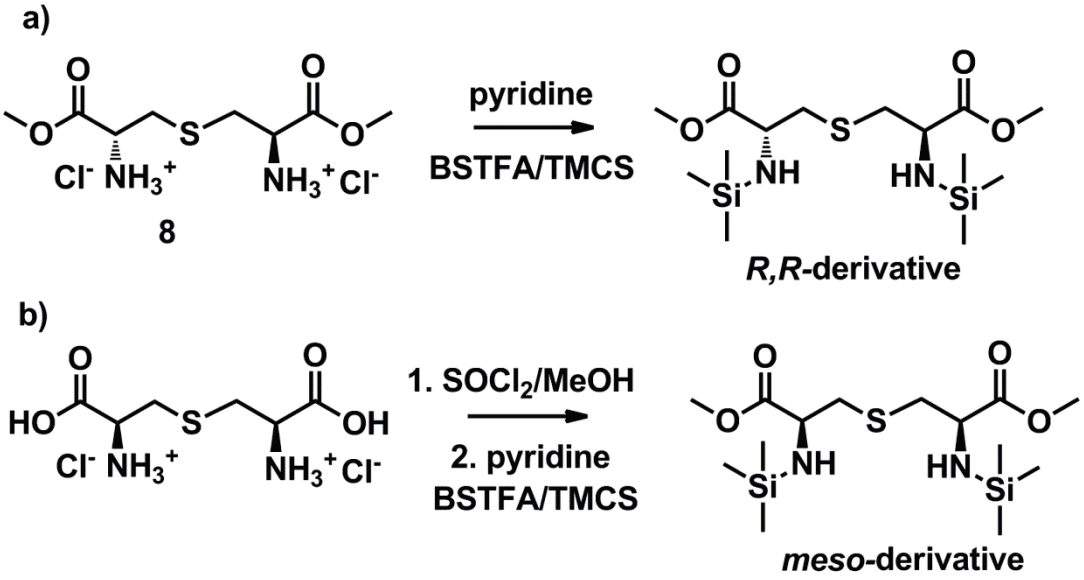
8

Boc-deprotection of partially deprotected dimethyl ester of lanthionine (compound 8): Partially deprotected dimethyl ester of lanthionine (15mg) was dissolved in 4M HCl/dioxane (1mL). The reaction mixture was stirred for 8h at RT, under N_2. The solvent was evaporated to dryness and the product was purified by layer crystallization: the crude product was dissolved in very small amount of MeOH and Et_2O was added to obtained two layers. After 24h white crystals were filtered and washed many times with cold Et_2O.

Hydrochloride of *R,R*-lanthionine dimethyl ester (8): White crystals; yield 44%; ^{1}H NMR (300 MHz, DMSO d_6) δ 8.63 (bs, 6H), 4.37 (t, *J* = 5.9 Hz, 2H), 3.80 (s, 6H), 3.11 (ddd, *J* = 21.2, 14.6, 6.0 Hz, 4H). ESI MS: 237 $[M+H]^+$, 473 $[2M+H]^+$

Derivatization procedures

To prove the stereochemistry of lanthionine fragment in desulfurized peptide **2a**, a GC/MS analyses on chiral column were performed. Initially, we tried to use a derivatization method previously reported in the literature.[5] The lanthionine (*meso* and *R,R*) samples as methyl esters were transformed into pentafluopropionyl amides. Unfortunately, we were not able to obtain satisfactory GC/MS results. We changed the derivatization procedure and lanthionines were analyzed as trimethylsilyl derivatives.



Scheme S2. Derivatization of lanthionines: a) *R,R*-lanthionine b) *meso*-lanthionine

[5] E. Küsters, H. Allgaier, G. Jung, E. Bayer, *Chromatographia* **1984**, *18*, 287-293

R,*R*-derivative

To the sample of hydrochloride of *R,R*-lanthionine dimethyl ester **8**, pyridine followed by N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide)/trimethylchlorosilane (BSTFA/TMCS) mixture was added. Afterwards, the reaction mixture was transferred into the vial with glass insert, heated for 30 min at 60 °C and 1µl of the derivatized sample was injected into GC/MS.

Meso-derivative

The sample was suspended in MeOH, cooled to -5°C and $SOCl_2$ was added. The vial was closed tightly and the mixture was heated at 90°C for 40 min. The solvent was removed in the stream of argon and the sample was dried. Next, pyridine followed by N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide)/trimethylchlorosilane (BSTFA/TMCS) mixture was added to the sample. Afterwards, the reaction mixture was transferred into the vial with glass insert, heated for 30 min at 60 °C and 1µl of the derivatized sample was injected into GC/MS.

*Hydrolysis and derivatisation of peptide **2a***

The peptide sample (0.5mg) was dissolved in 2mL 6M HCl. The vial was closed tightly and the sample was heated at 110°C for 24h. After that time, the remaining acid solution was evaporated under the vacuum. MeOH was added to the sample and evaporated; it was repeated three times and the sample was dried under the vacuum to be sure that all water was removed. Next the hydrolyzed peptide sample was suspended in MeOH, cooled to -5°C and $SOCl_2$ was added. The vial was closed tightly and the mixture was heated at 90°C for 40 min. The solvent was removed in the stream of argon and the sample was dried. Next, pyridine followed by BSTFA/TMCS mixture was added to the sample. Afterwards, the reaction mixture was transferred into the vial with glass insert, heated for 30 min at 60 °C and 1µl of the derivatized sample was injected into GC/MS.

GC/MS results

Gas chromatography was performed using GC/MS-QP2010 Ultra gas chromatograph coupled to QP-5000 (Shimadzu) single quadrupole mass spectrometer; GC/MS was equipped with AOC-5000 autosampler (Shimadzu). Separation of the compounds was carried out with CP-Chirasil-L-Val (Agilent) capillary column: (25m x 0.25mm, 0.12 µm film thickness). Carrier gas (He) was delivered at a flow rate of 9.1 ml/min, split ratio was 30:1 and the pressure was maintained constantly. Chromatographic conditions were as follows: injector temperature 250°C; temperatures of the MS transfer line and ion source were set to 250°C. Temperature was programmed as follows: initially 100°C maintained for 2 min, then 1°C/min to 190°C, maintained for 2 min; analysis was completed in 94 minutes. MS was equipped with electron impact (EI) ion source (70 eV) and the spectrum was acquired in the total ion current (TIC) mode in the mass range 35 - 600 m/z, solvent cut was 5 min. GCMSsolution 2.53 (Shimadzu) software was used for data analysis.

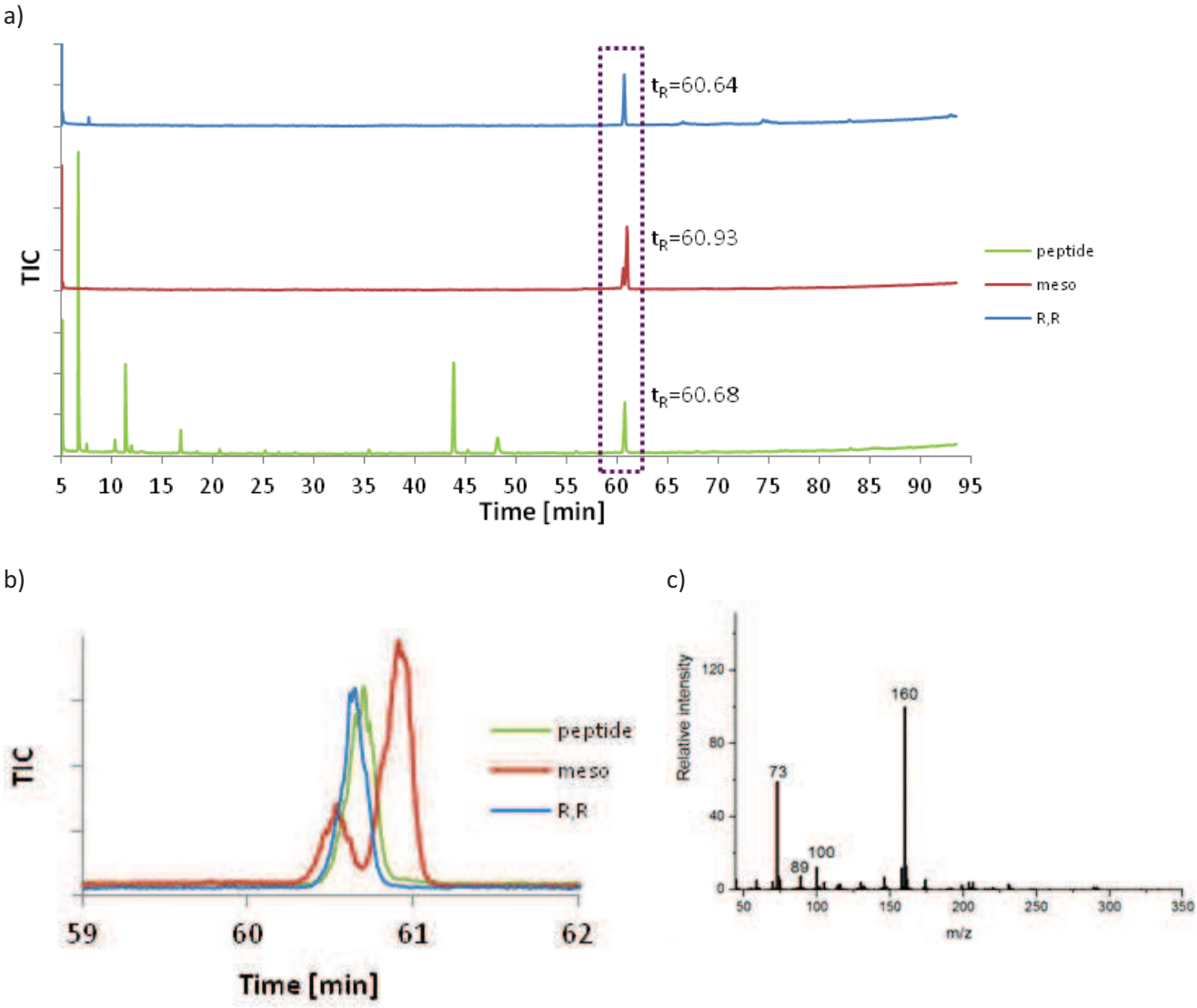


Fig. S8: a) Chromatograms of derivatized samples; b) Superimposition of all chromatograms showing the peaks of lanthionine-derivatives; c) MS (EI) spectrum of lanthionine-derivatives

Fragmentation analysis

As shown in **Fig. S8c**, relatively few fragmentation ions were observed despite the use of an EI ion source. Molecular ion for the lanthionine derivative was not detected. In order to provide additional structural information, high resolution mass spectrum of the derivative was acquired using GC coupled to the time-of-flight (ToF) mass spectrometer. GC/ToF mass spectrum of the studied lanthionine derivative is shown in **Fig. S9**.

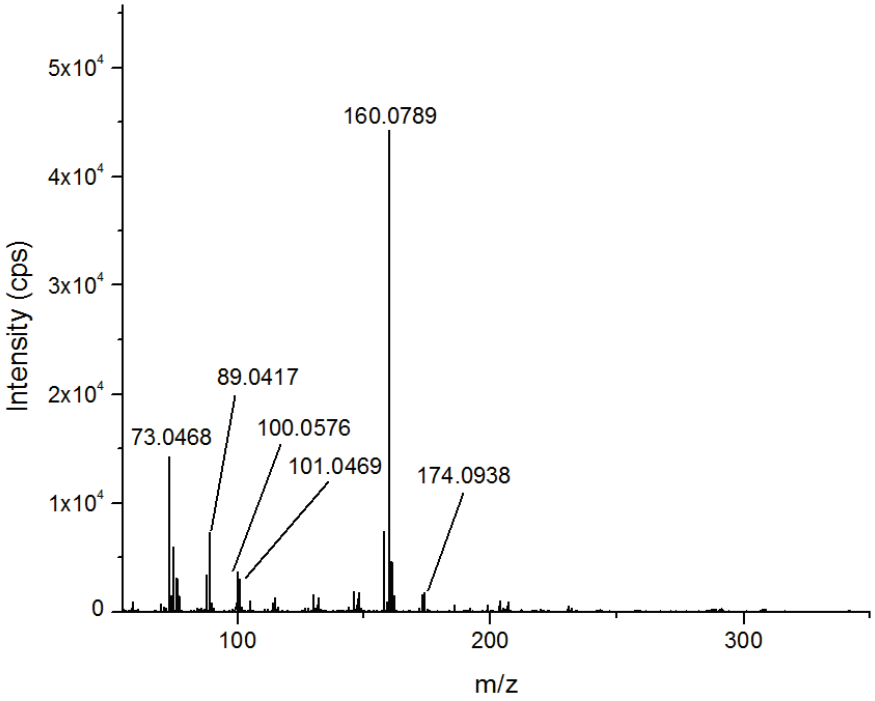
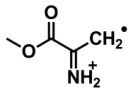
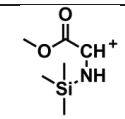
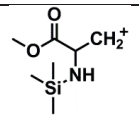


Fig.S9. Lanthionine derivative high resolution mass spectrum

For the major peaks, elemental formulas were assigned. Using the acquired data, structural elucidation for the major fragmentation ions structures was performed. Results are summarized in **Table S6.**

Table S6. Structural elucidation of the fragmentation ions shown in Fig. S9

Proposed fragmentation ion structure	Elemental composition	m/z (measured)	m/z (calculated, monoisotopic)
	C_3H_9Si	73.0468	73.0468
	$C_4H_7NO_2$	101.0476	101.0477
	$C_6H_{14}NO_2Si$	160.0789	160.0788
	$C_7H_{16}NO_2Si$	174.0938	174.0944

As shown in **Fig. S10**, major fragment ions formation can be explained by simple bond cleavage of the parent molecular ion. Both ions m/z 160.0789 (pathway a) as well as m/z 174.0938 (pathway b) can be produced via simple bond cleavage of the two possible molecular ions. Fragmentation pathway a is clearly predominant producing secondary carbocation, since the major ion in the mass spectra shown in **Fig. S8b** and **S9** is m/z 160 ion. Ion m/z 73.0468 is very characteristic fragment for the TMS derivative and can be formed by simple bond cleavage of molecular ion (pathway c) as well as via number of rearrangement reactions. Formation of the ion m/z 101.0476 is more difficult to elucidate. This ion can potentially be formed via hydrogen rearrangement to the amine nitrogen, however this conclusion cannot be confirmed, based on the acquired experimental data.

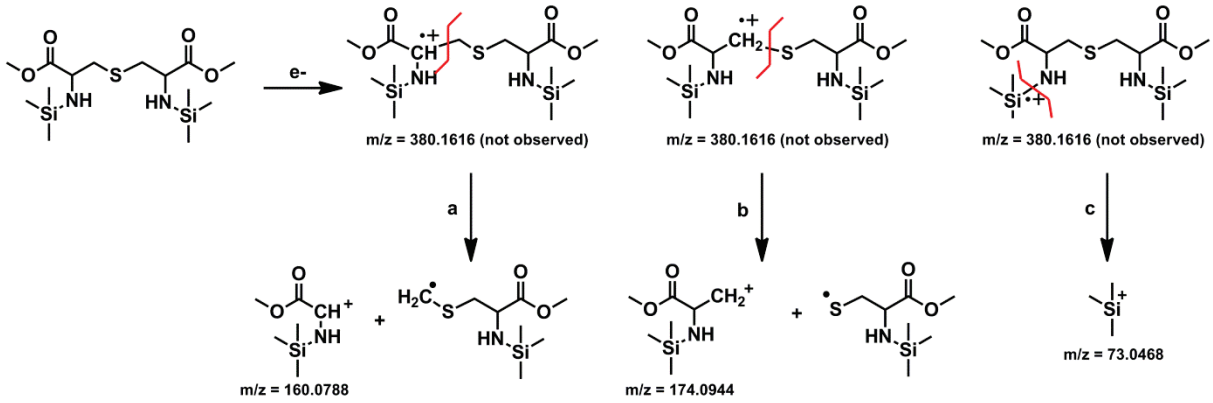


Fig. S10: Fragmentation analysis

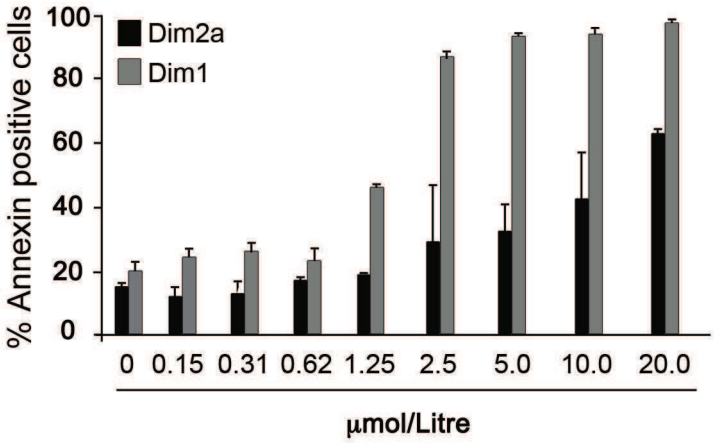


Fig.S11. Desulfurized **M1d** triggers dose-dependent apoptosis through DR5 receptor. BJAB cells were treated with the indicated doses of desulfurized **Dim1** and **Dim2a** during 40hrs and apoptosis was determined as the percentage of Annexin V positive cells. Results represent mean +/- standard deviation of at least two independent biological replicas.

CHAPITRE 1

Article 2 : The degree of Death Receptor 5 oligomerization required to induce apoptosis differs according to tumor cell lines and is independent of ligand internalization

(en préparation)

The degree of Death Receptor 5 oligomerization required to induce apoptosis differs according to tumor cell lines and is independent of ligand internalization

(Article en préparation)

Julien Beyrath, Neila Chekkat, Cristian R. Smulski, Marie-Charlotte Lechner, Marion Decossas Maria Vittoria Spanedda, Benoît Frisch, Gilles Guichard*, Sylvie Fournel*
* corresponding authors that shared senior authorship

Abbreviations

TNF, tumor necrosis factor; TNFR, TNF receptor; TRAIL, TNF-related apoptosis-inducing ligand; DR5, death receptor 5 ; DISC, Death inducing signaling complex ; EC50, half maximal effective concentration ; IC50, half maximal inhibitory concentration ; mAb, monoclonal antibody; HRP, horseradish peroxidase; PE, phycoerythrin ; FITC, fluorescein isothiocyanate; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis; FCS, foetal calf serum; SPR (Surface Plasmon resonance).

Abstract

TRAIL-R1 and TRAIL-R2 (DR4 and DR5) represent great targets for cancer therapy due to their ability to trigger apoptosis of cancer cells, but not normal ones, when activated by their cognate ligand TRAIL (TNF related apoptosis-inducing ligand). Therapies based on soluble recombinant TRAIL or agonist antibodies directed against one of the receptors are currently under clinical trials. However, TRAIL-R positive tumor cells are frequently resistant to TRAIL induced apoptosis. The precise mechanisms of this resistance are still not entirely understood. We have previously reported on synthetic divalent or trivalent peptides that bind to TRAIL-R2 ($TRAIL^{mim/DR5}$) and induce tumor cell apoptosis *in vitro* and *in vivo*. Here, we showed that while hexameric soluble TRAIL is able to efficiently kill the TRAIL-R2 positive lymphoma cell line Jurkat, these cells are resistant to apoptosis induced by the divalent form of $TRAIL^{mim/DR5}$ as well as by an anti-TRAIL-R2 agonist monoclonal antibody. This TRAIL-R2-induced apoptosis can be restored by cross link of anti-TRAIL-R2 agonist antibody but not by cross linking of the divalent form of $TRAIL^{mim/DR5}$. Interestingly, the divalent form of $TRAIL^{mim/DR5}$ that induced apoptosis of TRAIL-R2 positive BJAB cells, acts as an inhibitor of TRAIL-induced apoptosis on Jurkat cells. The rapid internalization of TRAIL-R2 observed in both cell lines when treated with divalent form of $TRAIL^{mim/DR5}$ could explain the antagonist activity of the ligand on Jurkat cells but also highlights the independence of the mechanisms responsible for the internalization of TRAIL-R2

and the activation of the TRAIL-R2- dependent apoptotic cascade. Furthermore, we pinpoint that special care must be taken we considering TRAIL-R2 as an anticancer target as some ligands have a cell-dependent agonist or antagonist activity.

Introduction

Tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL/Apo2L/TNFSF10) belongs to the TNF ligand superfamily (Locksley et al., 2001) and triggers apoptosis. TRAIL bears great value for cancer therapy as it preferentially kills tumor cells while sparing normal ones (Ashkenazi, et al.,2008; Gonzalvez, et al., 2010). There are five different TRAIL receptors: two fully functional called TRAIL-R1 (TNFRSF10A/DR4) and TRAIL-R2 (TNFRSF10B/ R5), two cell-bound receptors unable to transmitting an apoptotic signal, TRAIL-R3 (TNFRSF10C/DcR1) and TRAIL-R4 (TNFRSF10D/DcR2), and a soluble receptor called osteoprotegerin (OPG) that also binds RANK ligand (Bossen et al., 2006). Multimerization of TRAIL-R1 and TRAIL-R2, results in formation of a death inducing signaling complex (DISC) leading to caspase activation and apoptosis (Merino et al., 2007).

The unique character of TRAIL encourages the development of TRAIL-R agonists including recombinant TRAIL and monoclonal antibodies targeting TRAIL-R1 or TRAIL-R2 which have demonstrated efficient anticancer activities in a number of preclinical studies (Micheau et al., 2013). However, results from clinical trials showed that despite TRAIL agonists have shown low toxicity in patients, only weak therapeutic effect were observed when TRAIL agonists were used in monotherapy (Lemke et al., 2014). It had emerged that some cancer cells especially primary cancer cells acquired a resistance to TRAIL-induced apoptosis. Multiple mechanisms for TRAIL resistance had been identified that can affect any components of the TRAIL signaling pathways (Dimberg et al., 2013). Major mechanisms include overexpression of anti-apoptotic molecules as c-FLIP, of proteins that belong to the Bcl-2 family or Inhibitory of Apoptosis Protein (IAP) family. In some case, TRAIL-R agonists induced activation of non-cell death signaling pathways such as NFkB, MAPK, Scr, and phosphoinositide 3-kinase (reviewed in (Azijli et al., 2013). In addition, mutations could generate nonfunctional TRAIL-R1/R2 receptors (Horak et al., 2005; Witham et al., 2007). Finally, resistance can be acquired following an inefficient receptor clustering at the membrane level, thus limiting DISC component recruitment (Jin et al., 2004). To overpass these resistances, it is crucial to better characterize the mechanisms of apoptosis induction including the early stages occurring at the membrane level.

TRAIL is a type II transmembrane protein, active in a membrane-bound form or as a soluble cytokine after proteolytic shedding (Mariani and Krammer, 1998; Mariani et al., 1997). The C-terminal extracellular domain forms homotrimers that mediate receptor binding. Although this ligand-induced oligomerization is generally accepted to generate the minimal active unit, some members of the family require a higher degree of oligomerization to trigger an effective signalling (Haswell et al., 2001; Holler et al., 2003). Using a soluble FLAG-tagged form of TRAIL

(sTRAIL) enabling its cross-linking, Wajant H *et al* (Wajant et al., 2001) concluded that TRAIL-R1 was activated by both cross-linked and non-cross-linked sTRAIL whereas TRAIL-R2 required cross-linked sTRAIL, and to a larger extent a membrane-bound TRAIL. This difference in receptor oligomerization between TRAIL-R1 and TRAIL-R2 required for apoptosis induction has also been reported with specific antibodies directed against each receptor on chronic lymphocytic leukaemia, where cross-link of anti-TRAIL-R2 *via* a secondary antibody was necessary to efficiently kill the cells (Natoni et al., 2007).

However, all these observations might certainly be cell and agonist specific. Indeed, several groups have reported the apoptogenic activity of non-cross-linked antibodies directed against TRAIL-R2 (Cretney et al., 2007; Shimada et al., 2007; Zeng et al., 2006) and we previously reported the activity of divalent peptidic agonists of TRAIL-R2 receptor (named as TRAIL$^{mim/DR5}$) (Pavet et al., 2010). Finally, the work from Thomas and coworkers (Thomas et al., 2004), clearly illustrates some mechanistic specificities in the triggering of TRAIL-R2 pathway by various agonists, highlighting the fact that activation of TRAIL-Rs is agonist-specific and might not only depend on oligomerization and therefore bringing this system to a higher degree of complexity. Moreover, little is known about TRAIL receptors internalization requirement in TRAIL induced apoptosis. It has been proposed that TRAIL ligation induces rapid TRAIL-Rs internalization primarily by clathrin-dependent endocytosis but also by clathrin-independent endocytosis internalization but internalization was not considered to be important in signaling to death (Kohlhaas et al., 2007). Nevertheless, there were still few studies that showed that TRAIL-Rs internalization is required for apoptotic signaling (Akazawa et al., 2009; Zhang and Zhang, 2008).

Here, we used BJAB and Jurkat cells, the latter known to require a cross-linked form of sTRAIL to induce TRAIL-R2-dependant apoptosis, to further characterize our peptidic ligands and gain insight on the TRAIL-R2 activation mechanism. The present study demonstrates that while both cell types are sensitive to a cross-linked form of TRAIL, Jurkat cells are resistant to apoptosis induced by the divalent form of TRAIL$^{mim/DR5}$ as well as by an anti-TRAIL-R2 agonist monoclonal. Moreover, caspase-8 is not recruited to TRAIL-R2 upon treatment of Jurkat cells with TRAIL$^{mim/DR5}$. The resistance of Jurkat cells was overcome by cross-linked of anti-TRAIL-R2 antibody but not by cross-linking of the divalent form of TRAIL$^{mim/DR5}$.

Furthermore, we show that divalent TRAIL$^{mim/DR5}$ can specifically inhibit apoptosis induced by the cross-linked form of TRAIL, thus acting as an antagonist. More surprisingly, divalent TRAIL$^{mim/DR5}$ induced a rapid internalization of TRAIL-R2 in both BJAB and Jurkat cells, a phenomenon explaining its antagonist activity. In summary we show that divalent TRAIL$^{mim/DR5}$ selectively bind to TRAIL-R2 and induce its internalization in both BJAB and Jurkat cells, but could only induce DISC formation, and by so, the apoptotic machinery activation, in BJAB cells.

Results

Divalent TRAIL$^{mim/DR5}$ induces apoptosis of BJAB cells but not Jurkat cells.

TRAIL-R2 is known to require a high degree of oligomerization in order to activate the apoptotic machinery (Berg et al., 2009) and as expected, the pro-apoptotic TRAIL-R2-specific peptides we developed (TRAIL$^{mim/DR5}$) are active only at divalent or trivalent forms (Pavet et al., 2010). Divalent TRAIL$^{mim/DR5}$ display great therapeutic potential as shown by their capability to selectively induce a TRAIL-R2-dependent apoptosis incancer cells *in vitro* and their tumoricidal activity *in vivo* (Pavet et al., 2011). To further characterize the mode of activation of the divalent TRAIL$^{mim/DR5}$, we compared their activity on the B cell lymphoma BJAB and the T cell lymphoma Jurkat that expressed a similar amount of TRAIL-R2 at their surface (**Figure 1A and suppfig1**). We also compared the pro-apoptotic efficiency of the divalent form of TRAIL$^{mim/DR5}$ (referred here to as **2d**) with the recombinant hexameric form of TRAIL (SuperKiller TRAIL, referred to as **SPK**). Cells were incubated with stepwise 2-fold increasing concentrations of **SPK** or **2d** for 16 hours and percentage of apoptosis was measured by detection of phosphatidylserine externalization after co-labeling with Annexin V-FITC/propidium iodide. Whereas **SPK** induced apoptosis in a dose dependent manner of both BJAB and Jurkat cells, with more than eighty percent of apoptosis at doses over 10ng/mL (**Figure 1B, Left panel**), **2d** peptide induced apoptosis of only BJAB cells (**Figure 1B, right panel**). Indeed, **SPK** EC50 were about 1.5ng/mL and 5ng/mL on Jurkat and BJAB cells, respectively, conferring a 3.3 fold difference between the two cell lines. By contrast, **2d** peptide EC50 was 0.05µM (**Figure 1B**) on BJAB cells but no induction of apoptosis was observed when Jurkat cell line was treated with **2d** peptide at 32µM, a concentration already 600 times higher than the EC50 on BJAB cells.

The apoptotic machinery appeared to be blocked at a very early step as no DISC formation, assessed by immunoprecipitation of caspase-8, was detected in Jurkat cells incubate with **2d** compared to BJAB cells (**Figure 1C**). Taken together, the results suggest that induction of apotosis of Jurkat cells by our peptide require an extended oligomerization state of TRAIL-R2.

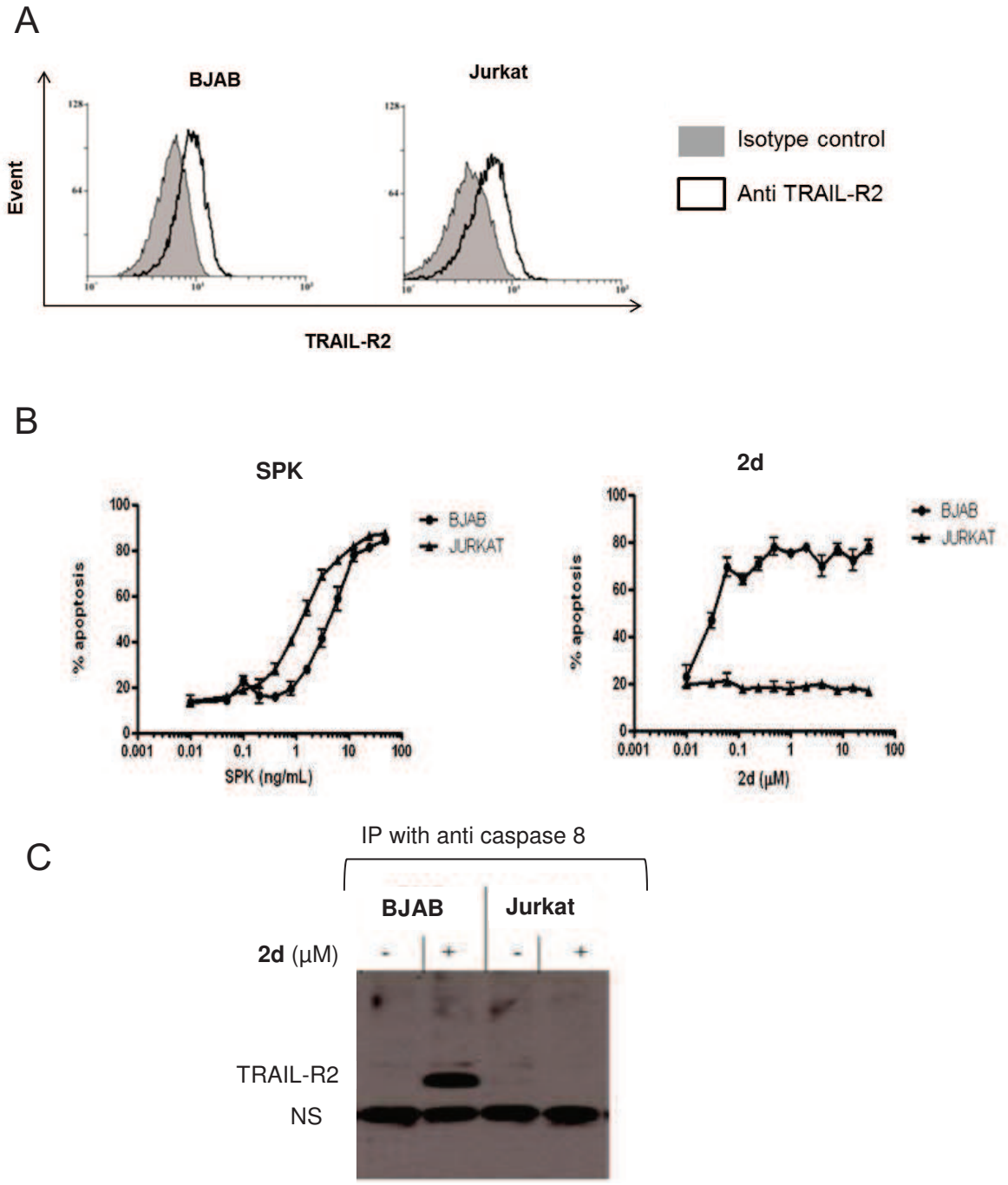


Figure 1: ***Differential apoptogenic activity of rTRAIL and TRAIL$^{mim/DR5}$***

BJAB and Jurkat (A) cells were stained with monoclonal antibody directed against TRAIL-R2 or a control isotype coupled to phycoerythrin (PE) and analyzed by flow cytometry. (B) BJAB or Jurkat cells were treated with recombinant human TRAIL or divalent (**2d**) TRAIL$^{mim/DR5}$ peptide with stepwise 2-fold increasing concentrations. After 16 hours of incubation apoptosis was determined as the percentage of Annexin V–positive cells by flow cytometry analysis. Results are expressed as mean % apoptosis of 3 experiments +/- SD. (C) BJAB or Jurkat cells were treated with divalent (**2d**) TRAIL$^{mim/DR5}$ peptide, subjected to immunoprecipitation with antibody against caspase-8, and later immunoblotted to analyze TRAIL-R2 presence. *ns,* nonspecific.

BJAB and Jurkat cells requirement differential TRAIL-R2 oligomerization for apoptosis induction

To emphasis the potential implication of TRAIL-R2 oligomerization state in the discrepancy between TRAIL-R2-induced apoptosis in BJAB and Jurkat cells, they were treated with a specific anti-TRAIL-R2 agonist antibody in its different state of oligomerization, i.e. monovalent Fab fragment (anti-TRAIL-R2-Fab), complete divalent antibody (anti-TRAIL-R2) and cross-linked antibodies (anti-TRAIL-R2-CL; partially tetravalent form). As expected, anti-TRAIL-R2-Fab never induced cell death. The complete divalent anti-TRAIL-R2 did on BJAB cells but not in Jurkat cells confirming the results obtained with our divalent peptide. Interestingly, the anti-TRAIL-R2-CL increased about 3.5 fold apoptosis induction, in comparison to anti-TRAIL-R2 (**Figure 2A**), on BJAB cells, but more importantly, induced apoptosis of Jurkat cells (**Figure 2B**). These results suggest that the different sensibility of BJAB and Jurkat cells in **2d**-induced apoptosis could be explained by the fact that the degree of oligomerization of TRAIL-R2 required to induce cell death is different between the two cell lines, Jurkat requiring a higher extent of oligomerization.

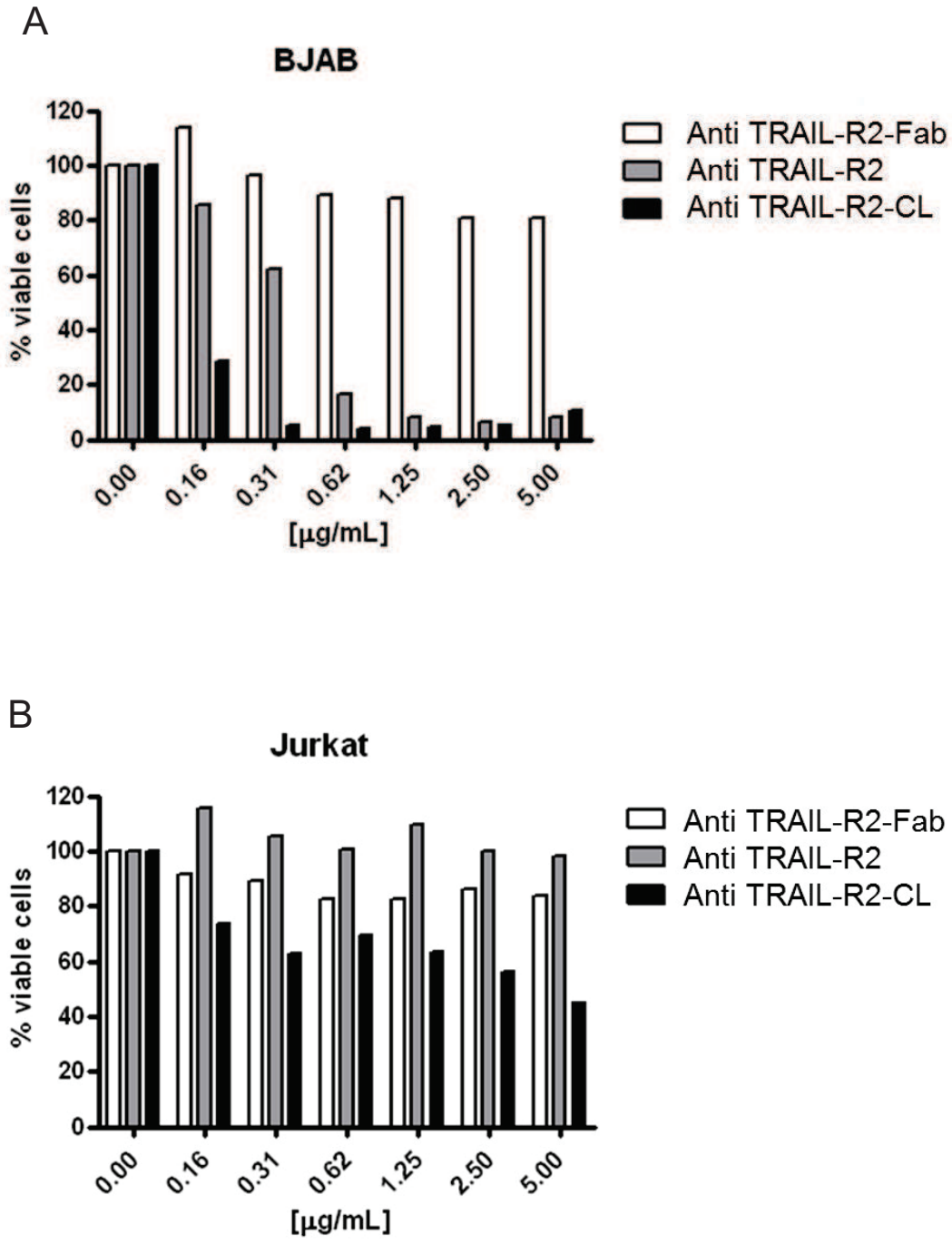


Figure 2: ***Differential requirement of TRAIL-R2 oligomerization for apoptosis induction***

BJAB (A) or Jurkat (B) cells were treated with an agonist antibody directed against TRAIL-R2 processed for different levels of valencies: monovalent (anti-TRAIL-R2-Fab), divalent (anti-TRAIL-R2), and tetravalent (anti-TRAIL-R2-CL). After 16 hours of incubation cell viability was determined using the MTS assay.

TRAIL-R2 induced apoptosis on Jurkat cells required recruitment of more than 2 TRAIL-R2 receptors

To go further in the understanding of TRAIL-R2 oligomerization requirement for apoptosis in Jurkat cell, we developed a tetravalent version of $TRAIL^{mim/DR5}$ (referred here to as **4d**). For that, two divalent $TRAIL^{mim/DR5}$ were cross-linked by a lysine linker. Unlike cross-linked antibodies whose valency is not precisely defined, **4d** is chemically characterized as a tetramer (**Supp fig2)**. We then compared the efficiency of **4d** and **2d** to induce cell death of Jurkat and BJAB cells. No apoptosis induction was observed when Jurkat cells were treated by **4d** peptide (**Figure 3A**). Unexpectedly, in BJAB cells, **4d** peptide triggered cell death in the same extendibility that **2d** peptide (**Figure 3B**). To understand this surprising absence of activity gain with **4d** on the two cell lines, we explored the ability of **4d** peptide to bind to human TRAIL-R2 using Surface Plasmon Resonance (SPR). Recombinant human TRAIL-R2 was immobilized on a sensor surface and the **2d** or **4d** peptides were flushed at different concentrations over empty and TRAIL-R2 surfaces. As the model of interaction was complex, we only evaluated an apparent k_{off} from the post-injection phases using the Langmuir binding model (**Figure 3C and 3D**). Interestingly, results showed equivalent apparent k_{off} for **4d** and **2d** indicating that peptide tetramerization did not enhance the stability of the ligand/receptor complexes. More surprisingly, when we normalized the maximal response (ie 5µM) obtained for each peptide to the stoichiometry of interaction between peptides and TRAIL-R2, we observed that **2d** peptide engaged two TRAIL-R2 receptors (stoichiometry = 0.5) whereas the **4d** peptide recruit only one TRAIL-R2 receptor (stoichiometry = 1) (**Figure 3E)** probably due to maladjusted geometry. In the same way, a hexameric form (referred as **6d**) of $TRAIL^{mim/DR5}$ have been designed (Lamanna et al., 2013) and did not induced apoptosis of Jurkat cells (**supp Fig3**).

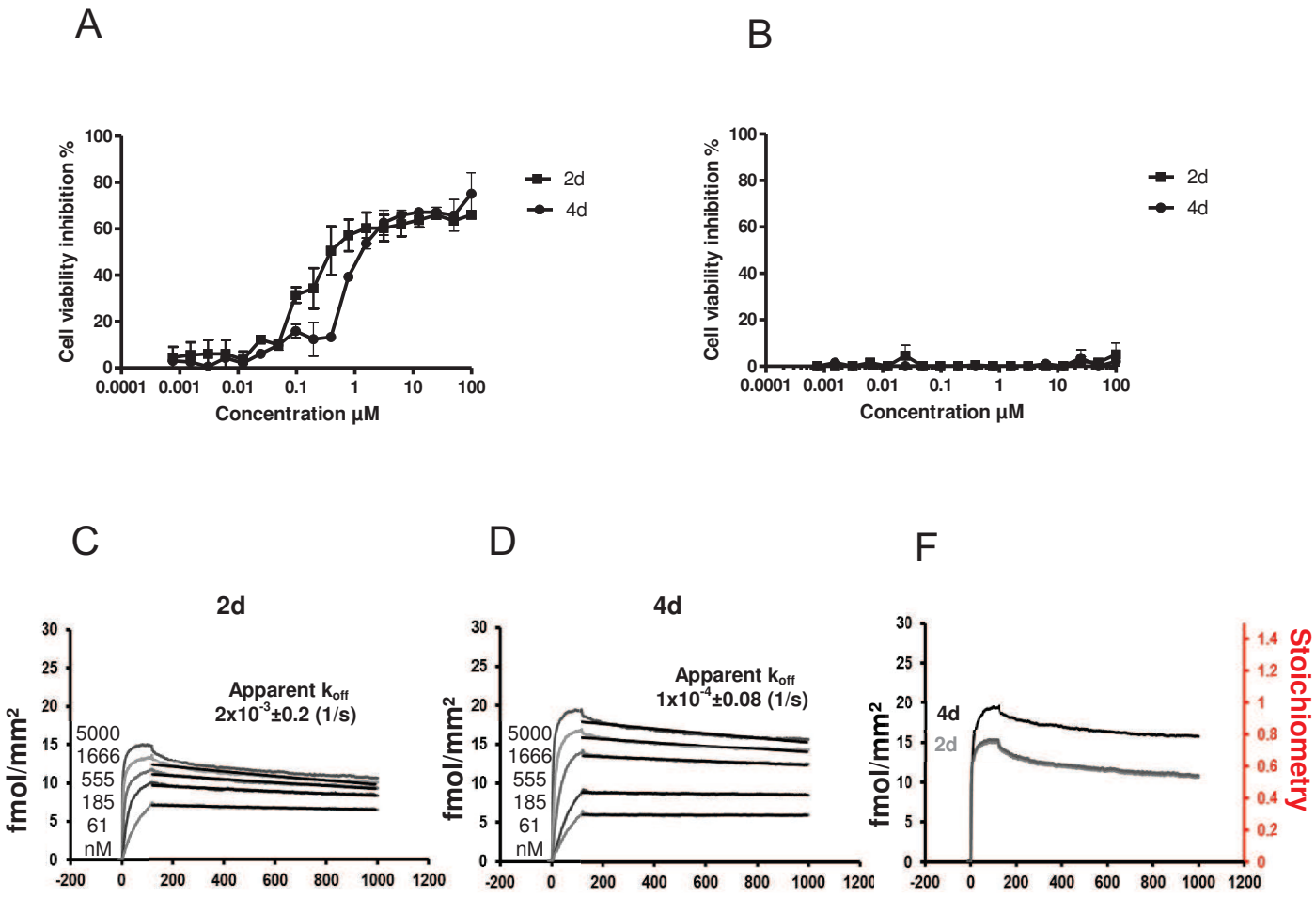


Figure 3: Tetravalent version of TRAIL$^{mim/DR5}$ peptide is not sufficient for triggering Jurkat cell death

BJAB (A) or Jurkat (B) cells were treated with the divalent TRAIL$^{mim/DR5}$ peptide (**2d**) and the tetravalent version (**4d**). After 16 hours of incubation, cell viability was determined using the MTS assay. Kinetic curves of divalent and tetravalent TRAIL$^{mim/DR5}$ peptides binding to immobilized human TRAIL-R2 (density of TRAIL-R2 was 65 fmol/mm²) were obtained by SPR experiments. (C, D) Peptides **2d** and **4d** were tested at concentrations of 5000, 1666, 555, 185, 61 nM. The response is expressed in fmol/mm² (1000RU= 1mg/mm²). The apparent k_{off} were evaluated by fitting (black curves) the post-injection phase of the curves and values are the mean of three experiments. (E) Responses obtained at 5µM were normalized to the stoichiometry of interaction.

Divalent TRAIL$^{mim/DR5}$ inhibits rhTRAIL-induced apoptosis of Jurkat cells by inducing TRAIL-R2 internalization.

The absence of **4d** or **6d** efficiency in inducing Jurkat cell apoptosis did not permit to exclude the possibility that our TRAIL$^{mim/DR5}$ couldn't bind to TRAIL-R2 at Jurkat cell surface. Using SPR, we previously reported that both monovalent and divalent forms of TRAIL$^{mim/DR5}$ competed with rhTRAIL for binding to rhTRAIL-R2 in a concentration-dependent manner, with a 10-fold difference of the IC50 (Pavet et al., 2011). Thus, we tested the ability of TRAIL$^{mim/DR5}$ to compete with **SPK** in apoptosis induction of Jurkat cells. To that, cells were incubated for 16 hours with solutions consisting of a constant concentration of **SPK** (5ng/mL) and stepwise 2-fold increasing concentrations of peptide **2m** (monovalent) or **2d** (divalent) and apoptosis was determined by detection of phosphatidylserine externalization after co-labeling with Annexin V-FITC/propidium iodide. At this concentration of **SPK**, 45 % of the cells became apoptotic. Co-incubation with **2d,** but not with **2m**, inhibited the apoptosis induction mediated by **SPK** in a dose dependent manner with a **2d** IC50 of 0.3µM (**Figure 4**). Moreover, the inhibition observed is restricted to TRAIL-R2 since **2d** peptides could not inhibit apoptosis induced by an agonist antibody (CH11) directed against Fas, another pro-apoptotic member of the TNFR superfamilly (**Figure 4**).

Altogether, these results suggest that TRAIL$^{mim/DR5}$ binds to TRAIL-R2 and that divalent structure of the peptide is required for effective inhibition of **SPK** induced cell death on Jurkat cells.

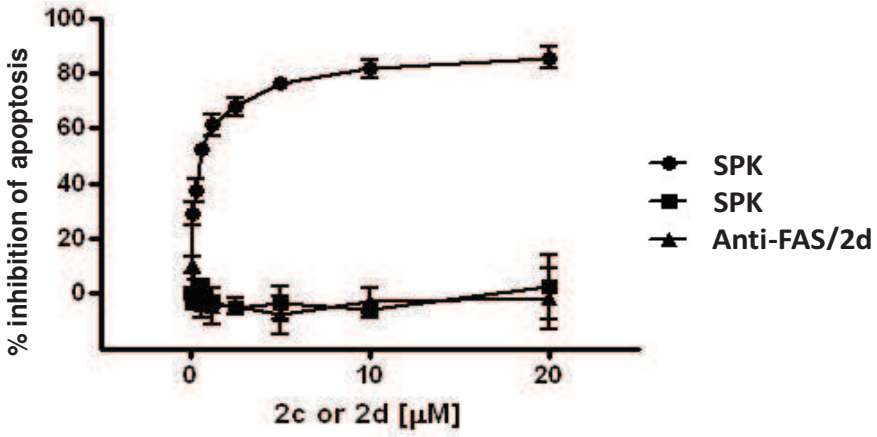


Figure 4: *TRAIL$^{mim/DR5}$ inhibits rhTRAIL-mediated Jurkat cells apoptosis.*

Jurkat cells were treated with a solution consisting of a constant concentration of SPK (5ng/mL) or an agonist antibody directed against Fas and stepwise 2-fold increasing concentration of divalent (**2d**) or monovalent (**2c**) TRAIL$^{mim/DR5}$ peptides. After 16h of incubation, apoptosis was determined as the percentage of Annexin V–positive cells by flow cytometry. Data are expressed as the percentage of inhibition of apoptosis.

It was described that TRAIL-R2 endocytosis occurs after TRAIL treatment in BJAB cells, although it was not required for the activation of the apoptosis pathway (Kohlhaas et al., 2007). To determine whether TRAIL$^{mim/DR5}$ induced TRAIL-R2 endocytosis in BJAB cells but also in Jurkat cells, cells were incubated with a dose (EC50) of **2d** or **SPK** for different time period and assessed for TRAIL-R2 surface expression by flow cytometry. In accordance with the literature, **SPK** induced internalization of TRAIL-R2 on the BJAB cells, with a maximum of 30 % after 2 hours of incubation in our experimental conditions. **2d** had the same effect, although with a faster kinetic since TRAIL-R2 internalization reached almost 95 % after one hour of incubation (**Figure 5A**). More surprisingly, the same profiles were obtained with both **SPK** and **2d** when incubated with Jurkat cells (**Figure 5B**). Indeed, the kinetic of internalization of TRAIL-R2, reaching 65 % after fifteen minutes and a maximum of 85 % after 2 hours upon **2d** treatment, was faster than upon rhTRAIL treatment, reaching only 37 % after 15 minutes and 52 % after 2 hours. Internalization of TRAIL-R2 was confirmed by immunocytochemistry experiments. A clear cytosolic localization of TRAIL-R2 was depicted in both BJAB and Jurkat cells treated with **2d** while it localized at the plasma membrane in the non-treated cells or cells incubated with **2m (sup figure 3)**. According to the fast kinetic of TRAIL-R2 internalization following **2d** incubation, this phenomenon might explain the desensitization of Jurkat cells to **SPK**, rather than a competition for a binding site. It is also in accordance with results obtained with the monovalent form of TRAIL$^{mim/DR5}$ which neither inhibits **SPK**-induced Jurkat cell apoptosis nor internalization of TRAIL-R2.

Taken together, these results show that divalent TRAIL$^{mim/DR5}$ can induce rapid internalization of TRAIL-R2 in both BJAB and Jurkat cells but can trigger apoptosis in BJAB but not Jurkat cells, acting in one case as an agonist and in another one as an antagonist.

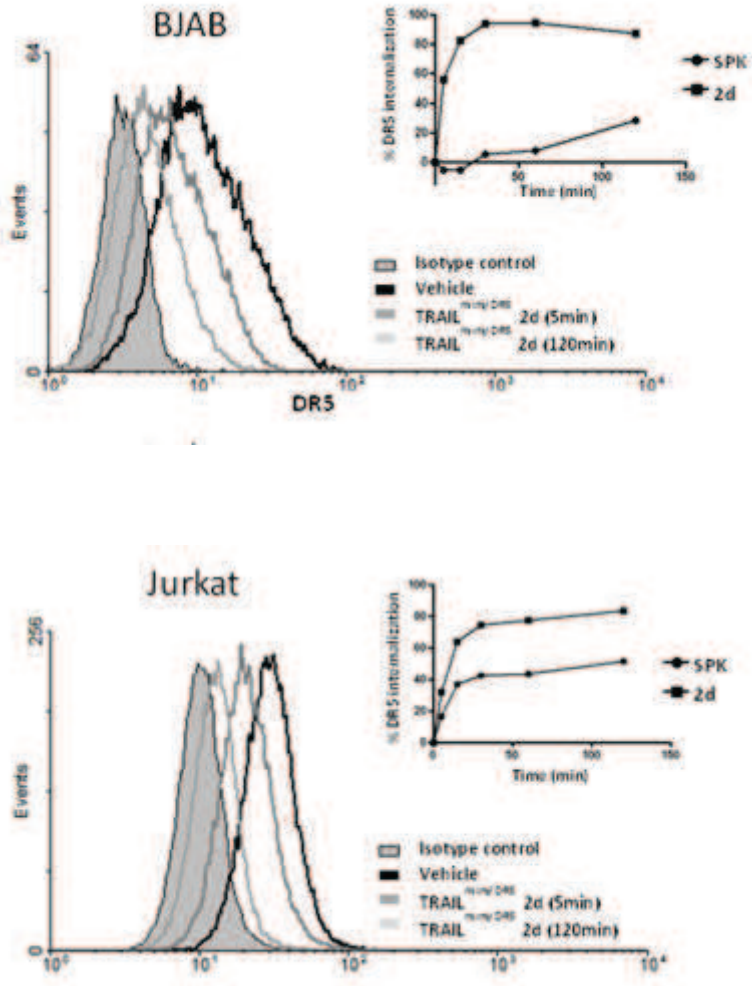


Figure 5: ***SPK and TRAIL$^{mim/DR5}$ induce TRAIL-R2 internalization on BJAB and Jurkat cell lines***

BJAB or Jurkat cells were treated with SPK or divalent (2d) TRAIL$^{mim/DR5}$ peptide for different period of times. Cells were subsequently processed for either surface expression of TRAIL-R2 analysis by flow cytometry. The panels show histograms for selected times during a kinetic analysis of TRAIL-R2 internalization after treatment with divalent (**2d**) TRAIL$^{mim/DR5}$. The right panels represent the percentage of TRAIL-R2 internalization upon treatments calculated using the mean fluorescence intensity values at each time point.

Discussion

Since its discovery in the mid 90's (Wiley et al., 1995, Pitti et al., 1996), TRAIL rapidly appeared as the magic bullet in the family of cancer therapeutics, as it selectively induces apoptosis of tumor cells while sparing normal ones. Although the physiological role of TRAIL is not totally elucidated, different strategies to exploit the TRAIL pathway for cancer therapy are currently under clinical investigation (for review see (Pavet et al., 2011). Indeed, recombinant TRAIL or activating antibodies directed against either TRAIL-R1 or TRAIL-R2, alone or in combination with other cytotoxic agents, have reached phase II of clinical trial for a diverse set of cancers. Other potential approaches have been reported such as the adenoviral delivery of the TRAIL coding sequence into tumor cells (Ad5-TRAIL) (Holoch and Griffith, 2009) or the more "drug-like" synthetic multivalent ligands of TRAIL-R2 ($TRAIL^{mim/DR5}$)(Pavet et al., 2010) .

As introduced above, targeting TRAIL-Rs in cancer monotherapy is limited by acquired resistance in many cancers cells. The major cause of resistance described in the literature is about overexpression of anti-apoptotic proteins. Indeed, c-FLIP is a crucial regulator that inhibits the pro-apoptotic activity of the DISC. Overexpression of c-Flip has been linked to TRAIL resistance in many cancers (Zang et al., 2014) and downregulation of c-FLIP using synthetic inhibitors enhances TRAIL induced apoptosis (Shirley and Micheau, 2013). Moreover the anti-apoptotic members of Bcl-2 family proteins inhibit apoptosis by influencing the permeability of the mitochondrial membrane. Overexpression of Bcl-2, Bcl-XL and Mcl-1 has been reported to result in TRAIL resistance in mitochondria-dependent type II cancer cells (Gillissen et al., 2010) (Fulda et al., 2002.). IAPs are regulator of apoptosis by modulating caspase activity. The most studied IAPs, the X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP), mediates TRAIL resistance when overexpressed (Cummins et al., 2004). In addition to these intracellular resistances, resistance in TRAIL induced apoptosis at the membrane level is not clearly studied yet. In this case, the main resistance described is the apparition of mutations in agonists TRAIL-Rs leading to dysfunctional receptors. Here we showed that Jurkat cells were not sensitive to anti TRAIL-R2 antibody or divalent peptide to induce apoptosis and required a higher degree of oligomerization

At molecular level TRAIL is organized as a homotrimer, as other members of the TNF-superfamily, a structural feature accepted to be the minimum unit required to oligomerize and fully activate its receptors. Indeed, it was shown that the membrane-bound, but not soluble form of TNF, is the prime activating ligand for TNF-R2 (TNFRSF1B), while TNF-R1 (TNFRSF1A) could be activated by both ligand forms (Grell et al., 1995; Grell et al., 1998). Fas (TNFRSF6) induced apoptosis is highly dependent on Fas oligomerization and requires at least two adjacent trimers for an effective signal (Holler et al., 2003). However, some intrinsically divalent molecules such as antibodies or synthetic peptides are known to activate TRAIL-R1- or TRAIL-R2-dependant cell apoptosis. Why such molecules are able to trigger signaling through TRAIL-R2 is not fully understood but can be rationally explained by the existence of pre-oligomerized form of the receptor at the surface of the cells (Clancyet al., 2005; Lee et al., 2005). In an opposite

manner, it is generally accepted that extended oligomerization of recombinant TRAIL or antibodies against TRAIL-R1/R2 can be required to exert maximal activity depending on the cell types.

Herein, we highlighted that TRAIL-R2 induced apoptosis required different degree of oligomerization that can vary according to the cancer cells. Indeed, while divalent peptide or TRAIL-R2 antibody induce BJAB cell apoptosis, Jurkat cell required the TRAIL-R2 antibody cross-linked (tetravalent ligand) to induce apoptosis

We tried to develop a tetravalent version of TRAIL$^{mim/DR5}$ peptide to recruit more TRAIL-R2 receptors and at hence, induced highly DISC formation. Unfortunately, our tetravalent peptide did not enhanced apoptosis in BJAB cells and did not induced apoptosis in Jurkat cells. This is surprising because antibody cross-linked led to apoptosis induction in Jurkat cells. In this condition, tetravalent peptide was not efficient certainly because of an inappropriate conformational presentation of TRAIL$^{mim/DR5}$ peptides and thus limiting the interactions between the four peptidic ligands and TRAIL-R2 at the membrane level. Thus, understanding the interaction between synthetic ligands and TRAIL-R2 are crucial and will be helpful for the development of efficient multivalent ligands. Moreover, in the present study, we showed that poorly oligomerized synthetic ligands of TRAIL-R2 can exert either an agonistic or an antagonistic activity in a cell-type dependent fashion. Up to date, it is the first demonstration of dual and opposite roles for ligands of TRAIL-R2. The antagonism activity was explained by the fact that TRAIL$^{mim/DR5}$ induced internalization of the receptor without formation of the DISC and by so, the apoptotic machinery, thus desensitizing the cells to recombinant TRAIL-induced apoptosis. As TRAIL pathway is a natural component of the endogenous tumor-surveillance system in mammals (Smyth et al., 2001) (Cretney et al., 2002; Zerafa et al., 2005), therapies based on poorly-oligomerized activators of TRAIL death receptors could potentially have negative effect on the tumor progression and dissemination.

The internalization of Fas and TRAIL-R2 following the binding of their cognate ligands has already been reported (Chaigne-Delalande et al., 2009), however, on contrary to Fas, TRAIL-R2 internalization is not necessary for induction of apoptosis signaling (Kohlhaas et al., 2007). Indeed, inhibition of endocytosis could not block apoptosis induction by TRAIL. Here we show in an opposite manner that the internalization of TRAIL-R2 can arise without induction of apoptosis, confirming the independence of the two mechanisms. More interestingly, this mechanism was restricted to the divalent form of TRAIL$^{mim/DR5}$ as the monovalent version of the peptide had no effect neither on the internalization nor the inhibition of recombinant TRAIL signaling.

Supplements

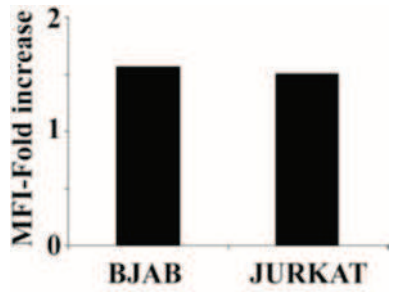


Figure 1: BJAB and Jurkat express similar level of TRAIL-R2

BJAB and Jurkat cells were stained with monoclonal antibody directed against TRAIL-R2 and analyzed by flow cytometry. Results showed fold increase of the mean of fluorescence intensity between isotype control and TRAIL-R2 specific labeling was calculated to compare level of TRAIL-R2 expression on the two cells.

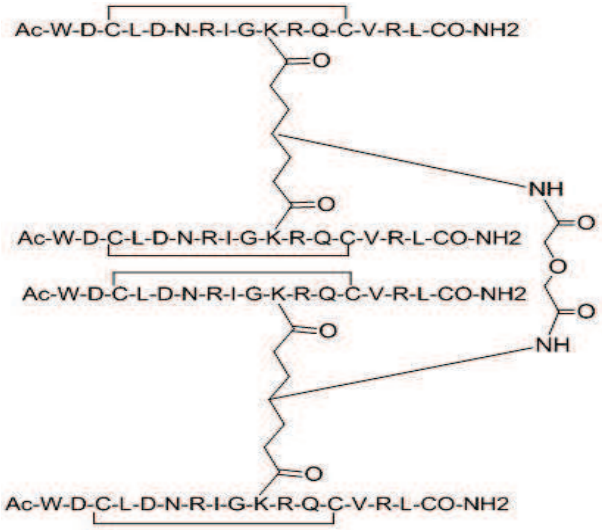


Figure 2: Tetravalent (4d) TRAIL$^{min/DR5}$ peptide

Tetravalent peptide **4d** corresponds to two divalent **2d** TRAIL$^{mim/DR5}$ cross-linked by a lysine linker

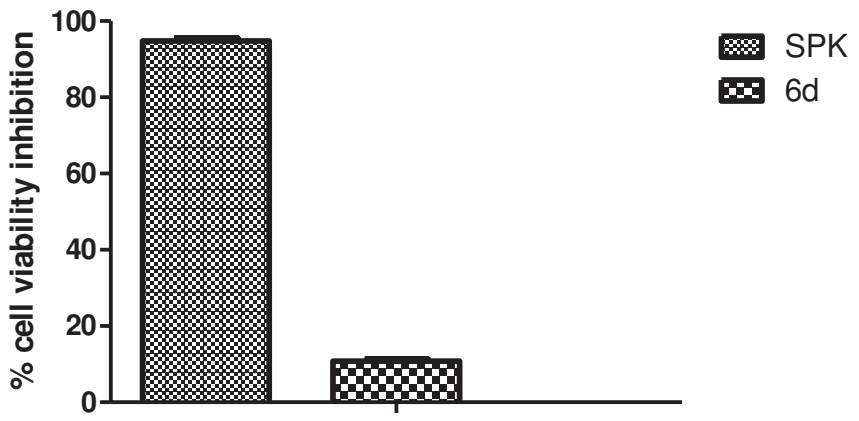


Figure 3 : Hexameric (6d) TRAIL$^{min/DR5}$ peptides did not induced Jurkat apoptosis

Jurkat cells (10^6cells/well) were treated with **SPK** (100ng/mL) or **6d** (100µM). 16h after treatment cells viability was evaluated by MTS assay. Results are expressed as % of cell viability inhibition according to the following formula: viable cell % = (OD (treatment) /OD(100% viability) * 100) were cells incubated with medium alone were was considered as 100% of viability Results are expressed as the OD mean of 3 experiments ± SEM.

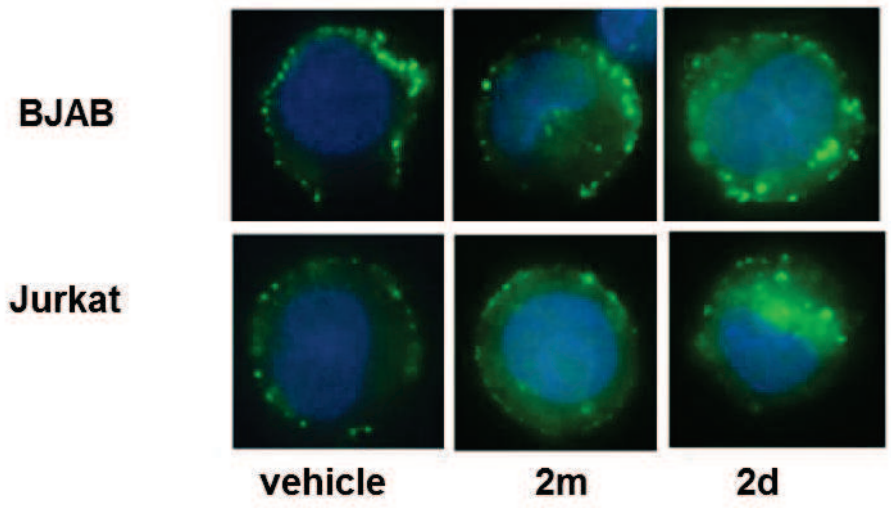


Figure 4: TRAIL$^{mim/DR5}$ induce TRAIL-R2 internalization on BJAB and Jurkat cell lines

BJAB or Jurkat cells were treated for 30 minutes with vehicle, monovalent (**2c**) or divalent (**2d**) TRAIL$^{mim/DR5}$ peptides. Cells were subsequently processed for either surface expression of TRAIL-R2 analysis by localization of TRAIL-R2 by immunocytochemistry. Results showed representative images of TRAIL-R2 localization in BJAB or Jurkat cells.

Materials and methods

Reagents

SuperKiller TRAIL (SPK) was obtained from Enzo life Sciences (Lausane Switzerland). For apoptosis induction, agonist antibody against CD95/Fas (clone CH11) was purchased from Beckman coulter (Fullerton, USA). For immunoprecipitation analysis, anti-caspase-8 antibodies (clone C20) were purchased from Santa Cruz Biotechnology (California, USA) and anti-TRAIL-R2 were from Chemicon (Temecula, CA). PE-labeled anti-TRAIL-R2 and isotype control used in FACS analysis were purchased from Diaclone (Besançon, France). Non-coupled Anti-TRAIL-R2 antibody (clone DJR2-4) and the secondary antibody coupled to alexa-488 used for the immunocytochemistry experiment were obtained from ABDserotec (Düsseldorf, Germany) and Life technologies (Carlsbad, CA), respectively. TRAILmim/DR5 peptides 2m, 2d and 6d were synthesized in our laboratories as previously described in (Pavet et al., 2010).

Tetramer (4d) TRAIL$^{min/DR5}$ synthesis:

2d dimer (8.9 mg, 2.0 µmol MW: 4965, considering 7 x TFA salt) and the linker (bis(2,5-dioxopyrrolidin-1-yl) 2,2'-oxydiacetate1, 0.23 mg, 0.7 µmol) were dissolved in 36 µl of DMF, stirring at room temperature. DIEA was subsequently added (1.2 µl, 7.0 µmol) to reach a pH of 9, and the mixture was stirred at room temperature, monitoring the pH. The progression of the reaction was followed by HPLC (20% -50% CH3CN 0.1% TFA, 10 min, UV-vis detection). After 1.30 hours and an overall addition of 1.7 µl of DIEA, the reaction was quenched by addition of H2O until neutral pH and the crude was purified with semipreparative HPLC (gradient 20% -50% CH3CN 0.1% TFA, 30 min, 220 nm), to afford the desired product as a white solid (2 mg, 29%). MW: 8437.65 (neutral); Exact mass: 8432.1227; Analytic HPLC (20% -50% CH3CN 0.1% TFA, 10 min) rt 5.7 min, purity > 99%; HRMS: m/z measured 8433.2628 (2109.3157 [M+4H]4+, 1687.6564 [M+5H]5+, 1406.5500 [M+5H]5+).

Cell lines

The Burkitt lymphoma BJAB were kindly provided by Andrew Thorburn (Department of Pharmacology, University of Colorado Denver School of Medicine, USA) and were maintained as previously described [24]. Jurkat cells were purchased from ATCC (American Type of Culture Collection). Both cells were cultured in RPMI 1640 supplemented with 10% FCS (Fetal Calf Serum) and gentamycin (10 µg/mL). Puromycin antibiotic (0.5µg/mL) was added to the BJAB medium to ensure the maintaining of TRAIL-R2 expression. For apoptosis assay, 105 cells were cultured in 96-flat bottom well plates (BD Falcon, Pont de Claix, France) and treated with the different ligands at the indicated concentration for sixteen hours.

Apoptosis and cell viability measurement

BJAB and Jurkat cells (10^5 cells/well) were cultured in 100µL of culture medium in 96-well plates. The next day, cells were treated with the indicated concentrations of the different ligands. Apoptosis was determined by detection of phosphatidylserine externalization after co-labeling with Annexin V-APC/propidium iodide, according to the manufacturer instructions or cell viability was evaluated by MTS assay.

For apoptosis determination, cells were analyzed by flow cytometry using a FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson, Pont de Claix, France) and the data were analyzed using Flowjo software (Treestar, Ashland, USA). Apoptosis is displayed as the percentage of cells presenting an Annexin-V positive staining on rhTRAIL or synthetic peptides treatment compared with no treated cells as control. Inhibition of apoptosis was calculated as follows: [% of Annexin V-positive cells X 100] / % of Annexin V-positive cells treated with rhTRAIL or anti-CD95/Fas.

MTS assay was performed according to the manufacturer specification (Promega Corporation, Madison, WI).

DISC immunoprecipitation

Jurkat cells (108) were stimulated with 5 µM of peptide 2d for 1 h at 37°C. Cells were then washed with cold PBS and then lysed in 1 mL of lysis buffer [containing 1% NP40, 20 mmol/L of Tris-HCl (pH 7.5), 150 mmol/L of NaCl, and 10% of glycerol]. The DISC was immunoprecipitated using 5 µg of anti–caspase-8 antibody bound to Dynabeads® Protein G (Invitrogen, Paisley, UK). Immunoprecipitates were processed for immunoblotting to detect TRAIL-R2. Immunoprecipitates were separated by SDS-PAGE, electrotransferred onto nitrocellulose membranes. After transfer, membranes were blocked with 5% non-fat dry milk and 0.1% Tween 20 in PBS for 1hr at room temperature and incubated overnight at 4°C with primary antibodies directed against TRAIL-R2 according to manufacturer's instructions, followed by incubation with corresponding secondary peroxidase-conjugated antibodies. Immunoreactive bands were visualized by enhanced chemiluminescence and subsequent exposure to hyperfilm (Amersham, Saclay, France). Images were scanned and processed by Adobe Photoshop CS2 software.

Differential requirement of TRAIL-R2 oligomerization analysis

For crosslinking assay, human IgG1 TRAIL-R2 antibody was purchased from R&D systems (Clone 71903) and corresponds to the bivalent ligand. To obtained a monovalent ligand, TRAIL-R2 antibody was digested with 0.25µg of papain (Sigma Aldrich) during 6h at RT in a digestion buffer consisting of 0.02M EDTA, 0.02M cysteine diluted in PBS. Digestion was stopped with addition of 0.3M Iodoacetamide. To obtained a tetravalent ligand, TRAIL-R2 antibody was cross-linked by a goat anti mouse IgG, Fc fragment from Jackson ImmunoResaerch in a ration 1:10 (v/v) at RT during 6h. To evaluate the impact of multivalent ligand on TRAIL-R2 induced

apoptosis, BJAB and Jurkat (105cells/well) cells were treated with the different ligand and viability was meseared by MTS assay as described above.

Receptor internalization analysis

Flow cytometry

BJAB and Jurkat cells were stimulated with either rhTRAIL or 2d peptide for different time periods and washed once with cold PBS. Since that time cells were maintained at 4°C. TRAIL-R2 was stained with PE-labeled anti-TRAIL-R2 according to the manufacturer's instructions followed by cell fixation in a solution of 0.4 % paraformaldehyde. Cell surface expression of TRAIL-R2 was analysed by flow cytometry using a FACSCalibur flow cytometer, and the data were analyzed using Flowjo software or WinMDI 2.8 freeware (Joseph Trotter, Scripps Research Institute, http://facs.scripps.edu/software.html) for histogram representation. Percentage of internalization was calculated as follows: 100-[mean of fluorescence (MFI) X 100] / MFI of non-treated cells.

Immunocytochemistry

5x105 BJAB or Jurkat cells were exposed to 2m (100nM) or 2d peptides (50nM) for 30 minutes at 37°C. Cells were then fixed with 2% paraformaldehyde during 15 minutes at room temperature, washed in TBS (Tris Buffered Saline) followed by incubation with primary antibody against TRAIL-R2 1/20 (clone DJR2-4) in 0.2% saponin for 2 hours at room temperature. After two washing steps in TBS the cells were incubated with the secondary antibody 1/200 (polyclonal goat Ig F(ab')2 anti-mouse IgG(H+L)-alexa488) in 0.2% saponin for 30 minutes at 37°C. Cells were counterstained with the DNA dye DAPI (0.5 µg/mL) for 10 minutes at room temperature to identify nuclei, and images were collected by epifluorescence microscopy (Axiovert 200M, Zeiss, equipped with a Zeiss Apotome module) and processed by Adobe Photoshop CS2 software. The same procedure without the primary antibody step was run in parallel as a control for the specificity of the staining.

Staining for flow cytometry analysis

10^6 cells were washed in PBS containing 2% FCS and then incubated at 4°C for 20 min with the various antibodies used at a concentration recommended by the manufacturer. After two washes in PBS-2% FBS, cells were analyzed by flow cytometry.

Surface Plasmon Resonance:

Biosensor assays were performed on a Biacore T200™, at 25°C. The running buffer was HBS-EP buffer [10mM HEPES (pH 7.4) containing 0.15M NaCl, 3.4mM EDTA and 0.005% (v/v) Tween P20]. The human TRAIL-R2 and RANK (Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY) receptors were immobilized on a sCM5 sensor chip (GE Healthcare) using the standard amine coupling procedure. The receptors were diluted in 10mM acetate buffer (pH 5.0) at a concentration of

5µg/mL. The density of receptors immobilized on the sensor chip was 65 fmol/mm² for TRAIL-R2. Peptides were injected at a flow rate of 5µL/min for 120s and allowed to dissociate for an additional of 420s. Channels were then regenerated for 5s with 25mM HCl. All binding curves were double-referenced (i-e subtraction of the data of the empty flow cell followed by the subtraction of the data from a run buffer injection cycle). The Langmuir model was used to fit the post-injection phases of peptides (BIAevaluation version 4.1.1).

References

Akazawa, Y., Mott, J.L., Bronk, S.F., Werneburg, N.W., Kahraman, A., Guicciardi, M.E., Meng, X.W., Kohno, S., Shah, V.H., Kaufmann, S.H.*, et al.* (2009). Death receptor 5 internalization is required for lysosomal permeabilization by TRAIL in malignant liver cell lines. Gastroenterology *136*, 2365-2376 e2361-2367.

Ashkenazi, A., Holland, P., and Eckhardt, S.G. (2008). Ligand-based targeting of apoptosis in cancer: the potential of recombinant human apoptosis ligand 2/Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (rhApo2L/TRAIL). Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology *26*, 3621-3630.

Azijli, K., Weyhenmeyer, B., Peters, G.J., de Jong, S., and Kruyt, F.A. (2013). Non-canonical kinase signaling by the death ligand TRAIL in cancer cells: discord in the death receptor family. Cell death and differentiation *20*, 858-868.

Berg, D., Stuhmer, T., Siegmund, D., Muller, N., Giner, T., Dittrich-Breiholz, O., Kracht, M., Bargou, R., and Wajant, H. (2009). Oligomerized tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand strongly induces cell death in myeloma cells, but also activates proinflammatory signaling pathways. The FEBS journal *276*, 6912-6927.

Bin, L., Thorburn, J., Thomas, L.R., Clark, P.E., Humphreys, R., and Thorburn, A. (2007). Tumor-derived mutations in the TRAIL receptor DR5 inhibit TRAIL signaling through the DR4 receptor by competing for ligand binding. The Journal of biological chemistry *282*, 28189-28194.

Bossen, C., Ingold, K., Tardivel, A., Bodmer, J.L., Gaide, O., Hertig, S., Ambrose, C., Tschopp, J., and Schneider, P. (2006). Interactions of tumor necrosis factor (TNF) and TNF receptor family members in the mouse and human. The Journal of biological chemistry *281*, 13964-13971.

Chaigne-Delalande, B., Mahfouf, W., Daburon, S., Moreau, J.F., and Legembre, P. (2009). CD95 engagement mediates actin-independent and -dependent apoptotic signals. Cell death and differentiation *16*, 1654-1664.

Clancy, L., Mruk, K., Archer, K., Woelfel, M., Mongkolsapaya, J., Screaton, G., Lenardo, M.J., and Chan, F.K. (2005). Preligand assembly domain-mediated ligand-independent association between TRAIL receptor 4 (TR4) and TR2 regulates TRAIL-induced apoptosis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *102*, 18099-18104.

Cretney, E., Takeda, K., and Smyth, M.J. (2007). Cancer: novel therapeutic strategies that exploit the TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)/TRAIL receptor pathway. The international journal of biochemistry & cell biology *39*, 280-286.

Cretney, E., Takeda, K., Yagita, H., Glaccum, M., Peschon, J.J., and Smyth, M.J. (2002). Increased susceptibility to tumor initiation and metastasis in TNF-related apoptosis-inducing ligand-deficient mice. J Immunol *168*, 1356-1361.

Cummins, J.M., Kohli, M., Rago, C., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., and Bunz, F. (2004). X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) is a nonredundant modulator of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-mediated apoptosis in human cancer cells. Cancer research *64*, 3006-3008.

Dimberg, L.Y., Anderson, C.K., Camidge, R., Behbakht, K., Thorburn, A., and Ford, H.L. (2013). On the TRAIL to successful cancer therapy? Predicting and counteracting resistance against TRAIL-based therapeutics. Oncogene *32*, 1341-1350.

Fulda, S., Meyer, E., and Debatin, K.M. (2002). Inhibition of TRAIL-induced apoptosis by Bcl-2 overexpression. Oncogene *21*, 2283-2294.

Gillissen, B., Wendt, J., Richter, A., Muer, A., Overkamp, T., Gebhardt, N., Preissner, R., Belka, C., Dorken, B., and Daniel, P.T. (2010). Endogenous Bak inhibitors Mcl-1 and Bcl-xL: differential impact on TRAIL resistance in Bax-deficient carcinoma. The Journal of cell biology *188*, 851-862.

Gonzalvez, F., and Ashkenazi, A. (2010). New insights into apoptosis signaling by Apo2L/TRAIL. Oncogene *29*, 4752-4765.

Grell, M., Douni, E., Wajant, H., Lohden, M., Clauss, M., Maxeiner, B., Georgopoulos, S., Lesslauer, W., Kollias, G., Pfizenmaier, K.*, et al.* (1995). The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor. Cell *83*, 793-802.

Grell, M., Wajant, H., Zimmermann, G., and Scheurich, P. (1998). The type 1 receptor (CD120a) is the high-affinity receptor for soluble tumor necrosis factor. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *95*, 570-575.

Haswell, L.E., Glennie, M.J., and Al-Shamkhani, A. (2001). Analysis of the oligomeric requirement for signaling by CD40 using soluble multimeric forms of its ligand, CD154. European journal of immunology *31*, 3094-3100.

Deperthes, D., Calderara, S., Schulthess, T.*, et al.* (2003). Two adjacent trimeric Fas ligands are required for Fas signaling and formation of a death-inducing signaling complex. Molecular and cellular biology *23*, 1428-1440.

Holoch, P.A., and Griffith, T.S. (2009). TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL): a new path to anti-cancer therapies. European journal of pharmacology *625*, 63-72.

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

Jin, Z., McDonald, E.R., 3rd, Dicker, D.T., and El-Deiry, W.S. (2004). Deficient tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) death receptor transport to the cell surface in human colon cancer cells selected for resistance to TRAIL-induced apoptosis. The Journal of biological chemistry *279*, 35829-35839.

Kohlhaas, S.L., Craxton, A., Sun, X.M., Pinkoski, M.J., and Cohen, G.M. (2007). Receptor-mediated endocytosis is not required for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis. The Journal of biological chemistry *282*, 12831-12841.

Bianco, A. (2013). Multimerization of an apoptogenic TRAIL-mimicking peptide by using adamantane-based dendrons. Chemistry *19*, 1762-1768.

Lee, H.W., Lee, S.H., Ryu, Y.W., Kwon, M.H., and Kim, Y.S. (2005). Homomeric and heteromeric interactions of the extracellular domains of death receptors and death decoy receptors. Biochemical and biophysical research communications *330*, 1205-1212.

Lemke, J., von Karstedt, S., Zinngrebe, J., and Walczak, H. (2014). Getting TRAIL back on track for cancer therapy. Cell death and differentiation *21*, 1350-1364.

Locksley, R.M., Killeen, N., and Lenardo, M.J. (2001). The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. Cell *104*, 487-501.

Mariani, S.M., and Krammer, P.H. (1998). Differential regulation of TRAIL and CD95 ligand in transformed cells of the T and B lymphocyte lineage. European journal of immunology *28*, 973-982.

Mariani, S.M., Matiba, B., Armandola, E.A., and Krammer, P.H. (1997). Interleukin 1 beta-converting enzyme related proteases/caspases are involved in TRAIL-induced apoptosis of myeloma and leukemia cells. The Journal of cell biology *137*, 221-229.

Merino, D., Lalaoui, N., Morizot, A., Solary, E., and Micheau, O. (2007). TRAIL in cancer therapy: present and future challenges. Expert opinion on therapeutic targets *11*, 1299-1314.

Micheau, O., Shirley, S., and Dufour, F. (2013). Death receptors as targets in cancer. British journal of pharmacology *169*, 1723-1744.

M.J., and Cohen, G.M. (2007). TRAIL signals to apoptosis in chronic lymphocytic leukaemia cells primarily through TRAIL-R1 whereas cross-linked agonistic TRAIL-R2 antibodies facilitate signalling via TRAIL-R2. British journal of haematology *139*, 568-577.

Pavet, V., Beyrath, J., Pardin, C., Morizot, A., Lechner, M.C., Briand, J.P., Wendland, M., Maison, W., Fournel, S., Micheau, O.*, et al.* (2010). Multivalent DR5 peptides activate the TRAIL death pathway and exert tumoricidal activity. Cancer research *70*, 1101-1110.

Pavet, V., Portal, M.M., Moulin, J.C., Herbrecht, R., and Gronemeyer, H. (2011). Towards novel paradigms for cancer therapy. Oncogene *30*, 1-20.

Pitti, R.M., Marsters, S.A., Ruppert, S., Donahue, C.J., Moore, A., and Ashkenazi, A. (1996). Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family. The Journal of biological chemistry *271*, 12687-12690.

Shimada, O., Wu, X., Jin, X., Nouh, M.A., Fiscella, M., Albert, V., Matsuda, T., and Kakehi, Y. (2007). Human agonistic antibody to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor 2 induces cytotoxicity and apoptosis in prostate cancer and bladder cancer cells. Urology *69*, 395-401.

Shirley, S., and Micheau, O. (2013). Targeting c-FLIP in cancer. Cancer letters *332*, 141-150.

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

Thomas, L.R., Henson, A., Reed, J.C., Salsbury, F.R., and Thorburn, A. (2004). Direct binding of Fas-associated death domain (FADD) to the tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor DR5 is regulated by the death effector domain of FADD. The Journal of biological chemistry *279*, 32780-32785.

Wajant, H., Moosmayer, D., Wuest, T., Bartke, T., Gerlach, E., Schonherr, U., Peters, N., Scheurich, P., and Pfizenmaier, K. (2001). Differential activation of TRAIL-R1 and -2 by soluble and membrane TRAIL allows selective surface antigen-directed activation of TRAIL-R2 by a soluble TRAIL derivative. Oncogene *20*, 4101-4106.

Wiley, S.R., Schooley, K., Smolak, P.J., Din, W.S., Huang, C.P., Nicholl, J.K., Sutherland, G.R., Smith, T.D., Rauch, C., Smith, C.A.*, et al.* (1995). Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. Immunity *3*, 673-682.

Zang, F., Wei, X., Leng, X., Yu, M., and Sun, B. (2014). C-FLIP(L) contributes to TRAIL resistance in HER2-positive breast cancer. Biochemical and biophysical research communications *450*, 267-273.

Zeng, Y., Wu, X.X., Fiscella, M., Shimada, O., Humphreys, R., Albert, V., and Kakehi, Y. (2006). Monoclonal antibody to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor 2 (TRAIL-R2) induces apoptosis in primary renal cell carcinoma cells in vitro and inhibits tumor growth in vivo. International journal of oncology *28*, 421-430.

Zerafa, N., Westwood, J.A., Cretney, E., Mitchell, S., Waring, P., Iezzi, M., and Smyth, M.J. (2005). Cutting edge: TRAIL deficiency accelerates hematological malignancies. J Immunol *175*, 5586-5590.

Zhang, Y., and Zhang, B. (2008). TRAIL resistance of breast cancer cells is associated with constitutive endocytosis of death receptors 4 and 5. Molecular cancer research : MCR *6*, 1861-1871.

CHAPITRE 1

Article 3 : Multimerization of an apoptogenic TRAIL-Mimicking Peptide by Using Adamentane-Based Dendrons

Giuseppe Lamanna, Cristian R. Smulski, Neila Chekkat,
Karine Estieu-Gionnet, Gilles Guichard, Sylvie Fournel, and Alberto Bianco

(publié en 2013 dans Biochemestry)

CHEMISTRY
A EUROPEAN JOURNAL

ChemPubSoc
Europe

DOI: 10.1002/chem.201202415

Multimerization of an Apoptogenic TRAIL-Mimicking Peptide by Using Adamantane-Based Dendrons**

Giuseppe Lamanna,*[a] Cristian R. Smulski,[a, c] Neila Chekkat,[a, d] Karine Estieu-Gionnet,[b] Gilles Guichard,[b] Sylvie Fournel,[a, d] and Alberto Bianco*[a]

Abstract: We have developed a straightforward strategy to multimerize an apoptogenic peptide that mimics the natural tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) by using adamantane-based dendrons as multivalent scaffolds. The selective binding affinity of the ligands to TRAIL receptor 2 (TR2) was studied by surface plasmon resonance, thus demonstrating that the trimeric and hexameric forms of the peptide exert an increased affinity of about 1500- and 20000-fold, respectively, relative to the monomer. Moreover, only the trimeric and hexameric ligands were able to induce cell death in TR2 expressing cells (BJAB), thus confirming that a multivalent form of the peptide is necessary to trigger a substantial TR2-dependent apoptotic response in vitro. These results provide interesting insight into the multivalency effect on biological ligand/receptor interactions for future therapeutic applications.

Keywords: adamantane · click chemistry · dendrimers · multivalency · peptides · TRAIL

Introduction

Polyvalent interactions that occur in biological systems are characterized by the simultaneous binding of multiple ligands to multiple receptors.[1] These interactions can induce (agonist mechanism) or inhibit (antagonist mechanism) a biological response differently to monovalent complexes.[2] To understand receptor signaling by multivalent interactions, new strategies have emerged from synthetic organic chemistry and chemical biology by the design of multivalent ligands.[3] The latter are composed of a central scaffold bearing multiple copies of a recognition element, such as a carbohydrate, peptide, small molecule, or any moiety that binds to a receptor.[4] The size, shape, flexibility, and valency of the central scaffold play important roles in the biological activity and the action mechanism of the recognition element.[5] Different scaffolds from various classes of structure, such as proteins, liposomes, dendrimers, polymers, and solid supports, have been designed.[6] Because of their nanoscale size and monodispersity, dendrimers and dendrons (wedge-shaped dendrimer sections) have appeared as ideal scaffolds for the design of multivalent ligands.[4,7]

We have recently reported the synthesis of the first- and the second-generation (G1 and G2, respectively) adamantane based-dendrons displaying the anti-inflammatory ibuprofen moiety at their periphery in a trimeric or nonameric arrangement, respectively.[8] The multivalency effect on the drug activity was studied, demonstrating that the multivalent ibuprofen/dendron conjugates exert an enhanced anti-inflammatory activity in vitro relative to free ibuprofen. Moreover, in the proposed dendritic structures, the adamantane building blocks with their rigid tetrahedral geometry, provided a three-dimensional tripodal arrangement of the attached entities. This tripodal arrangement is an ideal recognition motif for the cell surface, as several important receptors form complexes with threefold geometry.[9] On the basis of these elements, we decided to explore the adamantane-based dendrons as scaffolds to study multivalent ligand/receptor interactions.[10] We chose an apoptogenic cyclic peptide, termed **M1**, as a ligand, which was developed at Affymax,[11] which specifically recognizes human tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) receptor 2 (TR2) and once oligomerized mimics the function of its natural ligand TRAIL.[12]

TRAIL is a type II transmembrane protein that, like other tumor necrosis factor (TNF) superfamily members,

[a] Dr. G. Lamanna,[+] Dr. C. R. Smulski,[+] N. Chekkat, Prof. S. Fournel, Dr. A. Bianco
CNRS, Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire
Laboratoire d'Immunologie et Chimie Thérapeutiques
15 Rue René Descartes, 67084 Strasbourg (France)
Fax: (+33) 388610680
E-mail: lamanna@unistra.fr
a.bianco@ibmc-cnrs.unistra.fr

[b] Dr. K. Estieu-Gionnet, Dr. G. Guichard
Institut Européen de Chimie et de Biologie CBMN
Université de Bordeaux I - CNRS UMR 5248
2 Rue Robert Escarpit, 33607 PESSAC (France)

[c] Dr. C. R. Smulski[+]
Current address: University of Lausanne
Department of Biochemistry
Boveresses 155, 1066 Epalinges (Switzerland)

[d] N. Chekkat, Prof. S. Fournel
Current address: UMR 7199 CNRS-Université de Strasbourg
Laboratoire de Conception et Application de Molécules Bioactives
74 Route du Rhin, BP 60024- 67401 Illkirch Cédex (France)

[+] These authors contributed equally to this work.

[**] TRAIL = tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand.

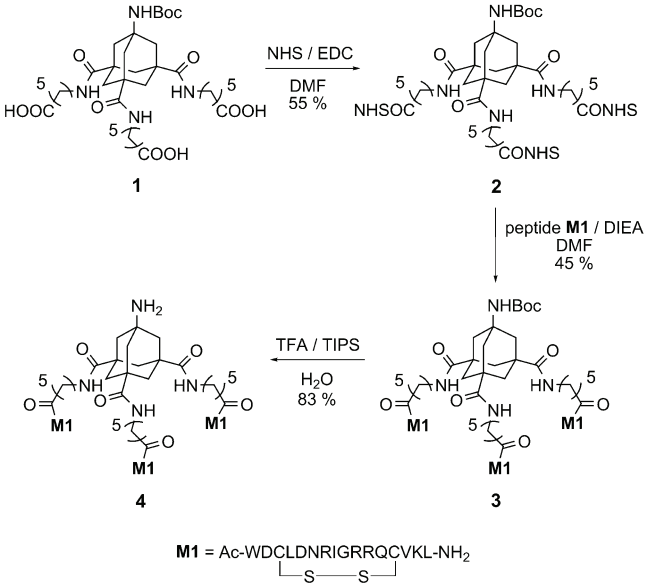
Supporting information for this article is available on the WWW under http://dx.doi.org/10.1002/chem.201202415.

WILEY ONLINE LIBRARY

© 2013 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

forms homotrimers. Each ligand subunit binds a receptor molecule that induces an oligomerization process, which is generally accepted to generate the minimal active unit that triggers an effective signal.[13] TRAIL receptors belong to the TNF receptor subgroup that contains an intracellular "death domain" and triggers apoptosis. There are five different TRAIL receptors: two fully functional receptors (i.e., TR1 and TR2), two membrane-bound receptors that cannot transmit an apoptotic signal (i.e., TR3 and TR4), and a soluble receptor called osteoprotegerin (OPG).[14]

Trimerization or multimerization of TR1 and TR2 results in the formation of a death-inducing signaling complex (DISC), thus leading to caspase activation and cell death by apoptosis. TRAIL is a ligand with enormous potential in cancer therapy because of its unique characteristic to induce apoptosis in tumor cells through the endogenous molecule while sparing normal cells.[15] Moreover, it is well established that death-receptor oligomerization is central for efficient formation of DISC, and structural studies provide novel insight into this process.[16] Indeed, it has been shown that strategies that increase receptor oligomerization amplify TRAIL-induced apoptosis.[17] Therefore, in the present study, we have analyzed the multimerization effect of the **M1** peptide ligand on TR2 binding by using different generations of adamantane-based dendrons as multivalent scaffolds.

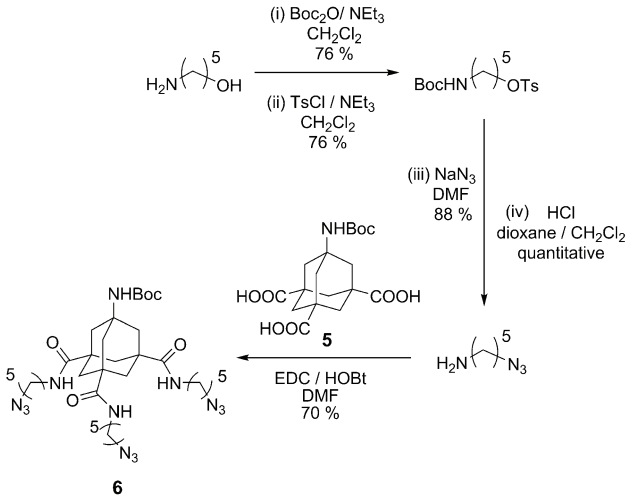


Scheme 1. The multimerization of **M1** peptide by using an amidation approach: synthesis of trimer **4**. Boc = *tert*-butoxycarbonyl, DIEA = *N*-diisopropylethylamine, EDC × HCl = *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N*′-ethylcarbodiimide hydrochloride, NHS = *N*-hydroxysuccinimidyl, TFA = trifluoroacetic acid, TIPS = triisopropylsilane.

Results and Discussion

We have previously described the synthesis of the G1 adamantane-based dendron **1** with three carboxylic acid groups at its periphery.[18] We decided to use this molecule as a scaffold for the construction of the trivalent form of the **M1** peptide ligand. We initially activated the acid functions of **1** by forming the corresponding NHS esters in the presence of EDC × HCl, and then we coupled the peptide **M1** through amidation with its lysine residue. HPLC purification on a C_{18} column afforded the trimeric ligand **3** in an overall yield of 25 % (Scheme 1). The Boc group at the focal point of **3** was subsequently cleaved with TFA in the presence of a TIPS scavenger to obtain the necessary building block **4** for the synthesis of the G2 dendron bearing **M1** in a nonameric arrangement. For this purpose, we decided to explore a synthetic approach based on the click chemistry between azides and alkynes.

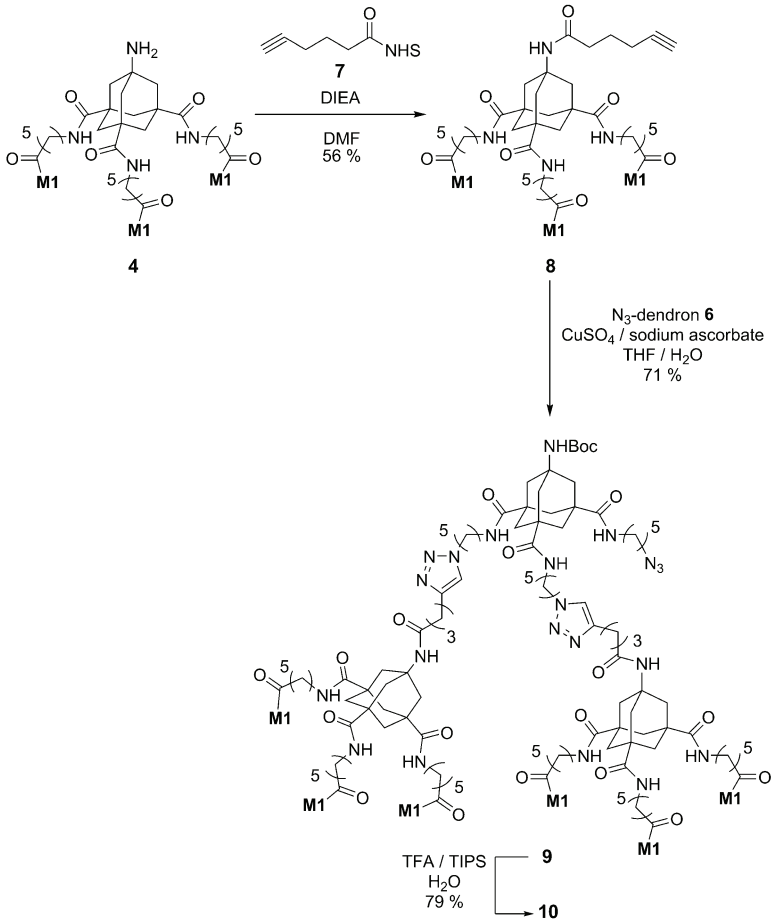
In our first experiments, we prepared the G1 dendron **6** functionalized at its periphery with azide groups (Scheme 2). By starting from the commercially available 5-amino-1-pentanol, we generated the desired azide-terminated chain following a four-step sequence: 1) the introduction of a Boc-protecting group on the amine using Boc_2O and triethylamine;[19] 2) the activation of the hydroxy function by tosylation with TsCl;[20] 3) the conversion of the tosylate into an azide group by treatment with NaN_3; and 4) Boc-deprotection with a solution of HCl in dioxane. The resulting azide-derivatized chain was finally introduced in the 3-, 5-, 7-carboxylate positions of adamantane **5** by means of amidation with EDC × HCl/HOBt to afford the G1 azide dendron **6** in good yield after isolation by column chromatography on silica gel (Scheme 2). Tetrasubstituted adamantane **5** was synthesized, in turn, according to our protocols in six steps from 1-bromoadamantane as an inexpensive starting material.[18]



Scheme 2. Synthesis of the first-generation azide dendron **6**. Boc_2O = di-*tert*-butyl dicarbonate, HOBt = 1-hydroxybenzotriazole, TsCl = *para*-toluenesulfonyl chloride.

At this point, for the development of the nonameric ligand, we needed a second adamantane-based dendron to bring an alkyne moiety at the focal point and bearing the

 © 2013 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim



Scheme 3. Synthesis of hexamer **10** by using the click-chemistry approach.

M1 peptide at its periphery. For this aim, we linked the NHS ester **7**, which terminates with an alkyne function, to the free amine of **4**, thus obtaining intermediate **8** under basic conditions (Scheme 3). This latter derivative was involved in a Huisgen cycloaddition with the azide dendron **6** by using a copper(I) catalyst in the presence of sodium ascorbate. Purification by HPLC on a C_{18} column afforded only hexameric ligand **9**. We did not observe the formation of the nonamer molecule probably because of steric hindrance. Thus, the third azide group of hexamer **9** is likely inaccessible to alkyne **8**. In the last synthetic step, the deprotection of the Boc group of **9** with TFA took place to afford the corresponding hexamer **10** with the free amine at the focal point.

Once we obtained multivalent ligands **4** and **10**, we studied their binding affinity to TR2 receptor by surface plasmon resonance (SPR) relative to monomer **M1**. Recombinant human TR2 and the mouse homologue of TR2 were immobilized on the sensor chip and the peptide-based ligands were flushed onto this chip at different concentrations. The recombinant human RANK protein, a related protein from the TNF receptor family, was used as a control.

All the compounds displayed specific binding to human TR2, and no detectable interaction was observed with mouse TR2 (see Figure 1 and Figure S1 in the Supporting Information). We also carried out SPR studies with the peptide-free dendron **1** to demonstrate that the ligand/receptor interaction is not influenced by the adamantane-based building block. Unspecific binding of **1** to the TR2 protein was not recorded (see Figure S2 in the Supporting Information). SPR experiments with the monovalent peptide **M1** provided an equilibrium dissociation constant (or "binding constant"; K_D) of 1.29×10^{-7} M, calculated from the dissociation kinetic rate ($k_{off}=3.07\times10^{-3}\,s^{-1}$) divided by the association kinetic rate ($k_{on}=2.39\times10^{4}\,M^{-1}s^{-1}$; Table 1). The ligand in its trivalent form **4** substantially improved the binding affinity to human TR2 by approximately 1500-fold ($K_D=9.10\times10^{-11}$ M). Interestingly, this effect was mainly due to a change on the dissociation rate ($k_{off}=1.04\times10^{-6}\,s^{-1}$) as the k_{on} value for trivalent ligand **4** ($k_{on}=1.15\times10^{4}\,M^{-1}s^{-1}$) is almost the same than the k_{on} value for monomer **M1**.

Table 1. Kinetic parameters of the **M1** ligand in its monovalent, trivalent, or hexavalent forms.

Analyte	k_{on} [$M^{-1}s^{-1}$]	k_{off} [s^{-1}]	K_D [M]
monomer **M1**	$(2.39\pm1.91)\times10^{4}$	$(3.07\pm0.02)\times10^{-3}$	$(1.29\pm0.04)\times10^{-7}$
trimer **4**	$(1.15\pm0.22)\times10^{4}$	$(1.04\pm0.33)\times10^{-6}$	$(9.10\pm1.92)\times10^{-11}$
hexamer **10**	$(8.01\pm0.23)\times10^{4}$	$(5.74\pm0.54)\times10^{-7}$	$(7.16\pm1.35)\times10^{-12}$

Moreover, hexamer **10** exerted a 14-fold increased affinity to human TR2 ($K_D=7.16\times10^{-12}$ M) relative to trimer **4**. Reconstitution of the sensor chip surface after injection at high concentrations of **10** was only effective by using 50 mM HCl solution probably due to high stability of the formed ligand/receptor complexes (Table 1). Here again, the higher binding affinity of **10** was determined by a strong decrease in the k_{off} value ($k_{off}=5.74\times10^{-7}\,s^{-1}$), while keeping an association rate ($k_{on}=8.01\times10^{4}\,M^{-1}s^{-1}$) similar to **4** and **M1**. The latter results can be interpreted as an improved stability of the complex ligand/receptor due to the multimerization of peptide **M1** that provides a multivalent interaction with TR2.

© 2013 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

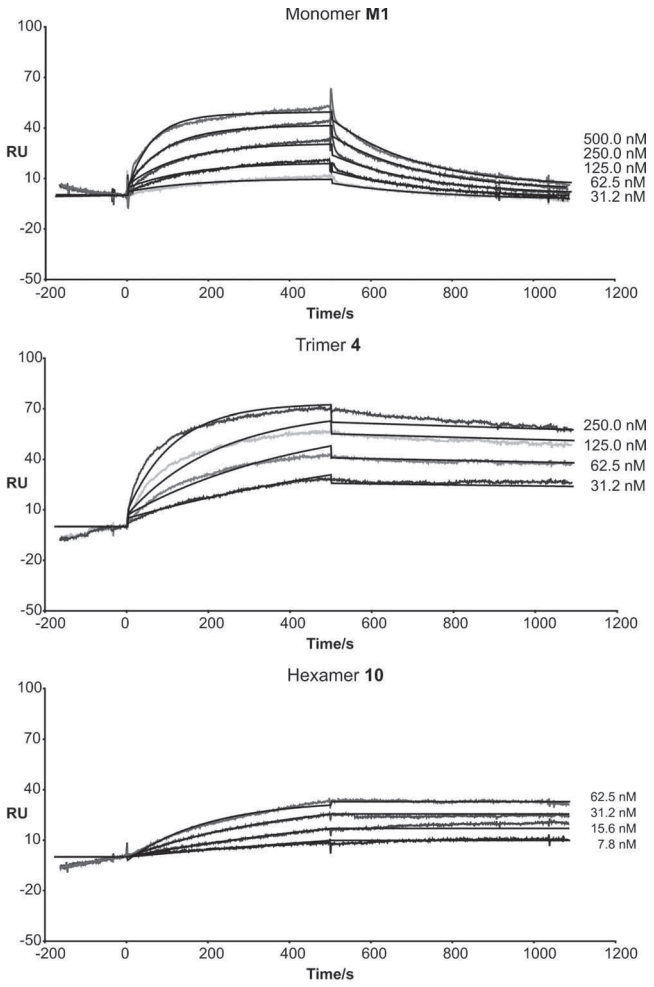


Figure 1. Sensorgrams of monomer **M1**, trimer **4**, and hexamer **10** on human TR2. The fittings correspond to the Langmuir binding model.

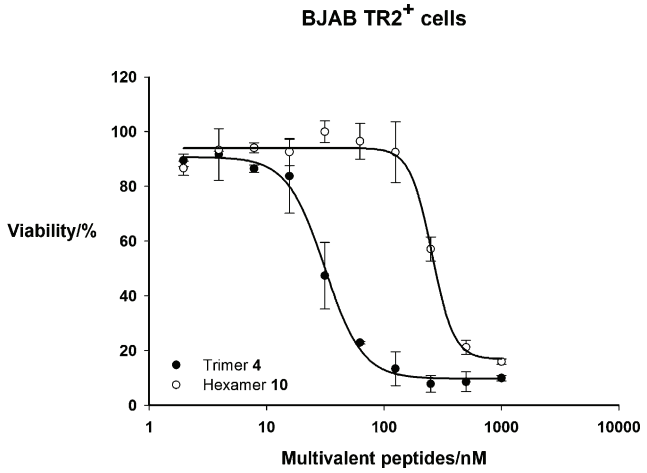


Figure 2. Cell-viability assay (MTS) in which BJAB TR2$^+$ cells were treated with increasing concentrations of trivalent **4** or hexavalent **10** peptides for 16 h. The IC_{50} values were obtained by a sigmoidal, logistic, four-parameter fitting and correspond to (31.23 ± 1.59) and (255.64 ± 13.90) nM for the trivalent and hexavalent peptides, respectively.

In addition, we can suggest that the applied strategy for ligand multimerization by using adamantane-based dendrons does not alter complex formation but contributes to increased stability during the dissociation phase.

Encouraged by these positive results, we decided to analyze the efficiency and specificity of trimer **4** and hexamer **10** to induce cell death in a TR2-dependent manner by using an in vitro model of human Burkitt lymphoma (BJAB) that either does or does not express (BJAB TR2$^+$ or BJAB TR2$^-$ cells, respectively) TRAIL receptor 2.[21] The BJAB TR2$^+$ and BJAB TR2$^-$ cells were incubated with increasing concentrations of either trivalent **4** or hexavalent **10** ligand and cell viability was analyzed after 16 h of incubation. Whereas a significant death of BJAB TR2$^+$ cells was observed upon treatment with both compounds, no cell death was seen in BJAB TR2$^-$ cells, thus indicating high TR2 selectivity of the multivalent peptides (Figure 2) and no toxic effect at the assessed concentrations (see Figure S3 in the Supporting Information).

As it has been previously shown, the monomer **M1** has no effect on BJAB TR2$^+$ cell death, thus confirming that a multivalent form of the peptide is necessary to trigger a substantial TR2-dependent apoptotic response in vitro.[12a] Unexpectedly, hexavalent ligand **10** displayed a decreased activity relative to trimer **4**. Indeed, the IC_{50} value of **10** was approximately 255 nM relative to the trivalent ligand **4**, which displayed an IC_{50} value of approximately 31 nM (Figure 2). This seemingly discordant result, when compared with SPR data, can be due to unfavorable interactions between the six **M1** peptides of **10** and TR2 on the cell surface for reasons of steric hindrance, thus avoiding the formation of a functional signaling complex. The TNF superfamily ligands are type-II transmembrane proteins that can be active in a membrane-bound form or as soluble cytokines after proteolytic shedding.[9a] The C-terminal, extracellular domain of TRAIL forms a homotrimer and mediates receptor binding and oliogomerization.[22] This ligand-induced oligomerization is generally accepted to trigger the signal cascade, but increasing the oligomerization level improves the effectiveness of the signal.[23] This effect can be related to the differential activity of membrane-bound ligands relative to their soluble products. Our goal was to set up the basis for mimicking a highly oligomeric ligand by using a G2 dendron that presented the TRAIL receptor 2 agonistic peptide **M1** on its periphery. However, contrary to what it was expected from SPR data, the hexameric peptide **10** displayed a decreased cellular activity relative to the trimeric peptide **4**. This behavior can be a consequence of a biological incompatible three-dimensional arrangement of both trimers present on the hexameric molecule, thus avoiding the formation of a functional signaling complex. Unfortunately information is not available about the three-dimensional distribution of highly multimeric ligands within the TNF superfamily members. Further synthetic studies are needed to find the optimal length of the spacer arms between the peptide and adamantane core to obtain effective apoptotic signaling, even with multivalent ligands higher than trivalent forms.

 © 2013 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

Conclusion

Our studies have demonstrated that adamantane-based dendrons are promising scaffolds because they provide a three-dimensional tripodal arrangement for the multimerization of peptides such as the TRAIL-mimicking ligand **M1**. Indeed, we carried out a straightforward synthesis of trimer **4** and hexamer **10**. These multivalent ligands proved to specifically bind the human TR2, showing an increased affinity (higher avidity) relative to the monomer **M1** in SPR assays. Moreover, both the trimeric and hexameric ligands could induce selective cell death in TR2 expressing cells (BJAB). These results together with the fact that the monomeric **M1** peptide could not induce cell death[12a] confirm that a multivalent form of the peptide is necessary to trigger a substantial TR2-dependent apoptotic response in vitro. Unexpectedly, hexamer **10** displayed a decreased biological activity relative to the trimeric ligand **4**. This outcome is probably due to unfavorable interactions between the six **M1** peptides of **10** and TR2 on the cell surface for reasons of steric hindrance. To overcome this limitation, in silico models are needed to predict the most favorable distance between the ligands and the adamantane core for the formation of a functional signaling ligand/receptor complex. The insertion of a longer spacer between the adamantane units might also render the functional groups more accessible, thus generating higher multimeric structures.

Experimental Section

General: All the starting materials, chemicals, and anhydrous solvents were obtained from commercial suppliers and used without purification. Peptide **M1** was purchased from PolyPeptide. ^{1}H and ^{13}C NMR spectra were recorded using a Brucker 300, 400, or 500 MHz spectrometer; the protons of the residual solvent were used to reference the chemical shift in ppm. Coupling constants J are reported in Hertz (Hz), and the splitting patterns are designated as s (singlet), d (doublet), t (triplet), q (quartet), m (multiplet), and br (broad). IR spectra were measured on a Perkin–Elmer Spectrum One ATR-FTIR spectrometer. ESI mass spectra were recorded on ThermoFisher Finnigan LCQ Advantage Max instrument. Elemental analyses were performed at the Micro-Analytical Facility Core of the University of Strasbourg. All the peptide-based compounds were purified by preparative HPLC on a Beckman instrument equipped with a System Gold 166 NMP detector with a Macherey–Nagel Nucleodur 100–16 C_{18} column (gradient: 5–65% B in 20 min; eluent: A = H_2O + 0.1% TFA, eluent B = MeCN + 0.08% TFA; λ = 220 nm). The following compounds were synthesized according to reported procedures: 5-*O*-tosyl-1-*tert*-butoxycarbonylaminopentane,[19,20] 1,3,5-tri(5-carboxy-pentylcarbamoyl)-7-*tert*-butoxycarbonylaminoadamantane (**1**), and 1,3,5-tricarboxy-7-*tert*-butoxycarbonylaminoadamantane (**5**).[18]

5-Azido-1-*tert*-butoxycarbonylaminopentane: Sodium azide (0.54 g, 8.39 mmol) was added to a solution of 5-*O*-tosyl-1-*tert*-butoxycarbonylaminopentane (1.00 g, 2.79 mmol) in dry DMF (20 mL). The resulting mixture was stirred at 70 °C for 24 h in an atmosphere of argon. After the addition of CH_2Cl_2 (150 mL), the organic phase was washed with ice-cold deionized water (3 × 150 mL), dried over Na_2SO_4, and filtered. After removal of the solvent, the crude product was purified by column chromatography on silica gel with CH_2Cl_2 as the eluent to give the product as a colorless oil (0.56 g, 2.45 mmol, 88%). ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz): δ = 4.78 (bs, 1H), 3.17 (t, J = 6.7 Hz, 2H), 2.96–3.06 (m, 2H), 1.33 (s, 9H), 1.25–1.55 ppm (m, 6H); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 125 MHz): D = 155.82, 78.77, 51.08, 29.44, 28.30, 28.18, 23.71 ppm; FTIR (neat) $\tilde{\nu}$ = 3362, 2972, 2931, 2861, 2091, 1689, 1515, 1244, 1163 cm^{-1}; MS (ESI): m/z: 229.2 $[M+H]^+$; elemental analysis calcd for $C_{10}H_{20}N_4O_2$: C 52.61, H 8.83, N 24.54; found: C 52.92, H 8.38, N 24.59.

5-Azidopentylamine: A solution of HCl in dioxane (4 M, 6.5 mL, 26.28 mmol) was added to a solution of 5-azido-1-*tert*-butoxycarbonylaminopentane (1.00 g, 4.38 mmol) in CH_2Cl_2 (8 mL). The resulting mixture was stirred at room temperature for 1 h. Evaporation of the solvent in vacuo afforded the product as a beige solid (0.56 g, 4.38 mmol, quant.). ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): D = 8.27 (bs, 2H), 3.30 (t, J = 6.4 Hz, 2H), 2.93–3.08 (m, 2H), 1.77–1.87 (m, 2H), 1.60–1.67 (m, 2H), 1.47–1.55 ppm (m, 2H); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 125 MHz): D = 50.94, 39.74, 28.14, 26.92, 23.62 ppm; FTIR (neat) $\tilde{\nu}$ = 2931, 2866, 2091, 1605, 1509, 1282, 1254 cm^{-1}; MS (ESI): m/z: 129.3 $[M+H]^+$; elemental analysis calcd for $C_5H_{12}N_4$: C 46.85, H 9.44, N 43.71; found: C 47.00, H 9.46, N 43.57.

NHS triester 2: EDC × HCl (0.120 g, 0.63 mmol) and *N*-hydroxysuccinimide (0.066 g, 0.57 mmol) were added to a solution of **1** (0.130 g, 0.18 mmol) in dry DMF (3 mL). The resulting mixture was stirred overnight at room temperature. After the addition of AcOEt (60 mL), the organic phase was washed with saturated aqueous NH_4Cl solution (1 × 60 mL) and water (1 × 60 mL), dried over Na_2SO_4, and filtered. Evaporation of the solvent in vacuo yielded the desired product **2** as a beige solid (0.101 g, 0.10 mmol, 55%).^{1}H NMR (CD_3OD, 300 MHz): D = 3.17–3.24 (m, 6H), 2.84 (s, 12H), 2.64 (t, J = 7.2 Hz, 6H), 1.98 (s, 6H), 1.82–1.91 (m, 6H), 1.69–1.79 (m, 6H), 1.49–1.58 (m, 6H), 1.42 (s, 9H), 1.39–1.47 ppm (m, 6H); ^{13}C NMR (CD_3OD, 75 MHz): D = 178.03, 177.95, 170.22, 156.33, 79.78, 52.98, 44.57, 42.57, 42.52, 40.32, 31.54, 29.81, 28.88, 26.89, 26.57, 25.40 ppm; FTIR (neat) $\tilde{\nu}$ = 3352, 2937, 2866, 1810, 1780, 1729, 1633, 1522, 1201, 1161, 1065 cm^{-1}; MS (ESI): m/z: 1037.2 $[M+Na]^+$, 1015.0 $[M+H]^+$; elemental analysis calcd for $C_{48}H_{67}N_7O_{17}$: C 56.85, H 6.66, N 9.67; found: C 57.01, H 6.69, N 9.23.

Trimer 4: Peptide **M1** (0.065 g, 0.0323 mmol) and DIEA (50 μL) were added to a solution of NHS triester **2** (0.008 g, 0.0079 mmol) in dry DMF (3 mL). The resulting mixture was stirred at room temperature for 48 h. After removal of the solvent, the crude product was purified by preparative HPLC (t_r = 13.8 min) to obtain trimer **3** as a white solid (0.024 g, 0.0036 mmol, 45%). MS (ESI): m/z: 6710.7 $[M+H]^+$.

The obtained trimer **3** (0.019 g, 0.0028 mmol) was dissolved in TFA/H_2O/TIPS (1.5 mL, 44:5:1), and the resulting mixture was stirred at room temperature for 3 h. Purification by preparative HPLC (t_r = 12.9 min) afforded the desired compound **4** as a white solid (0.018 g, 0.0027 mmol, 83%). MS (ESI): m/z: 6609.9 $[M+H]^+$.

1,3,5-Tri(5-azido-pentylcarbamoyl)-7-*tert*-butoxycarbonylaminoadamantane (6): EDC × HCl (0.348 g, 1.82 mmol) and HOBt (0.246 g, 1.82 mmol) were added to a solution of **5** (0.100 g, 0.26 mmol) in dry DMF (3 mL). The resulting mixture was stirred at room temperature for 30 min. A solution of 5-azidopentylamine (0.200 g, 1.56 mmol) and DIEA (0.70 mL, 3.90 mmol) in dry DMF (2 mL) was added to the reaction mixture, which was stirred at 65 °C for 72 h. After the addition of AcOEt (80 mL), the organic phase was washed with saturated aqueous NH_4Cl solution (2 × 80 mL), saturated aqueous $NaHCO_3$ solution (2 × 80 mL), and brine (1 × 80 mL), dried over Na_2SO_4, and filtered. The solvent was removed in vacuo and the crude product was purified by column chromatography on silica gel with AcOEt as the eluent to yield the G1 azide dendron **6** as an orange oil (0.128 g, 0.18 mmol, 70%). ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz): D = 5.92 (t, J = 5.7 Hz, 3H), 4.77 (s, 1H), 3.15–3.27 (m, 12H), 1.98 (s, 6H), 1.78–1.90 (m, 6H), 1.44–1.61 (m, 12H), 1.37 (s, 9H), 1.29–1.37 ppm (m, 6H); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75 MHz): D = 174.9, 154.1, 79.3, 51.8, 51.0, 43.1, 41.6, 39.21, 39.2, 28.9, 28.3, 28.28, 23.8 ppm; FTIR (neat) $\tilde{\nu}$ = 3326, 2926, 2855, 2086, 1701, 1630, 1519, 1244, 1158 cm^{-1}; MS (ESI): m/z: 714.8 $[M+H]^+$; elemental analysis calcd for $C_{33}H_{55}N_{13}O_5$: C 55.52, H 7.77, N 25.51; found: C 55.11, H 7.90, N 25.03.

5-Hexynoic NHS ester 7: EDC × HCl (0.256 g, 1.33 mmol) and *N*-hydroxysuccinimide (0.123 g, 1.07 mmol) were added to a solution of commercial 5-hexynoic acid (0.100 g, 0.89 mmol) in dry DMF (2 mL). The resulting mixture was stirred at room temperature for 24 h. After the addition of AcOEt (60 mL), the organic phase was washed with saturated aqueous NH_4Cl solution (1 × 60 mL) and water (1 × 60 mL), dried over Na_2SO_4,

 © 2013 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

and filtered. Evaporation of the solvent in vacuo afforded the desired product **7** as a yellow oil (0.164 g, 0.78 mmol, 88%).^{1}H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): δ=2.78 (s, 4H), 2.72 (t, J=7.4 Hz, 2H), 2.30 (dt, J=2.8 and 6.8 Hz, 2H), 1.99 (t, J=2.8 Hz, 1H), 1.87–1.95 ppm (m, 2H); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 125 MHz): δ=169.07, 167.99, 82.29, 69.67, 29.43, 25.36, 23.13, 17.31 ppm; FTIR (neat) $\tilde{\nu}$=3281, 2942, 2105, 1810, 1780, 1727, 1201, 1064 cm^{-1}; MS (ESI): m/z: 210.1 $[M+H]^+$; elemental analysis calcd for $C_{10}H_{11}NO_4$: C 57.41, H 5.30, N 6.70; found: C 57.54, H 5.97, N 6.44.

Alkyne trimer 8: Amine **4** (0.016 g, 0.0024 mmol) and DIEA (30 μL) were added to a solution of **7** (0.001 g, 0.0048 mmol) in dry DMF (2 mL). The resulting mixture was stirred at 45 °C for 48 h. After removal of the solvent, the crude product was purified by preparative HPLC (t_r= 13.6 min) to obtain the alkyne **8** as a white solid (0.009 g, 0.0013 mmol, 56%). MS (ESI): m/z: 6703.3 $[M+H]^+$.

Hexamer 10: Compound **6** (357 μg, 0.5 μmol), sodium ascorbate (99 μg, 0.5 μmol), and copper(II) sulfate pentahydrate (75 μg, 0.3 μmol) were added to a solution of alkyne trimer **8** (12 mg, 1.8 μmol) in THF/H_2O (5 mL, 1:1) in an argon atmosphere,. The reaction mixture was stirred at room temperature for 48 h in an argon atmosphere. After lyophilization, the crude product was purified by preparative HPLC (t_r=15.5 min) to obtain hexamer **9** as a white solid (5 mg, 0.35 μmol, 71%). MS (ESI): m/z: 14123.7 $[M+H]^+$.

The obtained hexamer **9** (5 mg, 0.3 μmol) was dissolved in TFA/H_2O/TIPS (0.5 mL, 44:5:1), and the resulting mixture was stirred at room temperature for 2 h. Purification by preparative HPLC (t_r=14.1 min) afforded the desired compound **10** as a white solid (4 mg, 0.3 μmol, 79%). MS (ESI): m/z: 14023.0 $[M+H]^+$.

SPR analysis: The Biacore 3000 system, sensor chip CM5, surfactant P20, amine-coupling kit containing NHS, EDC×HCl, and ethanolamine were from Biacore (Uppsala, Sweden). Biosensor assays were performed with HBS-EP buffer as a running buffer (10 mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES), 150 mM sodium chloride, 3 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), and 0.005% v/v surfactant P20; pH 7.4). The low carboxylated dextran matrix (B1) was activated with a mixture of 0.2 M EDC×HCl and 0.05 M NHS (35 μL) at 5 μL min^{-1}. Human RANK, human TR2, and mouse TR2-Fc fusion proteins were immobilized with the standard Biacore protocol at a density of 0.05 pmol mm^{-2}. Soluble peptides were diluted in the running buffer and injected (250 μL), followed by a dissociation phase (500 μL) at a flow rate of 30 μL min^{-1}. The sensor chip surface was regenerated after each experiment by injecting HCl (20 μL, 25 mM (or 50 mM for the hexamer **10**)). The kinetic parameters were calculated using Biaeval 4.1 software. Analysis was performed by using the simple Langmuir binding model. Specific binding profiles were obtained after subtracting the response signal from the control RANK channel and from a blank-buffer injection. The fitting to each model was judged by the chi square χ2 value and the randomness of residue distribution compared to the theoretical model. The use of others binding models did not give better fits.

Cell-viability assay: BJAB cells were grown in RPMI1640 medium (Lonza, Basel Switzerland) supplemented with 10% fetal calf serum. The cells were seeded in 96-well plates at 5×10^5 cells well^{-1} and treated with the indicated concentrations of multivalent peptides for 16 h. Stock peptides were prepared at a concentration of 1 mM in water, and all the dilutions were performed in the cell-culture medium. The CellTiter 96 aqueous non-radioactive cell proliferation assay (MTS; Promega, WI, USA) was used to estimate the percentage of viable cells by following the manufacturer's instructions. Nontreated cells were used to normalize the 100% value.

Acknowledgements

The authors thank the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), the Agence Nationale de la Recherche (ANR-07-PCVI-0031–01 (S.F.) and ANR-08-PCVI-0034–01 (G.G.)), and the Ligue Nationale Contre le Cancer, Comité de la Dordogne (G.G.). C.R.S. was awarded a grant by the Agence Nationale de la Recherche and Strasbourg University. G.L. is grateful to the Agence Nationale de la Recherche (NANOTHER, project no. 2010 NANO 008 01). N.C. was given a grant by the French "Ministère de la Recherche". We are also grateful to Andrew Thorburn for providing the BJAB cell lines.

[1] M. Mammen, S. K. Choi, G. M. Whitesides, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 2908–2953; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 2754–2794.
[2] a) M. D. Carrithers, M. R. Lerner, *Chem. Biol.* **1996**, *3*, 537–542; b) I. A. Graef, L. J. Holsinger, S. Diver, S. L. Schreiber, G. R. Crabtree, *EMBO J.* **1997**, *16*, 5618–5628.
[3] a) L. L. Kiessling, J. E. Gestwicki, L. E. Strong, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2000**, *4*, 696–703; b) L. L. Kiessling, J. E. Gestwicki, L. E. Strong, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 2408–2429; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 2348–2368.
[4] R. Roy, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1996**, *6*, 692–702.
[5] R. Roy, D. Pagé, S. F. Perez, V. V. Bencomo, *Glycoconjugate J.* **1998**, *15*, 251–263.
[6] L. L. Kiessling, L. E. Strong, J. E. Gestwicki, *Annu. Rep. Med. Chem.* **2000**, *35*, 321–330.
[7] a) E. K. Woller, M. J. Cloninger, *Org. Lett.* **2002**, *4*, 7–10; b) M. J. Cloninger, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2002**, *6*, 742–748; c) W. B. Turnbull, S. A. Kalovidouris, J. F. Stoddart, *Chem. Eur. J.* **2002**, *8*, 2988–3000; d) O. Rolland, C. O. Turrin, A. M. Caminade, J. P. Majoral, *New J. Chem.* **2009**, *33*, 1809–1824.
[8] G. Lamanna, J. Russier, H. Dumortier, A. Bianco, *Biomaterials* **2012**, *33*, 5610–5617.
[9] a) J. L. Bodmer, P. Schneider, J. Tschopp, *Trends Biochem. Sci.* **2002**, *27*, 19–26; b) S. E. Gibson, M. P. Castaldi, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 4834–4837; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 4718–4720; c) M. C. Bewley, K. Springer, Y. B. Zhang, P. Freimuth, J. M. Flanagan, *Science* **1999**, *286*, 1579–1583.
[10] V. Humblet, P. Misra, K. R. Bhushan, K. Nasr, Y. S. Ko, T. Tsukamoto, N. Pannier, J. V. Frangioni, W. Maison, *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 544–550.
[11] Y. M. Angell, A. Bhandari, M. N. De Francisco, B. T. Frederick, J. M. Green, K. Leu, K. Leuther, R. Sana, P. J. Schatz, E. A. Whitehorn, K. Wright, C. P. Holmes, *Adv. Exp. Med. Biol.* **2009**, *611*, 101–103.
[12] a) V. Pavet, J. Beyrath, C. Pardin, A. Morizot, M. C. Lechner, J. P. Briand, M. Wendland, W. Maison, S. Fournel, O. Micheau, G. Guichard, H. Gronemeyer, *Cancer Res.* **2010**, *70*, 1101–1110; b) K. Gorska, J. Beyrath, S. Fournel, G. Guichard, N. Winssinger, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 7742–7744.
[13] a) S. G. Hymowitz, H. W. Christinger, G. Fuh, M. Ultsch, M. O'Connell, R. F. Kelley, A. Ashkenazi, A. M. de Vos, *Mol. Cell* **1999**, *4*, 563–571; b) A. Ashkenazi, *Nat. Rev. Cancer* **2002**, *2*, 420–430.
[14] D. Mérino, N. Lalaoui, A. Morizot, P. Schneider, E. Solary, O. Micheau, *Mol. Cell. Biol.* **2006**, *26*, 7046–7055.
[15] a) A. Ashkenazi, P. Holland, S. G. Eckhardt, *J. Clin. Oncol.* **2008**, *26*, 3621–3630; b) E. Cretney, K. Takeda, H. Yagita, M. Glaccum, J. J. Peschon, M. J. Smyth, *J. Immunol.* **2002**, *168*, 1356–1361; c) K. Takeda, M. J. Smyth, E. Cretney, Y. Hayakawa, N. Kayagaki, H. Yagita, K. Okumura, *J. Exp. Med.* **2002**, *195*, 161–169.
[16] F. L. Scott, B. Stec, C. Pop, M. K. Dobaczewska, J. J. Lee, E. Monosov, H. Robinson, G. S. Salvesen, R. Schwarzenbacher, S. J. Riedl, *Nature* **2009**, *457*, 1019–1022.
[17] a) D. Berg, M. Lehne, N. Müller, D. Siegmund, S. Münkel, W. Sebald, K. Pfizenmaier, H. Wajant, *Cell Death Differ.* **2007**, *14*, 2021–2034; b) T. W. Poh, S. Huang, J. L. Hirpara, S. Pervaiz, *Cell Death Differ.* **2007**, *14*, 1813–1825.
[18] G. Lamanna, J. Russier, C. Ménard-Moyon, A. Bianco, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 8955–8957.
[19] B. E. Kane, M. K. Grant, E. E. El-Fakahany, D. M. Ferguson, *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 1376–1392.
[20] T. Wang, H. An, B. D. Haly, P. Dan Cook, *J. Heterocycl. Chem.* **2000**, *37*, 687–696.
[21] L. R. Thomas, R. L. Johnson, J. C. Reed, A. Thorburn, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 52479–52486.

 © 2013 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

[22] D. W. Banner, A. D'Arcy, W. Janes, R. Gentz, H. J. Schoenfeld, C. Broger, H. Loetscher, W. Lesslauer, *Cell.* **1993**, *73*, 431–445.
[23] a) N. Holler, A. Tardivel, M. Kovacsovics-Bankowski, S. Hertig, O. Gaide, F. Martinon, A. Tinel, D. Deperthes, S. Calderara, T. Schulthess, J. Engel, P. Schneider, J. Tschopp, *Mol. Cell. Biol.* **2003**, *23*, 1428–1440; b) L. E. Haswell, M. J. Glennie, A. Al-Shamkhani, *Eur. J. Immunol.* **2001**, *31*, 3094–3100.

Received: July 6, 2012
Revised: October 3, 2012
Published online: December 13, 2012

 © 2013 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

CHAPITRE 1

Article 4 : Effect of various strategies for the presentation of TRAIL-R2 specific peptides on helical oligourea foldamer scaffold on their binding parameters and pro-apoptotic activity

(en préparation)

Effect of various strategies for the presentation of TRAIL-R2 specific peptides on helical oligourea foldamer scaffold on their binding parameters and pro-apoptotic activity

Neil W. Owens*, Neila Chekkat*, Valeria Pavet, Caterina Lombardo, Hinrich Gronemeyer, Sylvie Fournel [$] and Gilles Guichard[$]

* The authors contributed equally to this work.

[$] Corresponding authors and shared senior authorship

Introduction

The Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducting Ligand (TRAIL/Apo2L/TNFSF10), a member of the functionally diverse Tumor Necrosis Factor (TNF) superfamily, has been the subject of intense study since its discovery, essentially as a candidate for targeted cancer therapy (Lemke et al., 2014). Indeed, TRAIL induces apoptosis of tumor cells but not of healthy cells, which is a unique trait for an endogenous protein (Ashkenazi et al., 1999). TRAIL is a type-II transmembrane glycoprotein expressed in most cell types, but particularly in circulating immune cells (Daniels et al., 2005). The extracellular domain can be released in a 24 kDa soluble form, and both soluble and membrane forms of TRAIL bind to four cell surface receptors: two death receptors TRAIL-R1 (DR4/TNFSF10A) and TRAIL-R2 (DR5/TNFSF10B), that contain an intracellular death domain capable of unleashing the signal cascade resulting in apoptosis, and two decoy receptors TRAIL-R3 (DcR1/TNFSF10C) and TRAIL-R4 (DcR2/TNFRSF10D) that inhibit TRAIL-induced apoptosis (Degli-Esposti, 1999). Binding of TRAIL induces an organization of the TRAIL-R1 or TRAIL-R2 receptors at cell surface that leads to the formation of the death-inducing signaling complex (DISC) (Sessler et al., 2013) in the cytosol, leading to the activation of caspase 8 and downstream procaspases 3, 6 and 7, which leads to apoptosis in a largely p53 independent manner (Fulda, 2014).

TRAIL is a homotrimeric structure, which induces the clustering of multiple TRAIL-R1 or TRAIL-R2 receptors in a process that is not fully understood in terms of preorganization of the receptors prior to TRAIL binding (Chan, 2007a), kinetics of the oligomerization process, and actual number of receptors required for signal transduction (Valley et al., 2012). However, it is commonly accepted that TRAIL-R2 requires a higher degree of oligomerization in comparison to TRAIL-R1 receptor (Wajant et al., 2001).

As a result of tumor cell selectivity of TRAIL-induced apoptosis, efforts have been made to develop TRAIL-R1 or TRAIL-R2 specific ligands. Recombinant TRAIL protein and antibodies directed against TRAIL-R1 or TRAIL-R2 receptors are currently being evaluated in phase II clinical trials (Stuckey and Shah, 2013).

More recently, TRAIL-R2 specific peptides (Angell et al., 2009) have been investigated and we reported in 2010 (Pavet et al, 2010) about several cyclic peptides (**1**, **2**, and **3**), discovered through phage-display (Li et al., 2006), that bind to TRAIL-R2 with high affinity. We described that multimerization of these cyclic peptides provided several-thousand fold increase in binding affinity, and more importantly, induction of apoptosis in several cancer cell lines *in vitro* and *in vivo* in a tumor xenograft mouse model (Pavet et al., 2010). Dimerization and trimerization of the peptides was carried out using the 2,2'-oxydiacetamide linker and the 1,3,5-adamantyl propylamide scaffold, respectively. Knowing that TRAIL acts as a homotrimer, we were surprised by the low pro-apoptotic activity of the trimeric forms of the peptides that did not induce more apoptosis than the dimeric forms. We hypothesized that the geometry of the 3 cyclic peptides in the trimeric form was not optimal for TRAIL-R2 binding.

Therefore, we propose to investigate the role of TRAIL-R2-specific peptide geometry on TRAIL-R2 binding affinity and on apoptosis induction. However, the scaffolds that are commonly used for the presentation of bioactive compounds in a multivalent fashion are not very amenable for comparison of multivalency and for exploration of different projections of the ligands with the same scaffold.

Foldamers, or folded molecular architectures, offer modular scaffolds with rigid and well-defined secondary structures (Guichard and Huc, 2011). Oligourea type foldamers, of the form (-NH-CH(R)-CH_2-N'H-CO-)$_n$, provide particularly rigid 2.5-helical scaffolds due to a network of bifurcated intramolecular hydrogen bonds between urea carbonyl groups (*i* residue) and urea amino protons (*i*-2 and *i*-3 residues) (Fischer and Guichard, 2010). After the extensive characterization of their propensity to form helical structures, oligourea foldamers are now used in biological contexts, for example as antimicrobial agents (Claudon et al., 2010). While foldamers are often used for the discrete presentation of proteinogenic side chains, there are fewer examples demonstrating their use as scaffolds for the presentation of bioactive compounds.

In this study, we explored the impact of several strategies for presentation of TRAIL-R2 specific peptides (**1**, **2** and **3)** on oligourea helix scaffolds on the binding affinity on TRAIL-R2, and the ability to induce apoptosis in tumor cells *in vitro*.

Results

Oligourea helix as chemical scaffold to multimerize peptides specific for the TRAIL-R2 receptor

We previously described three cyclic peptides named **1**, **2** and **3** that differed only in the position of a single L-lysine residue (which alternates with an L-arginine residue) in their sequences (**Figure 1A).** These peptides bind to TRAIL-R2 with high affinity and induce apoptosis in divalent and trivalent forms (Pavet et al., 2010) (Lamanna et al., 2013). In this study, we used adamantane-based dendrons to provide a three dimensional tripodal arrangement for the trimerization of peptides **1, 2 and 3** (Pavet et al., 2010). Unfortunately, trimeric peptides did not display an increased pro-apoptotic activity in comparison to the dimeric forms of the peptides. We hypothesized that this outcome was probably due to unfavorable interactions between the three peptides presented on the adamentane scaffold and TRAIL-R2 receptors expressed on the cell surface for reason of steric hindrance.

In the present study, we used an alternative way to multimerize peptides **1**, **2**, and **3**, by using a helix scaffold consisting of the succession of two succinimidyl carbamate-activated building block, Boc-AlaU-OSu and Boc-Lys(ClZ)U-OSu (**Figure 1B**). The 2.5-helical nature of the oligourea helix permits to envisage several molecules, which vary in the peptide orientation on the scaffold and peptide number. The cyclic peptides contained a single lysine residue, which can be used to attach to the scaffold through succinimidyl carbamate activation of amino groups presented on the helix. Each scaffold was composed of seven alanine residues, a neutral amino acid that reinforces the structure of the helix, except at positions where the peptides were attached in which alanine residues were substituted by lysine residues. As shown in **Figure 1C** the i position is considered as the starting point of the oligourea helix, the addition of one building block residue leads to position i+1 with an angle of 144°.

The trivalent molecules **H1t, H2t and H3t** presented peptides **1**, **2**, and **3,** respectively, with sequential attachment of the ligands at positions *i*, *i*+1 and *i*+2 in the center of the helix, with angles of 72° and 144° between the ligands (**Figure 1D**).

The divalent molecules **H1d*trans*** and **H2d*trans*** presented peptides **1** and **2** respectively sequentially at *i* and *i*+1 position, with an angle of 144° between the ligands, or nearly opposite faces of the helix (**Figure 1E**). The divalent scaffolds **H1d*cis*** and **H2d*cis*** presented peptides **1** and **2** respectively, non-sequentially at positions *i* and *i*+2, giving an angle of only 72° between the ligands, or nearly on the same face of the helix (**Figure 1F**). As control, we also used non-helical scaffold by tethering peptide **1** to a LysU building block (referred to peptide **L1**; **Figure 1G**) or by dimerizing peptide **1** by a bis-succinimidyl carboxymethoxyacetate coupling (referred to peptide **1d**; **Figure 1H** and (Pavet et al., 2010).

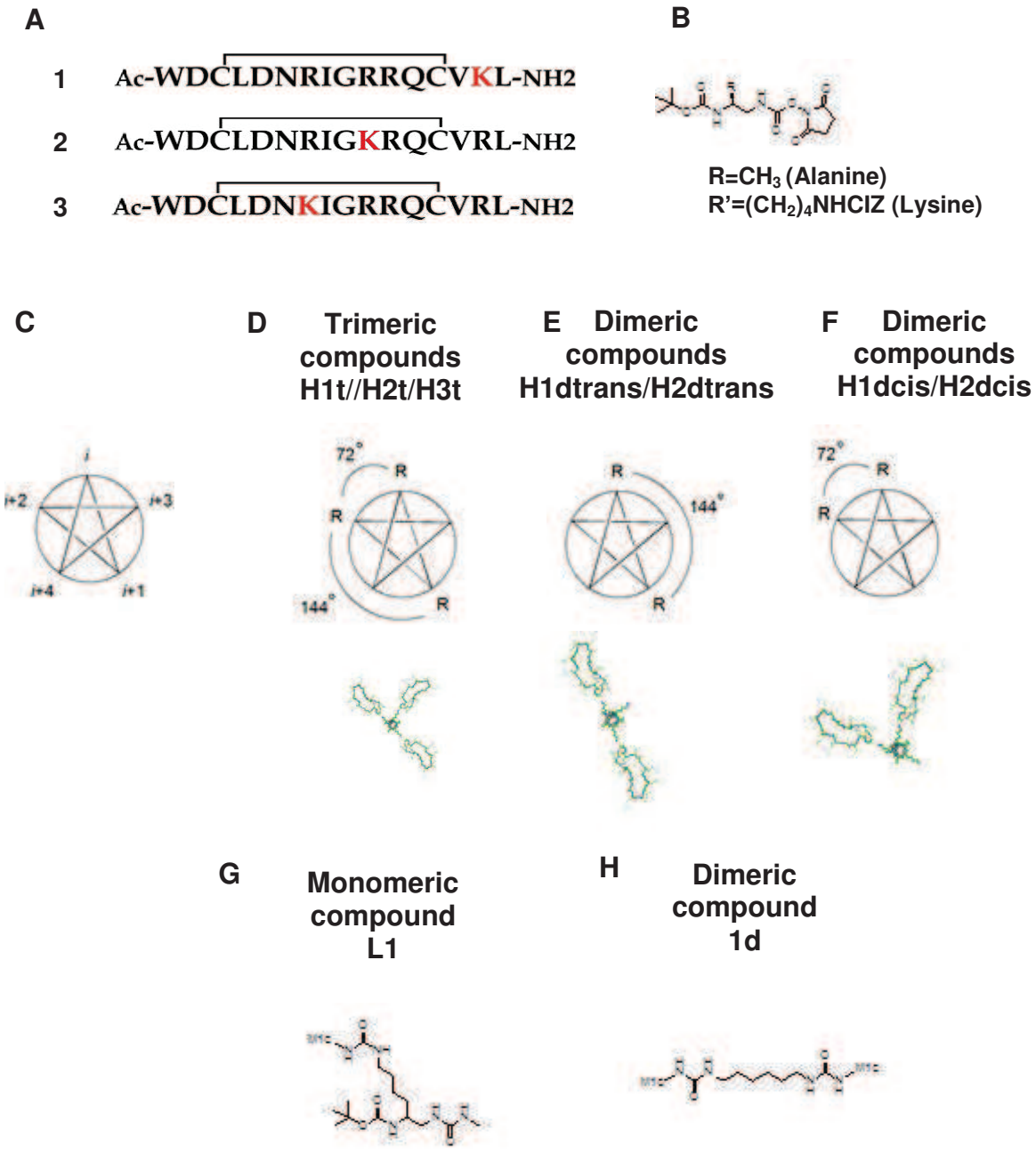


Figure 1: ***TRAIL-R2 specific peptides, oligourea helix scaffolds and strategies of presentation:*** (A) Sequences of cyclic monovalent peptides **1, 2** and **3**. (B) Structure of Lys and Ala building blocks used for the synthesis of oligourea scaffolds. (C, D) TRAIL-R2 specific peptides **1**, **2** or **3** trimerized on oligourea helix scaffolds. (E) TRAIL-R2 specific peptides **1** and **2**.dimerized on oligourea helix scaffolds in a 3.5 cis-fashion and (F) in a 3.4 trans fashion.(G) Monovalent **1** peptide presented on Boc-Lys(ClZ)U-OSu. (H) Divalent peptide **1d** coupled by bis-succinimidyl carboxymethoxyacetate.

TRAIL-R2 peptide multimerization confers increased Ligand/Receptor complex stabilization that is not correlated with an increase of pro-apoptotic activity

We first used Surface Plasmon Resonance (SPR) experiments to compare the binding affinity to TRAIL-R2 of the trimeric molecule **H1t** with that of the classical dimeric peptide **1d.** We applied several mathematical models of interaction to fit the kinetic curves of trimeric and dimeric peptides (data not showed) but none of them was appropriate to fit experimental binding curves. Therefore, we focused the analysis on the post injection phase that significantly differed between the peptides.

The apparent k_{off} (dissociation rate constant) was then calculated from the post-injection phase assuming a 1:1 Langmuir binding mode (**Figure 1 A-C**). In these experiments, the monomeric **L1** ligand was used as a reference to see a potential impact of the scaffold on the binding properties. To take into account differences in molecular weight between the peptide ligands and therefore to compare the binding signals, the SPR responses (RU) were normalized as fmol/mm² (1000 RU = 1mg/mm² for proteins). As shown in **Figures 2B** and **2C**, the trimeric **H1t** molecule dissociated more slowly from the surface (k_{off} = 5.6x10^{-4} s^{-1}) than the dimeric **1d** molecule (k_{off}= 1.5x10^{-3} s^{-1}), suggesting that trimerization of peptide **1** using an oligourea helix scaffold stabilizes the Ligand/Receptor complex. As expected, the monomeric **L1** compound (**Fig 2A**), showed fast dissociation from the TRAIL-R2 receptor (k_{off} = 2.1x10^{-3} s^{-1}), comparable to that of the monomer of peptide **1** (Pavet et al., 2010). This latter result indicates that the LysU building block did not interfere with peptide binding on TRAIL-R2.

We next evaluated the stoichiometry of the interactions between the various forms of peptide **1** and TRAIL-R2 by comparing the responses at surface saturation (R_{max}) expressed in fmol/mm². The experimental maximal binding capacity (R_{max}-exp) was compared to the expected theoretical value (R_{max}-calc) if one molecule of monovalent, divalent or trivalent peptide binds one receptor molecule. For example, if a divalent peptide binds "bivalently", the surface is saturated with half the molecules that if it binds "monovalently". Therefore R_{max}-exp = 1/2 R_{max}-calc. Similarly if trimeric peptides bind trivalently, R_{max}-exp = 1/3 R_{max}-calc (**Figure supp1**). Results in **Figure 2D** show that dimeric compound **1d** had an intermediate stoichiometry of 0.7 suggesting that **1d** bound both in monovalent and bivalent ways to TRAIL-R2. The trimeric compound **H1t** displayed a stoichiometry close to 0.5, which could indicate bivalent binding but also a mixture of binding stoichiometry.

In conclusion, in comparison with the dimeric compound **1d**, trimerization of peptide **1** on oligoruea helix scaffold increased the stability on the interaction on TRAIL-R2 but did not increase the statistical degree of TRAIL-R2 oligomerisation. We then wondered if trimerization on oligoruea helix scaffold could increase the pro-apoptotic activity of peptide **1**. For this, we evaluated the inhibition of cell viability induced by the various peptides on a TRAIL-R2 expressing cell, the Burkitt lymphoma BJAB. The trivalent **H1t compound** inhibited cell viability

in the same range than the divalent **1d** peptide. As expected the **L1** ligand (**Figure 2E**) did not induce a decrease of cell viability in physiological concentrations. In conclusion, the increase of stability of the **H1t**-TRAIL-R2 complexes is not sufficient to increase apoptosis.

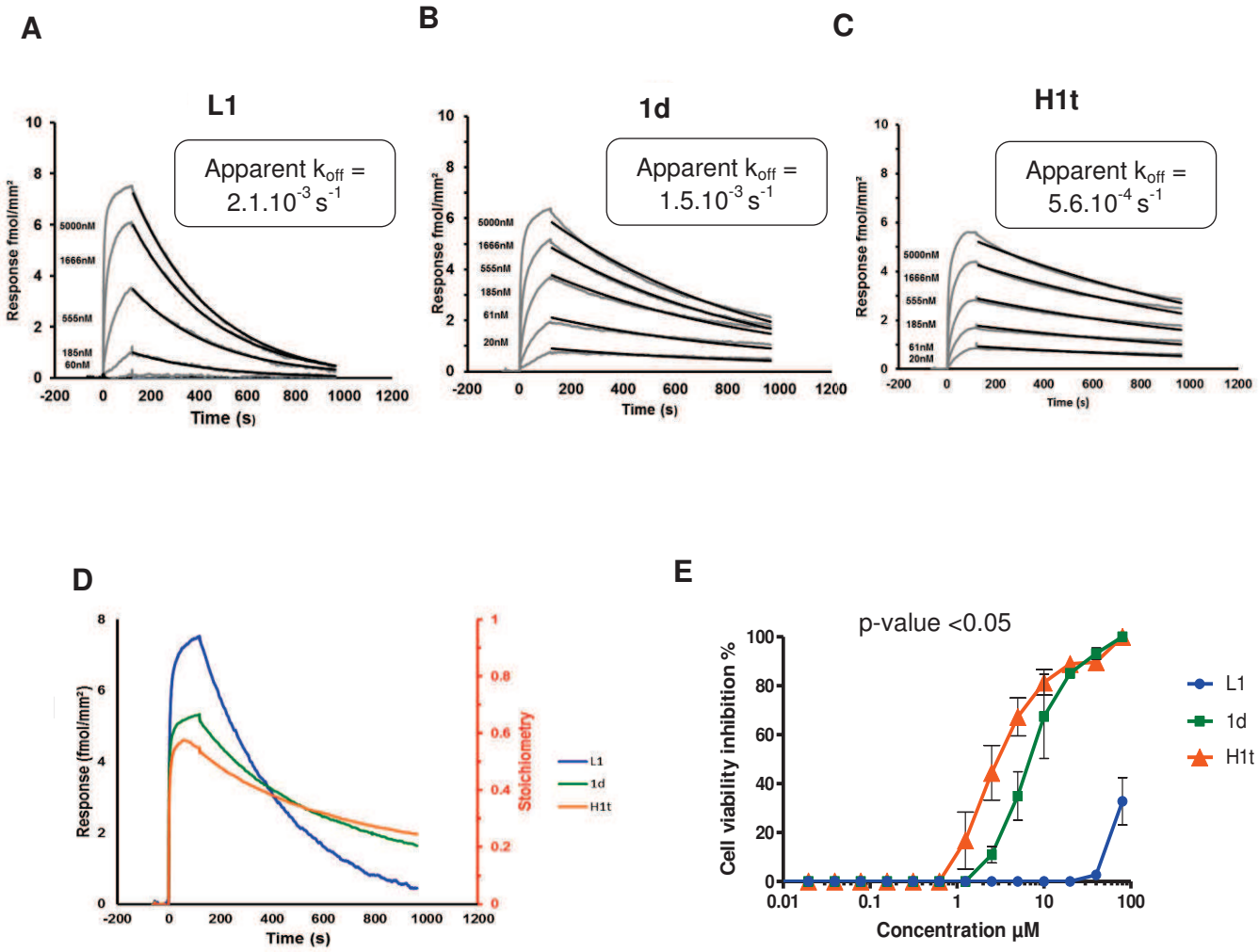


Figure 2: TRAIL mimic peptides multimerization conferred increased Ligand/Receptor complex stabilization which correlates with apoptosis induction.

Kinetic curves for the binding of peptides **L1** (A), **1d** (B), or **H1t** (C) to immobilized human TRAIL-R2 (density of TRAIL-R2 was 65 fmol/mm²) were obtained from SPR experiments. Peptides were tested at concentrations 5000, 1666, 555, 185, 61 nM. The response is expressed in fmol/mm² (1000RU= 1mg/mm²). The apparent k_{off} values were evaluated by fitting (black curves) the post-injection phase of the curves and values are the mean of k_{off} of two experiments. (D) Binding stoichiometries were evaluated from experimental saturation of a TRAIL-R2 surface, achieved by injecting the peptide samples at a concentration of 5µM. Curves recorded with peptides **L1**, **1d** and **H1t** are superimposed (E) BJAB cells expressing TRAIL-R2 were treated with ligands at different concentrations. After 16 hours of incubation, cell viability was determined using the MTS assay. Results are expressed as % of cell viability inhibition according to the following formula: % cell viability = (OD (treatment) /OD(100% viability) * 100) were OD of not treated cells is considered as 100% of viability.

Different peptide orientations on oligourea scaffolds did not change their pro-apoptotic activity

We showed that trimerization of peptide **1** on oligourea helix did not increased its pro-apoptotic effect. This might be due to an inappropriate orientation of the monomers of peptides that limited binding to TRAIL-R2 receptor. To avoid this issue, we synthetized new oligourea helix-based compounds, presenting two monomers of peptide **1** or peptide **2** in different orientations. We compared by SPR the parameters for the binding of TRAIL-R2 to **H1dcis** and **H2dcis** that presented peptide **1** and **2** in a 3,5-cis-fashion, and to **H1dtrans** and **H2dtrans that** presented peptide **1** and **2** in a 3,4-trans-fashion, respectively.

When we compared sensorgrams obtained with **H1dcis** and **H1dtrans** molecules (**Figure 3 A** and **B**), we observed no significant difference in dissociation between **H1dcis** and **H1dtrans**. Therefore, we could conclude that, in these conditions, the orientation of peptide **1** on oligourea scaffold did not to significantly change the binding capacity of the compound.

The same tendency was observed with peptide **2** in the various orientations (**H2dcis** and **H2dtrans, Figure 3 C and 3D**). However, peptide **2** presented on oligourea scaffolds, whatever its orientation, had a better binding capacity to TRAIL-R2 than the peptide **1**. Indeed while **H1dcis** showed a k_{off} = 6x10^{-3} s^{-1}, the **H2dcis** had a slower dissociate with a k_{off}=7.8x10^{-4} s^{-1} leading to the stabilization of the Ligand/receptor complex (**Figure 3 A** and **C**).

Calculation of the stoichiometry of interaction with TRAIL-R2 showed that bivalent compounds **H1dcis**, **H2dcis** and **H2dtrans** bound in a bivalent way to TRAIL-R2 receptors (stoichiometry = 0.5 in **Figure 3E).** Surprisingly, **H1dtrans** had a stoichiometry of 0.3 suggesting that **H1dtrans** bound tree TRAIL-R2 receptors. This unexpected result is difficult to interpret.

Finally, we evaluated the pro-apoptotic effect of these various multivalent compounds. **Figure 3F** showed that all compounds inhibit BJAB cell viability. However, peptide **1** and **2** presented in *trans* fashion seemed to be slightly more efficient in apoptosis induction. *In fine*, all these results suggested that the orientation of peptide **1** and peptide **2** on oligourea scaffolds in dimeric forms have only a slight effect on TRAIL-R2 binding and on biological properties.

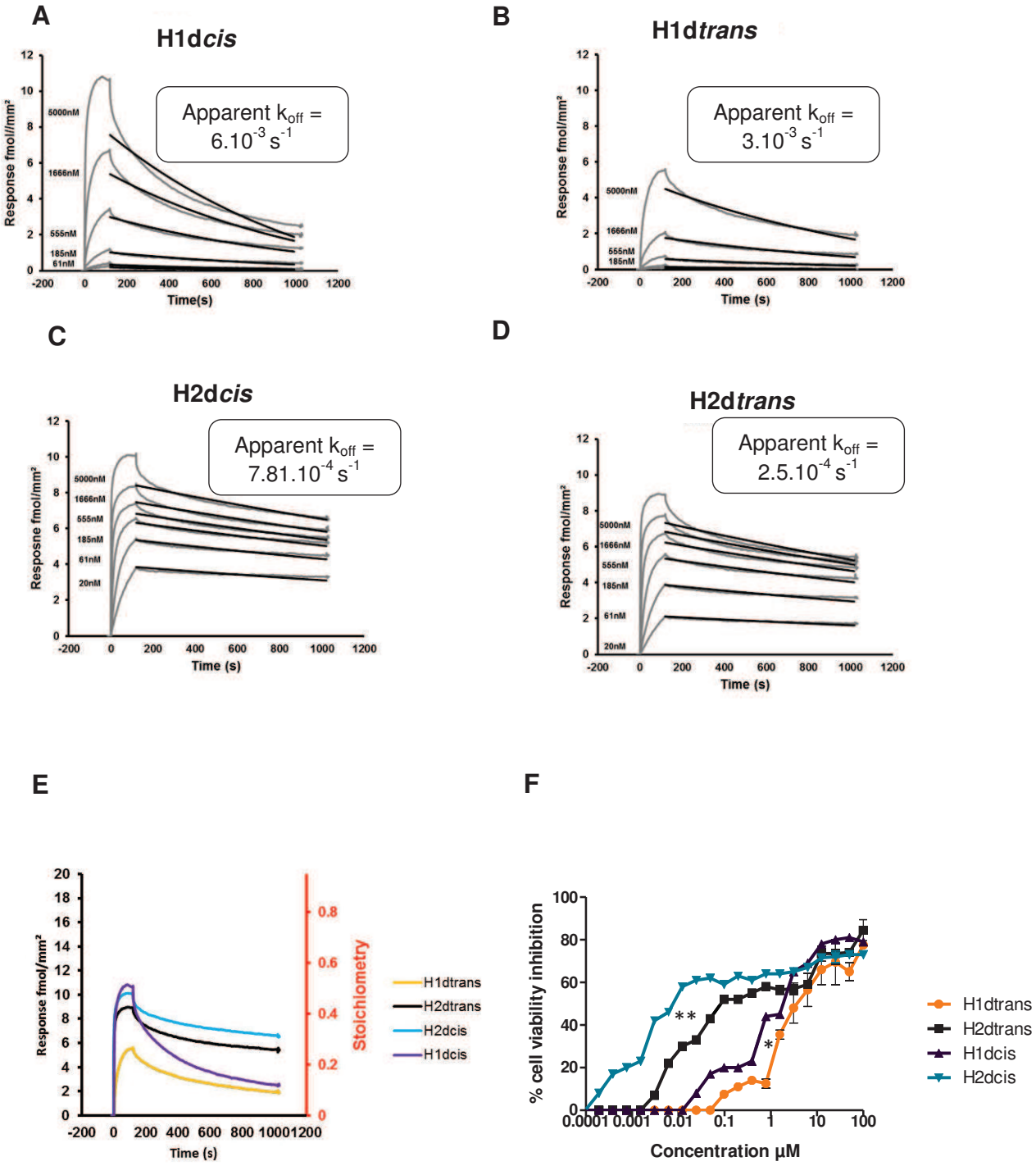


Figure 3: Different TRAIL-R2 specific peptides orientation on oligourea helix scaffolds did not changed their biological activity. Kinetic curves of the bonding of **H1d*cis*** (A), **H1d*trans*** (B), or **H2d*cis*** (C) and **H2d*trans*** (D) compounds to immobilized human TRAIL-R2 (density of TRAIL-R2 was 11 fmol/mm²) obtained by SPR. Compounds were tested at concentrations of 5000, 1666, 555, 185, 61 nM. The apparent koff were evaluated by fitting (black curves) the post-injection phase of the curves. (E) Stoichiometries are compared by superimposing curves recorded at a 5µM concentration of the peptides (F) Cell viability was determined using the MTS assay as described in **Figure 2**.

The position of the lysine on peptide 1, 2 and 3 affects their biological properties.

The latter results suggest that independently of the orientation, peptide **2** presented on oligourea helix scaffold displayed a stronger interaction with TRAIL-R2 than peptide **1** correlated with a higher pro-apoptotic activity. We then, compared the binding characteristics and pro-apoptotic activity of peptides **1**, **2** and **3** presented in trivalent way on oligourea helix scaffolds (referred as **H1t**, **H2t** and **H3t** respectively). SPR experiments (**Figure 4 A, B and C**) showed that **H2t** and **H3t** formed more stable complexes with TRAIL-R2 than **H1t** as indicated by the slow dissociation (k_{off}= $4.7x10^{-5}$ s^{-1}, and $1.1x10^{-4}$ s^{-1} for **H2t** and **H3t,** respectively, versus k_{off} =$2.1x10^{-3}$ s^{-1} for **H1t**). Moreover, compounds **H2t**, and **H3t** bound in a bivalent way to TRAIL-R2 (stoichiometry = 0.5) whereas **H1t** compound had an intermediate stoichiometry (0.6) indicating that **H1t** bound both in monovalent and bivalent way to TRAIL-R2. (**Figure 4D).** Surprisingly, the inhibition of BJAB cell viability by **H2t** was significantly increased in comparison with **H1t and H3t** (**Figure 4 E**)

In conclusion, all these results suggest that the gain in apoptosis induction in BJAB cells might not be due to increased TRAIL-R2 oligomerization by the peptidic ligand or by changes in the peptide orientation presented on the oligourea helix scaffold but to the position of a single lysine in the peptide sequence and therefore to the position of the linker that allows the multimerization.

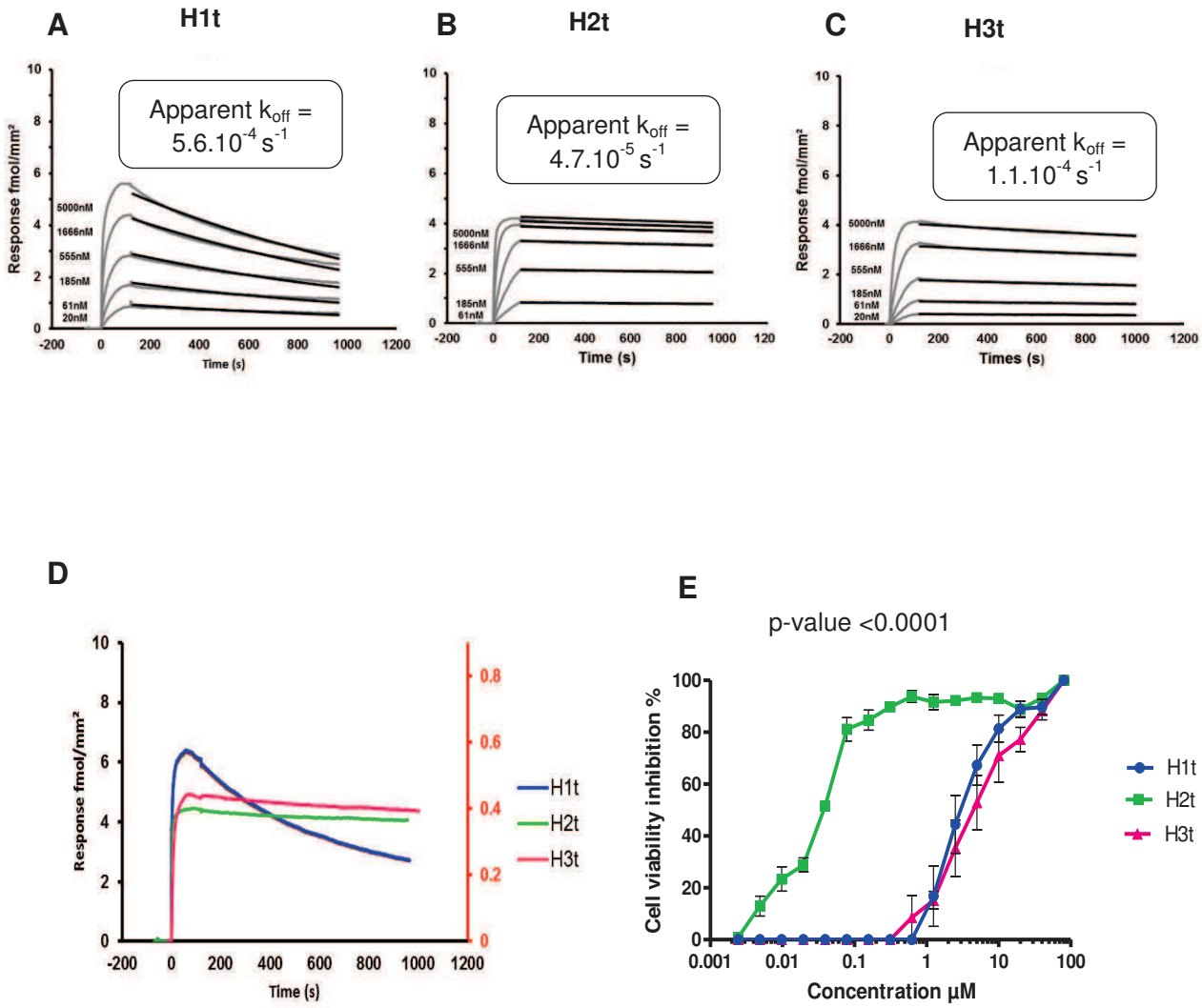


Figure 4: ***The position of the lysine on peptide 1, 2 and 3 affects their biological properties.*** Kinetic curves of TRAIL-R2 specific peptides trimerized on oligourea helix scaffolds **H1t** (A), **H2t** (B), or **H3t** (C) binding to immobilized human TRAIL-R2 (density of TRAIL-R2 was 65 fmol/mm²) were obtained by SPR. Peptides were tested at concentrations of 5000, 1666, 555, 185, 61 nM. The apparent k_{off} were evaluated by fitting (black curves) the post-injection phase of the curves. (D) As above (E) cell viability was determined using the MTS assay.

Discussion

Increasing evidence suggests that TRAIL-R2 receptor requires a high degree of oligomerization to induce apoptosis in many cancer cells (Wajant et al., 2001). Moreover, first results from clinical trials using TRAIL in monotherapy suggest that monoclonal antibodies targeting TRAIL-R2 are weak agonists because they did not recruit enough TRAIL-R2 to trigger apoptosis (Lemke et al., 2014). Consequently, it is necessary to develop new multivalent ligands. We previously described three cyclic peptides named **1**, **2** and **3** that differed only in the position of a single L-lysine residue in their sequences that bound to TRAIL-R2 with high affinity and induced apoptosis in divalent and trivalent forms (Pavet et al., 2010) (Lamanna et al., 2013)

In the present study, we used oligourea 2.5-helix as scaffold to present these 3 TRAIL-R2 specific peptides. Indeed, some of the drawbacks of most chemical scaffolds are that they are forced, leading to steric hindrance and thus, are not adapted to present biological compounds in a multivalent fashion. Oligourea helices are ideal scaffolds since they are conformationally robust, even in aqueous environment and offer several sites in a defined orientation for tethering peptides in multivalent fashion. We previously described a biological application of short oligoureas residues that mimic amphiphilic alpha-helical antibacterial peptides (Claudon et al., 2010). Herein, we suggested using these oligourea scaffolds for the presentation of apoptogenic peptides to induce tumor cell death.

In this preliminary study, we showed that tethering specific TRAIL-R2 peptides to oligourea scaffolds did not interfere with the binding to TRAIL-R2 nor to the proapoptotic activity of the peptides. We then used the versatility of the scaffolds to evaluate various strategies of peptide presentations in order to increase the pro-apoptotic activity of the peptides. We first confirmed that trimerization of TRAIL-R2 specific peptides increased TRAIL-R2/peptide complex stabilization but has only slight effect of the efficiency of apoptosis induction in comparison to the divalent forms of the peptide. We then hypothesized that TRAIL-R2 specific peptides were presented in an inappropriate orientation limiting their interaction with TRAIL-R2. We therefore imagined two oligourea helix scaffolds that presented two peptides **1** and **2** in a 3,5-trans fashion or in a 3,4-cis fashion. In our experimental conditions, peptides **1** or **2** presented in the 3,5-trans fashion seem to have a better affinity for TRAIL-R2 receptor as showed by their respective k_{off}. However, the effect on the efficiency of apoptosis is poor showing only a slightly increase in apoptosis with *trans* fashion presentation. However, these encouraging results suggest that other peptide orientations on our scaffold could be considered. Moreover, these experiments highlighted differences between peptides **1** and **2** presented on helical-oligourea scaffolds showing that the position of the lysine residue used to link the peptides to the scaffold had a profound effect on activity. Indeed peptide **2** was more potent in apoptosis induction than peptides **1** and **3**. In this case, the lysine position and therefore the linker position increased the affinity for TRAIL-R2 leading to a better apoptosis induction.

In conclusion, oligourea helices appear as promising scaffolds to present biologically active peptides in various strategies of presentation in order to investigate the parameters that control interaction with a ligand but also for therapeutic applications.

To complete this preliminary study, we propose to better characterize the interaction between compounds with different peptide orientations on oligourea scaffold and TRAIL-R2. For that, we could crystallize the complex between different TRAIL-R2 specific peptides presented in different orientation on helical oligourea scaffolds in order to identify the ligand binding sites on TRAIL-R2. Moreover, we could analyze the binding characteristic of the various compounds on TRAIL-R2 at the membrane level, using the Ligand Tracer® technology. We could also analyze the DISC formation induced by all these ligands to compare their efficiency in recruiting the intracellular components leading to apoptosis.

These news elements might be helpful to design new efficient multivalent ligands.

Supplement

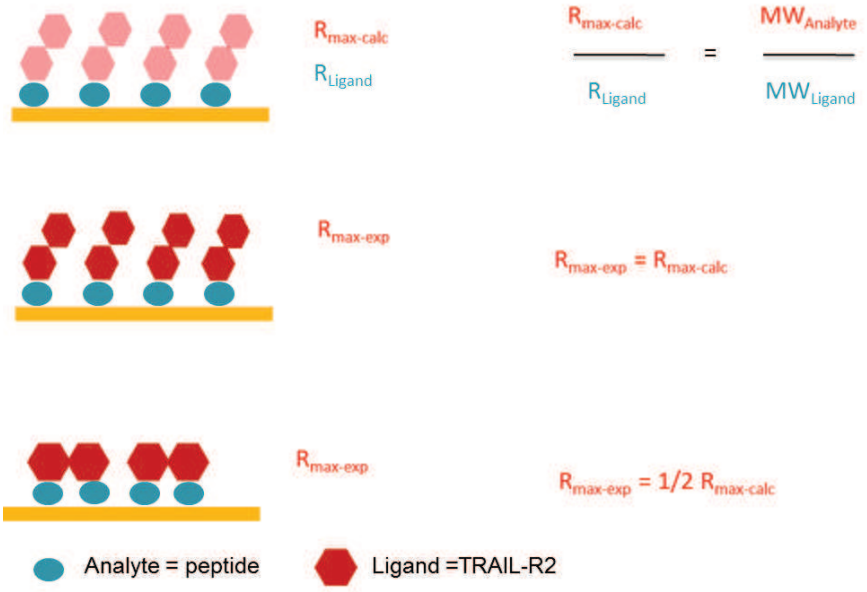


Figure 1: Stoichiometry. The stoichiometry of the interaction is deduced from the peptide response at saturation of a receptor surface ($R_{max\text{-}exp}$). We calculated the theoretical maximal capacity ($R_{max\text{-}calc}$) of the surface from the know receptor immobilization level (R_{ligand}), by assuming that one molecule of the peptide whether monomer, dimer or trimer binds one receptor. In this case, if a dimeric peptide binds bivalently, the experimental R_{max} should be equal to one half of the calculated Rmax.

The experimental maximal binding capacity (R_{max}-exp) was compared to the expected theoretical value (R_{max}-calc) if one molecule of monovalent, divalent or trivalent peptide binds one receptor molecule. For example, if a divalent peptide binds "bivalently", the surface is saturated with half the molecules that if it binds "monovalently". Therefore R_{max}-exp = 1/2 R_{max}-calc. Similarly if trimeric peptides bind trivalently, R_{max}-exp = 1/3 R_{max}-calc.

Material and methods

Peptides and oligourea scaffolds synthesis

TRAIL-R2 specific peptides **1-**, **2-**, **3-** were synthesized in our laboratories as previously described (Pavet et al., 2010). Divalent **1d** was prepared by reaction of cyclic peptides (2.2 equiv) with the bis-succinimidyl carboxymethoxyacetate (1 equiv) in dimethylformamide in the presence of a tertiary base. Briefly, the synthesis of all scaffolds required only two succinimidyl carbamate-activated building blocks: Boc-AlaU-OSu and Boc-Lys(ClZ)U-OSu and were made in three steps All scaffolds were synthesized starting from these building blocks reacting with methylamine hydrochloride in the presence of diisopropylamine in acetonitrile to provides a simple urea terminus to the scaffold. The scaffold was then built in sequential Boc-deprotection and coupling steps building blocks.Multivalent molecules were purified by RP-HPLC and their identity was confirmed by ^{1}H NMR conformational analysis: and circular dichroism experiments

Cell viability assay

The TRAIL-R2 positive Burkitt lymphoma BJAB cell line was kindly provided by Andrew Thorburn (Department of Pharmacology, University of Colorado Denver School of Medicine, USA). Cells (10^5 cells/well) were cultured in 100µL of RPMI 1640 culture medium in flat bottom 96-well plates and treated with the indicated concentrations of the different compounds and cultured at 37°C, 5% CO_2. After 16 hours of treatment, cell viability measurement was performed by the MTS assay according to the manufacturer specification (Promega Corporation, Madison, WI).

Surface Plasmon Resonance:

Biosensor assays were performed on a Biacore T200™, at 25°C. The running buffer was HBS-EP buffer [10mM HEPES (pH 7.4) containing 0.15M NaCl, 3.4mM EDTA and 0.005% (v/v) Tween P20]. The human TRAIL-R2 (Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY) receptors were immobilized on a sCM5 sensor chip (GE Healthcare) using the standard amine coupling procedure. The receptors were diluted in 10mM acetate buffer (pH 5.0) at a concentration of 5µg/mL. The density of receptors immobilized on the sensor chip was 65 fmol/mm² for kinetic measure of peptides **L1**, **1d**, **H1t**, **H2t** and **H3t**. The density of receptors immobilized on the sensor chip was 11 fmol/mm² for kinetic measure of peptides **H1d*cis***, **H1d*trans***, **H2d*cis***, **H2d*trans***. Peptides were injected at a flow rate of 5µL/min for 120s and allowed to dissociate for an additional of 420s. Channels were then regenerated for 5s with 25mM HCl. All binding curves were double-referenced (i-e subtraction of the data of the empty flow cell followed by the subtraction of the data from a run buffer injection cycle). The Langmuir model was used to fit the post-injection phases of peptides (BIAevaluation version 4.1.1).

References

Angell, Y.M., Bhandari, A., De Francisco, M.N., Frederick, B.T., Green, J.M., Leu, K., Leuther, K., Sana, R., Schatz, P.J., Whitehorn, E.A.*, et al.* (2009). Discovery and optimization of a TRAIL R2 agonist for cancer therapy. Advances in experimental medicine and biology *611*, 101-103.

Ashkenazi, A., Pai, R.C., Fong, S., Leung, S., Lawrence, D.A., Marsters, S.A., Blackie, C., Chang, L., McMurtrey, A.E., Hebert, A.*, et al.* (1999). Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand. The Journal of clinical investigation *104*, 155-162.

Chan, F.K. (2007). Three is better than one: pre-ligand receptor assembly in the regulation of TNF receptor signaling. Cytokine *37*, 101-107.

Claudon, P., Violette, A., Lamour, K., Decossas, M., Fournel, S., Heurtault, B., Godet, J., Mely, Y., Jamart-Gregoire, B., Averlant-Petit, M.C.*, et al.* (2010). Consequences of isostructural main-chain modifications for the design of antimicrobial foldamers: helical mimics of host-defense peptides based on a heterogeneous amide/urea backbone. Angew Chem Int Ed Engl *49*, 333-336.

Daniels, R.A., Turley, H., Kimberley, F.C., Liu, X.S., Mongkolsapaya, J., Ch'En, P., Xu, X.N., Jin, B.Q., Pezzella, F., and Screaton, G.R. (2005). Expression of TRAIL and TRAIL receptors in normal and malignant tissues. Cell research *15*, 430-438.

Degli-Esposti, M. (1999). To die or not to die--the quest of the TRAIL receptors. Journal of leukocyte biology *65*, 535-542.

Fischer, L., and Guichard, G. (2010). Folding and self-assembly of aromatic and aliphatic urea oligomers: towards connecting structure and function. Organic & biomolecular chemistry *8*, 3101-3117.

Fulda, S. (2014). Tumor-Necrosis-Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand (TRAIL). Advances in experimental medicine and biology *818*, 167-180.

Guichard, G., and Huc, I. (2011). Synthetic foldamers. Chem Commun (Camb) *47*, 5933-5941.

Lamanna, G., Smulski, C.R., Chekkat, N., Estieu-Gionnet, K., Guichard, G., Fournel, S., and Bianco, A. (2013). Multimerization of an apoptogenic TRAIL-mimicking peptide by using adamantane-based dendrons. Chemistry *19*, 1762-1768.

Lemke, J., von Karstedt, S., Zinngrebe, J., and Walczak, H. (2014). Getting TRAIL back on track for cancer therapy. Cell death and differentiation *21*, 1350-1364.

Li, B., Russell, S.J., Compaan, D.M., Totpal, K., Marsters, S.A., Ashkenazi, A., Cochran, A.G., Hymowitz, S.G., and Sidhu, S.S. (2006). Activation of the proapoptotic death receptor DR5 by oligomeric peptide and antibody agonists. Journal of molecular biology *361*, 522-536.

Pavet, V., Beyrath, J., Pardin, C., Morizot, A., Lechner, M.C., Briand, J.P., Wendland, M., Maison, W., Fournel, S., Micheau, O.*, et al.* (2010). Multivalent DR5 peptides activate the TRAIL death pathway and exert tumoricidal activity. Cancer research *70*, 1101-1110.

Sessler, T., Healy, S., Samali, A., and Szegezdi, E. (2013). Structural determinants of DISC function: new insights into death receptor-mediated apoptosis signalling. Pharmacology & therapeutics *140*, 186-199.

Stuckey, D.W., and Shah, K. (2013). TRAIL on trial: preclinical advances in cancer therapy. Trends in molecular medicine *19*, 685-694.

Valley, C.C., Lewis, A.K., Mudaliar, D.J., Perlmutter, J.D., Braun, A.R., Karim, C.B., Thomas, D.D., Brody, J.R., and Sachs, J.N. (2012). Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) induces death receptor 5 networks that are highly organized. The Journal of biological chemistry *287*, 21265-21278.

Wajant, H., Moosmayer, D., Wuest, T., Bartke, T., Gerlach, E., Schonherr, U., Peters, N., Scheurich, P., and Pfizenmaier, K. (2001). Differential activation of TRAIL-R1 and -2 by soluble and membrane TRAIL allows selective surface antigen-directed activation of TRAIL-R2 by a soluble TRAIL derivative. Oncogene *20*, 4101-4106.

CHAPITRE 2

Caractérisation des interactions entre ligands et récepteurs et des interactions entre récepteurs/récepteurs au niveau de la membrane cellulaire

Le second objectif de mes travaux de thèse consistait à caractériser les interactions entre les peptides ciblant TRAIL-R2 et le récepteur pour comprendre l'impact des ligands multivalents sur l'oligomérisation de TRAIL-R2 et la corrélation entre cette oligomérisation et la réponse intracellulaire. Ces travaux sont détaillés dans l'article 5 : **Characterization of interactions between TRAIL-R2 and divalent ligands at the membrane level and correlation with pro-apoptotic activity** (en préparation).

L'étude des interactions multivalentes est très complexe car elle nécessite des mesures soit à partir de récepteurs recombinants immobilisés sur des surfaces senseurs soit directement à la surface de la cellule vivante. J'ai utilisé la technique de SPR pour caractériser les interactions multivalentes entre le récepteur TRAIL-R2 recombinant et les nombreux ligands dont nous disposons au laboratoire. Cet outil m'a permis d'obtenir beaucoup d'informations sur les constantes cinétiques d'interaction et le comportement des ligands. Cependant, nous ne savons pas si ces données sont pertinentes à la surface cellulaire. C'est pourquoi j'ai utilisé une nouvelle technologie encore très peu connue appelée le Ligand Tracer® (Ridgeview Instruments AB), qui permet d'analyser les interactions directement à la surface des cellules

J'ai utilisés comme modèle les peptides divalents **1** et **2** décrits dans (Pavet et al., 2010) et leurs versions fluoresentes. Bien que les cellules BJAB et HCT116 soient sensibles à l'apoptose induite par la molécule TRAIL recombinante (rTRAIL), les peptides divalents induisent efficacement l'apoptose de lymphomes B (BJAB) mais sont incapable d'induire l'apoptose de carcinome colorectal (HCT116). En utilisant le LT, j'ai pu montrer que les peptides divalents de lient avec une forte affinité aux cellules BJAB et de manière surprenante ces peptides se lient avec une faible affinité aux cellules HCT116 ce qui corrèle avec l'absence d'activité biologique sur les cellules HCT116.

Ces données sont analysées mathématiquement afin d'obtenir des cartes permettant de visualiser la distribution des interactions multivalentes. Grâce à ces cartes, j'ai également pu mettre en évidence un comportement de liaison différent des peptides divalents **1** et **2** (qui diffèrent seulement par un changement de la position de la lysine dans leur séquence) à la surface des cellules BJAB. De plus, ce profil d'interaction des peptides aux cellules BJAB exprimant le récepteur TRAIL-R2 pourrait être caractéristique de l'activité pro-apoptotique.

Nous espérons à l'aide de ces travaux pouvoir « prédire » la structure des molécules les plus efficaces pour induire l'apoptose via TRAIL-R des cellules tumorales.

Au cours de mes travaux de thèse nous nous sommes également intéressés au récepteur CD40 qui apparait comme une cible attractive pour la thérapie de cancers.

Sachant que le degré d'oligomérisation de CD40 était crucial dans la signalisation induite par son pontage, nous nous nous sommes tout d'abord interrogés sur l'état d'oligomérisation du récepteur CD40 à la surface cellulaire à l'état physiologique. Nous souhaitions savoir si CD40 est déjà oligomérisé à la membrane, en absence de son ligand, et si cela peut avoir un effet sur la signalisation intra cellulaire. Ces travaux sont détaillés dans l'article 6 : **Cysteine-rich domain one of CD40 mediates receptor self-assembly** (publié dans The Journal of Biological Chemistry en 2013). Les résultats indiquent que CD40, en l'absence de son ligand, est majoritairement présent sous forme dimérique à la surface de cellules exprimant soit naturellement le récepteur soit transfecté avec le récepteur. De plus, l'homo-dimérisation de CD40 se fait au niveau du domaine riche en Cystéine (CRD) 1 et que la lysine 29 est indispensable.

Au cours de ces recherches, nous avons également montré qu'il existait des interactions entre les récepteurs de la famille du TNF-R et sont exposées dans l'article 7 : **Hetero-oligomerization between the TNF receptor superfamily members CD40, FAS and TRAILR2 modulate CD40 signalling** (en révision dans Cell death differenciation, resoumis en Septembre 2014). Nous avons montré que le récepteur CD40, en l'absence de CD40L peut former des hétéro-oligomères à la surface de la cellule avec les récepteurs de mort TRAIL-R ou Fas. De plus, nos résultats indiquent que ces hétéro-oligomères modulent la signalisation intra cellulaire induite par CD40L.

Ces travaux nous ont montré l'intérêt d'analyser les interactions entre les ligands et les récepteurs directement à la surface cellulaire.

CHAPITRE 2

Article 5 : Characterization of interactions between TRAIL-R2 and divalent ligands at the membrane level and correlation with pro-apoptotic activity

(en préparation)

Characterization of interactions between TRAIL-R2 and divalent ligands at the membrane level and correlation with pro-apoptotic activity

(Article en préparation)

Neila Chekkat, Caterina Lombardo, Gilles Guichard, Danièle Altschuh*, Sylvie Fournel*

* Shared senior authorship

Abstract

Tumor Necrosis Factor Receptor Apoptosis Inducing Ligand (TRAIL) appears as an interesting candidate for cancer therapy as it induces apoptosis in cancer cells without toxicity to normal cells. TRAIL induces apoptosis through agonist death receptor TRAIL-R1 and TRAIL-R2 engagement. Recombinant soluble TRAIL and monoclonal antibody against its agonist receptors are developed and evaluated in clinical trials with some success. Nevertheless, the degree of TRAIL-R2 or TRAIL-R1 oligomerization required for apoptosis induction is different and could vary according to cell type. Recently, we have reported on the therapeutic potential of synthetic multivalent ligands of the TRAIL-R2 receptor ($TRAIL^{mim/DR5}$). These entirely synthetic ligands have a controlled level of valency and therefore appear as useful tools to analyze the contribution of TRAIL-R2 oligomerization in apoptosis induction and therapeutic efficacy. In this study, we characterized the binding between the divalent $TRAIL^{mim/DR5}$ peptides and TRAIL-R2 expressed on the membrane of living cells. Our results showed that divalent peptides bound with high affinity to TRAIL-R2 expressed on the B lymphoma BJAB. This binding is correlated with high apoptosis induction *in vitro*. By contrast, the same peptides bound with low affinity to TRAIL-R2 expressed at cell surface of the human colon cancer cell line HCT116 and did not induce its apoptosis. Beside the precise characterization of synthetic ligand binding at membrane surface of living cells, these finding might also help us to predict therapeutic potential of synthetic ligand for clinical trials.

Introduction

Tumor Necrosis Factor Receptor Apoptosis Inducing Ligand (TRAIL) is a type 2 transmembrane protein that binds to two agonist receptors TRAIL-R1 (DR4, TNFR-SF10A) (Pan et al., 1997) and TRAIL-R2 (DR5, TNFR-SF10B) (Chaudhary et al., 1997) and to TRAIL-R3 (DcR1, TNFR-SF10C) (Walczak et al., 1997), and TRAIL-R4 (DcR2, TNFR-SF10D) (Marsters et al., 1997) that act as decoy receptors. TRAIL-R1/TRAIL-R2 receptors are type I transmembrane proteins that belong to the family of death receptors and trigger apoptosis *via* their death domain in the intracellular region. TRAIL forms a homotrimer that, when it binds to TRAIL-R1 or TRAIL-R2 at the cell surface, allows the recruitment of the cytosolic protein FADD which, in turn, recruits pro-caspase 8 (Bodmer et al., 2000). The formed complex is called the Death Inducing Signaling Complex (DISC). After its activation in the DISC, caspase 8 cleaves and activates the executioner caspases leading to apoptosis through the extrinsic pathway. According to the cell type, caspase 8 can also cleave the pro-apoptotic protein Bid to induce the intrinsic pathway of apoptosis (Yang et al., 2010).

TRAIL appears as a promising target for cancer therapy as it induces apoptosis in cancer cells while sparing the normal ones (Nesterov et al., 2004). Thus recombinant human TRAIL (rhTRAIL) and monoclonal antibody (mAb) directed against TRAIL-R2 or TRAIL-R1 have been developed and are evaluated in clinical trials (Micheau et al., 2013; Wajant et al., 2013). Despites its promising potential, first results from clinical trials are quite disappointing (Stuckey and Shah, 2013). Indeed TRAIL monotherapy did not always induce cancer elimination. The assumption most often suggested is the acquired resistance to TRAIL-induced apoptosis of tumor cells (Dimberg et al., 2013). However, an additional explanation could be the poor efficiency of some mAbs in triggering apoptosis. Indeed, it was shown that anti-TRAIL-R2 antibodies did not induce a sufficient degree of TRAIL-R2 oligomerization to induce apoptosis and that a cross-linking of these antibodies was required to induce optimal apoptosis *in vitro* (Wajant et al., 2001).

In the present study, we used synthetic multivalent agonist peptides of TRAIL-R2 receptor (named as $TRAIL^{mim/DR5}$) with controlled valency to analyze the contribution of TRAIL-R2 oligomerization in induction of apoptosis in two cancer cell lines, the B lymphoma BJAB and the human colon cancer HCT116. We previously showed that $TRAIL^{mim/DR5}$ induced TRAIL-R2-dependent apoptosis of BJAB cell line in divalent and trivalent forms (Pavet et al., 2010). Here, we showed that while BJAB and HCT116 cells expressing TRAIL-R2 were both sensitive to rhTRAIL, only BJAB underwent apoptosis after divalent $TRAIL^{mim/DR5}$ peptide treatment. To understand this discrepancy, we used an innovative technology called the Ligand Tracer® (Ridgeview Instruments, Uppsala, Sweden) (Bjorke and Andersson, 2006) to measure kinetic parameters between divalent peptides and TRAIL-R2 directly at the surface of living cells. We demonstrated that divalent peptides bound to TRAIL-R2 with high affinity in BJAB cells that was

correlated with high apoptosis efficiency *in vitro*. By contrast, the same peptides bound with low affinity to TRAIL-R2 expressed on HCT116 cells and did not induce apoptosis. Moreover, the kinetic data recorded with Ligand tracer were evaluated with the mathematical tool "Interaction Map" (Ridgeview Diagnostics, Uppsala, Sweden). The interactions maps calculated for the binding of different synthetic TRAIL$^{mim/DR5}$ (Pavet et al., 2010) with TRAIL-R2 expressed on living cells were compared. Beside the precise characterization of synthetic ligand binding at membrane surface of living cells, these finding might also help us to predict therapeutic potential of synthetic ligand for clinical trials.

Results

Divalent TRAIL$^{mim/DR5}$ induce apoptosis in BJAB-TRAIL-R2 cells but not in HCT166-TRAIL-R2 cells

We previously described two cyclic peptides, named **1m** and **2m,** that only differed by the position of a lysine in their sequence (**Figure supp1**), which bound to TRAIL-R2 and induced apoptosis of various cell lines in divalent forms, known as **1d** and **2d**. (Pavet et al., 2010). In the present study, we compared the pro apoptotic activity of **1d** and **2d** on the human Burkitt lymphoma BJAB and the human colon carcinoma HCT116 cell lines that both express a similar amount of TRAIL-R2 as shown in flow cytometry using an anti-TRAIL-R2 antibody (**Figure supp2**). While BJAB-TRAIL-R2 cells underwent apoptosis when treated with **1d** and **2d**, HCT116 expressing TRAIL-R2 did not **(Figure 1 A and B).** For note, **2d** seemed more efficient than **1d** in inducing BJAB-TRAIL-R2 cell death as shown by IC_{50} of 0.03µM for **2d** and 9µM for **1d**. Interestingly, the two cell lines were sensitive to the hexameric form of rhTRAIL (**SPK**) (**Figure 1C and D**) but with a slightly higher pro-apoptotic activity on BJAB-TRAIL-R2.

Divalent TRAIL$^{mim/DR5}$ peptides 1d and 2d bound with high affinity to TRAIL-R2 on BJAB cells and with low affinity to TRAIL-R2 on HCT116 cells

To go further inside the understanding of the discrepancy between the sensitivity to **1d and 2d** peptide-induced apoptosis*,* we monitored in real time the binding on TRAIL-R2 expressed by living BJAB or HCT116 cells of fluorescent (ATO 488) **1d** (**f1d**) and **2d** (**f2d**) peptides using the Ligand Tracer® (LT) technology (see peptides structure in **Figure supp3**). As shown in sup **Figure 2 (A and B)**, the binding parameters measured by SPR on immobilized recombinant TRAIL-R2, as well as the pro-apoptotic activity of the peptides were unaffected by the presence of the fluorochrome.

We showed in flow cytometry that **f1d** and **f2d** bound on BJAB-TRAIL-R2 and HCT116-TRAIL-R2 cells but not on BJAB or HCT116 cells deficient for TRAIL-R2 (**Figure 2C**). BJAB and HCT116 cells expressing or not TRAIL-R2 were then cultured in the LT apparatus in presence of increasing doses (10, 30 and 90 nM) of each fluorescent peptide, added successively

approximately every two hours. Illustrative kinetics curves corresponding to the binding of the fluorescent peptides at the cell surface are shown in **Figure 3**. **Figure 3A** clearly shows that the two fluorescent peptides bound strongly to BJAB cells when they expressed TRAIL-R2 (blue curves) but only slightly when there were deficient for TRAIL-R2 (red curves). After peptide removal, the complexes between peptides and TRAIL-R2 did not completely dissociate. As for BJAB cells, fluorescent peptides bound to HCT116 expressing TRAIL-R2 but not on HCT116 cells deficient for TRAIL-R2 (**Figure 3B**). However, in contrast to BJAB, the complexes between TRAIL-R2 and the peptide dissociated immediately after peptide removal. Interestingly, similar binding curves were observed when the fluorescent monovalent **1m** peptide was incubated with BJAB-TRAIL-R2 cells **(Figure supp4A)**. As the **1m** peptide did not induce apoptosis of BJAB-TRAIL-R2 cells **(Figure 1 A and B)**. These results showed a correlation between stable complexes with TRAIL-R2 of **1d** and **2d** at cell surface and pro-apoptotic activity.

Divalent TRAIL$^{mim/DR5}$ 1d and 2d present differences in their binding modes on immobilized TRAIL-R2 and on TRAIL-R2 at cell surface

Experiments in **Figure 1** suggested that **2d** was more efficient than **1d** to induce BJAB-TRAIL-R2 apoptosis. To examine if this difference in efficiency might result from a difference in recognition, we analyzed the binding of **1d** and **2d** with sensor-immobilized recombinant TRAIL-R2 using SPR and with TRAIL-R2 expressed at BJAB surface using LT.

We first compared the SPR binding profiles of the divalent (**1d** and **2d)** and monovalent (**1m** and **2m)** peptides, injected on recombinant immobilized TRAIL-R2. Kinetic parameters were calculated by global fitting of the kinetic curves using a Langmuir binding model. As shown in **Figure 4**, the equilibrium constants (K_D) calculated with the divalent peptides were always smaller than those of the monovalent peptides. More interestingly, the K_D obtained with peptide **2d** was approximately 250 fold smaller than the K_D obtained with peptide **1d.** This gain in affinity is due to a faster association (**2d** k_{on}=8 x10^{+05} M^{-1} s^{-1}, **1d** k_{on}= 3 x 10^{+04} M^{-1} s^{-1}) and a slower dissociation (**2d** k_{off}=2 x 10^{-04} s^{-1}, **1d** k_{off}= 2 x 10^{-03} s^{-1}). Moreover we compared R_{max} values of the monovalent and the divalent peptides to evaluate the stoichiometry of the interactions between the divalent peptides and TRAIL-R2 (**Figure supp5)**. Indeed R_{max} represents the amount of peptide bound at surface saturation. If one divalent peptide molecule binds to two TRAIL-R2 molecules ("bivalent binding"), R_{max} would be the same for the monovalent and the divalent peptides. By contrast, if one divalent peptide molecule binds to one TRAIL-R2 molecule ("monovalent binding"), R_{max} of the divalent peptides, would be twice that of the monovalent peptides. As shown in **Figure 4D**, R_{max} for **1m** and **1d** were similar suggesting that peptide **1d** prevalently bound in a "bivalent" way. In contrast, R_{max} of divalent **2d** was higher than that of **2m** but similar to that of **1m** and **1d**, also suggesting bivalent binding (**1d** and **2d** have the same molecular mass). The lower R_{max} of **2m** most likely results from a poor accuracy of the fit because the sample concentrations were too low to approach surface saturation. To further

investigate the binding modes, we applied several mathematical models of interaction to fit the kinetic curves of **1d** and **2d.** Results shown in supplementary **Table 1** indicate that the "bivalent" or “heterogeneous ligand” models are more appropriate to fit **2d** data (10-fold smaller Chi_2 compared to that obtained with the 1:1 model) but not **1d** data (similar Chi_2 whatever the model). These results suggest a homogeneous bivalent binding mode **of** 1d and a more heterogeneous mode for **2d**.

Finally, we used LT technology to compare the binding of **1d** and **2d** at BJAB-TRAIL-R2 cell surface. As already shown in **Figure 2C**, **f1d** and **f2d** bound to TRAIL-R2 expressed at BJAB-TRAIL-R2 surface. A 90 nM concentration of **1d** was required to reach a significant fluorescence signal while a 30 nM concentration of **2d** was sufficient.

The data obtained in LT were then evaluated by kinetic distribution analysis (tool Interaction Map), an approach that is appropriate to describe complex binding kinetics that results from parallel interactions. The analysis yields two-dimensional maps (association versus dissociation rate constant) where each peak represents the affinity of one of the complexes formed at cell surface. The maps shown in **Figure 6**, suggest subtle differences in the binding modes of peptides **1d** and **2d**. Indeed, maps obtained with **2d** showed two peaks that differed predominantly by their dissociation rate (x-axis: stability). The high affinity interaction (left peak) was dominant in all cases. The maps calculated for peptide **1d** also showed a dominant high-affinity interaction but with an association rate constant slightly smaller than that of the high-affinity peak in **2d** maps (peak position slightly lower on the y-axis: recognition). Furthermore, the residual binding signal was not identified as a single low-affinity peak as for **2d**, but as several ill-defined peaks. Interaction Maps obtained with **1d** and **2d** peptides on BJAB deficient for the expression of TRAIL-R2 (BJAB-TRAIL-R2-DEF) showed a dominant peak (left peak) corresponding to a weak affinity interaction (**Figure supp6**).

In conclusion, LT experiments and interaction maps highlighted subtle differences between the binding of **1d** and **2d** to TRAIL-R2 expressed on BJAB living cells that were correlated with differences in apoptosis sensitivity.

Discussion

Despite the perfect knowledge of signaling events downstream TRAIL-Rs activation, the initiating events in TRAIL induced apoptosis, especially at the membrane level, are not clearly investigated (Shirley et al., 2011). So far, we knew that, TRAIL-R2 receptor is pre-oligomerized *via* its PLAD domain (Pre-Oligomerized Associated Domain) at the membrane surface in absence of TRAIL (Chan, 2007b). TRAIL binding on TRAIL-R2 pre-oligomerized leads to receptors clustering in a network highly organized, required to induce efficient apoptosis (Valley et al., 2012).

At least five mAb targeting TRAIL-R2 were developed and evaluated in clinical trials (Lemke et al., 2014). Unfortunately, most of them are weak agonists certainly because they are not able to form a powerful receptors network. Characterization of the binding of ligands targeting TRAIL-Rs is crucial to understand how it initiates apoptosis signaling and optimize TRAIL receptors targeted strategies.

We previously described synthetic peptide (**1** and **2**) targeting TRAIL-R2 receptor and that induce TRAIL-R2-dependant apoptosis of BJAB cell line in divalent and trivalent forms (Pavet et al., 2010). Moreover as showed in the results, while HCT116 were sensitive to hexameric rTRAIL (**SPK**) induce apoptosis, these peptides failed to kill them. Using SPR experiments we saw that both divalent **1d** and **2d** peptides form stable complexes with covalently immobilized TRAIL-R2 due to a fast association and slow dissociation. We therefore asked why these high bound affinity peptides were not able to induce apoptosis in HCT116 cells. However, investigation of how ligand interacts with receptor at the cellular level is quite difficult because the lack of tools that enable the monitoring of cellular uptake and retention *in vitro* (Nordberg et al., 2005; Wei et al., 2003).

Herein, we proposed to monitor in real time the binding between divalent peptides and TRAIL-R2 receptors expressed on BJAB and HCT116 living cells, using an innovative technology called Ligand Tracer® (Bjorke and Andersson, 2006). This recent tool enable in real time and with high resolution the automated monitoring of kinetics parameters allowing us to obtain precise and detailed analyses on living cells.

As expected by the peptide binding observed in flow cytometry experiments, LT results showed that the divalent peptides bound to BJAB and HCT116 cells that expressed TRAIL-R2 receptors. Although the peptides bound rapidly to HCT116 and BJAB expressing TRAIL-R2, after peptide removal, the complexes between TRAIL-R2 and the peptides dissociated immediately in HCT116 cells but remained stable in BJAB. Interestingly, the binding curves observed with the fluorescent monovalent **1m** peptide at BJAB-TRAIL-R2 cell surface were similar to the binding curves observed with divalent peptides at HCT116-TRAIL-R2 cell surface. As the monovalent peptides do not induce apoptosis, these results allow correlating the binding mode of the peptides with their efficiently in inducing apoptosis.

One hypothesis to explain the difference of peptide sensitivity in inducing apoptosis might be due to differences in TRAIL-R2 receptors expressed on HCT116 and BJAB cells. It has been described that TRAIL-R2 as well as TRAIL-R1 receptors presented high extracellular conserved sites of O-glycosylation. Recent studies highlight the importance of O-glycosylation that promoted ligand-stimulated clustering of TRAIL-R1 and TRAIL-R2, which mediated recruitment and activation of the apoptosis-initiating protease caspase-8 and could also be used as predictive biomarkers for TRAIL-based cancer therapy (Wagner et al., 2007). In the case of

HCT116 cells, TRAIL-R2 might present less O-glycosylation sites than TRAIL-R2 in BJAB thus limiting the recruitment of receptors to induce apoptosis (Patsos et al., 2009).
Besides differences in binding profiles of divalent peptides between cell lines, we also observed that various peptides can bind differently on the same cell line.

Indeed, **1d** and **2d** peptides are not equivalent ligand to induce apoptosis in BJAB and HCT116 cells. Using SPR and LT® technologies, we highlight that divalent peptide bound to cells expressing TRAIL *i)* with different affinities and *ii)* in different modes (homogeneous and heterogeneous).

When comparing Interaction Map® of both divalent peptides interaction on TRAIL-R2 expressed on BJAB cells, we highlight that **2d** presented two peaks of interaction that contributed to in interaction with TRAIL-R2 in equally proportion that might correspond to a bivalent binding (left hand peak) and either monovalent or a weaker bivalent binding mode (right hand peak). By contrast, **1d** was characterized by one dominant stable interaction that might correspond to a bivalent binding. This hypothesis is consistent with the conclusion from SPR experiments that **1d** binds mainly in a homogeneous bivalent way while **2d** bind more heterogeneously. The same kinds of differences might explain why some mAb evaluated in clinical trials have only a weak agonist activity.

Monitoring kinetic parameters on living cells is difficult certainly because *i)* we can't control the exact numbers of cells during the long term experiment *ii)* because nonspecific binding due to the fluorescent dye can occurred and can interfered with ligand binding. However, in our study, for the first time, the binding kinetics were recorded between small peptides and receptors expressed on living cells. We repeated at least 3 times each experiment. The resulting binding curves show some variability in shape, both within and in between experiments, particularly during the washing phase. However, we managed to measured kinetic parameters that always were in the same ranges. Kinetic parameters were measured in the same experiment on both cells expressing TRAIL-R2 and cells deficient for the expression of the receptor. Although a weak binding was observed in cells deficient for TRAIL-R2 receptor that might be due to the fluorescent dye, in all experiment the response observed in cells expressing TRAIL-R2 was higher than the one observed in the cells deficient for TRAIL-R2.

In conclusion, we demonstrated for the first time that even if divalent peptide had a high affinity for TRAIL-R2, the binding mode can differ from one cells to another and thus limiting the efficiency of cells apoptosis induction. These observations might explain in part how some mAb evaluated in clinical trials were weak agonists. Therefore, these results could be useful to predict the efficiency a new therapeutic and synthetic ligand developed. Indeed if measurement of cellular binding was associated with biological response *in vitro*, development of inefficient ligand might be avoided.

Figures

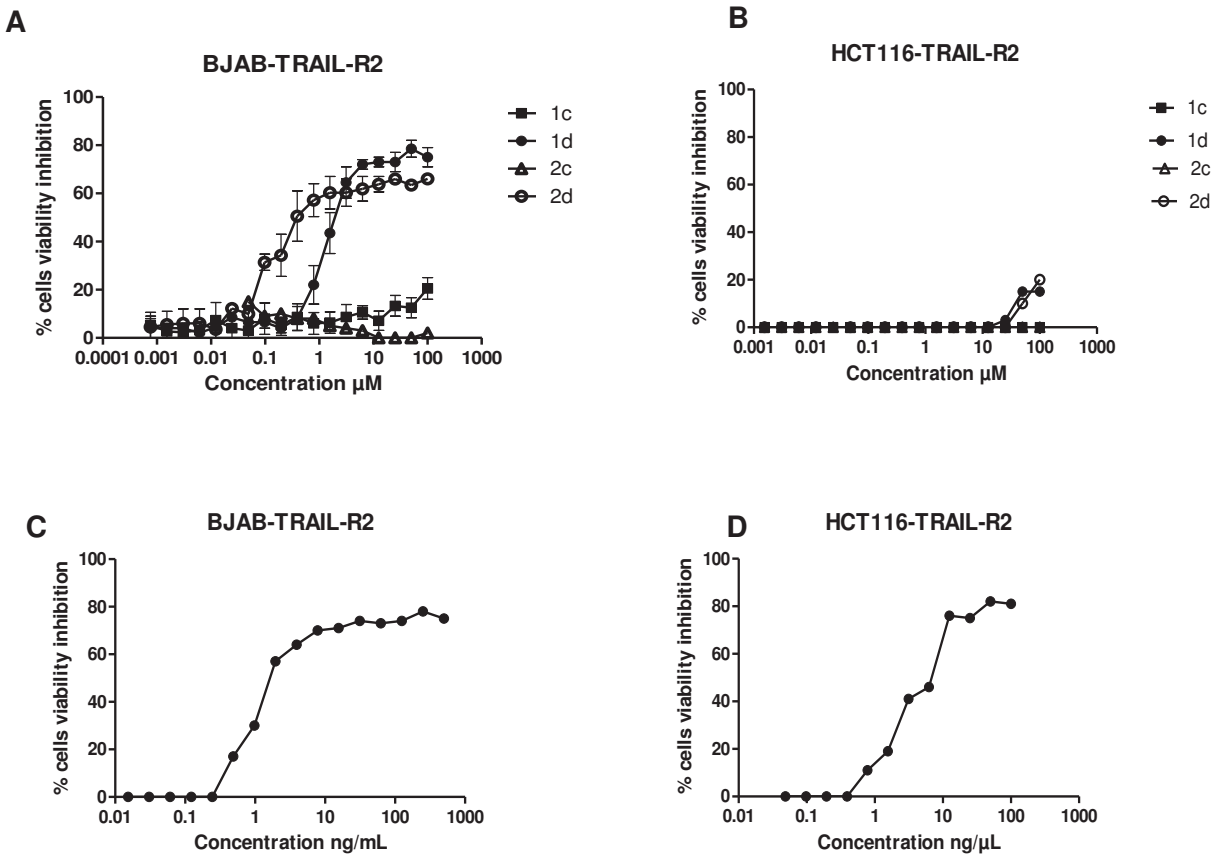


Figure 1: Divalent TRAIL$^{mim/DR5}$ induce BJAB-TRAIL-R2 cells apoptosis but not in HCT166-TRAIL-R2 cells. BJAB-TRAIL-R2 (A and C) and HCT116-TRAIL-R2 (B and D) cells were treated with different concentrations of divalent peptides or with **SPK** and viability inhibition was measured by MTS assay. The results are expressed as % of cell viability inhibition according to the following formula: viable cell % = (OD (treatment) /OD(100% viability) * 100) were cells incubated with medium alone were was considered as 100% of viability. Results were expressed as the mean of 3 experiments ± SEM. Results with a p-value less than 0.05 were considered significant.

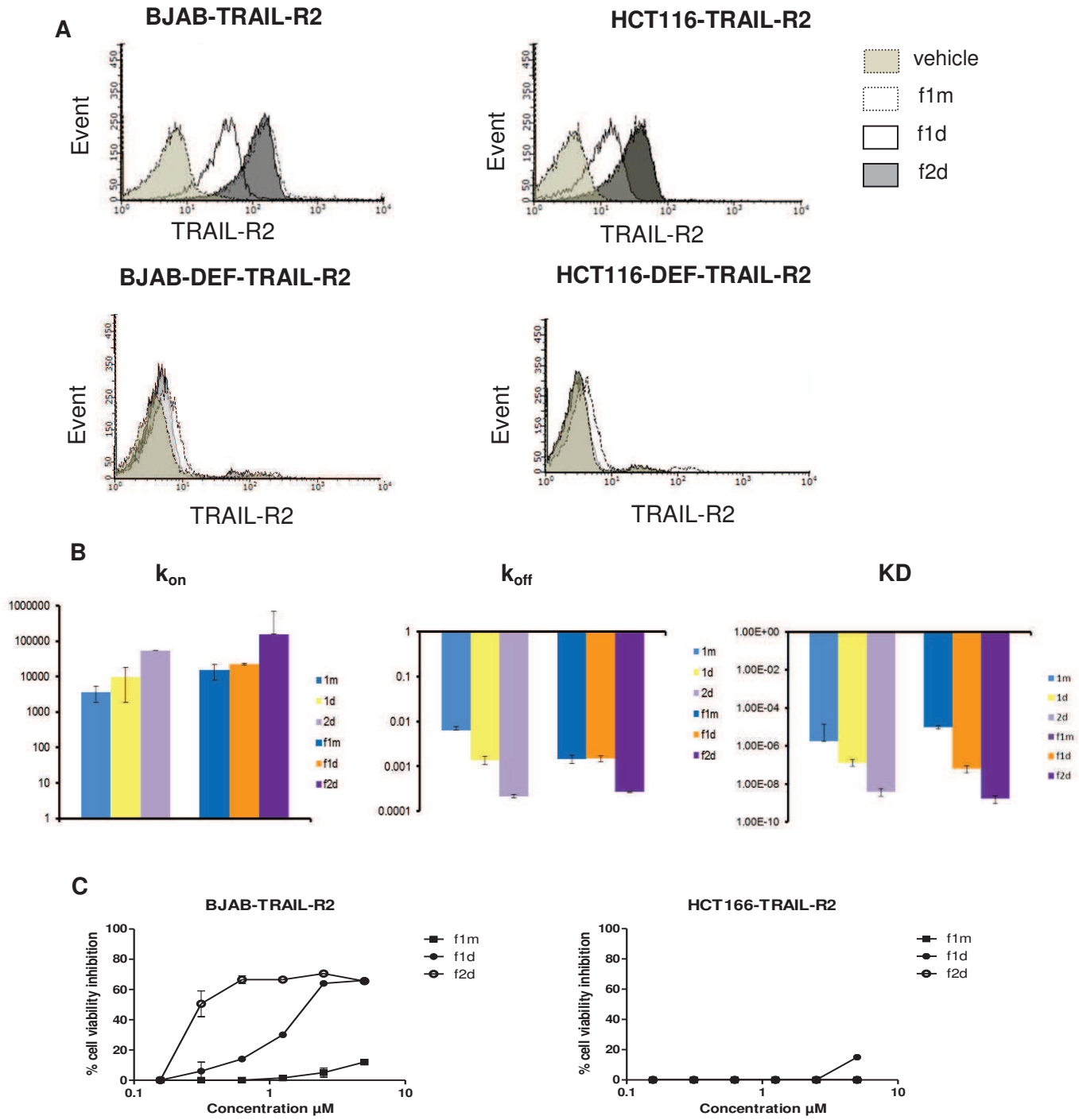


Figure 2: Labeled peptides bind on BJAB and HCT116 expressing TRAIL-R2 and present the same binding properties and biological activity as unlabeled 1m, 1d and 2d peptides. BJAB and HCT166 cells expressing or not TRAIL-R2 were stained with labelled peptides and expressing of TRAIL-R2 was monitored in cytometry experiments. Binding properties of unlabeled and labeled peptides were monitored by SPR experiments. The mean association (k_{on}) constants, dissociation constants (k_{off}) and affinities (KD) (B) from 2 independent experiments are compared. Their capacity to induce BJAB and HCT116 cells to induce apoptosis was monitored by MTS experiments (C). Results of MTS are expressed as % of cell viability inhibition according to the following formula: viable cell % = (OD (treatment) /OD(100% viability) * 100) were OD of non-treated cells was considered as 100% of viability. Results with a p-value less than 0.05 were considered significant (n=3).

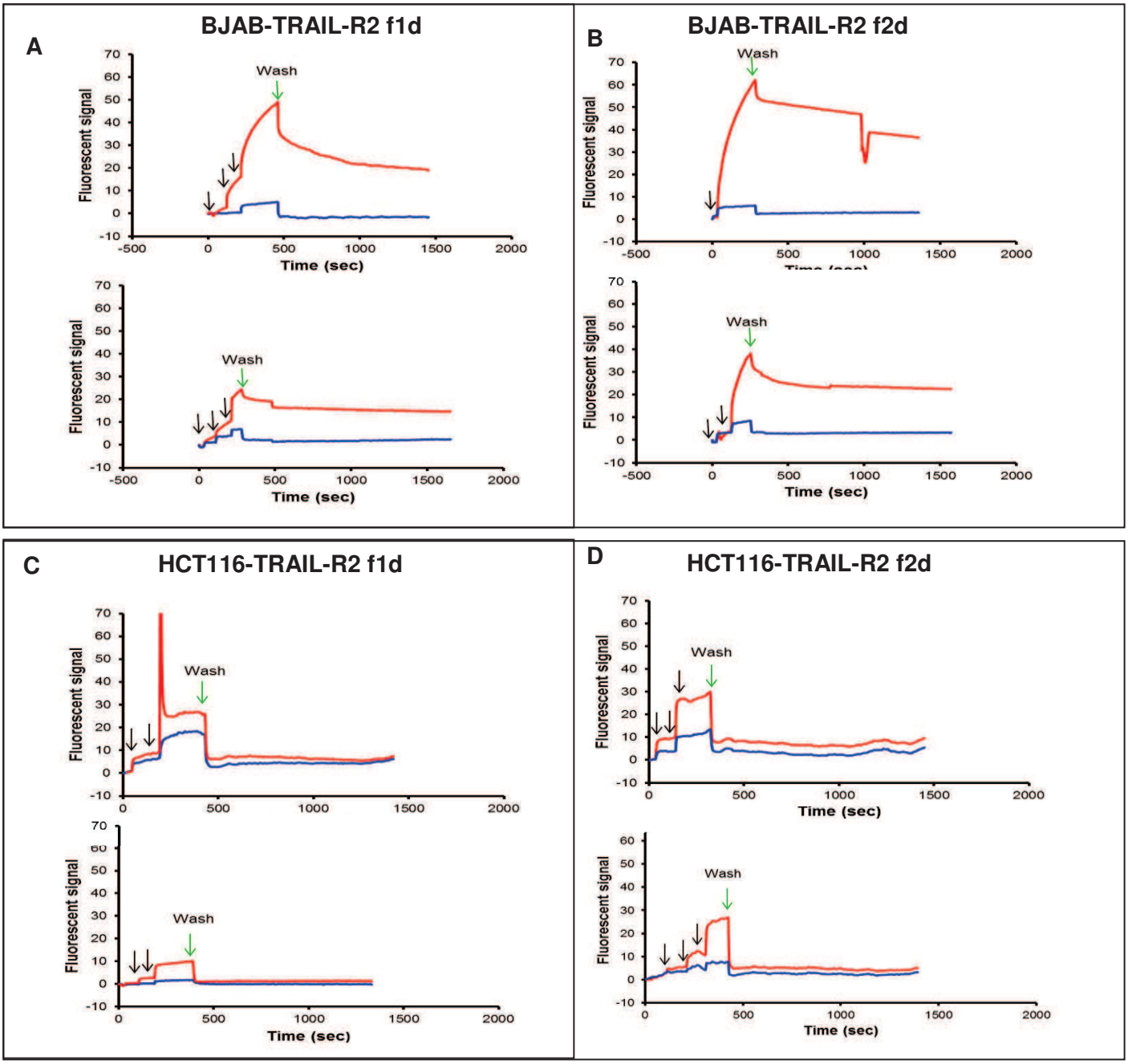
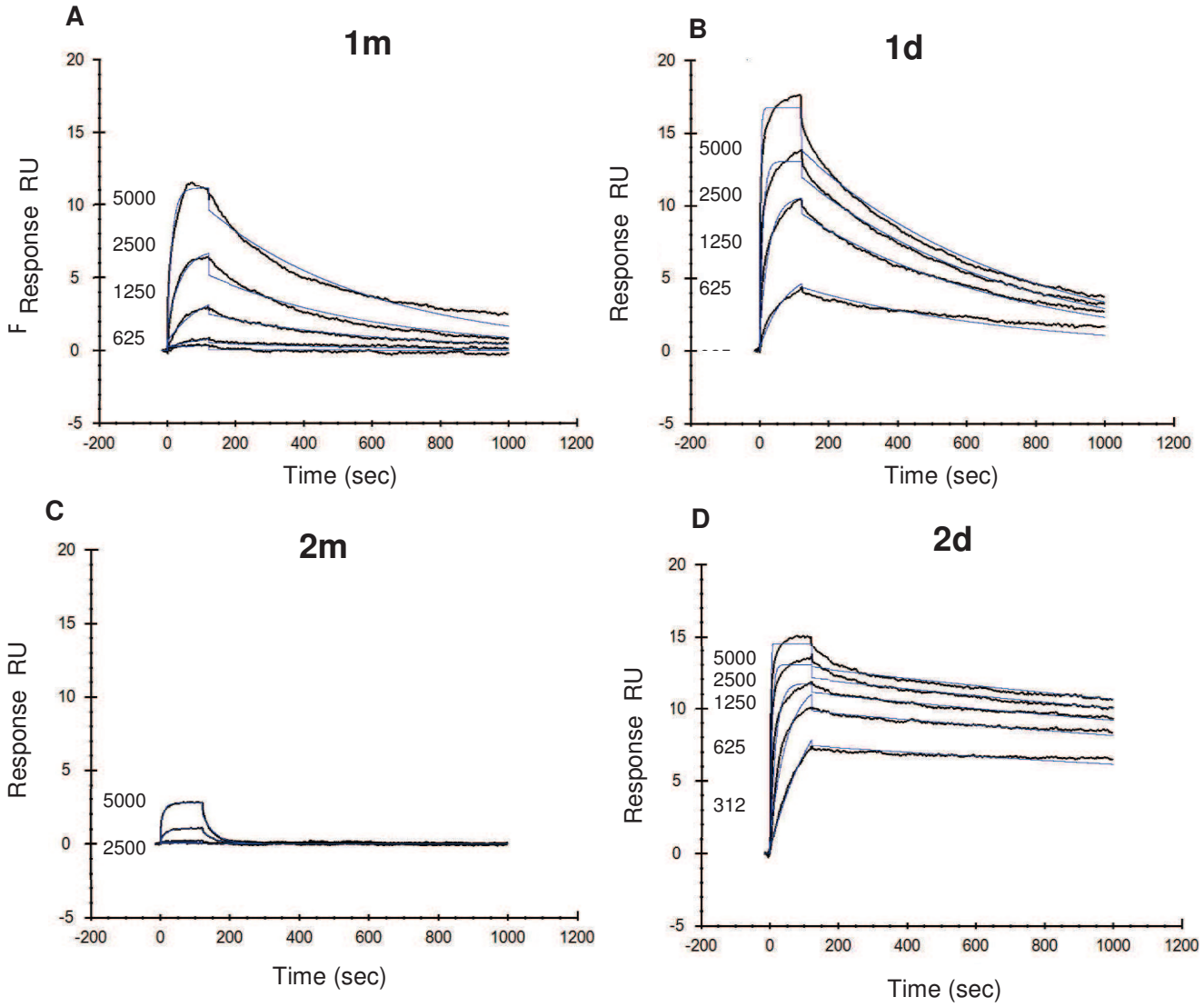


Figure 3: Divalent peptides 1d and 2d form stable complexes with TRAIL-R2 expressed on BJAB cells whereas the same peptides bound weakly to HCT116-TRAIL-R2 cells. Binding curves represent the interaction between divalent peptides **1d** (A,C) and **2d** (C,D) with (A,B) BJAB-TRAIL-R2 (red curves) and BJAB-TRAIL-R2-DEF (blue curves) cells or with (C,D) HCT116-TRAIL-R2 (red curves) and HCT116-TRAIL-R2-DEF (blue curves). The black arrows correspond to the addition of 10, 30 then 90 nM of peptides. The green arrows indicate the removal of peptides. For each peptide kinetic curves from two independent experiences are represented.



Peptides	k_{on} ($M^{-1}.s^{-1}$)	k_{off} (s^{-1})	KD (M)	Chi²	R_{max} (RU)
1m	5.10^{3}±1.3	2.10^{-3}±5	5.10^{-7}±3	0.05	9.5
2m	3.10^{3}±2.7	1.10^{-2}±1	3.10^{-6}±1	0.03	5
1d	2.10^{4} ± 2.8	6.10^{-3}±3.4	1.10^{-10} ± 1.5	0.252	12.9
2d	8.10^{5} ±2.1	2.10^{-4} ±3.3	2.10^{-11} ± 2.3	0.0261	11.9

Figure 4 : Divalent TRAIL$^{mim/DR5}$ peptides 1d and 2d bound with higher affinity than monovalent peptides 1m and 2m to sensor-immobilized TRAIL-R2. Kinetic SPR curves of monovalent **1m** (A) and **2m** (B) and divalent **1d** (C) and **2d** (D) peptides binding to immobilized human TRAIL-R2. All compounds were tested at concentrations 5000, 2500, 1250, 625 and 312 nM. The SPR response is expressed in RU. The fitted curves using a Langmuir 1:1 model are in blue. Kinetic parameters for peptides reported in the table (E) represent the mean of two experiments.

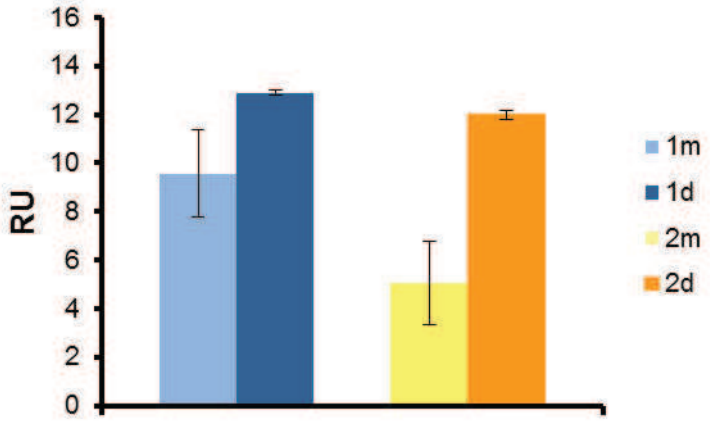


Figure 5: 1d might prevalently bind in a bivalent way. The fitted R_{max} (RU) for **1m**, **2m**, **1d and 2d,** are compared. The values correspond to the mean of 2 experiments performed on a same surface.

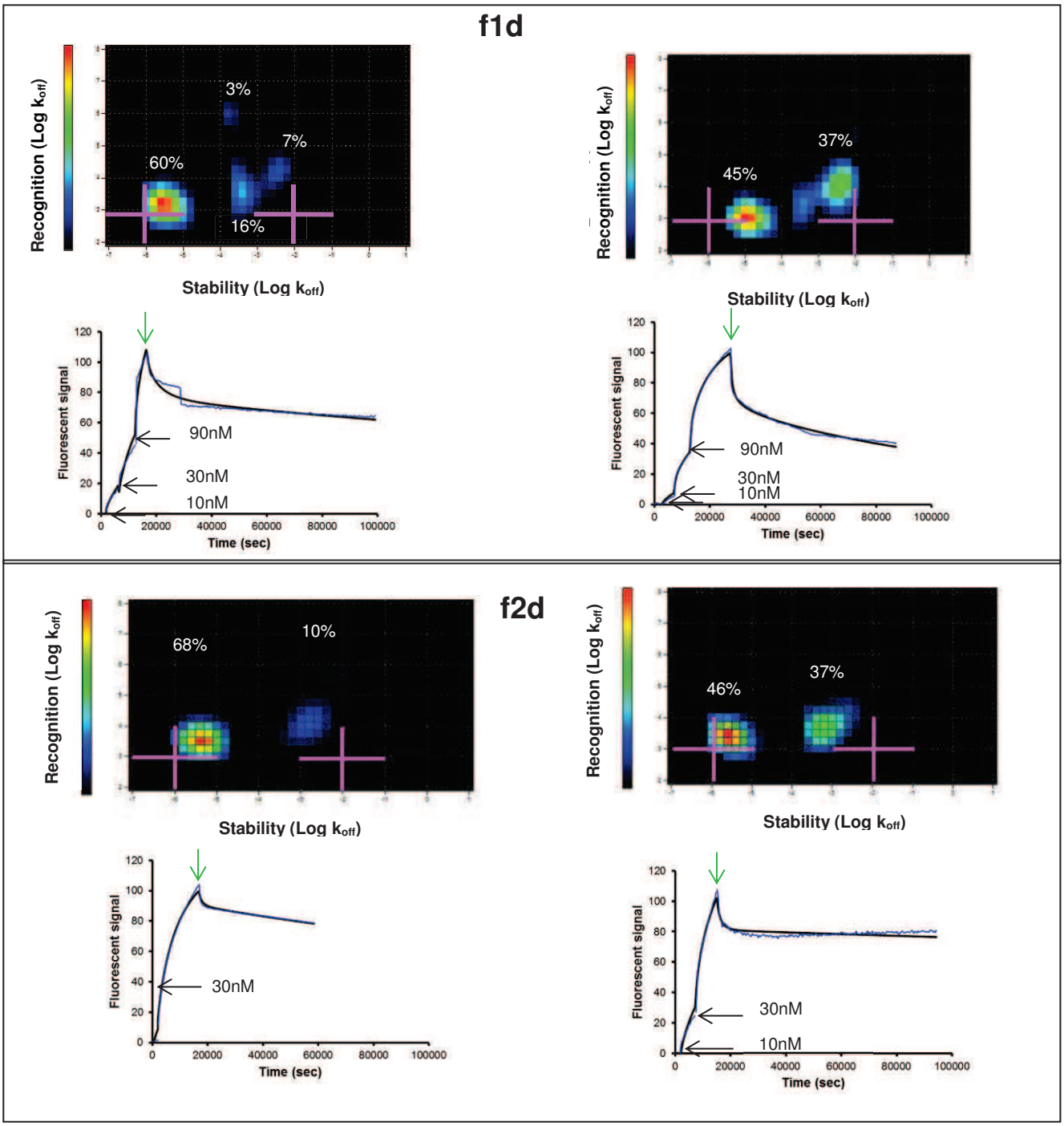


Figure 6: Divalent TRAIL$^{mim/DR5}$ 1d and 2d presented differences in BJAB-TRAIL-R2 binding modes. Interaction Maps were calculated from real time LT binding curves of the interaction between divalent peptides **f1d** or **f2d** on BJAB expressing TRAIL-R2. Two independent experiments were performed for each peptide. The black arrows correspond to the addition of 10, 30 and 90 nM of peptides **1d** (upper-right panel) and 10nM and 30 nM for **2d** (lower right panel) to the cells. The green arrows indicate the removal of peptides.The contribution (%) of each interaction to the binding signal is indicated in white on the maps.

Supplements

Figure 1: The amino acids sequence of monovalent 1m and 2m peptides

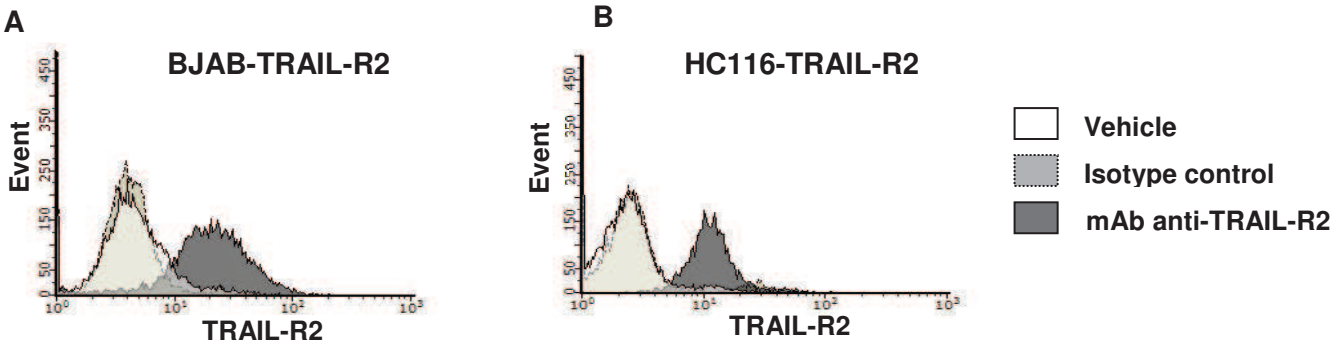


Figure 2: BJAB and HCT116 cells express TRAIL-R2 receptor. BJAB-TRAIL-R2 (A) and HCT116-TRAIL-R2 (B) cells (10^6cells/well) were stained with monoclonal anti-TRAIL-R2/PE antibody (dark) or a control isotype (gray) couple to allophycocyanin (APC) and expression of TRAIL-R2 was analyzed by flow cytometry.

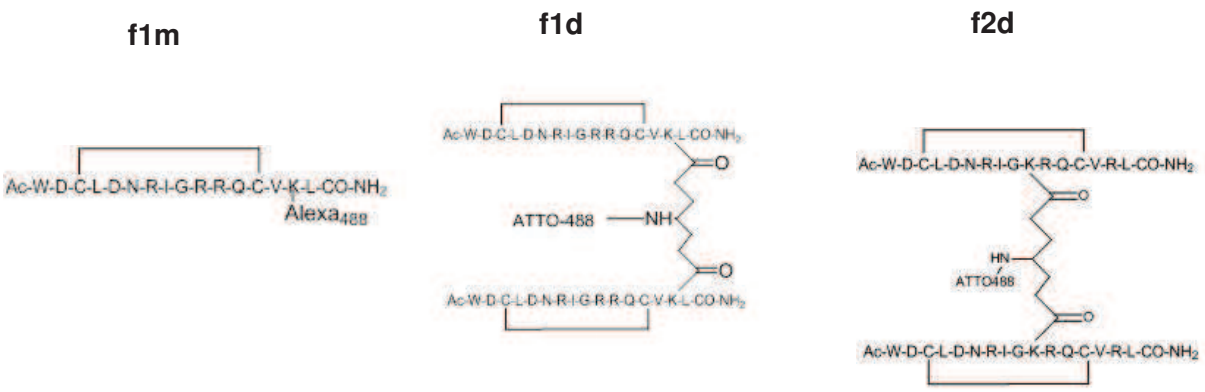


Figure 3: The labeled peptides

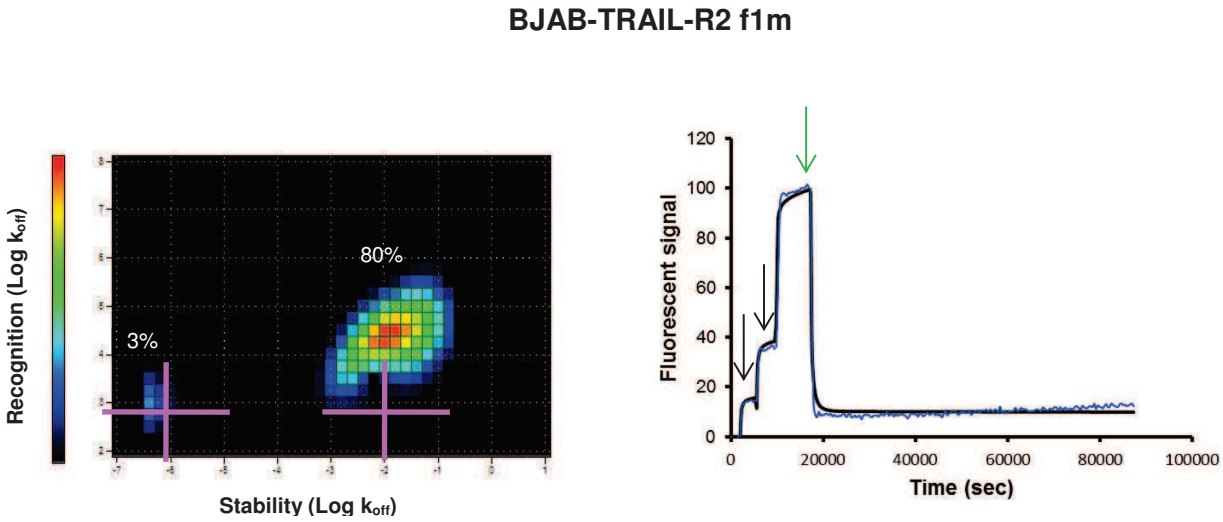


Figure 4: Monovalent f1m peptide binds TRAIL-R2 weakly and induces no BJAB apoptosis. The Interaction Map (left) was calculated from real time LT binding curve of the interaction between monovalent peptide **f1m** and BJAB expressing TRAIL-R2 (right). The contribution (%) of each interaction to the binding signal is indicated in white on the map. The experimental curve is in black and the fitted curve in blue (right). The black arrow corresponds to the addition of 10 then 30 nM of peptides every 2 hours. The green arrow indicates the removal of the peptide.

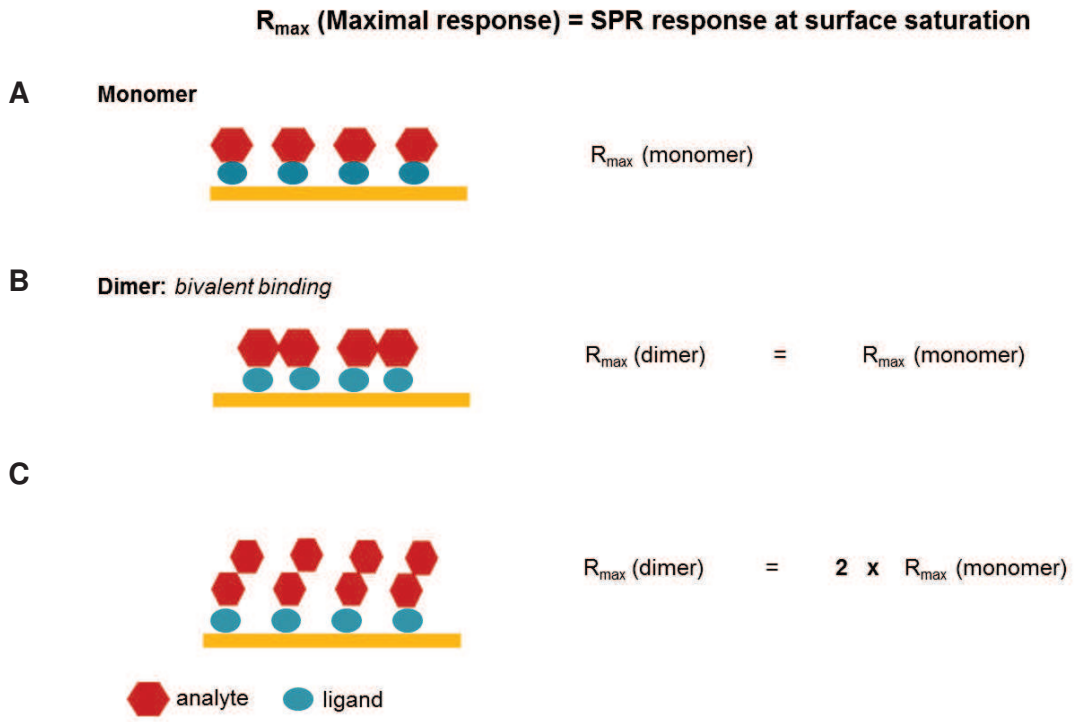


Figure 5: **The R_{max} value an indicator of the interaction stoichiometry's**. The fitted R_{max} values are related to the amount of peptides bound at surface saturation. The R_{max} should be the same for the monomer (A) and the dimer (B) if the latter binds bivalently. The R_{max} of the dimer should be twice that of the monomer if the dimer binds monovalently (C).

	Ratio (Chi² Langmuir/ Chi² Bivalent Analyte)	Ratio (Chi² Langmuir/ Chi² Heterogenous Ligand	Ratio (Chi² Langmuir/ Chi² Two states reactions)
1m	1.05	2.40	1.36
1d	1.67	1.74	1.65
2m	1.85	1.96	1.93
2d	**10.21**	**12.16**	2.47

Table 1: The bivalent or heterogeneous ligand models are more appropriate to fit 2d data than the monovalent or two-state models. The numbers reported in the Table correspond to the ratio of the Chi² (statistical parameter indicating the goodness of the fit) obtained with the Langmuir model (Figure 2D) to the Chi² obtained with the complex interaction models. A large ratio indicates a better fit of the complex model compared to the one:one model.

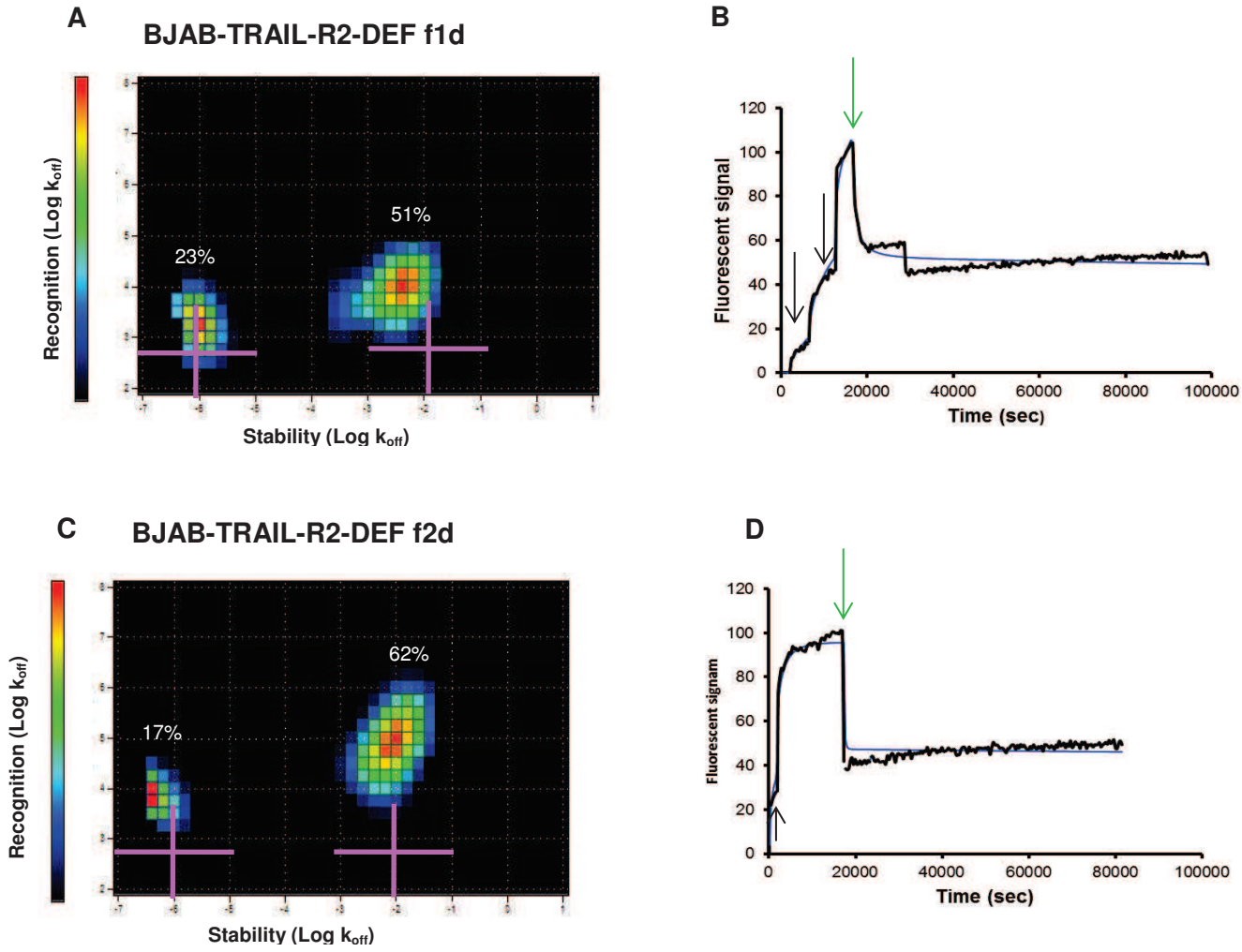


Figure 6: LT binding measurements of the interaction between 1d or 2d on BJAB-TRAIL-R2-DEF. Interaction Maps (A and C) were calculated from real time LT binding measurements (B and D) of the interaction between divalent peptides **f1d** (A and B) and **f2d** (C and D) and BJAB deficient for the expression of TRAIL-R2. The contribution of each interaction to the signal (%) is indicated in white in the maps. The experimental curves are in black and the fitted curves in blue (right hand panels). The black arrows correspond to the addition of 10 then 30 nM of peptides **1d** (upper-right panel) and 10nM for **2d** (lower right panel) to the cells. The green arrows indicate the removal of peptides.

Material and methods

Cell lines **:** The human Burkitt lymphoma BJAB cells TRAIL-R2deficient for TRAIL-R2 (BJAB-TRAIL-R2 -DEF) as well as BJAB-TRAIL-R2 cells in which the expression of TRAIL-R2 was recovered by stable expression of TRAIL-R2 (BJAB-TRAIL-R2TRAIL-R2were kindly provided by Andrew Thorburn (Department of Pharmacology, University of Colorado Denver School of Medicine, USA). HCT116 human colon cancer cell lines (HCT116-TRAIL-R2 and HCT116-TRAIL-R2-DEF) that differ in the presence or absence of TRAIL-R2 expression at cell membrane were kindly provided by Olivier Micheau (Inserm UMR866, University of Bourgogne, France). Both cells were cultured in RPMI 1640 supplemented with 10% FBS (Fetal Bovine Serum) 100U/ml penicillin, 0,1mg/ml streptomycin. Puromycin antibiotic (0.5µg/mL) was added to the BJAB-TRAIL-R2 medium to ensure the maintaining of TRAIL-R2 expression. Cells were maintained at 37°C with 5% CO_2.

Peptide synthesis: TRAIL$^{min/DR5}$ peptides **1m**, **2m**, **1d** and **2d** were synthesized in our laboratory according our previous report (Pavet et al., 2010). For synthesis of fluorescent version of the peptides, **1m**-Alexa 488 conjugate (**f1m**), **1d**-ATTO 488 conjugate (**f1d**) and **2d**-ATTO 488 conjugate (**f2d**) were dissolved in DMF and added to solid ATTO-488-OSu or Alexa488-NHS. DIEA was added to the reaction to reach pH =8- 9, and the reaction was stirred at room temperature, monitoring with HPLC and maintaining the pH basic. The reaction was quenched with addition of H_2O and the crude was purified with semi-preparative HPLC (20-50 % acetonitrile 0.1 % TFA, 30 min), and the desired product was obtained as solid after lyophilisation.
1m, **2m**, **1d** and **2d** peptides were solubilized in H_2O and prepared in a stock solution at 5mM. Fluorescent conjugate peptides were solubilized in DMSO in a stock solution at 100µM.

Cell viability assay**:** BJAB and HCT116 cells (10^5 cells/well) were cultured in 100µL of culture medium in 96-flat bottom well plates. The next day, cells were treated with the indicated concentrations of the different divalent ^{DR5} peptides. After 16 hours of treatment cell viability measurement was performed by the MTS assay according to the manufacturer specification (Promega Corporation, Madison, WI).

Staining for flow cytometry analysis**:** 10^6 cells were washed in PBS containing 2% FCS and then incubated at 4°C for 30 min with an antibody anti-TRAIL-R2 (clone BK9 Diaclone, Besançon, France) according to concentration recommended by the manufacturer or with fluorescent peptides at the concentration of 1µM. After two washes in PBS-2% FBS, TRAIL-R2

expression was monitored by flow cytometry (Guava easyCyte™, Merck Milipore, Darmstadt, Germany) and data were analyzed with InCyte Software (Merck Milipore)

Surface Plasmon Resonance: Biosensor assays were performed on a Biacore T200™, at 25°C. The running buffer was HBS-EP buffer [10mM HEPES (pH 7.4) containing 0.15M NaCl, 3.4mM EDTA and 0.005% (v/v) Tween P20]. The human TRAIL-R2 and RANK (Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY) receptors were immobilized on a sCM5 sensor chip (GE Healthcare) using the standard amine coupling procedure. The receptors were diluted in 10mM acetate buffer (pH 5.0) at a concentration of 5µg/mL. The receptor immobilization level on the sensor chip was 430 RU. Peptides were injected at a flow rate of 5µL/min for 120s and allowed to dissociate for an additional of 420s. Channels were then regenerated for 5s with 25mM HCl. All binding curves were double-referenced (i-e subtraction of the data of the empty flow cell followed by the subtraction of the data from a run buffer injection cycle). The Langmuir model was used to fit kinetic curves (TraceDrawer 1.2, Ridgeview Instrument AB, Uppsala, Sweden).

Real time kinetic measurement assay on living cells**:** HCT116-TRAIL-R2-DEF and HCT116-TRAIL-R2 cells were directly plated on a glass slide (Ø20mm) (10^6cells/well). BJAB-TRAIL-R2 and BJAB-TRAIL-R2-DEF were plated on glass slides pretreated with poly-L-lysine (0.1% v/v) (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA). After 24 hours, the slides were fixed in a Petri dish. Measurements of binding kinetics of $^{TRAIL\text{-}R2}$peptides on cells expressing or not TRAIL-R2 was performed using the Green Ligand Tracer (LT) instrument (Ridgeview Instruments). Cells were incubated in culture medium during 30 min to provide a clear base line. Then increasing concentrations of labeled peptides were added (10nM, 30nM and 90nM approximately every 2 hours). After 6h of association measurement, cells were washed with fresh medium and the dissociation rate was followed overnight. Fluorescent measurement were conducted at room temperature (approximately 20°C).

Evaluation of SPR and LT kinetic sets: SPR data sets were analyzed by nonlinear regression using BIAevaluation 4.1.1 software (GE Life Sciences,). LT data were evaluated by Interaction Map® analysis (Ridgeview Diagnostics AB),. The mathematical tool “Interaction Map” expresses the measured binding of a homogeneous ligand to a heterogeneous group of targets as a sum of interactions, each having a unique combination of the association rate constant k_{on} and a dissociated rate constant k_{off}.

Statistical analysis: Results from cell viability experiments were expressed as the mean ± SEM. The statistical significance was evaluated by a non-parametric ANOVA 2 way test plus a Bonferonni correction. Results with a p-value less than 0.05 were considered significant**.**

References

Bjorke, H., and Andersson, K. (2006). Automated, high-resolution cellular retention and uptake studies in vitro. Applied radiation and isotopes : including data, instrumentation and methods for use in agriculture, industry and medicine *64*, 901-905.

Bodmer, J.L., Holler, N., Reynard, S., Vinciguerra, P., Schneider, P., Juo, P., Blenis, J., and Tschopp, J. (2000). TRAIL receptor-2 signals apoptosis through FADD and caspase-8. Nature cell biology *2*, 241-243.

Chan, F.K.M. (2007). Three is better than one: Pre-ligand receptor assembly in the regulation of TNF receptor signaling. Cytokine *37*, 101-107.

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

Dimberg, L.Y., Anderson, C.K., Camidge, R., Behbakht, K., Thorburn, A., and Ford, H.L. (2013). On the TRAIL to successful cancer therapy? Predicting and counteracting resistance against TRAIL-based therapeutics. Oncogene *32*, 1341-1350.

Lemke, J., von Karstedt, S., Zinngrebe, J., and Walczak, H. (2014). Getting TRAIL back on track for cancer therapy. Cell death and differentiation *21*, 1350-1364.

Marsters, S.A., Sheridan, J.P., Pitti, R.M., Huang, A., Skubatch, M., Baldwin, D., Yuan, J., Gurney, A., Goddard, A.D., Godowski, P.*, et al.* (1997). A novel receptor for Apo2L/TRAIL contains a truncated death domain. Current biology : CB *7*, 1003-1006.

Micheau, O., Shirley, S., and Dufour, F. (2013). Death receptors as targets in cancer. British journal of pharmacology *169*, 1723-1744.

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

Nordberg, E., Steffen, A.C., Persson, M., Sundberg, A.L., Carlsson, J., and Glimelius, B. (2005). Cellular uptake of radioiodine delivered by trastuzumab can be modified by the addition of epidermal growth factor. European journal of nuclear medicine and molecular imaging *32*, 771-777.

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

Patsos, G., Andre, S., Roeckel, N., Gromes, R., Gebert, J., Kopitz, J., and Gabius, H.J. (2009). Compensation of loss of protein function in microsatellite-unstable colon cancer cells (HCT116): a gene-dependent effect on the cell surface glycan profile. Glycobiology *19*, 726-734.

Pavet, V., Beyrath, J., Pardin, C., Morizot, A., Lechner, M.C., Briand, J.P., Wendland, M., Maison, W., Fournel, S., Micheau, O.*, et al.* (2010). Multivalent DR5 peptides activate the TRAIL death pathway and exert tumoricidal activity. Cancer research *70*, 1101-1110.

Shirley, S., Morizot, A., and Micheau, O. (2011). Regulating TRAIL receptor-induced cell death at the membrane : a deadly discussion. Recent patents on anti-cancer drug discovery *6*, 311-323.

Stuckey, D.W., and Shah, K. (2013). TRAIL on trial: preclinical advances in cancer therapy. Trends in molecular medicine *19*, 685-694.

Valley, C.C., Lewis, A.K., Mudaliar, D.J., Perlmutter, J.D., Braun, A.R., Karim, C.B., Thomas, D.D., Brody, J.R., and Sachs, J.N. (2012). Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) induces death receptor 5 networks that are highly organized. The Journal of biological chemistry *287*, 21265-21278.

Wagner, K.W., Punnoose, E.A., Januario, T., Lawrence, D.A., Pitti, R.M., Lancaster, K., Lee, D., von Goetz, M., Yee, S.F., Totpal, K.*, et al.* (2007). Death-receptor O-glycosylation controls tumor-cell sensitivity to the proapoptotic ligand Apo2L/TRAIL. Nature medicine *13*, 1070-1077.

Wajant, H., Gerspach, J., and Pfizenmaier, K. (2013). Engineering death receptor ligands for cancer therapy. Cancer letters *332*, 163-174.

Wajant, H., Moosmayer, D., Wuest, T., Bartke, T., Gerlach, E., Schonherr, U., Peters, N., Scheurich, P., and Pfizenmaier, K. (2001). Differential activation of TRAIL-R1 and -2 by soluble and membrane TRAIL allows selective surface antigen-directed activation of TRAIL-R2 by a soluble TRAIL derivative. Oncogene *20*, 4101-4106.

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

Wei, Q., Kullberg, E.B., and Gedda, L. (2003). Trastuzumab-conjugated boron-containing liposomes for tumor-cell targeting; development and cellular studies. International journal of oncology *23*, 1159-1165.

Yang, A., Wilson, N.S., and Ashkenazi, A. (2010). Proapoptotic DR4 and DR5 signaling in cancer cells: toward clinical translation. Current opinion in cell biology *22*, 837-844.

CHAPITRE 2

Article 6 : Cysteine-rich domain one of CD40 mediates receptor self-assembly

Cristian R. Smulski, Julien Beyrath, Marion Decossas, Neila Chekkat, Philippe Wolff , Karine Gionnet, Gilles Guichard, Daniel Speiser, Pascal Schneider and Sylvie Fournel

(publié dans The Journal of Biological Chemestry en 2013)

THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY VOL. 288, NO. 15, pp. 10914–10922, April 12, 2013
© 2013 by The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc. Published in the U.S.A.

Cysteine-rich Domain 1 of CD40 Mediates Receptor Self-assembly*[S]

Received for publication, October 12, 2012, and in revised form, March 2, 2013 Published, JBC Papers in Press, March 5, 2013, DOI 10.1074/jbc.M112.427583

Cristian R. Smulski[‡1], Julien Beyrath[‡2], Marion Decossas[‡], Neila Chekkat[‡3,4], Philippe Wolff[§], Karine Estieu-Gionnet[¶], Gilles Guichard[¶], Daniel Speiser[‖], Pascal Schneider[**], and Sylvie Fournel[‡4,5]

*From the [‡]Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Immunologie et Chimie Thérapeutiques, CNRS UPR 9021, 15 rue René Descartes, 67084 Strasbourg, France, the [§]Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Plateforme Protéomique Strasbourg Esplanade, 15 rue René Descartes, 67084 Strasbourg, France, the [¶]Institut Européen de Chimie et de Biologie CBMN, Université de Bordeaux I, CNRS UMR 5248, 2 Rue Robert Escarpit, 33607 PESSAC, France, the [‖]Department of Oncology and Ludwig Center for Cancer Research, University of Lausanne, Av. P.-Decker 4, CH-1011 Lausanne, Switzerland, and the **Department of Biochemistry, University of Lausanne, Boveresses 155, CH-1066 Epalinges, Switzerland*

Background: The activation of CD40 is essential for the development of humoral and cellular immune responses.
Results: CD40 dimerizes through the extracellular region via the CRD1, and recombinant CRD1 potentiates CD40L activity.
Conclusion: CD40-CRD1 participates to dimerization and is required for efficient receptor expression.
Significance: CD40 self-assembly modulates signaling, possibly by maintaining the receptor in a quiescent state.

The activation of CD40 on B cells, macrophages, and dendritic cells by its ligand CD154 (CD40L) is essential for the development of humoral and cellular immune responses. CD40L and other TNF superfamily ligands are noncovalent homotrimers, but the form under which CD40 exists in the absence of ligand remains to be elucidated. Here, we show that both cell surface-expressed and soluble CD40 self-assemble, most probably as noncovalent dimers. The cysteine-rich domain 1 (CRD1) of CD40 participated to dimerization and was also required for efficient receptor expression. Modelization of a CD40 dimer allowed the identification of lysine 29 in CRD1, whose mutation decreased CD40 self-interaction without affecting expression or response to ligand. When expressed alone, recombinant CD40-CRD1 bound CD40 with a K_D of 0.6 μM. This molecule triggered expression of maturation markers on human dendritic cells and potentiated CD40L activity. These results suggest that CD40 self-assembly modulates signaling, possibly by maintaining the receptor in a quiescent state.

Ligand-induced oligomerization is an important process for activating cell surface receptors like cytokine receptors, G protein-coupled receptors, protein-tyrosine kinase receptors, Toll-like receptors, and tumor necrosis factor receptor superfamily members (TNFRSF)[6] in a number of biological events (1, 2). TNF family ligands form noncovalent homotrimers that can bind three receptor molecules (3). Although this ligand-receptor complex is generally accepted to be the minimal requirement for signaling, some members of the family are only efficiently triggered by at least two adjacent trimeric ligands (4, 5). The form under which ligand-free TNFRSF members exist is still not fully understood. Indeed, unliganded TNFR1 crystallized as a parallel dimer (6, 7) whereas cell-based experiments rather proposed that receptors may preassemble as trimers in the absence of ligand (8). Interestingly, DcR3 (TNFRSF6B) assembled as parallel dimers when crystallized alone, but as trimers when co-crystallized with its ligand TL1A, each receptor in this trimeric form contacting a different ligand (9). Thus, receptors may exist both as dimers or trimers depending on the context. Gathering more structural information on unliganded TNF receptors will help to better understand the mechanism of ligand-induced receptor signaling.

The extracellular region of TNFRSF members is characterized by the presence of cysteine-rich domains (CRDs) which typically contain six cysteine residues engaged in the formation of three disulfide bonds. The number of CRDs in a given receptor usually varies from one to four (3). TNFR1 and CD40 possess four CRDs, of which only CRD2 and 3 are directly involved in ligand binding. Crystallography of unliganded TNFR1 (TNFRSF1A) (6) showed homodimerization in either parallel or anti-parallel manners (7). Anti-parallel dimers associate through an interface that overlaps with CRD1 and 2, whereas parallel dimers associate mainly via CRD1 and leave ligand binding sites accessible. Cell-based studies identified a preligand-binding assembly domain at the N terminus of TNFR1

* This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (to S. F. and G. G.), the Swiss National Science Foundation (to P. S.), and the Agence Nationale Recherche Grant ANR-08-PCVI-0034-01) (to G. G.).

[S] This article contains supplemental Figs. 1–7.

[1] Recipient of grants from the Agence Nationale de la Recherche and the University of Strasbourg. To whom correspondence may be sent at the present address: Dept. of Biochemistry, University of Lausanne, Boveresses 155, CH-1066 Epalinges, Switzerland. Tel.: 41-216925743; Fax: 41-216925705; E-mail: cristianroberto.smulski@unil.ch.

[2] Present address: Centre for Systems Biology and Bioenergetics, Radboud University Nijmegen Medical Centre, 6500HB Nijmegen, The Netherlands.

[3] Recipient of a grant from the French Ministère de la Recherche.

[4] Present address: Laboratoire de Conception et Application de Molécules Bioactives, Equipe de Biovectorologie, UMR 7199 CNRS-Université de Strasbourg, Faculté de Pharmacie, 74 Route du Rhin, 67401 Illkirch, France.

[5] To whom correspondence may be sent at the present address. Tel.: 33-3-68854173; Fax: 33-3-68854306; E-mail: s.fournel@unistra.fr.

[6] The abbreviations used are: TNFRSF, TNF receptor superfamily; BS[3], (bis)sulfosuccinimidyl suberate; CRD, cysteine-rich domain; EDAC, *N*-ethyl-*N*′-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide; TRAIL, TNF-related apoptosis-inducing ligand.

Downloaded from http://www.jbc.org/ at Université Louis Pasteur on December 2, 2014

and 2 that is required for preassembly of TNFR complexes in a fully ligand-responsive conformation (8). In any case, TNF receptors appear to exist as preformed complexes and not as monomeric receptors that would only oligomerize upon ligand binding. In line with these results, the CRD1 of Fas (TNFRSF6) was shown to be essential for the formation of homotypic, ligand-independent receptor complexes (10). The situation is more complex for the TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL), another TNF family member that binds five different receptors: two fully functional death receptors, TRAIL-R1 (TNFRSF10A) and TRAIL-R2 (TNFRSF10B), two membrane bound "decoy" receptors, TRAIL-R3 (TNFRSF10C) and TRAIL-R4 (TNFRSF10D), and a soluble decoy receptor, OPG (TNFRSF11B). Decoy receptors inhibit cell death by competing for TRAIL binding. However, inhibition of TRAIL-induced apoptosis by TRAIL-R4 critically depends on its association with TRAIL-R2 via the N-terminal domain containing the first partial CRD of both receptors. Thus, in contrast to homotypic TNFR1 or Fas complexes, TRAIL-R2 and TRAIL-R4 form mixed complexes as a means to regulate TRAIL-induced apoptosis (11).

The present study focuses on CD40 (TNFRSF5). Engagement of CD40 by CD40L leads to CD40 clustering, recruitment of TNFR-associated factors, and activation, among others, of the transcription factor NF-κB (12, 13). CD40 is expressed mainly on professional antigen-presenting cells, *i.e.* dendritic cells, macrophages, and B cells (14), and its activation is essential for the development of humoral and cellular immune responses. Thus, selective blockade or activation of CD40 is of pharmacological interest. The crystal structure of CD40-CD40L was recently solved showing that CRD2 and CRD3 are both involved in CD40L binding (15); however, little is known about the function of CRD1 and CRD4.

Here, we show that CD40 exists as preformed, noncovalent dimers on the cell surface and that dimerization is dependent on the extracellular region. Mutation of K^{29} in CRD1 impaired CD40 self-assembly. Recombinant CD40-CRD1 bound the extracellular domain of CD40 with a K_D of approximately 0.6 μM and displayed an agonist-like activity on CD40-expressing cells such as human dendritic cells. Co-incubation of CD40-CRD1 with CD40L potentiated the NF-κB response induced by CD40L alone, suggesting that CRD1 interactions participate in CD40 signaling. These observations provide a novel means to manipulate CD40 signaling.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Cell Lines and Reagents—Human embryonic kidney HEK293 cells were grown in RPMI 1640 medium (Lonza, Basel) supplemented with 10% fetal calf serum and 5 μg/ml penicillin and streptomycin. Anti-CD40 (clone C20) monoclonal antibody from Santa Cruz Biotechnology and horseradish peroxidase-coupled anti-myc antibody from Life Technologies were used for Western blot analysis. Two different CD40L (CD154) were used as indicated: muCD8-CD40L (Ancell) and Mega-CD40L (Adipogen). Antibodies for flow cytometry analysis were purchased from BD Biosciences: Pacific blue CD14 and PerCp5.5 HLA-DR were used for monocyte purification control; PE-Cy7 CD86, PerCp5.5 HLA-DR, and APC CD83 were used to follow monocyte-derived dendritic cell maturation.

Molecular Cross-linking at the Cell Surface—Approximately 2×10^7 HEK293 cells stably expressing CD40 or BJAB cells were washed three times with ice-cold PBS (pH 8) within the culture flask (HEK cells) or in 15-ml tubes (BJAB cells). BS^3 cross-linker (Thermo Scientific) was added at a final concentration of 3 mM for 1 h at 4 °C. The reaction was quenched by the addition of Tris at a final concentration of 20 mM for 15 min. Cells were then harvested and analyzed by Western blotting.

Recombinant Proteins—myc-H-tagged CD40 was produced in HEK293 cells using the mammalian expression vector pSectag2-Hy (Life Technologies) and purified from cell culture supernatant by nickel affinity chromatography. The encoded mature protein sequence was DAAQPAMNS, followed by amino acids 20–193 of human CD40 and the sequence QAAARGGPEQKLISEEDLNSAVDHHHHHH. The CRD1 of CD40 was expressed in *Escherichia coli* BL21 Rosseta-gami 2 using the expression vector $pET22b^+$ (Merck). The encoded protein sequence was MDIGINSDPNS, followed by amino acids 20–62 of human CD40 and the sequence AAALEHHHHHH. Mutations K29A, K29E, C26Q, or the triple mutation C37G/C38G/C41G was introduced by conventional molecular biology techniques. Bacteria were induced for production of the proteins at an $A_{600\ nm}$ of 0.6 with 0.5 mM isopropyl β-D-thiogalactoside for 16 h at 20 °C. Soluble periplasmic proteins were extracted and purified by nickel affinity chromatography as described in Ref. 16.

Mass Spectrometry—Prior to mass analysis, protein samples were dialyzed against 200 mM ammonium acetate on Amicon Ultra-4 centrifugal filter unit-10000NMWL (Millipore). Mass spectrometry was performed on an ESI-TOF mass spectrometer Q-TOF micro. Purity and homogeneity were verified by mass analysis in denaturing conditions: the protein was diluted to a concentration of 0.3 μM in water-acetonitrile (1:10, v/v) acidified with 1% formic acid.

In nondenaturing conditions, the mass measurement of the protein was performed in 50 mM ammonium acetate with 10% isopropyl alcohol, to preserve the native conformation. The protein was injected at 2.0 μM. Clusters of Cs(n+1)In were used for the calibration of the extended masse range in the high m/z region. Mass data were acquired in the positive ion mode on the mass range 1000–10,000 m/z. CD40 deglycosylation was performed using the deglycosylation mix from New England Biolabs following the manufacturer's instructions.

Molecular Modeling—All procedures were performed with Discovery Studio 2.5 software from Accelrys (San Diego, CA). The crystal structure of the ligand-free TNFR1 (Protein Data Bank (PDB) ID code 1NCF) was used as template to build a model of dimeric CD40. The receptor monomer corresponds to the crystal structure of the complex CD40-CD40L (PDB ID code 3QD6). A fixed atom constraint was applied to both C-terminal residues, and the dimeric CD40 model was subjected to an initial minimization step (maximum 500), root-mean-square (RMS) gradient 0.1 kcal/mol by conjugated gradient; followed by a second minimization step (maximum 500), RMS gradient 0.0001 kcal/mol by conjugated gradient. The structure was then submitted to a dynamic simulation including heating

Downloaded from http://www.jbc.org/ at Université Louis Pasteur on December 2, 2014

(2000 steps), equilibration (1000 steps), and production (1000 steps) at 300 K with a time step of 0.001 ps under a distance-dependent, dielectric constant, implicit solvent model. A negative intermolecular energy of −361.5 kcal/mol was obtained for the complex under these conditions. *In silico* mutation K29A produced an increase on the interaction energy to −218.0 kcal/mol, indicating a less stable complex. All images were generated using the PyMOL Molecular Graphics System, version 1.0 (Schrödinger, LLC).

FRET Experiments—CD40-ECFP, CD40-EYFP, and the negative control ERBB2-EYFP C-terminal fusion proteins all contained the full-length receptor sequences. Mutations K29A and K29E were introduced by site-directed mutagenesis. Experiments were performed using a LSRII (BD Biosciences) flow cytometer instrument. EYFP signal was recorded using the 488-nm laser with a 530/30 filter; the ECFP signal was recorded using the 405-nm laser with a 450/50 filter, and FRET signal was recorded using the 405-nm laser with a 585/42 filter. For each condition we evaluated a minimum of 10,000 ECFP-EYFP double-positive cells. HEK293 cells were transiently transfected with ECFP and EYFP fusion receptors and analyzed at 16 h after transfection. Positive FRET cells were gated using an ECFP-EYFP fusion protein as positive control and a co-transfection of EFCP and EYFP as negative control according to Ref. 17.

Surface Plasmon Resonance—The Biacore 3000 system, sensor chip CM5, surfactant P20, amine coupling kit containing *N*-hydroxysuccinimide and EDAC and ethanolamine were from Biacore (Uppsala, Sweden). Biosensor assays were performed with HBS-EP buffer as running buffer (10 mM HEPES, 150 mM sodium chloride, 3 mM EDTA 0.005% surfactant P20 (pH 7.4)). The low carboxylated dextran matrix (B1) was activated with 35 μl of a mixture 0.2 M EDAC and 0.05 M *N*-hydroxysuccinimide at 5 μl/min. The anti-myc antibody (Life Technologies) was immobilized with the standard Biacore protocol at ~2000 resonance units (RU) per channel. Soluble CD40-myc tag fusion protein was injected for 30 s, then increasing concentrations of recombinant CRD1 were injected for 2 min, followed by a dissociation phase of 3 min at a flow rate of 30 μl/min. All dilutions were performed in running buffer. The sensor chip surface was regenerated after each experiment by injecting 20 μl of 3 M $MgCl_2$. The kinetic parameters were calculated using BIAeval 4.1 software. Analysis was performed using the simple Langmuir binding model. The specific binding profiles were obtained after subtracting the response signal from the control anti-myc antibody alone channel and from blank-buffer injection. The fitting to each model was judged by the chi square ($\chi 2$) value and randomness of residue distribution compared with the theoretical model. Active concentration was determined under mass transfer condition where the slope of the curves is directly correlated with the active concentration of the protein (18).

Luciferase Reporter Assay—HEK293 cells stably expressing either wt CD40 or CD40-K29A were cultured in 24 well plates at 3×10^5 cell/ml. After 24 h cells were transfected with control luciferase vectors or promoter specific luciferase reporter vectors (Panomics, Fremont, CA), using FuGENE6 transfection reagent (Roche Applied Science). Reporter luciferase assays were performed for STAT3, AP1, CRE, NF-κB, and SRE that all are CD40L-activated transcription factors. After 24h, cells were treated with CD40L or a recombinant CD40-CRD1 protein at the indicated concentrations in the presence of 20 μg/ml polymyxin B (Fluka, St. Louis, MO). After 16 h cells were lysed and luciferase activity was determined using a Wallac Victor^2 1420 multilabel counter (PerkinElmer Life Sciences) according to instructions of the Promega luciferase assay system. Dual luciferase assay was performed using NF-κB reporter plasmid together with *Renilla* luciferase plasmid for normalization. Detection of firefly luciferase and *Renilla* luciferase expression was done using the dual luciferase assay detection kit (Promega).

Monocyte-derived Dendritic Cell Differentiation and Maturation—Elutriated monocytes were obtained from the Etablissement Français du Sang (EFS; Strasbourg, France). Monocytes were cultured in RPMI 1640 medium with Ultraglutamine (Lonza) supplemented with 10 μg/ml gentamycin, 2 mM HEPES, and 10% heat-inactivated fetal calf serum. At day 0, cells were seeded at a density of 4×10^6 cells/well in a 6-wells plate, and differentiation into CD209-positive dendritic cells was induced by addition of 5 ng/ml GM-CSF^{HuXp} and 5 ng/ml IL-4^{HuXp} (Humanzyme, Chicago, IL). At day 5, when >80% of the cells expressed CD209 (data not shown), cells were incubated with the indicated stimuli in the presence or absence of 100 μg/ml polymyxin B (Fluka). After 24 h of culture, cells were harvested and washed with 2 ml of cold PBS, and maturation maker expression was analyzed by flow cytometry.

Flow Cytometry Analysis—Cells were stained in PBS containing 2% fetal calf serum at 4 °C for 20 min with the various antibodies used at concentration recommended by the manufacturer. After two washes in PBS, cells were analyzed by flow cytometry with a Gallios flow cytometer (Beckman Coulter). At least 10,000 events were acquired for each experiment, and the data were processed with the Kaluza® Flow Analysis Software (Beckman Coulter).

Statistical Analysis—FRET experiments were analyzed using one-way ANOVA with Tukey post test, and luciferase NF-κB and monocyte-derived dendritic cell maturation assays were analyzed using two-way ANOVA with Bonferroni post test, using GraphPad Prism version 5.00 for Windows (GraphPad Software).

RESULTS

CD40 Dimerizes through the Extracellular Region—To define the oligomerization state of CD40 in the absence of ligand, HEK cells stably transfected with full-length WT CD40 were chemically cross-linked with the nonpermeable reagent BS^3. Western blot analysis revealed that a portion of CD40, migrating at ~45 kDa, shifted to a dimer of ~90 kDa in cross-linked cell lysates (Fig. 1*A*). Some CD40 dimer was also observed in the B cell lymphoma BJAB cell line that expresses endogenous CD40 (Fig. 1*A*). To define the contribution of the extracellular region to dimerization, soluble CD40 fused to the nonoligomerizing myc and H tags was produced in mammalian cells. This soluble CD40 bound CD154 in a surface plasmon resonance assay (data not shown). Under denaturing SDS-PAGE, soluble CD40 migrated as a band of ~36 kDa under both reducing and nonreducing conditions, but the same protein eluted with an appar-

Downloaded from http://www.jbc.org/ at Université Louis Pasteur on December 2, 2014

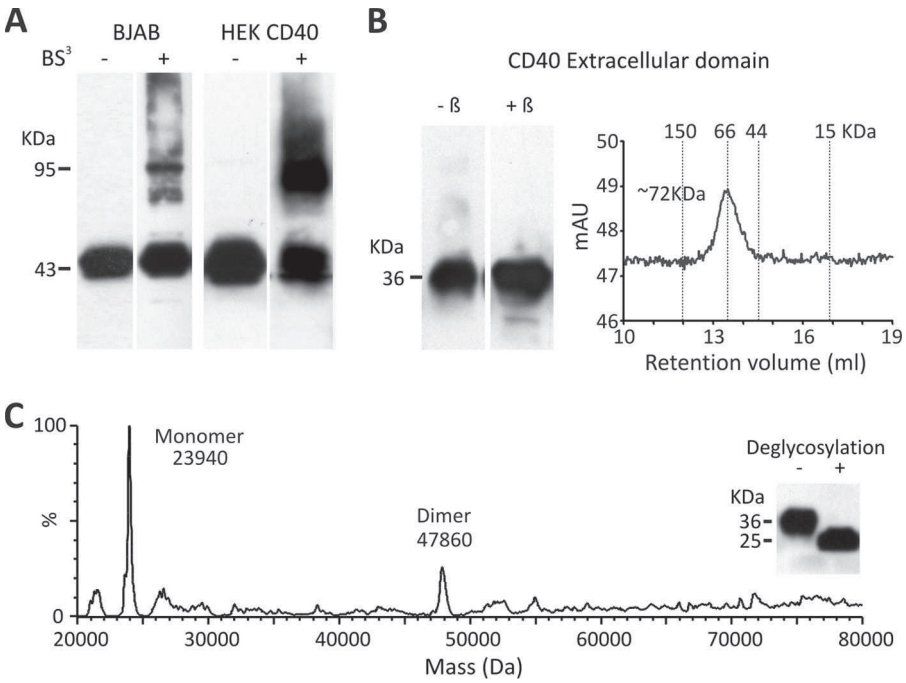


FIGURE 1. **CD40 dimerizes through the extracellular region.** *A*, BJAB cells and stably transfected CD40 HEK cells were treated or not with the nonpermeable chemical cross-linker BS^3. CD40 was then detected by Western blotting with an anti-CD40 antibody. *B*, the recombinant extracellular region of CD40 was analyzed by SDS-PAGE in the presence or absence of β-mercaptoethanol (*left*) and by size exclusion chromatography (*right*). *C*, native mass spectrometry analysis of the recombinant extracellular region of CD40 is shown. The protein was deglycosylated before native mass analysis. The *inset* shows a Western blot analysis of soluble CD40 before and after deglycosylation.

ent molecular mass of ~72 kDa from a size exclusion chromatography column, suggesting that it may form roughly globular dimers (Fig. 1*B*). Although glycosylation interfered with ionization of soluble CD40 in native mass spectrometry (supplemental Fig. 1), the deglycosylated protein behaved well in this assay which allowed detection of two peaks at masses of 23.94 and 47.86 kDa, corresponding relatively closely to expected theoretical values for the nonglycosylated monomeric (23.4 kDa) and dimeric (46.7 kDa) CD40 (Fig. 1*C*). Taken together, these results indicate that at least a fraction of CD40 can self-assemble in the absence of ligand, most probably as a noncovalent homodimer.

CD40-CRD1 Mediates Self-interaction of CD40—To define the site required for CD40 self-assembly, we first constructed a model of a CD40 dimer based on the structures of the parallel TNFR1 dimer (PDB ID code1NCF) and ligand-bound CD40 (PDB ID code 3QD6). The rational was that (i) the structure of monomeric (liganded) and dimeric (unliganded) TNFR1 differ strongly in CRD1, suggesting that this domain is important for self-assembly (supplemental Fig. 2*A*); (ii) lymphotoxin α-TNFR1 is the closest available crystal structure to CD40-CD40L (15); and given that (iii) CRD1 and 2 of TNFR1 and CD40 superimpose with a Cα root mean square deviation of 1.05 Å, chances of getting a relevant model were good (supplemental Fig. 2*B*).

The model suggested the involvement of the CRD1 domain in CD40 self-assembly, with an important contribution of K^{29} (Fig. 2*A*). We therefore generated full-length CD40 constructs with mutation K29A, K29E, or with mutations predicted to disrupt folding of the first A1 sub-domain (C26Q) or of the entire CRD1 (triple cysteine mutant C37G/C38G/C41G: mutC), or lacking CRD1 but retaining the signal peptide (CD40ΔCRD1) (Fig. 2*B*). With the exception of the K29A and K29E mutants, all other untagged or EYFP-tagged CD40 CRD1 mutants were retained in the endoplasmic reticulum, failed to reach the cell surface efficiently, and did not respond to exogenously added CD40L (Fig. 2*C* and supplemental Figs. 3, 4, and 5*A*), indicating that CD40 is sensitive to mutations affecting normal folding of its CRD1. In line with these results, steered molecular dynamic simulation showed strong local perturbations in CD40-CRD1 in the case of C26Q and mutC mutations and strong local perturbations in CD40-CRD2 in the case of the ΔCRD1 construct (supplemental Fig. 5*B*). As mentioned above, the CD40 dimer model suggested a contribution of K^{29} in receptor dimerization, and it is noteworthy that this residue is conserved in human and mouse CD40. *In silico* mutation of this residue to an alanine increased the interaction energies from −361 kcal/mol to −219 kcal/mol, highlighting its importance in receptor dimerization. We also introduced the mutation K29E to obtain a stronger effect by charge repulsion. Neither the K29A nor K29E mutation altered the surface expression of CD40 (Fig. 2*D*). Furthermore, CD40L-induced NF-κB activity was similar in the WT CD40 cell line compared with the mutant cell lines K29A and K29E (Fig. 2*E*). Under the same conditions, no activity was observed in the CD40 cell line lacking the intracellular domain (CD40-ΔICD). However, the ability of the CD40 K29A or K29E mutant to produce FRET signals with either themselves or with WT CD40 was reduced by approximately 50%, supporting the notion that K^{29} is involved in CRD1-mediated dimerization of CD40 (Fig. 3*A*). Finally, chemical cross-linking of untagged mutant or WT CD40 showed a marked reduction of dimeric

Downloaded from http://www.jbc.org/ at Université Louis Pasteur on December 2, 2014

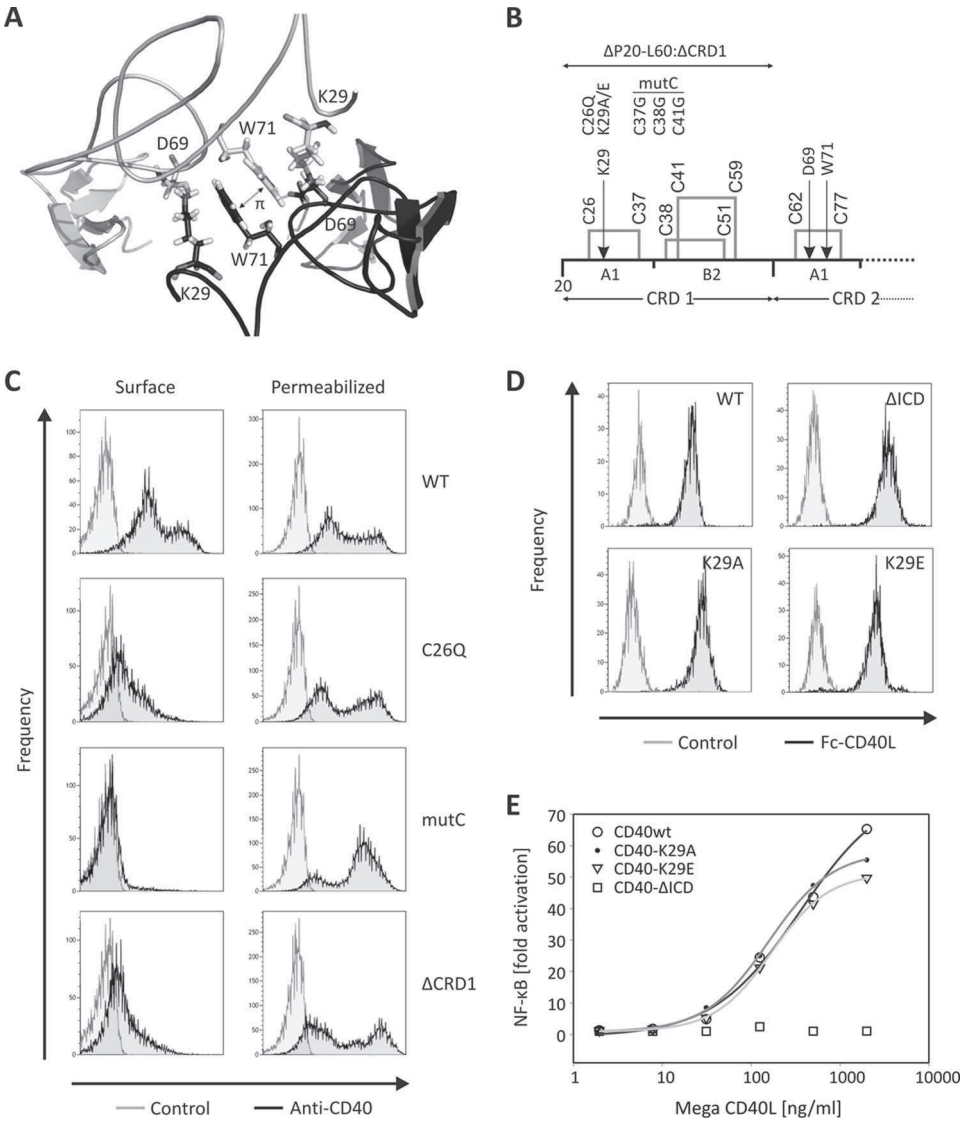


FIGURE 2. **CD40-CRD1 is required for normal surface expression.** *A*, detail of the CD40 dimer model in the region of CRD1-CRD1 interaction, showing side chains of K^{29}, D^{49}, and W^{71}. *B*, schematic representation of the CRD1 domain of CD40 with disulfide bridges *highlighted*. Mutations tested are indicated. *C*, flow cytometry analysis of HEK293 cells transfected with untagged WT or mutant CD40 constructs. Staining was performed with an anti-CD40 antibody in permeabilized or nonpermeabilized (surface) conditions. *D*, flow cytometry analysis of different CD40-HEK293 stable cell lines used in this study. Staining was performed with Fc-CD40L followed by anti-human Fc-PE. *E*, dose response of CD40L in a NF-κB luciferase activity assay in different CD40-expressing HEK cell lines (CD40-WT, CD40-K29A, CD40-K29E, and CD40-ΔICD).

species at the cell surface when using both mutant receptors compared with WT CD40 (Fig. 3*B*).

Recombinant CD40-CRD1 Binds to CD40—Although the isolated CD40-CRD1 was poorly secreted in HEK cells, it was successfully produced in a prokaryotic expression system with human-compatible tRNAs and enhanced ability to form disulfide bridges. CD40-CRD1 was also expressed with the K29A, K29E, and CRD1-disrupting mutations C26Q or mutC (Fig. 4*A*). All CRD1 molecules migrated on SDS-PAGE with an apparent molecular mass of ~16 kDa despite their theoretical molecular mass of ~8 kDa. Wild-type CD40-CRD1 bound to the extracellular domain of CD40 with a K_D of 5.7×10^{-7} M (k_{on} 2.04×10^3 M^{-1} s^{-1} and k_{off} 1.16×10^{-3} s^{-1}), as determined by surface plasmon resonance analysis, whereas no binding was detected for both cysteine mutants (Fig. 4*B* and supplemental Fig. 6). These data show the importance of an adequate CRD1 folding for binding to CD40. Of note, using surface plasmon resonance, the active concentration of CD40-CRD1 was estimated to be 4.7% of the total protein. In all experiments, the mentioned concentration of CD40-CRD1 is that of the active protein. The concentration of CRD1 mutants was estimated also as 4.7% of the total protein although it was not possible to estimate its active fraction because there is no detectable binding to CD40.

Recombinant CD40-CRD1 Induces a Mild Ligand-like Activity and Potentiates CD40L Signals—As expected, an overnight stimulation of CD40-expressing cells with CD40L activated the NF-κB transcription factor and induced expression of a NF-κB luciferase reporter gene (Fig. 4*C*). Surprisingly, soluble CD40-CRD1 showed a weak agonistic activity on WT CD40-expressing HEK cells, but not on cells expressing CD40-K29A, CD40-K29E, or CD40 lacking the intracellular domain (CD40-ΔICD)

Downloaded from http://www.jbc.org/ at Université Louis Pasteur on December 2, 2014

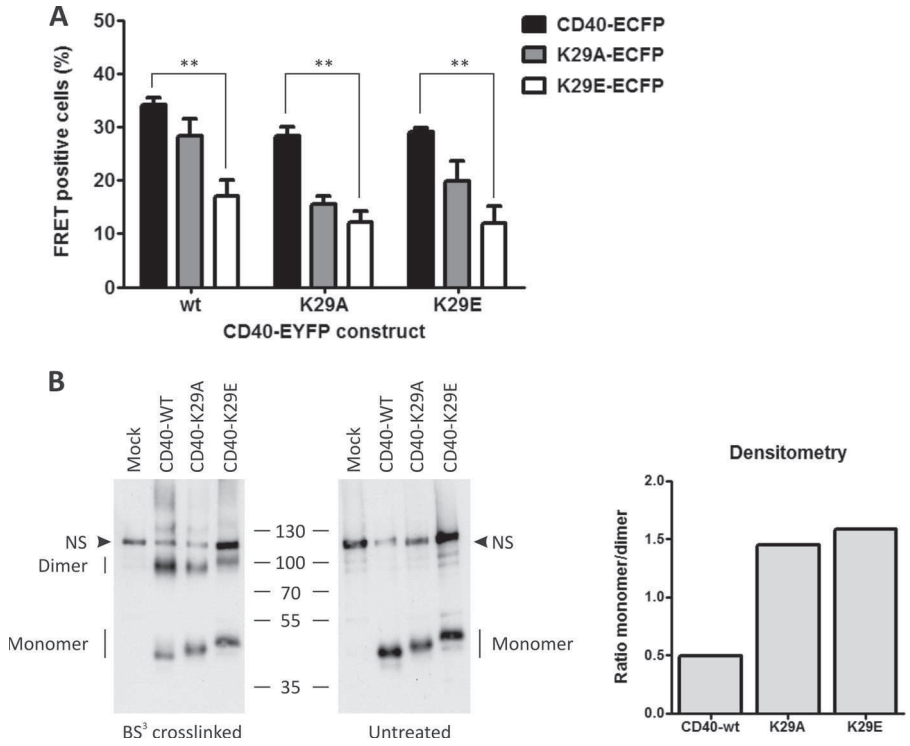


FIGURE 3. **Mutations of lysine 29 disrupt CD40 self-assembly.** *A*, cytometric FRET analysis was performed of CD40 interaction with WT CD40, CD40-K29A, or CD40-K29E, using both ECFP and EYFP fusion combinations. Mean values with S.E. (*error bars*) of three independent experiments are shown (**, $p < 0.01$). *B*, CD40 stable cell lines (WT, K29A, and K29E) were treated or not with the nonpermeable chemical cross-linker BS^3. CD40 was then detected by Western blotting with an anti-CD40 antibody. Densitometry analysis is shown on the *right* as a ratio between monomeric and dimeric receptors. *NS*, nonspecific signal.

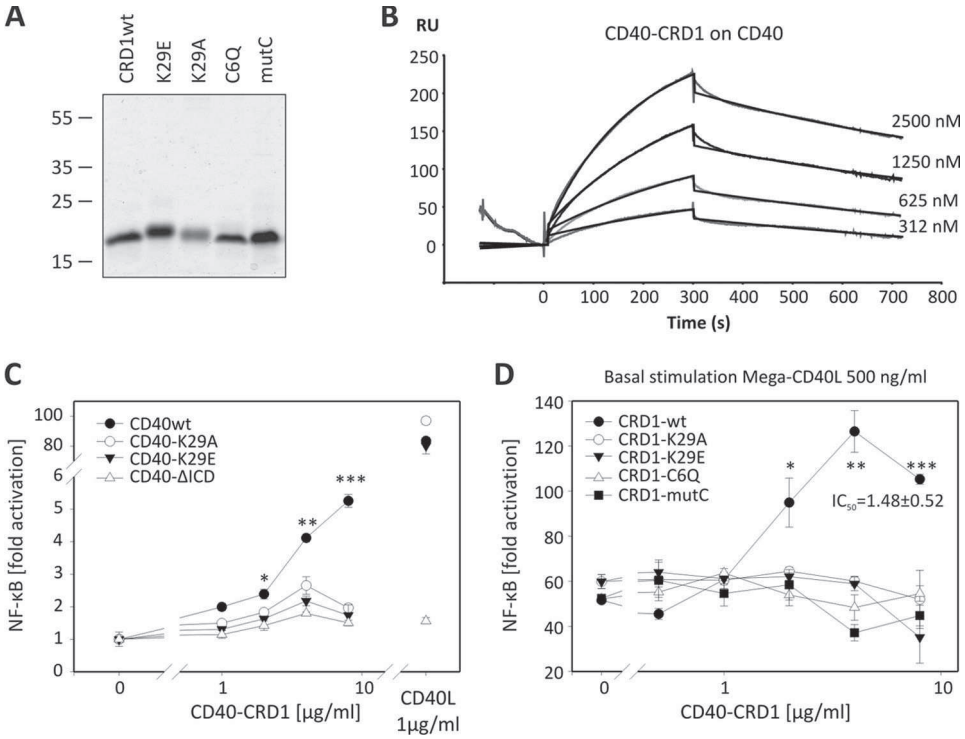


FIGURE 4. **Recombinant CD40-CRD1 binds to CD40 and potentiates CD40L activity.** *A*, purified CD40-CRD1, CRD1-K29E, CRD1-K29A, CRD1-C6Q, and CRD1-mutC (20 μg of protein/lane) were resolved by SDS-PAGE and stained with Coomassie Blue. *B*, Biacore sensorgram of CD40-CRD1 binding to the entire extracellular domain of CD40. *C*, luciferase reporter assay for NF-κB activity in different CD40 HEK cell lines (CD40wt, CD40-K29A, CD40-K29E, and CD40-ΔICD) treated with recombinant soluble CD40-CRD1. Untreated cells are shown on the *left*, and Mega-CD40L-stimulated cells are shown on the *right*. *D*, luciferase reporter NF-κB assay in HEK CD40 cell line treated with 500 ng/ml CD40L and increasing concentrations of recombinant soluble CD40-CRD1, CRD1-K29A, CRD1-K29E, CRD1-C6Q, and CRD1-mutC. Mean values with S.E. (*error bars*) of three independent experiments are shown (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$).

Downloaded from http://www.jbc.org/ at Université Louis Pasteur on December 2, 2014

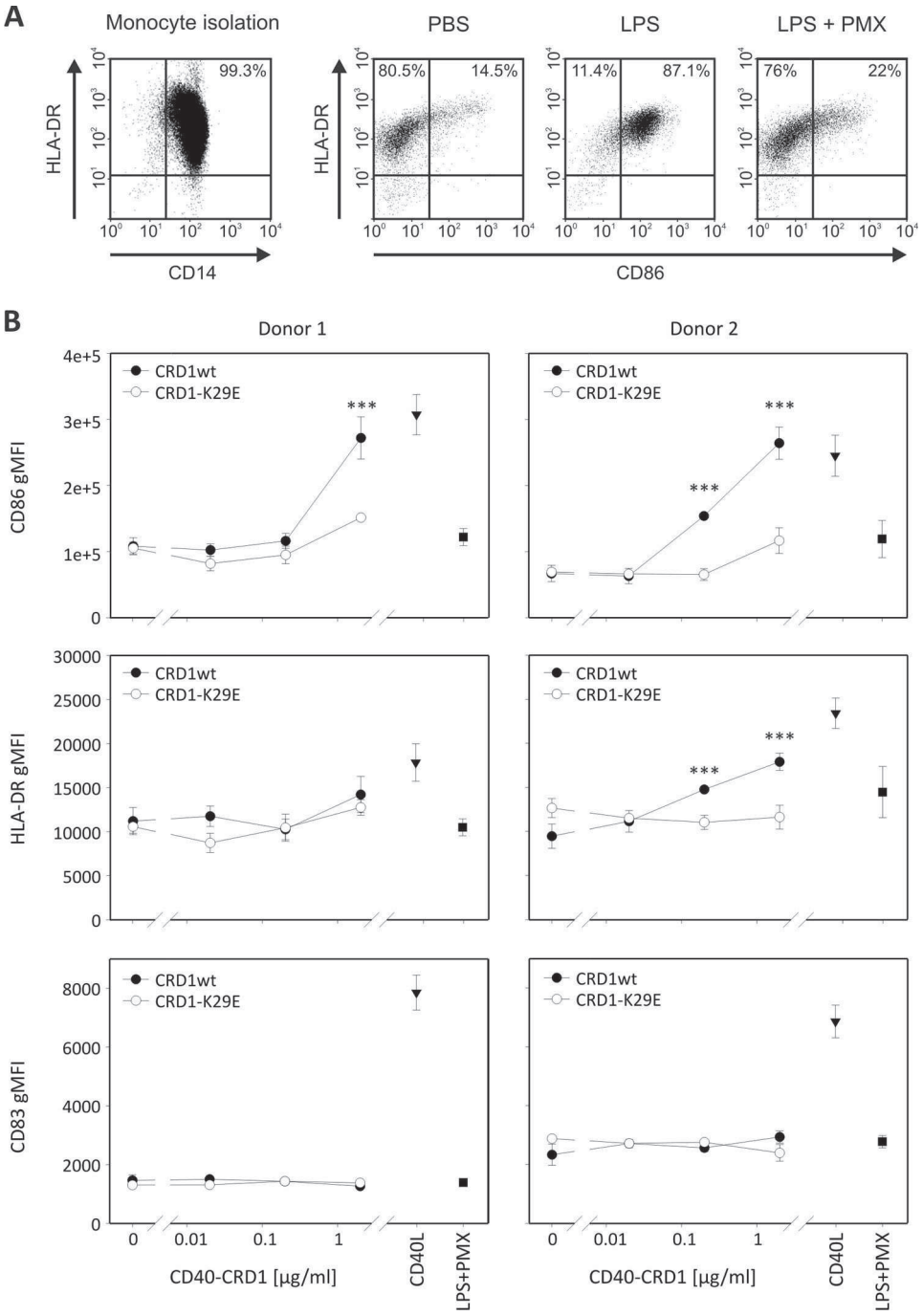


FIGURE 5. **Recombinant CD40-CRD1 induces maturation of human monocyte-derived dendritic cells.** *A*, CD14-positive cells (scattergram on the *left*) were cultured in the presence of IL-4 and GM-CSF for 5 days. Cells were then treated for 24 h with PBS (vehicle), LPS (10 μg/ml), or LPS plus polymyxin B (100 μg/ml) (*LPS+PMX*) and analyzed for expression of activation markers CD86 and HLA-DR on CD209-positive cells. *B*, expression of maturation markers CD86, HLA-DR, and CD83 (geo-mean, *gMFI*) was assessed after treatment with the indicated concentrations of recombinant WT CD40-CRD1 or CD40-CRD1-K29E in the presence of polymyxin B (100 μg/ml). Control treatments CD40L (Mega-CD40L 200 ng/ml) and LPS plus polymyxin B (100 μg/ml) are also shown for each donor. Mean value with S.E. (*error bars*) of triplicates are shown (***, $p < 0.001$). Data are representative of two independent experiments performed on a total of three different donors.

(Fig. 4*C*). Furthermore, WT CRD1, but not the mutants, potentiated CD40L-induced NF-κB activation by up to 2-fold, with an IC_{50} of approximately 1.5 $\pm$ 0.5 μg/ml (Fig. 4*D*). In line with the observation that WT CD40-CRD1 could induce NF-κB activity in cells expressing WT CD40, but not in cells expressing mutant CD40, recombinant mutant CD40-CRD1 proteins were unable to increase CD40L activity in WT CD40 HEK cells. Because the CRD1 of CD40 does not interact with CD40L in the crystallographic structure of the CD40-CD40L complex (15), we believe that the observed signal potentiation results from independent effects of CD40-CRD1 and CD40L on membrane CD40.

When human monocyte-derived dendritic cells from different donors were treated with increasing concentrations of WT CD40-CRD1, the surface maturation markers CD86 and HLA-DR were up-regulated (Fig. 5). This effect occurred in the

Downloaded from http://www.jbc.org/ at Université Louis Pasteur on December 2, 2014

presence of the LPS inhibitor polymyxin B (19) at a dose sufficient to fully inhibit up to 10 μg/ml LPS (Fig. 5*A*), making it unlikely that it was endotoxin-mediated. Moreover, CD40-CRD1 K29E was markedly less potent than its WT counterpart at stimulating dendritic cells. Unlike CD40L, WT CD40-CRD1 taken alone failed to up-regulate the activation marker CD83, suggesting that it is less potent than CD40L (Fig. 5*B*). When dendritic cells were treated simultaneously with WT CD40-CRD1 and CD40L, a modest potentiation of CD40L-induced activation was observed at low doses of recombinant CD40-CRD1 (supplemental Fig. 7, *A* and *B*). Taken together, our results suggest that the CRD1 of CD40 can increase CD40-dependent signals in target cells, alone or in cooperation with CD40L.

DISCUSSION

Although it is well established that CD154 (CD40L) assembles as a trimer, not much research has been conducted on CD40 oligomerization before ligand engagement and on the potential functional effect of this oligomerization. Reports from Mourad and colleagues suggested that CD40 at the cell surface exist as disulfide-linked dimers and that disulfide-linked homodimerization was increased by CD40L (20–22). However, all cysteine residues in the extracellular region of CD40 and other crystallized TNFR family members are engaged in intrachain disulfide bridges, making it unlikely that CD40 would dimerize through interchain extracellular covalent bonds.

In the present study, we show that CD40 can self-assemble at the cell surface in a noncovalent manner, probably as dimers. Soluble CD40 also dimerizes, suggesting that the extracellular domain plays an important role in dimer formation. In addition, *in silico* modelization and site-directed mutagenesis confirmed the role of CD40-CRD1 in receptor-receptor interactions. Until now, only TNFR1 and DcR3 have been crystallized as ligand-free receptors. TNFR1 crystallized as both parallel and anti-parallel dimers (6). The parallel dimer was stabilized by interactions involving CRD1 and exposed fully accessible TNF binding sites in CRD2 and CRD3. In contrast, the anti-parallel dimer was stabilized by interactions involving CRD1 and CRD2 that occluded the TNF binding sites. Parallel TNFR dimers are favored at neutral pH, whereas anti-parallel TNFR dimers are favored at acidic pH (7). This observation led to the hypothesis that parallel dimers may occur at the cell surface and could serve to create an activation network in the presence of ligand, in contrast to anti-parallel dimers that may form upon acidification of endocytic vesicles and release the ligand from the complex (7). Unliganded DcR3 was also crystallized as parallel dimers, with the main contact area in CRD1 and 4 and an accessible ligand binding site to its ligand TL1A (9). Sedimentation equilibrium analyses of DcR3 showed weak self-association, with an estimated equilibrium dissociation constant greater than 2.4×10^{-3} M, a low value if we consider that the physiological concentration of this soluble receptor is in the range of 10^{-12} pM (23). Interestingly, the CRD1-CRD1 interaction surface modeled for CD40 in our study superimposed relatively well with the interaction surface found between the CRD1 of the TNF receptor HVEM and the immunomodulatory protein BTLA in the HVEM-BTLA complex (24). Therefore, a CRD1 seems to use the same interface to interact with another CRD1 (as in the TNFR1 dimer) or with a regulatory protein. The CRD1 could therefore be considered as an interaction domain that regulates receptor activity by interacting either with itself or with other proteins such as BTLA.

Using surface plasmon resonance, an equilibrium dissociation constant of 5.7×10^{-7} M was determined for the interaction between CD40 and recombinant CD40-CRD1. Although this equilibrium constant is rather low, it may still be relevant because local protein concentrations on the cell membrane can be high, especially in some microdomains, and because other interaction sites outside CRD1 may also participate to dimerization. These results raise the question of whether the active form of the receptor is the dimeric or the monomeric form and whether receptor dimers persist after ligand engagement. Further analyses are warranted to address these questions.

The CRD1 of TNFR1 fused to glutathione *S*-transferase as been described previously as an inhibitor of TNFR1-mediated signaling (25). This molecule could block the effects of TNF *in vitro* and was shown to inhibit arthritis in mice (25). Unfortunately, this study was not designed to address the molecular basis of these effects, nor did it test the potential impact of glutathione *S*-transferase-induced dimerization on CRD1 activity. In the case of Fas, the study of dominant interfering mutations associated with autoimmune lymphoproliferative syndrome revealed that Fas CRD1 was fully preserved in all dominant interfering mutations, including mutations that truncate Fas after 57 or 62 amino acids of the mature Fas protein and that would be unable to bind FasL (10). In addition, deletion of CRD1 in dominant negative inhibitory receptors restored susceptibility to FasL-induced apoptosis, indicating that mutant proteins must physically interact with wild-type proteins to create a nonfunctional complex. Although the phenotype of patients provides strong genetic evidence for a dominant negative function of the N-terminal portion of Fas, results obtained with N-terminal Fas deletion mutants must be taken with caution in view of our results demonstrating that CRD1 disruption prevents CD40 surface expression. At least for CD40, N-terminal truncation or severe perturbations of CRD1 structures are not appropriate to study CRD1 function. In any case, the studies mentioned above indicate that the N-terminal portions of TNFR1 and Fas taken alone antagonize receptor signaling.

Because of the described inhibitory activity of TNFR1 and Fas CRD1, the ability of recombinant CD40-CRD1 to induce a weak CD40 activation rather than an inhibition of NF-κB signaling was unexpected. A gross artifact can probably be excluded because NF-κB activation was CD40-dependent and because CRD1 disruption mutants were ineffective. The agonist activity of CD40-CRD1 could be explained in several ways: (i) if CD40 is inhibited by dimerization, then recombinant CRD1 may activate CD40 by disrupting the dimers; (ii) recombinant CRD1 could oligomerize CD40 on the cell surface, inducing an agonist-like signaling; and (iii) recombinant CRD1 may induce conformational changes in the receptor similar to those induced by the ligand upon signal activation. Importantly, the agonist activity of CD40-CRD1 was not restricted to

Downloaded from http://www.jbc.org/ at Université Louis Pasteur on December 2, 2014

cells overexpressing CD40, but was also observed in primary, monocyte-derived dendritic cells. However, the observation that CD40-CRD1 was unable to induce the full set of activation markers in dendritic cells probably indicates a weak agonist activity compared with CD40L.

Altogether, our result have revealed the ability of CD40 to self-assemble through its cysteine-rich domain 1 and the ability of recombinant CD40-CRD1 to potentiate CD40L in HEK CD40 cells and to induce a ligand-like activity in human dendritic cells. Our data indicate that CD40 homo-dimerization controls signaling, possibly by maintaining the receptor in a quiescent state, although further studies are needed to elucidate mechanisms mediating receptor activation.

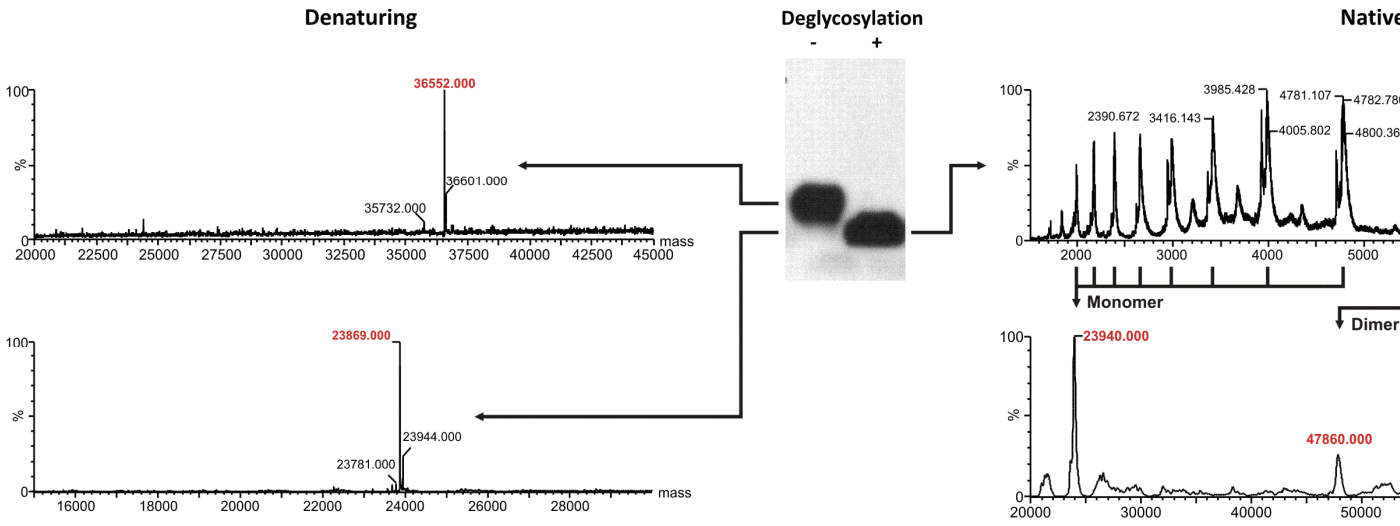
Acknowledgments—We thank Dr. Sylviane Muller (UPR 9021 Strasbourg, France) for constant support and encouragement; Laure Willen (University of Lausanne) for expert technical assistance in plasmid cloning; Marie-Christine Rio and Fabien Alpy for kindly providing the ERBB2-EYFP construct; and Pedro Romero and Petra Baumgaertner (University of Lausanne) for helpful discussions, advice, and assistance in monocyte-derived dendritic cell assay.

REFERENCES

1. Tetsch, L., and Jung, K. (2009) How are signals transduced across the cytoplasmic membrane? Transport proteins as transmitter of information. *Amino Acids* **37,** 467–477
2. Heldin, C. H. (1995) Dimerization of cell surface receptors in signal transduction. *Cell* **80,** 213–223
3. Bodmer, J. L., Schneider, P., and Tschopp, J. (2002) The molecular architecture of the TNF superfamily. *Trends Biochem. Sci.* **27,** 19–26
4. Holler, N., Tardivel, A., Kovacsovics-Bankowski, M., Hertig, S., Gaide, O., Martinon, F., Tinel, A., Deperthes, D., Calderara, S., Schulthess, T., Engel, J., Schneider, P., and Tschopp, J. (2003) Two adjacent trimeric Fas ligands are required for Fas signaling and formation of a death-inducing signaling complex. *Mol. Cell. Biol.* **23,** 1428–1440
5. Haswell, L. E., Glennie, M. J., and Al-Shamkhani, A. (2001) Analysis of the oligomeric requirement for signaling by CD40 using soluble multimeric forms of its ligand, CD154. *Eur. J. Immunol.* **31,** 3094–3100
6. Naismith, J. H., Devine, T. Q., Brandhuber, B. J., and Sprang, S. R. (1995) Crystallographic evidence for dimerization of unliganded tumor necrosis factor receptor. *J. Biol. Chem.* **270,** 13303–13307
7. Naismith, J. H., Devine, T. Q., Kohno, T., and Sprang, S. R. (1996) Structures of the extracellular domain of the type I tumor necrosis factor receptor. *Structure* **4,** 1251–1262
8. Chan, F. K., Chun, H. J., Zheng, L., Siegel, R. M., Bui, K. L., and Lenardo, M. J. (2000) A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signaling. *Science* **288,** 2351–2354
9. Zhan, C., Patskovsky, Y., Yan, Q., Li, Z., Ramagopal, U., Cheng, H., Brenowitz, M., Hui, X., Nathenson, S. G., and Almo, S. C. (2011) Decoy strategies: the structure of TL1A:DcR3 complex. *Structure* **19,** 162–171
10. Siegel, R. M., Frederiksen, J. K., Zacharias, D. A., Chan, F. K., Johnson, M., Lynch, D., Tsien, R. Y., and Lenardo, M. J. (2000) Fas preassociation required for apoptosis signaling and dominant inhibition by pathogenic mutations. *Science* **288,** 2354–2357
11. Clancy, L., Mruk, K., Archer, K., Woelfel, M., Mongkolsapaya, J., Screaton, G., Lenardo, M. J., and Chan, F. K. (2005) Preligand assembly domain-mediated ligand-independent association between TRAIL receptor 4 (TR4) and TR2 regulates TRAIL-induced apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102,** 18099–18104
12. Pullen, S. S., Miller, H. G., Everdeen, D. S., Dang, T. T., Crute, J. J., and Kehry, M. R. (1998) CD40-tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) interactions: regulation of CD40 signaling through multiple TRAF binding sites and TRAF hetero-oligomerization. *Biochemistry* **37,** 11836–11845
13. Pullen, S. S., Labadia, M. E., Ingraham, R. H., McWhirter, S. M., Everdeen, D. S., Alber, T., Crute, J. J., and Kehry, M. R. (1999) High-affinity interactions of tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs) and CD40 require TRAF trimerization and CD40 multimerization. *Biochemistry* **38,** 10168–10177
14. van Kooten, C., and Banchereau, J. (2000) CD40-CD40 ligand. *J. Leukoc. Biol.* **67,** 2–17
15. An, H. J., Kim, Y. J., Song, D. H., Park, B. S., Kim, H. M., Lee, J. D., Paik, S. G., Lee, J. O., and Lee, H. (2011) Crystallographic and mutational analysis of the CD40-CD154 complex and its implications for receptor activation. *J. Biol. Chem.* **286,** 11226–11235
16. Smulski, C., Labovsky, V., Levy, G., Hontebeyrie, M., Hoebeke, J., and Levin, M. J. (2006) Structural basis of the cross-reaction between an antibody to the *Trypanosoma cruzi* ribosomal P2β protein and the human β_1 adrenergic receptor. *FASEB J.* **20,** 1396–1406
17. Banning, C., Votteler, J., Hoffmann, D., Koppensteiner, H., Warmer, M., Reimer, R., Kirchhoff, F., Schubert, U., Hauber, J., and Schindler, M. (2010) A flow cytometry-based FRET assay to identify and analyse protein-protein interactions in living cells. *PLoS One* **5,** e9344
18. Richalet-Sécordel, P. M., Rauffer-Bruyère, N., Christensen, L. L., Ofenloch-Haehnle, B., Seidel, C., and Van Regenmortel, M. H. (1997) Concentration measurement of unpurified proteins using biosensor technology under conditions of partial mass transport limitation. *Anal. Biochem.* **249,** 165–173
19. Cardoso, L. S., Araujo, M. I., Góes, A. M., Pacífico, L. G., Oliveira, R. R., and Oliveira, S. C. (2007) Polymyxin B as inhibitor of LPS contamination of *Schistosoma mansoni* recombinant proteins in human cytokine analysis. *Microb. Cell Fact.* **6,** 1
20. Reyes-Moreno, C., Girouard, J., Lapointe, R., Darveau, A., and Mourad, W. (2004) CD40/CD40 homodimers are required for CD40-induced phosphatidylinositol 3-kinase-dependent expression of B7.2 by human B lymphocytes. *J. Biol. Chem.* **279,** 7799–7806
21. Girouard, J., Reyes-Moreno, C., Darveau, A., Akoum, A., and Mourad, W. (2005) Requirement of the extracellular cysteine at position six for CD40/CD40 dimer formation and CD40-induced IL-8 expression. *Mol. Immunol.* **42,** 773–780
22. Reyes-Moreno, C., Sharif-Askari, E., Girouard, J., Léveillé, C., Jundi, M., Akoum, A., Lapointe, R., Darveau, A., and Mourad, W. (2007) Requirement of oxidation-dependent CD40 homodimers for CD154/CD40 bidirectional signaling. *J. Biol. Chem.* **282,** 19473–19480
23. Wu, Y., Han, B., Sheng, H., Lin, M., Moore, P. A., Zhang, J., and Wu, J. (2003) Clinical significance of detecting elevated serum DcR3/TR6/M68 in malignant tumor patients. *Int. J. Cancer* **105,** 724–732
24. Compaan, D. M., Gonzalez, L. C., Tom, I., Loyet, K. M., Eaton, D., and Hymowitz, S. G. (2005) Attenuating lymphocyte activity: the crystal structure of the BTLA-HVEM complex. *J. Biol. Chem.* **280,** 39553–39561
25. Deng, G. M., Zheng, L., Chan, F. K., and Lenardo, M. (2005) Amelioration of inflammatory arthritis by targeting the pre-ligand assembly domain of tumor necrosis factor receptors. *Nat. Med.* **11,** 1066–1072

Downloaded from http://www.jbc.org/ at Université Louis Pasteur on December 2, 2014

Online Supplemental Material

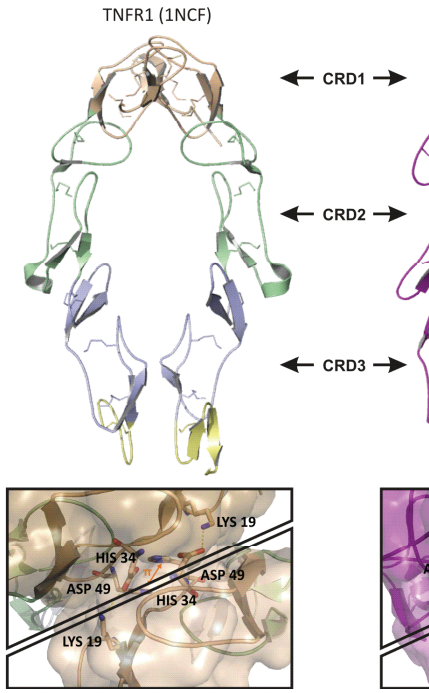


Supplemental Figure 1: **Mass spectrometry analysis of glycosylated and deglycosylated CD40 extracellul** Left panel, denaturing mass analysis of recombinant soluble extracellular CD40 Myc-HIS tagged glycosylat NEB deglycosylation mix. Middle panel, western blot analysis of glycosylated and deglycosylated recombi CD40. The protein was detected with anti-myc antibody. Right panel, native mass spectrometry analys recombinant soluble extracellular CD40. Raw data (up) and deconvoluted data (bottom) is shown.

A

RMSD Å			Parallel Dimer		Antiparallel Dimer		P. Dimer Inh mol		Ligand
			1NCF (A)	1NCF (B)	1EXT (A)	1EXT (B)	1FT4 (A)	1FT4 (B)	1TNR
Parallel Dimer	1NCF (A)	**CRD1**							
		CRD2							
		CRD3							
		Full							
	1NCF (B)	**CRD1**	**0.357**						
		CRD2	0.311						
		CRD3	0.374						
		Full	0.900						
Antiparallel Dimer	1EXT (A)	**CRD1**	**0.513**	**0.445**					
		CRD2	1.186	1.030					
		CRD3	1.155	1.053					
		Full	2.403	2.431					
	1EXT (B)	**CRD1**	**0.567**	**0.478**	**0.409**				
		CRD2	1.052	0.904	0.347				
		CRD3	1.013	1.174	0.528				
		Full	1.802	1.748	1.077				
P. Dimer Inh mol	1FT4 (A)	**CRD1**	**0.583**	**0.603**	**0.628**	**0.613**			
		CRD2	0.679	0.685	1.172	1.020			
		CRD3	1.267	1.104	1.638	1.718			
		Full	1.013	1.061	2.425	1.866			
	1FT4 (B)	**CRD1**	**0.572**	**0.517**	**0.590**	**0.632**	**0.661**		
		CRD2	0.697	0.654	1.060	0.946	0.783		
		CRD3	1.207	1.116	1.762	1.754	1.187		
		Full	1.126	1.111	2.219	1.700	0.991		
Ligand	**1TNR**	**CRD1**	**0.742**	**0.662**	**0.719**	**0.720**	**0.807**	**0.728**	
		CRD2	0.645	0.573	0.741	0.617	0.756	0.737	
		CRD3	0.769	0.788	0.771	0.875	1.362	1.568	
		Full	1.382	1.494	1.428	0.973	1.549	1.486	

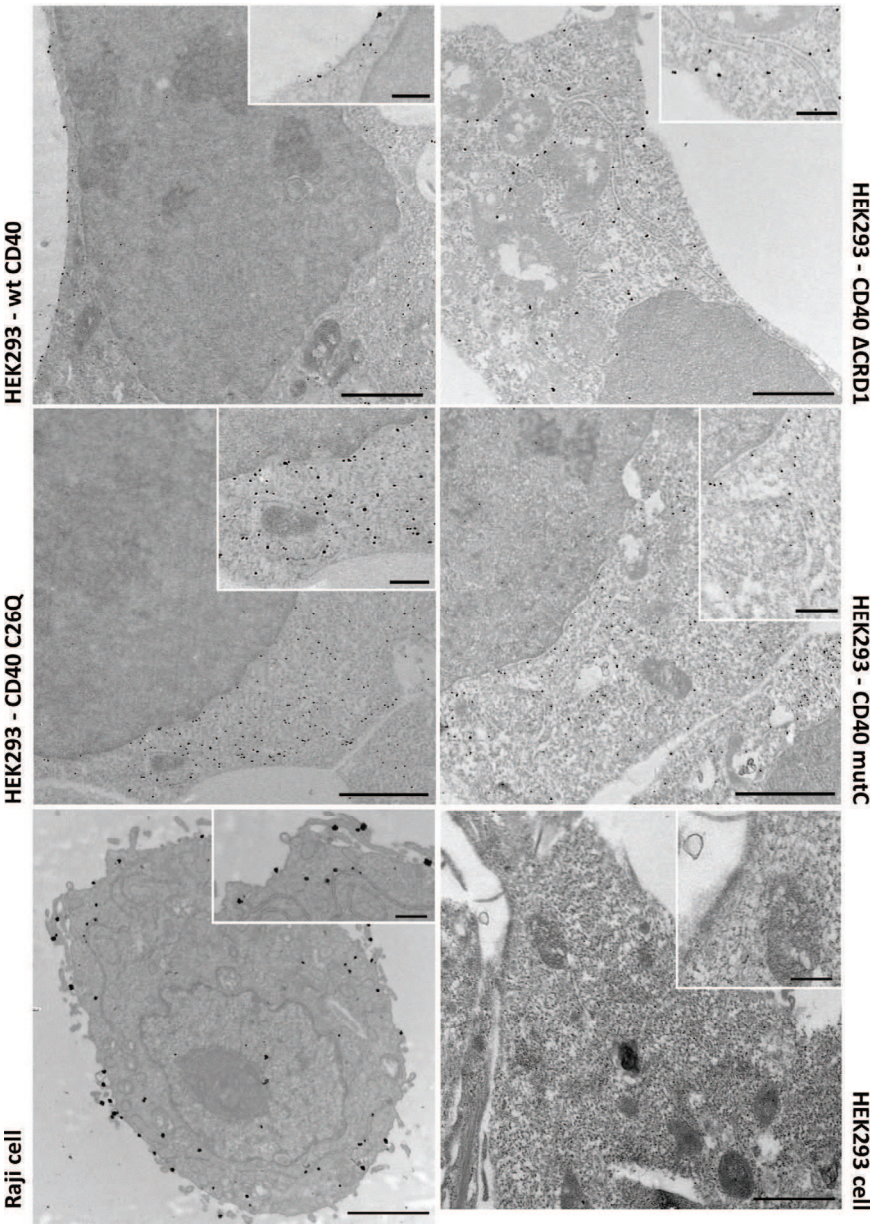
B



Supplemental Figure 2: **TNFR1 RMSD analysis and CD40 dimerization model.**

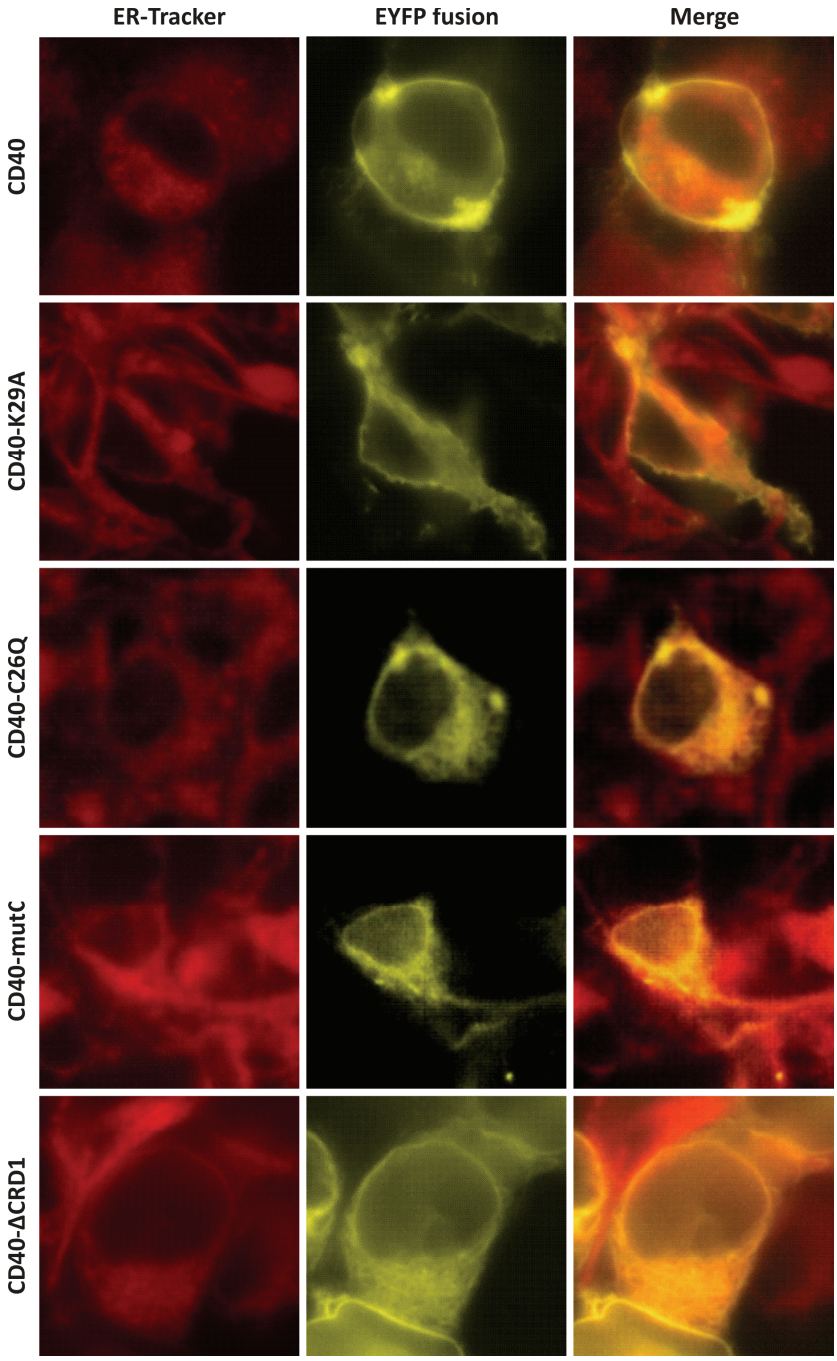
A. Root mean square deviation (RMSD) analysis of the different TNFR1 dimeric structures in comparison w receptor. Each cysteine rich domain (CRD) was analyzed independently.

B. Top: ligand-free dimeric structure of TNFR1 (PDB 1NCF) in comparison with the modeled CD40 dime crystallographic structure of both CD40 (PDB 3QD6) and TNFR1 (PDB 1NCF). Bottom: detail of the CRD 29 of CD40 is shown in red. Space filling representation was applied to CRD1 residues. Note that t established between His 34 in TNFR1 is established between Trp71 in CD40 dimeric model.



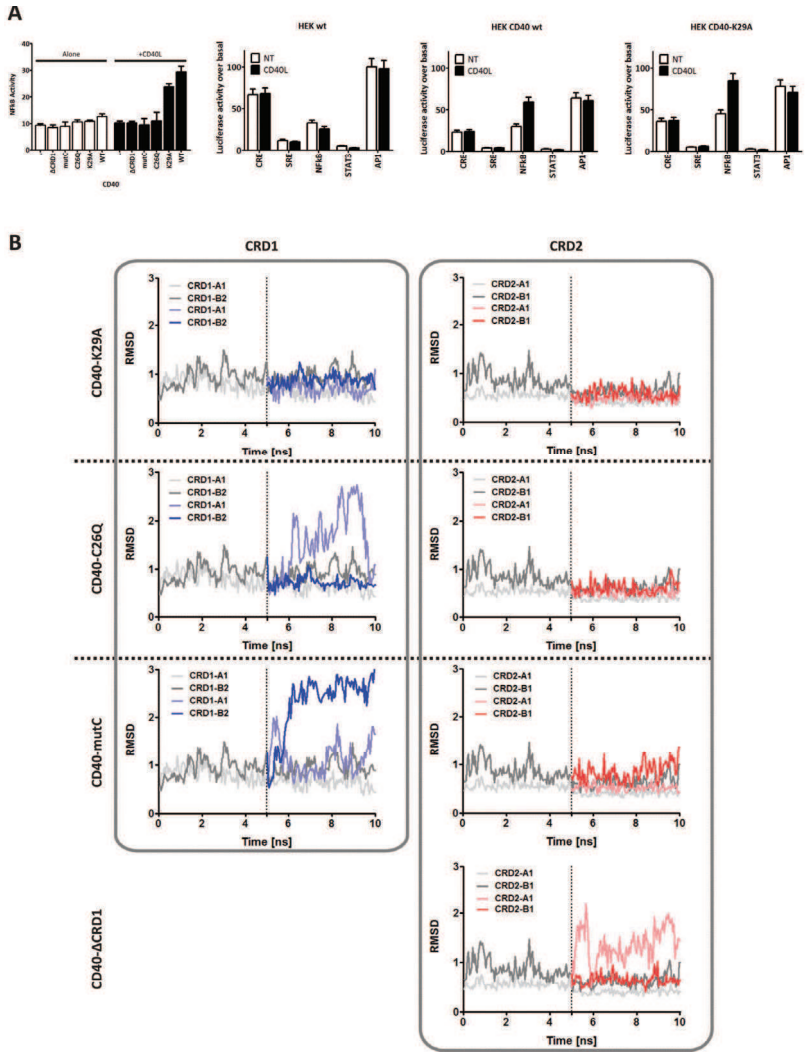
Supplemental figure 3: **Electron microscopy analysis of HEK293 cells transfected with untagged CD40 constructs.**

Electron microscopy analysis of untagged CD40 constructs, showing lack of surface expression and intracellular retention of CRD1 truncated or cysteine mutated CD40. mutC = C37G/C38G/C41G. Untransfected HEK293 cells and the B cell line Raji expressing endogenous CD40 are shown as controls. Scale bars 2 μm in the main pictures and 0.5 μm in the insets.



Supplemental figure 4: **Fluorescence microscopy analysis of EYFP-tagged CD40 constructs.**

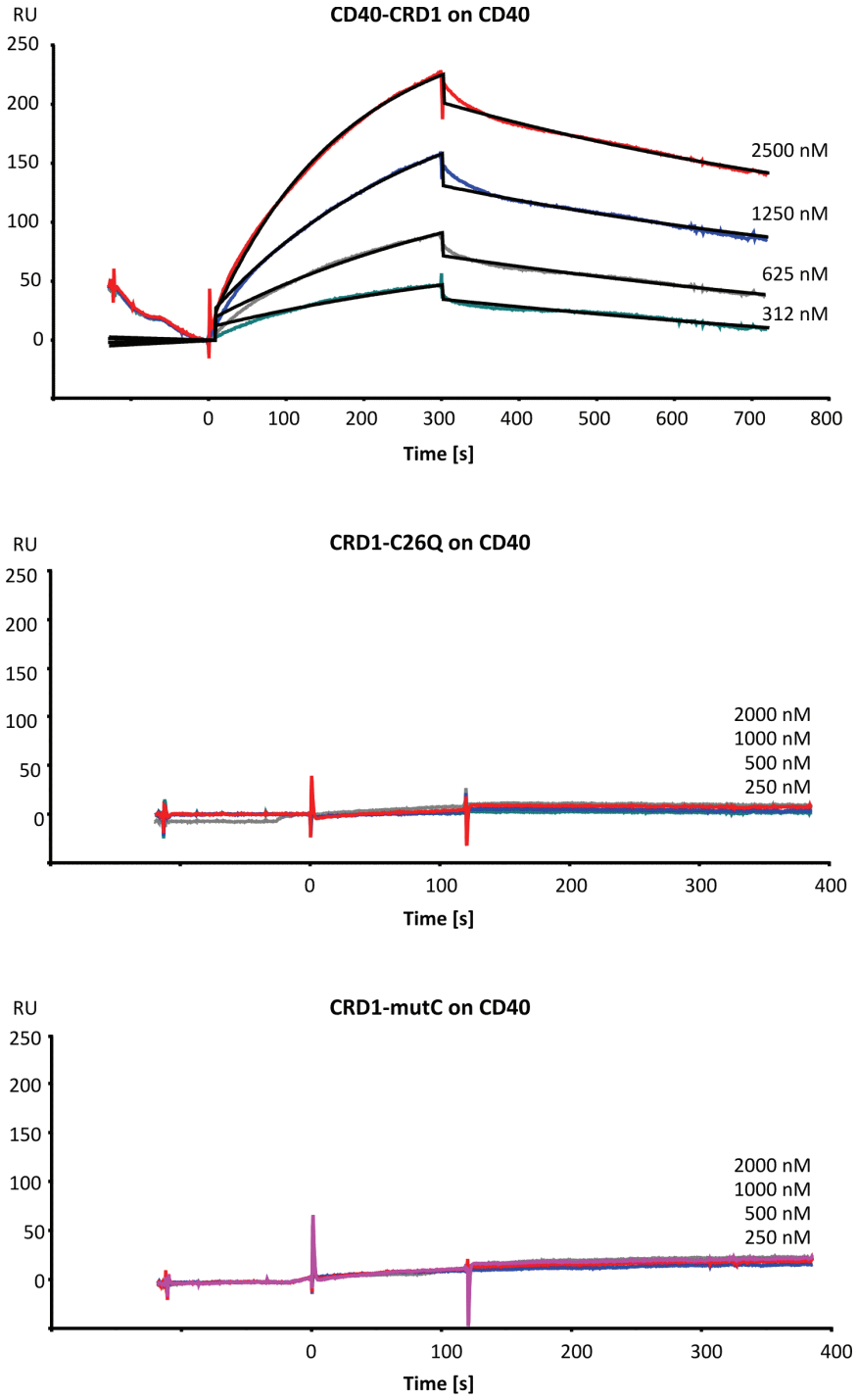
Fluorescence microscopy analysis of c-terminal EYFP fusion constructs of WT CD40 and CD40 with the indicated CRD1 mutations. Cells were stained with a marker of endoplasmic reticulum (ER-Tracker). mutC = C37G/C38G/C41G.



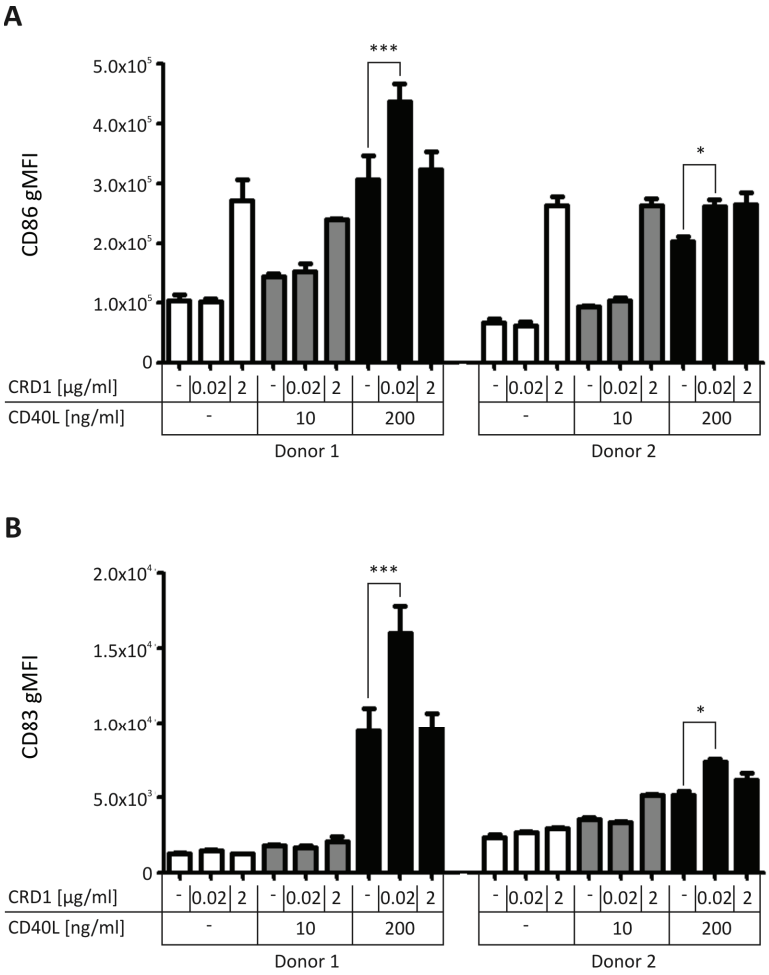
Supplemental Figure 5: **CD40 mutational analysis.**

A. NF-kB activity of cell lines transfected with different truncated or mutated CD40 molecules (CD40-DCRD1, CD40-C6Q, CD40-mutC, CD40-K29A and CD40-wt) in response to mCD8-CD40L treatment. Activity of different transcription factor reporters transfected into wt HEK, HEK CD40 or HEK CD40-K29A cells, treated or not with 8 nM mCD8-CD40L. Wild type CD40 and CD40-K29A activate NF-κB signalling in similar ways.

B. Steered molecular dynamic simulation of the different mutations or deletions introduced in CD40, showing strong local perturbation in all cysteine and deletion mutants of CD40, but not with the K29A mutation. Grey lines correspond to wt CD40 behaviour during simulation.



Supplemental Figure 6: **Surface plasmon resonance analysis of CD40-CRD1.** Biacore sensorgrams of CD40-CRD1 (top), CRD1-C26Q (center) and CRD1-mutC (bottom) binding to the entire extracellular domain of CD40.



Supplemental Figure 7: **CD40-CRD1 potentiates CD40L-induced activation of monocyte-derived dendritic cells.**

A. CD86 expression levels (geo-mean, gMFI) evaluated after 24h culture with the indicated stimuli. ($p<0.05$, *; $p<0.001$, ***).

B. Same as panel A, but for CD83 expression levels.

CHAPITRE 2

Article 7 : Hetero-oligomerization between the TNF receptor superfamily members CD40, FAS and TRAIL-R2 modulate CD40 signaling

Smulski C.R., Decossas M., Chekkat N., Beyrath J., Willen L., Guichard G., Lorenzetti R., Rizzi M., Eibel H., Schneider P. and Fournel S

(en révision et resoumis dans Cell Death Differenciation)

Hetero-oligomerization between the TNF receptor superfamily members CD40, FAS and TRAILR2 modulate CD40 signalling

Running title: CD40-Fas and CD40-TRAILR2 Interactions

Smulski C.R.[a,b], Decossas M.[b], Chekkat N.[b,f], Beyrath J.[b], Willen L.[a], Guichard G.[c], Lorenzetti R.[d], Rizzi M.[d,e], Eibel H.[e], Schneider P.[a,#] and Fournel S.[b,f,#]

[a] Department of Biochemistry, University of Lausanne, Ch. des Boveresses 155, CH-1066 Epalinges, Switzerland.

[b] Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire UPR 9021 "Immunologie et Chimie Thérapeutiques" du CNRS, 15 Rue René Descartes 67084 Strasbourg Cedex, France.

[c] Institut européen de chimie et biologie CBMN UMR5248 - CNRS/UB1, 2 rue Robert Escarpit, F-33607 Pessac Cedex, France.

[d] Department of Rheumatology and Clinical Immunology, University Medical Center Freiburg

[e] Center for Chronic Immunodeficiency, University Medical Centre Freiburg and University of Freiburg, Engesserstrasse. 4, D-79110 Freiburg, Germany.

[f] Present address: UMR 7199 CNRS-Université de Strasbourg, Faculté de Pharmacie, Université de Strasbourg, 74 Route du Rhin, 67401 Illkirch, France.

[#] Shared senior authorship

Address correspondence to either: Cristian Smulski, Department of Biochemistry, University of Lausanne, Ch. des Boveresses 155, CH-1066 Epalinges, Switzerland.
Phone +41 216925743, Fax +41 216925705 CristianRoberto.Smulski@unil.ch
Sylvie Fournel: s.fournel@unistra.fr or Pascal Schneider: pascal.schneider@unil.ch

Abstract

TNF receptor super-family members (TNFRSF) such as CD40, Fas and TRAIL receptor 2 (TRAILR2) participate to the adaptive immune response by eliciting survival, proliferation, differentiation and/or cell death signals. The balance between these signals determines the fate of the immune response. It was previously reported that these receptors are able to self-assemble in the absence of ligand through their extracellular regions. However, the role of this oligomerization is not well understood, and none of the proposed hypotheses take into account potential hetero-association of receptors. Using CD40 as bait in a flow cytometry FRET assay, TNFRSF members with known functions in B cells were probed for interactions. Both Fas and TRAILR2 associated with CD40. Immunoprecipitation experiments confirmed the interaction of CD40 with Fas at the endogenous levels in a BJAB B-cell lymphoma cell line deficient for TRAILR2. TRAILR2-expressing BJAB cells displayed a robust CD40-TRAILR2 interaction at the expense of the CD40-Fas interaction. The same results were obtained by proximity ligation assay, using TRAILR2-positive and -negative BJAB cells and primary human B cells. Expression of the extracellular domains of Fas or TRAILR2 with a glycolipid membrane anchor specifically reduced the intrinsic signalling pathway of CD40 in 293T cells. Conversely, BJAB cells lacking endogenous Fas or TRAILR2 showed an increased NF-κB response to CD40L. Finally, up-regulation of TRAILR2 in primary human B cells correlates with reduced proliferation in response to CD40L. Altogether, these data reveal that selective interactions between different TNFRSF members can modulate ligand-induced responses upstream signalling events.

Keywords: TNFR superfamily, CD40, Fas, TRAILR2, oligomerization, signaling.

Introduction

Germinal centres (GC) are unique sites in peripheral lymphoid tissue where clonal selection of B-lymphocytes takes place in response to antigen stimulation. B cell clonal selection results in differentiation of high affinity B memory and antibody-secreting cells that permit an efficient secondary immune response [1-3]. At the same time, GCs are known to be a major source of B cell lymphomas including follicular and Burkitt's and also some diffuse large B cell lymphoma [4,5]. In the process of antibody affinity maturation that takes place in GCs, B-lymphocytes with low affinity antigen receptor are eliminated by apoptosis, whereas those with higher affinity are selected and survive. The study of how apoptotic signals synchronize in the regulation of B cell death in GC will contribute not only to a better understanding of the mechanisms supporting clonal selection of B-lymphocytes and high affinity antibody production but also of lymphomagenesis or progression of B lymphomas of GC origin.

Several reports showed that Fas (CD95 or TNFRSF6), a pro-apoptotic TNFR superfamily member, is directly involved in the clonal selection of GC B-lymphocytes [6-8]. Other pro-apoptotic members of the same family, TRAIL receptors (TRs) are also expressed in GC B-lymphocytes [9]. There are four membrane-bound TRAIL receptors: two death receptors TRAILR1 and TRAILR2 (DR4 or TNFRSF10A and DR5 or TNFRSF10B, respectively) that mediate death signals and two decoy receptors TRAILR3 and TRAILR4 (DcR1 or TNFRSF10C and DcR2 or TNFRSF10D, respectively). Interestingly, Fas or TRAILR-mediated apoptosis is controlled or counterbalanced in GC cells by another TNFR superfamily member CD40 (TNFRSF5) [10-13]. It is conventionally accepted that CD40-induced protection against Fas or TRAILR-mediated apoptosis required NF-κB activation and up regulation of anti-apoptotic c-FLIP and Bcl-X_L proteins [12,14-16]. However, Benson *et al.* [17] described a rapid CD40-mediated rescue from Fas-induced apoptosis that did not require NF-κB activation, was independent of *de novo* protein synthesis but was dependent upon active PI3K. Both previously described rescue mechanisms are ligand-dependent, raising the question whether the relative amount of receptors may impact directly on CD40 signaling in a ligand-independent way.

Several TNFRSF members are able to self-associate, in particular Fas, TRAILRs and CD40 [18-23]. We previously reported that CD40 can form non-covalent dimers in the absence of ligand, with an important contribution of the extracellular region to establish contacts [23]. However, the potential for different TNF receptor family members to heteromerize has not been investigated.

In this study, we identified selective interactions between CD40 and Fas, and between CD40 and TRAILR2. These heteromers also form at the endogenous level, and appear to be dynamic, driven by the preferential association of CD40 with TRAILR2 over Fas. The impact of heteromer formation on CD40 signalling was studied in cell lines and in primary human B cells, showing that they can negatively regulate CD40L-induced responses. Thus, heteromer formation between receptors with opposite functions could represent the most apical regulation of TNFRSF signalling.

Results

CD40 interacts with Fas and TRAILR2

The first evidence of CD40-Fas interaction was obtained by Förster resonance energy transfer (FRET) by flow cytometry. Fas was initially predicted to serve as a negative control for CD40-CD40 interaction, but yielded high FRET rates when it was co-transfected with CD40 (**Fig. 1A**). Then, we tested the ability of CD40 to interact with other TNFRSF members important for B cell function such as Fas, TRAILR1, TRAILR2, BCMA (TNFRSF17), BAFFR (BR3 or TNFRSF13C), TACI (TNFRSF13B) and the two unrelated receptors ErbB1 and ErbB2. No interaction could be detected with ErbB1, ErbB2, TRAILR1, TACI, BAFFR or BCMA. However, positive FRET responses were observed between CD40 and Fas and, to a lesser extent, between CD40 and TRAILR2 (**Fig. 1B**). Ligand-independent associations of CD40 with itself, with Fas and with TRAILR2 were readily observed with constructs lacking the intracellular domain (ΔICD), indicating that the latter is not required for the observed homo- and hetero-oligomerizations (**Fig. 1C**). No interaction was detected between Fas and TRAILR2. In summary, in transiently transfected 293T cells, CD40 interacts with Fas and TRAILR2 as detected by FRET and these interactions do not require the intracellular domains.

CD40 selectively interacts with TRAILR2 over Fas

In order to visualize these interactions in cells with endogenous expression levels, the CD40-positive and Fas-positive B-cell lymphoma cell line BJAB, with or without expression of TRAILR2, was used [24]. Immunocytochemistry using antibodies against the ectodomains of CD40, Fas and TRAILR2 showed co-localization at the cell surface between CD40 and Fas in TRAILR2-negative BJAB cells. However, co-localization of CD40 and Fas was reduced in TRAILR2-positive BJAB when compared to TRAILR2-negative BJAB cells, despite similar Fas expression levels. Under the same conditions, co-localization of CD40 and TRAILR2 was detected in TRAILR2-positive BJAB cells (**Fig. 2 and suppl. Fig. 1 and 2**).

In line with these results, we found that CD40 and Fas co-immunoprecipitated in native membrane fractions of TRAILR2-negative BJAB cells, but that this interaction was strongly decreased in TRAILR2-positive cells, which instead showed co-immunoprecipitation of CD40 with TRAILR2 (**Fig. 3A**). We next assessed these interactions by means of proximity ligation

assays (PLA) [25], using the same primary antibodies used for immunocytochemistry. This technique allows the detection of interacting proteins at endogenous levels by connecting two protein-specific antibodies in close proximity with a complementary DNA probe that is annealed, amplified and visualized as a fluorescent spot. We found CD40-Fas spots on TRAILR2-negative BJAB cells and, as expected, only background CD40-TRAILR2 spots (**Fig. 3B and D**). Interestingly, the number of CD40-Fas spots was significantly diminished in TRAILR2-positive BJAB cells, with a concomitant appearance of CD40-TRAILR2 spots (**Fig. 3C and D**). These results, together with those of the co-immunoprecipitation experiments, demonstrate that these interactions do take place at the endogenous level, and that CD40 selectively associates with TRAILR2 over Fas in BJAB cells.

CD40 interacts with Fas and TRAILR2 in primary human B cells

To investigate whether CD40 associates with Fas and TRAILR2 in primary human B cells, peripheral B-lymphocytes were isolated and activated with two different protocols. Without stimulation, these cells express high levels of CD40, low levels of Fas and no detectable TRAILR2 (**Fig.4A**). Treatment with PMA and ionomycin induced a mild activation profile characterized by increased MHC II expression but little changes in CD86 levels, associated with a strong up-regulation of Fas but not TRAILR2 (**Fig. 4A, B, G and H**). In contrast, treatment with an anti-BCR antibody (anti-IgM/IgG) plus CD40L induced a strong activation profile characterized by increased levels of both MHC II and CD86, associated with a mild increase of Fas and TRAILR2 levels (**Fig. 4D, E, G and H**). These stimulation protocols somewhat reproduce the situation of TRAILR2-positive and -negative BJAB cells, although the expression levels of Fas were decreased when TRAILR2 levels were increased and, consequently, the percentage of CD40 and Fas double positive cells was reduced when the percentage of CD40 and TRAILR2-positive cells was increased (**Fig. 4B and E**). PLA assays on activated human B cells detected the interaction of CD40 with Fas in the absence of TRAILR2 (PMA/ionomycin activation). This interaction was strongly reduced when less Fas was expressed (BCR/CD40L activation); it is possible that the concomitant increase in TRAILR2 expression might contribute to further reduce this signal (**Fig. 4A, B and C**). In line with the low expression of TRAILR2 after PMA/ionomycin activation, little CD40-TRAILR2 spots were present in this condition but a slight, yet significant increase of CD40-TRAILR2 spots was observed when a modest up

regulation of TRAILR2 was achieved by stimulation with BCR/CD40L (**Fig. 4D, E and F**). Similar PLA results were obtained with B cells of three different donors (**Fig. 4G and H**). These results confirm the interaction of CD40 with Fas or with TRAILR2 on activated human B-lymphocytes.

Signalling-incompetent TRAILR2 or Fas decreases CD40 signalling

We wanted to determine whether heteromerization of CD40 with TRAILR2 or Fas could modulate CD40-mediated NF-κB activation. However, Fas and TRAILR2 can also induce NF-κB activation [26] and overexpression of Fas or TRAILR2 may indirectly impact on CD40 signals by inducing cell death. To rule out any direct contribution of Fas and TRAILR2 to NF-κB signaling, we used glycolipid-anchored constructs of these receptors lacking transmembrane and intracellular domains [27], and observed how these truncated receptors may change CD40-mediated signals. 293T cells were transfected with a constant amount of CD40 and CD40L together with increasing concentrations of glycosyl-phosphatidylinositol (GPI)-anchored CD40, TRAILR2, Fas or TACI ectodomains, and the NF-κB response was quantified using a luciferase reporter. As expected, increasing concentrations of CD40-GPI inhibited CD40 signalling, most probably by competition for CD40L binding. However increasing concentrations of TRAILR2-GPI, which is unable to compete for CD40L binding, also inhibited CD40 signalling. A similar result was observed with higher amounts of Fas-GPI but no impact in CD40 signalling was observed upon expression of TACI-GPI (**Fig. 5A, left**). None of these receptors (CD40-, Fas- or TRAILR2-GPI) had an effect on TACI-induced NF-κB response, indicating a specific impact on CD40 signalling (**Fig. 5A, right**). The amount of transfected plasmid sufficient to inhibit 50% of CD40-induced NF-κB response was about 1.4 ng of CD40-GPI for 0.5 ng of full length CD40. For TRAILR2-GPI, the amount of transfected plasmid sufficient to inhibit 50% of CD40-induced NF-κB response was about 11 ng/ml. The differences between the strength of TRAILR2-GPI and Fas-GPI-mediated inhibition could be explained either by the endogenous expression of TRAILR2 in 293T cells, or by differences in the interaction affinities with CD40. The expression levels of TRAILR2-GPI remained relatively constant in the presence of either CD40 or TACI. Similarly, expression levels of CD40 and TACI were insensitive to the presence of TRAILR2-GPI (**Fig. 5B**). In addition TRAILR2-GPI did not impact on CD40-CD40L interaction, as determined by flow cytometry staining using Flag-tagged CD40 ligand (**Fig. 5B**).

Full-length CD40 and CD40-GPI showed similar expression levels on the cell surface when the same amount of plasmid was transfected (**Fig. 5C**). Finally, GPI-anchored receptors were all expressed at similar levels (**Fig. 5C**).

It was shown that the cysteine rich domain 1 (CRD1) of Fas [18], TRAILR2 [20] and CD40 [23] mediates receptor self-assembly. In contrast to Fas-GPI, Fas-ΔCRD1-GPI did not interfere with CD40-mediated NF-κB activation, suggesting that the CRD1 of Fas may be involved in Fas-CD40 interaction (**Fig. 5D**). No conclusive results could however be obtained with TRAILR2-ΔCRD1-GPI because this protein did not reach the cell surface, most probably due to folding problems similar to those reported when the CRD1 of CD40 was deleted or modified [23]. Taken together, these results indicate that the extracellular domains of Fas and TRAILR2, but not that of TACI, can inhibit CD40L-mediated signalling in the absence of any direct contribution of Fas or TRAILR2 to the signal or detectable changes in the levels of CD40 expression or its ability to interact with CD40L.

Endogenous TRAILR2 or Fas modulate CD40 signalling

To address the impact of endogenous Fas and TRAILR2 on CD40 signalling, we generated several clones of BJAB cells knocked-out for each of these receptors using the CRISPR/Cas9 system [28] (Suppl. Fig. 3). When tested for their ability to respond to CD40L, all Fas and TRAILR2 KO clones showed a significant, dose-dependent increase in CD40L-induced NF-κB response when compared to wild type cells, while CD40 KO BJAB clones were, as expected, completely resistant to CD40L stimulation (**Fig. 6A and B**). These changes in the NF-κB response strongly suggest that CD40-Fas and CD40-TRAILR2 heteromerization regulates CD40 signalling, even if it is difficult to exclude that the absence of Fas or TRAILR2 may indirectly modulate this outcome.

In primary human B cells the expression profile and the balance between CD40 and Fas signalling has been well described [1], however the expression and function of TRAILR2 remains poorly explored in B cell subsets. We found that primary human marginal zone B cells (MZ: CD27+ IgD+) express higher levels of TRAILR2 compared to switched memory cells (SM: CD27+ IgD-) while the expression of CD40 and Fas was similar in these two B cell populations (**Fig. 6C, E, G**). This difference was enhanced after stimulation with CD40L+IL21, with a peak of TRAIL-R2, Fas and CD40 expression at day 2 (**Fig. 6D, F, H**). To study the

impact of TRAILR2 expression on CD40 activation, we used CFSE labelled cells to analyse the proliferative response of CD27+ B cells to CD40L stimulation. After six days of activation, TRAILR2-high cells did not proliferate as strongly as TRAILR2-low cells. A similar response was observed in four independent donors (**Fig. 6I to L**). Taken together, these results suggest that endogenous TRAILR2 modulates CD40L-induced responses in cell lines and primary human B cells.

Discussion

There are increasing evidences suggesting that TNFR superfamily members are organized in the cell membrane as ligand-independent oligomers rather than as individual receptors. Different receptors of the family have been described forming homo-dimers or -trimers, such as TNFR1 and 2 [19], Fas [18], TRAIL receptors [20], CD40 [23] and BAFFR [29]. This pre-ligand assembly was reported in most cases to favour ligand binding and normal signalling [18-20,29]. However the potential heteromerization of TNFRs remains poorly explored and there are only three studies addressing this phenomenon, one between TRAILR2 and TRAILR4 [20] and two others in the context of the central nervous system that describe the interaction of DR6 with $p75^{NTR}$ [30] and DR6 with TROY [31]. From the screening performed by flow cytometry FRET using CD40 as bait, we consistently found high FRET rates with Fas and to a lesser extent with TRAILR2. Other receptors important for B cell survival and differentiation were negative in this screening. These interactions did not require the presence of the intracellular domain, which is in line with the fact that most of the TNFRSF-TNFRSF interactions described to date rely on the extracellular region of the receptors.

CD40-Fas and CD40-TRAILR2 interactions take place at the endogenous levels in the Burkitt B cell lymphoma BJAB cell line expressing or not TRAILR2. Interestingly, the CD40-Fas interaction was only detected in TRAILR2-negative BJAB cells despite similar expression levels of CD40 and Fas in both cell lines, indicating a possible competition between TRAILR2 and Fas for CD40 binding. This competition at the endogenous level was evidenced by co-immunoprecipitations and by proximity ligation assays. However, the molecular basis for the observed selectivity in these interactions remains unclear. CD40 may have a higher affinity for TRAILR2 than for Fas, but these interactions may also be influenced by the relative abundance of each receptor on the cell surface. Finally we cannot exclude that Fas or TRAILR2 may localize to specialized membrane micro-domains in which CD40 could be recruited.

PLA studies confirmed that both CD40-Fas and CD40-TRAILR2 interactions do take place in primary human B cells. In these experiments, CD40 was expressed in all conditions, and it was possible to preferentially induce Fas or TRAILR2 using different activation protocols. Cells in both stimulation conditions were not exactly comparable: Fas expression levels were different, and CD40 was engaged by ligand in one but not the other condition. Nonetheless, the results are

fully compatible with a model in which CD40 preferentially interacts with TRAILR2 rather than with Fas. The preferred interaction between CD40 and TRAILR2 may thus be common to lymphoma cell lines and primary cells.

We have shown that expression of signalling-incompetent TRAILR2 or Fas, unable to interact with CD40L, decreased or sometimes totally abolished the ability of full-length CD40 to respond to CD40L with NF-κB activation. Under these conditions, surface expression of CD40, and its ability to bind CD40L were unaffected, indicating that heteromers interfere with the signalling function by acting downstream of ligand binding, probably by interfering with formation of a functional signalling complex. Surface expression of full-length and GPI-anchored CD40 was similar, allowing comparisons to be performed. At the amount of transfected plasmid DNA sufficient for a 50% inhibition of CD40-induced NF-κB response, CD40-GPI was in a 3-fold excess over full-length CD40, and TRAILR2-GPI was in a 20-fold excess, which appears to be within a physiological range, especially when considering that the GPI fusion receptors may not be optimal for heteromer formation. In the case of TRAILR2-GPI, we carefully excluded the possibility of artefactual quenching of CD40L or CD40, suggesting that the observed effects are due to heteromer formation. It is tempting to speculate that the combined outcome of signalling via CD40 on the one hand, and TRAILR2 and Fas on the other hand, is not only regulated intracellularly by activation of pro- or anti-apoptotic signalling pathways, but also directly at the level of receptors whose relative expression levels may determine whether they can be activated or not. For several TNF receptors, a pre-ligand assembly domain (PLAD) has been described that mediates homo-interactions [32]. The deletion of the CRD1 of Fas was sufficient to abrogate its inhibitory effect on CD40 signalling indicating that the PLAD of Fas may have a role in heteromer formation. However, TRAILR2 with a similar deletion did not reach the cell surface, precluding interpretation of whether TRAILR2 CRD1 is involved or not in heteromer interactions. The inhibitory impact of Fas and TRAILR2 on CD40 signalling has been confirmed in Fas and TRAILR2 KO BJAB cell lines, which all showed robust increased responsiveness to CD40L.

In the biology of B cells, Fas and TRAILR2 are death receptors that trigger apoptosis of auto-reactive and/or activated B cells [33,34] while CD40 is a potent NF-κB activator that provides activation and proliferation signals [35,36]. However, the interplay between these 3 receptors is complicated and not fully understood. Several studies focused on the role of Fas during high

affinity B cell selection in GC showing that Fas has an essential role in GC B cell apoptosis both *in vitro* [37] and *in vivo* [6]. During B-cell maturation, somatic hypermutations are introduced in the variable regions of heavy and light chains of the BCR with the aim of generating antigen-specific B cells of higher affinity [38]. A stringent selection mechanism takes place to ensure the survival of antigen specific high affinity B cells and the death of low affinity or autoreactive B cells. GC B cells express CD40 and Fas and undergo FasL mediated apoptosis, unless a survival signal is provided by BCR or CD40 engagement [39-41] [42]. The same type of data does not exist for TRAILR2, but it was shown *ex vivo* on human primary B cells that BCR and/or CD40L signals can rescue naive B cells, but not memory B cells, from TRAIL-induced apoptosis [13]. Together, these data suggest that signals transduced by Fas, TRAILR2 and CD40 are entangled to finely control the fate of B cells. In B cell lymphomas, the relationship between CD40, Fas and TRAILRs appears even more complicated. As in normal GC B-lymphocytes, CD40 rescues apoptosis induced by Fas in low grade B lymphoma, but CD40 sensitizes Burkitt lymphoma B cells to Fas-induced apoptosis [43-45]. In a similar way, CD40 triggering protects Burkitt lymphoma [13] and follicular lymphoma [46,47], but sensitizes chronic lymphocytic leukaemia B cells to apoptosis induced by TRAIL [48]. The measure of TRAILR2 expression revealed that expression of this receptor is increased in marginal zone compared to switched memory B cells and that this difference is maintained upon CD40L+IL21 stimulation. Our *in vitro* data would be in line with the notion that TRAILR2 negatively regulates CD40L effects, as its expression inversely correlated with CD40L-induced proliferation in primary human B cells.

In conclusion, our results reveal that ligand-independent heteromer formation between different TNFRSF members modulates very early steps of activation, upstream of their signalling pathways.

Material and Methods.

Cell Lines. BJAB cells expressing TRAILR2 or not were grown in RPMI 1640 medium (Lonza, Verviers, Belgium) supplemented with 10% fetal calf serum and 5 µg/ml each of penicillin and streptomycin. HEK 293T cells were grown in DMEM medium (Gibco) supplemented with 10% fetal calf serum.

Antibodies and TNF ligands. Western blot: anti-CD40 S-17 (Santa Cruz biotechnology, USA), anti-Fas (ZB4) (AbCam, Cambridge, UK), anti-DR5 (Millipore, Billerica, USA). Immunoprecipitations: anti-CD40 C20 agarose conjugate (Santa Cruz biotechnology, USA), anti-Fas (C20) (Santa Cruz biotechnology, USA), anti-DR5 D4E9 (Cell Signalling, USA). Flow cytometry: anti-CD40-FITC (5C), anti-Fas-PE (DX2), anti-MHC-II-FITC (Tü 39) and anti-CD86-PE (2331) (BD Pharmingen, San Diego, USA); anti-DR5-PE (B-K29) (Diaclone research, San Diego, USA); anti-TRAILR2 (TR2.21; to screen TRAILR2 KO BJAB clones) (Adipogen, Lausen, Switzerland). Flag-ACRP-hBAFF, Flag-ACRP-hCD40L and Flag-ACRP-FasL were produced in house and staining were performed as described in [27]. Flag-ACRP-hCD40L (mega-CD40L) was also obtained from Adipogen (Lausen, Switzerland). Anti-TRAILR3 (LEIA) was used for GPI recognition (own production) [27]. Microscopy and PLA: monoclonal rabbit anti-CD40 (EBI-19-21) (Abcam, Cambridge, UK), mouse anti-DR5 (DJR2-4) (ABD Serotec, Raleigh, USA) and mouse anti-CD95 (DX2) (BD Biosciences, San Diego, USA).

Expression plasmids. See supplementary table 1.

FRET. Experiments were performed using a LSRII flow cytometer instrument (BD Biosciences). EYFP signal was recorded using the 488 nm laser with a 530/30 filter, ECFP signal was recorded using the 405 nm laser with a 450/50 filter and FRET signal was recorded using the 405 nm laser with a 585/42 filter. For each condition we evaluated a minimum of one thousand -ECFP -EYFP double positive cells. HEK 293T cells where transiently transfected with ECFP and EYFP fusion receptors and analyzed 16-20 h post-transfection. Positive FRET cells were gated using an ECFP-EYFP fusion protein as positive control and a co-transfection of ECFP and EYFP as negative control according to [49].

Immunocytochemistry.

BJAB cells grown on Lab-tek chambers were fixed with 2% formaldehyde and incubated with primary antibodies overnight at 4°C (rabbit anti-CD40 50 µg/ml, mouse anti-TRAILR2 25 µg/ml or biotinylated mouse anti-Fas 1/10) in 1% normal goat serum. Cells were then incubated for 1h with F(ab)'2 goat anti-rabbit-A488 (1/200) plus mouse-A594 (1/200) or in F(ab)'2 goat anti-rabbit-A488 (1/200) plus streptavidine A546 (1/1000) for the detection of CD40-TRAILR2 or CD40- Fas respectively. After post-fixation in 4% formaldehyde, nuclei were counterstained with DAPI (1/500). Slides were then mounted with Dako fluorescent medium and images were acquired using a LSM 510 Laser Scanning Microscope (Carl Zeiss, Jena, Germany).

Immunoprecipitations. $1x10^7$ TRAILR2-negative and TRAILR2-positive BJAB cells were harvested and the native membrane fraction was obtained using ProteoExtract kit (Calbiochem). Immunoprecipitations were performed with agarose conjugated anti-CD40 antibody or protein A loaded antibodies (Fas and TRAILR2) as described in [50]. Immunoprecipitates and whole membrane fractions were resolved on 10% acrylamide SDS gels prior to electrophoretic transfer onto nitrocellulose and western blot analysis.

Duolink *in situ* proximity ligation assay (PLA). PLA analysis was performed according to the manufacturer's instructions (OLink Biosciences, Uppsala, Sweden). Briefly, cells were incubated for 1 h at 37°C on poly-lysine coated slides, fixed with 2% formaldehyde and blocked with 2% of normal donkey serum. Primary antibodies (used at the same dilutions than for immunocytochemistry) were incubated overnight at 4°C, cells were then incubated with PLUS and MINUS secondary PLA probes against both rabbit and mouse IgG. The incubation was followed by hybridization and ligation steps, and then amplification was performed. After mounting with Duolink mounting medium, images were acquired using a LSM 700 Laser Scanning Microscope in the larger focal plane of each cell (Carl Zeiss, Jena, Germany). Quantification was done using ImageJ.

Human B cell purification. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were first isolated using Ficoll (Sigma, Saint Louis, MO). Then, B lymphocytes were purified by negative magnetic

sorting using the human B cell purification kit from Miltenyi Biotec (Paris, France). Cells were then incubated in RPMI 1640 supplemented with 10% fetal calf serum and 5 µg/ml each of penicillin and streptomycin for 24 hours and treated as follows: 50 ng/mL PMA (phorbol-myristate-acetate) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) and 1 mM ionomycin (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) or 0.5 ng/mL hCD40L-muCD8 (Ancell, Bayport, USA) and 20 µg/ml of anti-IgM/IgG (Sigma-Aldrich, St Louis, MO). Cells were then subjected to Flow cytometry and PLA analysis.

In vitro cell culture. MACS sorted B cells ($1.5x10^5$ cells/ml) were stimulated with CD40L and IL-21 as described [51] in enriched Iscove´s medium supplemented with 10% FCS, 1 µg/ml insulin, 2.5 µg/ml apo-transferrin, 0.1% fatty acid supplement, 1% non-essential amino acids, 2 mM glutamine, and 1 µg/ml reduced glutathione. B cells were stained and analysed by flow cytometry at the indicated time points.

Flow cytometry. Phenotype of human B cells was determined with the following antibodies: CD19 V500, CD40 PE-Cy5 (BD), CD27 Brilliant violet 421, CD95 Alexa Fluor 647, IgD PE-Cy7 (Biolegend), TRAILR2 PE (eBioscience). Dead cell exclusion was performed by Live/Dead staining kit (Invitrogen, Molecular Probes), following manufacturer instruction. B-cell proliferation was monitored by CFSE (carboxyfluorescein diacetate, succinimidyl ester; Molecular Probes) labelling. The data were acquired with BD FACS Canto II and were analysed with FlowJo software version 8.7 (TreeStar Inc., Ashland, USA).

Luciferase reporter assay. HEK293T cells were cultured in 96 well plates at $3x10^5$ cells/mL in 100 µl. After 24 h cells were transfected with a mix of vectors containing: EGFP (transfection efficiency control) (7 ng), control renilla vector (7 ng), NF-κB firefly luciferase reporter vector (7 ng), CD40 (0.5 ng), CD40L (1 ng) and increasing concentrations of GPI-anchored CD40, TRAILR2, Fas or TACI (0 to 34 ng) (70ng/well total DNA), using Polyfect transfection reagent (Qiagen). After 24 h, cells were lysed and expression of firefly and renilla luciferases was detected with the dual luciferase assay detection kit (Promega, MA).

Statistical analysis. FRET experiments were analyzed using unpaired t test, and when multiple receptors where compared using one-way ANOVA with Tukey post-test. PLA on BJAB cells was analyzed using unpaired t test. PLA on B cells was analyzed using one-way ANOVA (non parametric Kruskal-Wallis test) with Dunn post-test. All analyses were performed using GraphPad Prism version 5.00 for Windows, GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com

Acknowledgements

We thank Andrew Thorburn for providing BJAB TRAILR2$^-$/TRAILR2$^+$ cell lines, Marie-Christine Rio and Fabien Alpy for kindly providing ErbB-EYFP constructs and Fabio Martinon (University of Lausanne) for valuable advice regarding the generation of receptor-deficient BJAB cells. We thank Dr. Sylviane Muller (UPR 9021 Strasbourg, France), the GDR2588 and the French Network for Microscopy (RTmfm) for scientific discussions and the microscopy facility platform of Strasbourg Esplanade for the use of the confocal microscope. This work was supported by grants from Agence Nationale de la recherche (ANR-08-PCVI-0034-01) (to SF and GG) and the Swiss National Science Foundation (31003A-138065 to PS). NC was granted by the French "Ministère de la recherche"; RL was supported by CAPES Foundation, Ministry of Education of Brazil, Brasilia/DF 70040-020, Brazil (2610/13-2); MR by the German Federal Ministry of Education and Research (BMBF 01EO1303) and HE by the DFG through TRR130 project 06.

References

1. Koncz G, Hueber AO (2012) The Fas/CD95 Receptor Regulates the Death of Autoreactive B Cells and the Selection of Antigen-Specific B Cells. Front Immunol 3: 207.
2. Victora GD, Nussenzweig MC (2012) Germinal centers. Annu Rev Immunol 30: 429-457.
3. Chan TD, Gardam S, Gatto D, Turner VM, Silke J, et al. (2010) In vivo control of B-cell survival and antigen-specific B-cell responses. Immunol Rev 237: 90-103.
4. Kondo E, Yoshino T (2007) Expression of apoptosis regulators in germinal centers and germinal center-derived B-cell lymphomas: insight into B-cell lymphomagenesis. Pathol Int 57: 391-397.
5. Greil R, Anether G, Johrer K, Tinhofer I (2003) Tracking death dealing by Fas and TRAIL in lymphatic neoplastic disorders: pathways, targets, and therapeutic tools. J Leukoc Biol 74: 311-330.
6. Takahashi Y, Ohta H, Takemori T (2001) Fas is required for clonal selection in germinal centers and the subsequent establishment of the memory B cell repertoire. Immunity 14: 181-192.
7. van Eijk M, Defrance T, Hennino A, de Groot C (2001) Death-receptor contribution to the germinal-center reaction. Trends Immunol 22: 677-682.
8. Hao Z, Duncan GS, Seagal J, Su YW, Hong C, et al. (2008) Fas receptor expression in germinal-center B cells is essential for T and B lymphocyte homeostasis. Immunity 29: 615-627.
9. Crowder RN, Zhao H, Chatham WW, Zhou T, Carter RH (2011) B lymphocytes are resistant to death receptor 5-induced apoptosis. Clinical immunology 139: 21-31.
10. Cleary AM, Fortune SM, Yellin MJ, Chess L, Lederman S (1995) Opposing roles of CD95 (Fas/APO-1) and CD40 in the death and rescue of human low density tonsillar B cells. Journal of immunology 155: 3329-3337.
11. Metkar SS, Naresh KN, Redkar AA, Nadkarni JJ (1998) CD40-ligation-mediated protection from apoptosis of a Fas-sensitive Hodgkin's-disease-derived cell line. Cancer immunology, immunotherapy : CII 47: 104-112.
12. Zazzeroni F, Papa S, Algeciras-Schimnich A, Alvarez K, Melis T, et al. (2003) Gadd45 beta mediates the protective effects of CD40 costimulation against Fas-induced apoptosis. Blood 102: 3270-3279.
13. Guerreiro-Cacais AO, Levitskaya J, Levitsky V (2010) B cell receptor triggering sensitizes human B cells to TRAIL-induced apoptosis. Journal of leukocyte biology 88: 937-945.
14. Travert M, Ame-Thomas P, Pangault C, Morizot A, Micheau O, et al. (2008) CD40 ligand protects from TRAIL-induced apoptosis in follicular lymphomas through NF-kappaB activation and up-regulation of c-FLIP and Bcl-xL. Journal of immunology 181: 1001-1011.
15. Kreuz S, Siegmund D, Scheurich P, Wajant H (2001) NF-kappaB inducers upregulate cFLIP, a cycloheximide-sensitive inhibitor of death receptor signaling. Molecular and cellular biology 21: 3964-3973.
16. Lee HH, Dadgostar H, Cheng Q, Shu J, Cheng G (1999) NF-kappaB-mediated up-regulation of Bcl-x and Bfl-1/A1 is required for CD40 survival signaling in B lymphocytes. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 96: 9136-9141.
17. Benson RJ, Hostager BS, Bishop GA (2006) Rapid CD40-mediated rescue from CD95-induced apoptosis requires TNFR-associated factor-6 and PI3K. European journal of immunology 36: 2535-2543.
18. Siegel RM, Frederiksen JK, Zacharias DA, Chan FK, Johnson M, et al. (2000) Fas preassociation required for apoptosis signaling and dominant inhibition by pathogenic mutations. Science 288: 2354-2357.
19. Chan FK, Chun HJ, Zheng L, Siegel RM, Bui KL, et al. (2000) A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signaling. Science 288: 2351-2354.

20. Clancy L, Mruk K, Archer K, Woelfel M, Mongkolsapaya J, et al. (2005) Preligand assembly domain-mediated ligand-independent association between TRAIL receptor 4 (TR4) and TR2 regulates TRAIL-induced apoptosis. Proc Natl Acad Sci U S A 102: 18099-18104.
21. Zhan C, Patskovsky Y, Yan Q, Li Z, Ramagopal U, et al. (2011) Decoy Strategies: The Structure of TL1A:DcR3 Complex. Structure 19: 162-171.
22. Naismith JH, Devine TQ, Brandhuber BJ, Sprang SR (1995) Crystallographic evidence for dimerization of unliganded tumor necrosis factor receptor. J Biol Chem 270: 13303-13307.
23. Smulski CR, Beyrath J, Decossas M, Chekkat N, Wolff P, et al. (2013) Cysteine-rich domain one of CD40 mediates receptor self-assembly. J Biol Chem.
24. Thomas LR, Johnson RL, Reed JC, Thorburn A (2004) The C-terminal tails of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) and Fas receptors have opposing functions in Fas-associated death domain (FADD) recruitment and can regulate agonist-specific mechanisms of receptor activation. J Biol Chem 279: 52479-52486.
25. Antonio LS, Stewart AP, Xu XJ, Varanda WA, Murrell-Lagnado RD, et al. (2011) P2X4 receptors interact with both P2X2 and P2X7 receptors in the form of homotrimers. Br J Pharmacol 163: 1069-1077.
26. Schneider P, Thome M, Burns K, Bodmer JL, Hofmann K, et al. (1997) TRAIL receptors 1 (DR4) and 2 (DR5) signal FADD-dependent apoptosis and activate NF-kappaB. Immunity 7: 831-836.
27. Bossen C, Ingold K, Tardivel A, Bodmer JL, Gaide O, et al. (2006) Interactions of tumor necrosis factor (TNF) and TNF receptor family members in the mouse and human. J Biol Chem 281: 13964-13971.
28. Shalem O, Sanjana NE, Hartenian E, Shi X, Scott DA, et al. (2014) Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout screening in human cells. Science 343: 84-87.
29. Pieper K, Rizzi M, Speletas M, Smulski CR, Sic H, et al. (2014) A common single nucleotide polymorphism impairs B-cell activating factor receptor's multimerization, contributing to common variable immunodeficiency. J Allergy Clin Immunol.
30. Hu Y, Lee X, Shao Z, Apicco D, Huang G, et al. (2013) A DR6/p75(NTR) complex is responsible for beta-amyloid-induced cortical neuron death. Cell Death Dis 4: e579.
31. Tam SJ, Richmond DL, Kaminker JS, Modrusan Z, Martin-McNulty B, et al. (2011) Death receptors DR6 and TROY regulate brain vascular development. Dev Cell 22: 403-417.
32. (!!! INVALID CITATION !!!).
33. Strasser A, Jost PJ, Nagata S (2009) The many roles of FAS receptor signaling in the immune system. Immunity 30: 180-192.
34. Ursini-Siegel J, Zhang W, Altmeyer A, Hatada EN, Do RK, et al. (2002) TRAIL/Apo-2 ligand induces primary plasma cell apoptosis. J Immunol 169: 5505-5513.
35. Elgueta R, Benson MJ, de Vries VC, Wasiuk A, Guo Y, et al. (2009) Molecular mechanism and function of CD40/CD40L engagement in the immune system. Immunol Rev 229: 152-172.
36. Aggarwal BB (2003) Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. Nat Rev Immunol 3: 745-756.
37. Hennino A, Berard M, Krammer PH, Defrance T (2001) FLICE-inhibitory protein is a key regulator of germinal center B cell apoptosis. J Exp Med 193: 447-458.
38. Victora GD, Nussenzweig MC Germinal centers. Annu Rev Immunol 30: 429-457.
39. Wang J, Watanabe T (1999) Expression and function of Fas during differentiation and activation of B cells. Int Rev Immunol 18: 367-379.
40. Rothstein TL, Zhong X, Schram BR, Negm RS, Donohoe TJ, et al. (2000) Receptor-specific regulation of B-cell susceptibility to Fas-mediated apoptosis and a novel Fas apoptosis inhibitory molecule. Immunol Rev 176: 116-133.
41. Mizuno T, Zhong X, Rothstein TL (2003) Fas-induced apoptosis in B cells. Apoptosis 8: 451-460.

42. Koopman G, Keehnen RM, Lindhout E, Zhou DF, de Groot C, et al. (1997) Germinal center B cells rescued from apoptosis by CD40 ligation or attachment to follicular dendritic cells, but not by engagement of surface immunoglobulin or adhesion receptors, become resistant to CD95-induced apoptosis. Eur J Immunol 27: 1-7.
43. Eliopoulos AG, Young LS (2004) The role of the CD40 pathway in the pathogenesis and treatment of cancer. Curr Opin Pharmacol 4: 360-367.
44. Planken EV, Willemze R, Kluin-Nelemans JC (1996) The role of the CD40 antigen on malignant B cells. Leuk Lymphoma 22: 229-235.
45. Funakoshi S, Longo DL, Beckwith M, Conley DK, Tsarfaty G, et al. (1994) Inhibition of human B-cell lymphoma growth by CD40 stimulation. Blood 83: 2787-2794.
46. Travert M, Ame-Thomas P, Pangault C, Morizot A, Micheau O, et al. (2008) CD40 ligand protects from TRAIL-induced apoptosis in follicular lymphomas through NF-kappaB activation and up-regulation of c-FLIP and Bcl-xL. J Immunol 181: 1001-1011.
47. Nuutinen U, Ropponen A, Eeva J, Eray M, Pellinen R, et al. (2009) The effect of microenvironmental CD40 signals on TRAIL- and drug-induced apoptosis in follicular lymphoma cells. Scand J Immunol 70: 565-573.
48. Dicker F, Kater AP, Fukuda T, Kipps TJ (2005) Fas-ligand (CD178) and TRAIL synergistically induce apoptosis of CD40-activated chronic lymphocytic leukemia B cells. Blood 105: 3193-3198.
49. Banning C, Votteler J, Hoffmann D, Koppensteiner H, Warmer M, et al. (2010) A flow cytometry-based FRET assay to identify and analyse protein-protein interactions in living cells. PLoS One 5: e9344.
50. Schneider P, Willen L, Smulski CR (2014) Tools and Techniques to Study Ligand-Receptor Interactions and Receptor Activation by TNF Superfamily Members. Methods Enzymol 545: 103-125.
51. Kienzler AK, Rizzi M, Reith M, Nutt SL, Eibel H (2013) Inhibition of human B-cell development into plasmablasts by histone deacetylase inhibitor valproic acid. J Allergy Clin Immunol 131: 1695-1699.

Figure legends

Figure 1. CD40 interacts with Fas and TRAILR2

A. Flow cytometry FRET assay between CD40, Fas and TACI. The image shows the combination of the three receptors fused to ECFP and EYFP. The gate used to calculate the percentage of FRET positive cells was established by using a ECFP-EYFP fusion protein (100% FRET blue dots) together with a ECFP/EYFP co-transfection (0% FRET red dots), bottom left panel. Bottom right panel shows the mean value of FRET positive cells and SEM of five independent experiments. **B.** Flow cytometry FRET screening for different TNFRSF members expressed in B cells. **C.** Flow cytometry FRET assay between CD40, Fas, TRAILR2 and TACI lacking the intracellular domain (ΔICD).

In all cases FRET+ corresponds to the positive FRET reporter (ECFP-EYFP fusion protein) and FRET- corresponds to the negative control (ECFP/EYFP co-transfection). The dotted line represents background FRET levels.

Figure 2. CD40, Fas and TRAILR2 co-localize at the surface of human B cells.

Immunostainings of CD40-FAS and CD40-TRAILR2 in BJAB TRAILR2-positive (pos) and BJAB TRAILR2-negative (neg) cell lines. Scale bars correspond to 20 μm and 5 μm in the main image and the inset respectively.

Figure 3. CD40 selectively interacts with TRAILR2 over Fas

A. Co-Immunoprecipitation of CD40, Fas and TRAILR2 in BJAB TRAILR2-negative (neg) and TRAILR2-positive (pos) cells followed by WB detection of CD40, Fas and TRAILR2. (WMF: input of whole membrane fraction). **B.** FACS expression profile of CD40 and Fas or CD40 and TRAILR2 on BJAB cell line TRAILR2-negative (left panel) together with a confocal image of the same cell type analyzed by proximity ligation assay (PLA right panel) for both CD40-Fas or CD40-TRAILR2 interactions. **C.** Same as panel B, for the TRAILR2-positive BJAB cell line. **D.** Mean and SEM of the PLA assay. Spot numbers per cell were counted in the focal plane. The number of cells analyzed by PLA is indicated on each image in panels B and C. Scale bars in panels C and D correspond to 10 μm.

Figure 4. CD40 interacts with Fas and TRAILR2 in primary human B cells

A. FACS expression profile of CD40 and Fas on primary human B cells non stimulated (NS), activated with PMA-Ionomycin (PI) or activated with anti-BCR plus CD40L (BC) (left panels) together with a confocal image of the same cell type analyzed by proximity ligation assay (PLA) for CD40-Fas interaction (right panels) (one out of three independent donors is shown). **B.** Percentage of CD40-Fas double positive cells in five different donors treated as described in panel A. **C.** Mean and SEM of the PLA assay for the three donors analyzed by PLA. Spot numbers were counted in positive cells in the focal plane. **D, E and F** Same as A, B and C, but for CD40-TRAILR2 interactions. The number of cells analyzed in the example is indicated on each image. Scale bars correspond to 5 μm. **G.** HLA-DR and isotype control mean fluorescence intensity (MFI) and SEM of five different human primary B cells samples that were either non stimulated (NS), activated with PMA-Ionomycin (PI) or activated with anti-BCR plus CD40L (BC). **H.** Same as G, but for CD86 detection.

Figure 5. Heteromer formation with signalling-incompetent TRAILR2 or Fas has a negative impact on CD40 signalling

A. NF-κB luciferase assay in 293T cells transiently transfected with 0.5 ng of CD40, 1 ng of CD40L (left panel) or with 0.5 ng of TACI, 1 ng of BAFF (right panel) and increasing amounts of GPI-anchored CD40, TRAILR2, Fas or TACI. One out of three independent assays with similar results is shown. **B.** Flow cytometry analysis of TRAILR2-GPI, CD40 full-length and TACI full length surface expression. **C.** Left: surface expression levels of CD40 full-length, CD40-GPI and CD40 full-length in the presence of TRAILR2, detected by staining with Flag-CD40L. Right, surface expression levels of CD40-GPI and TRAILR2-GPI, detected by staining with an anti-TRAILR3 mAb recognizing the GPI-proximal region of the fusion receptors. MFI, mean of fluorescence intensity. **D.** NF-κB luciferase assay in 293T cells transiently transfected with 0.5 ng of CD40, 1 ng of CD40L and increasing amounts of GPI-anchored Fas, Fas-ΔCRD1, CD40 and TACI. One out of two independent assays with similar results is shown. **E.** Flow cytometry analysis of Fas and Fas-ΔCRD1 surface expression.

Figure 6. Endogenous TRAILR2 or Fas modulate CD40 signalling

A. NF-κB response of wild type, Fas KO, TRAILR2 KO and CD40 KO BJAB cell lines induced by the indicated concentrations of Flag-ACRP-CD40L (mega CD40L). One out of two independent experiments is shown **B.** Average of the different clones and replicates of each KO cell line stimulated with 1 μg/ml of mega CD40L. **C.** *ex vivo* expression profile of CD40 in marginal zone (MZ) and switched memory (SM) primary human B cells. **D.** Expression profile of CD40 in MZ and SM along six days of CD40L+IL21 stimulation. **E and F.** Same as C and D, but for Fas expression. **G and H.** Same as C and D, but for TRAILR2 expression. MZ B cells are gated as CD27+, IgD+ and SM B cells are gated as CD27+ IgD-. The mean and SEM of six independent experiments is shown. **I.** Gating set up for CD27+ TRAILR2 low and high B cells using an isotype control for TRAILR2 staining. The same gating was used in panel J. **J.** TRAILR2 expression in CD27+ B cells of one representative donor out of four tested after six day of stimulation with CD40L+IL21. **K.** CFSE proliferation profile of TRAILR2 low CD27+ (grey histogram) and TRAILR2 high CD27+ (black line) primary human B cells of one representative donor out of four tested after six days of stimulation with CD40L+IL21. **L.** Average proliferative response for the four independent donors analysed.

Figure 1

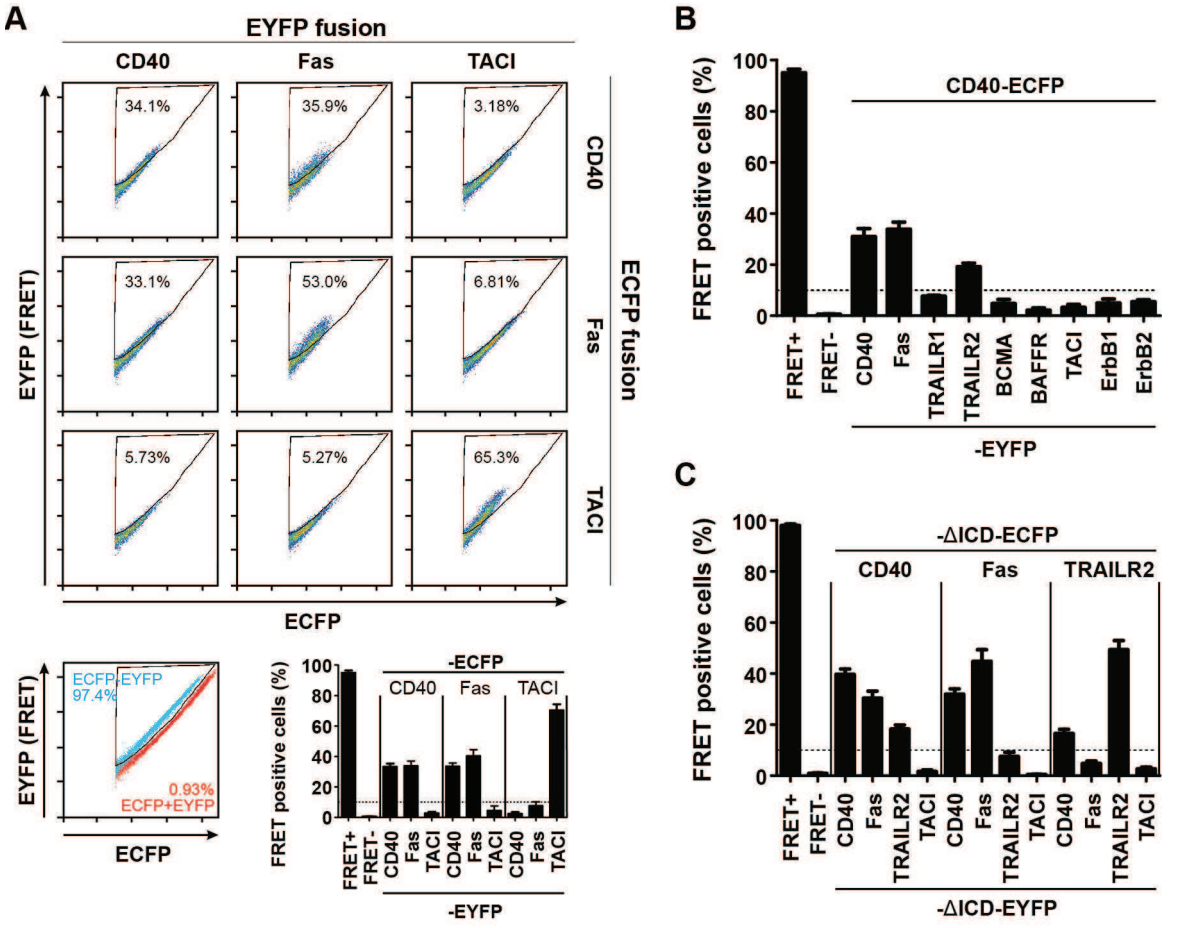

A
EYFP fusion
CD40
Fas
TACI
34.1%
35.9%
3.18%
33.1%
53.0%
6.81%
5.73%
5.27%
65.3%
CD40
Fas
TACI
ECFP fusion
EYFP (FRET)
ECFP
ECFP+EYFP
97.4%
0.93%
ECFP+EYFP
FRET positive cells (%)
-ECFP
CD40
Fas
TACI
FRET+
FRET-
-EYFP
B
CD40-ECFP
FRET positive cells (%)
FRET+
FRET-
CD40
Fas
TRAILR1
TRAILR2
BCMA
BAFFR
TACI
ErbB1
ErbB2
-EYFP
C
-ΔICD-ECFP
CD40
Fas
TRAILR2
FRET positive cells (%)
-ΔICD-EYFP

Figure 2

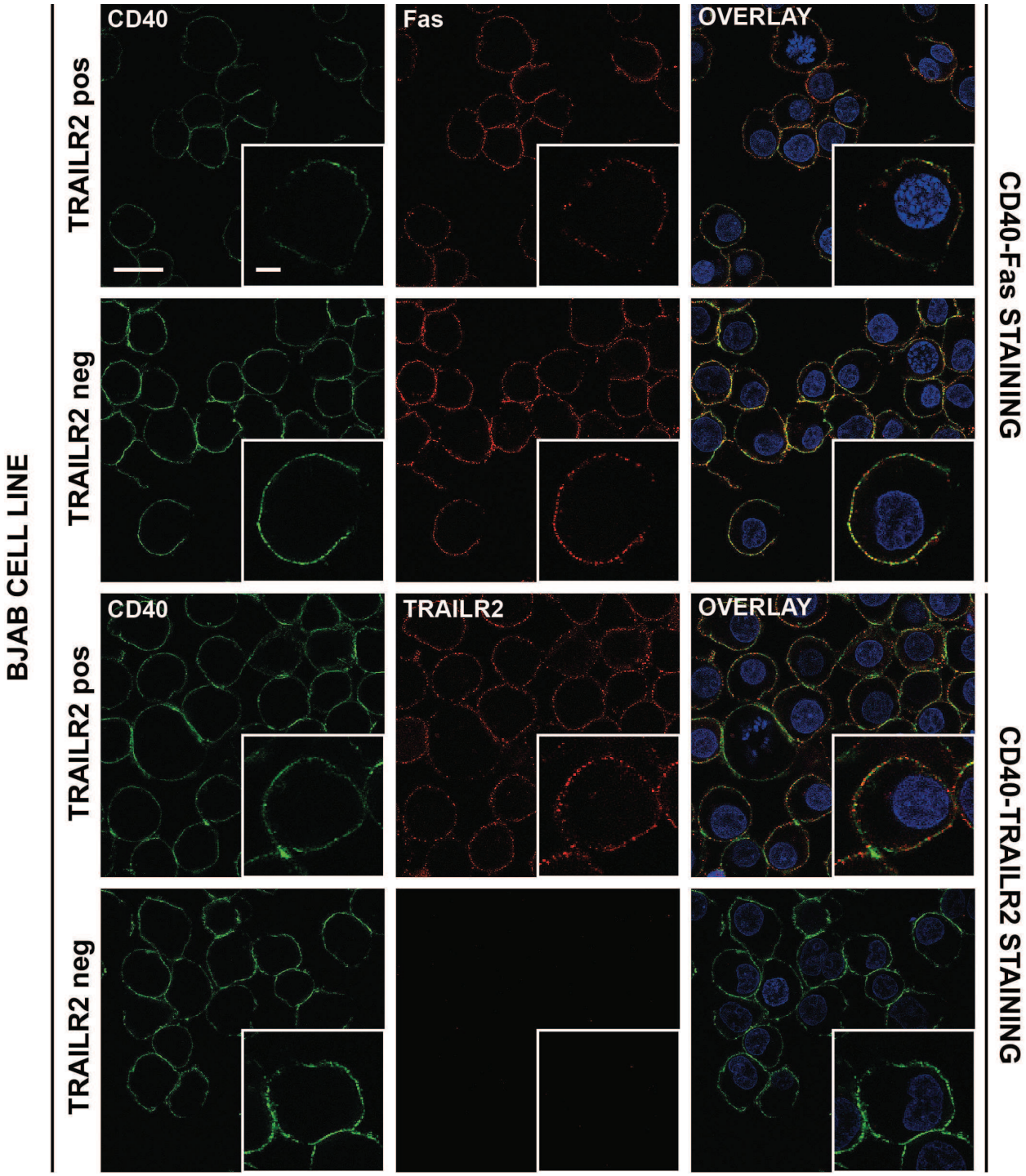

BJAB CELL LINE
TRAILR2 pos
TRAILR2 neg
TRAILR2 pos
TRAILR2 neg
CD40
Fas
OVERLAY
CD40
TRAILR2
OVERLAY
CD40-Fas STAINING
CD40-TRAILR2 STAINING

Figure 3

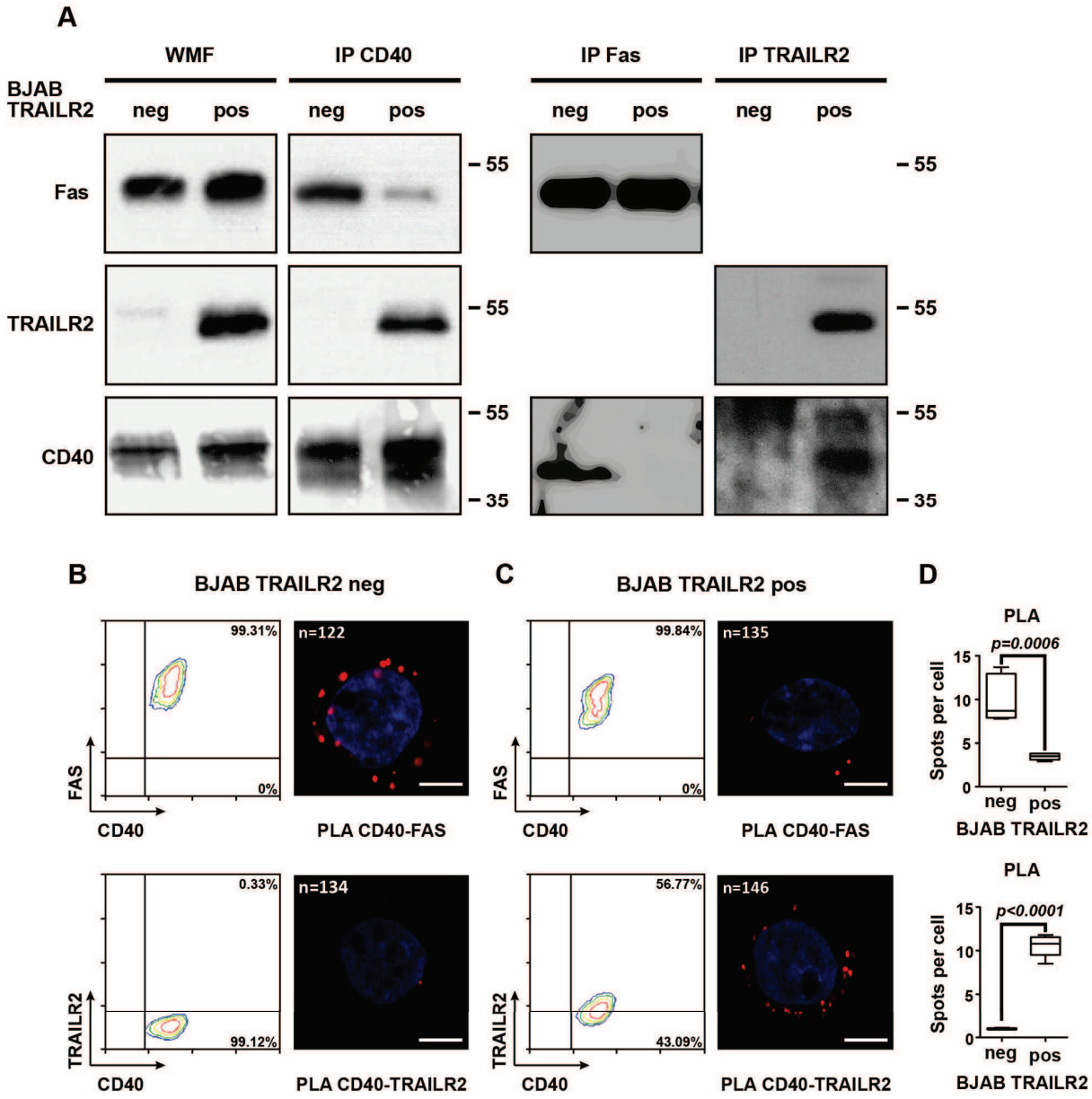

A
WMF
IP CD40
IP Fas
IP TRAILR2
BJAB TRAILR2
neg
pos
Fas
TRAILR2
CD40
55
35
B
BJAB TRAILR2 neg
99.31%
0%
n=122
FAS
CD40
PLA CD40-FAS
0.33%
99.12%
n=134
TRAILR2
PLA CD40-TRAILR2
C
BJAB TRAILR2 pos
99.84%
n=135
56.77%
43.09%
n=146
D
PLA
p=0.0006
p<0.0001
Spots per cell
BJAB TRAILR2

Figure 4

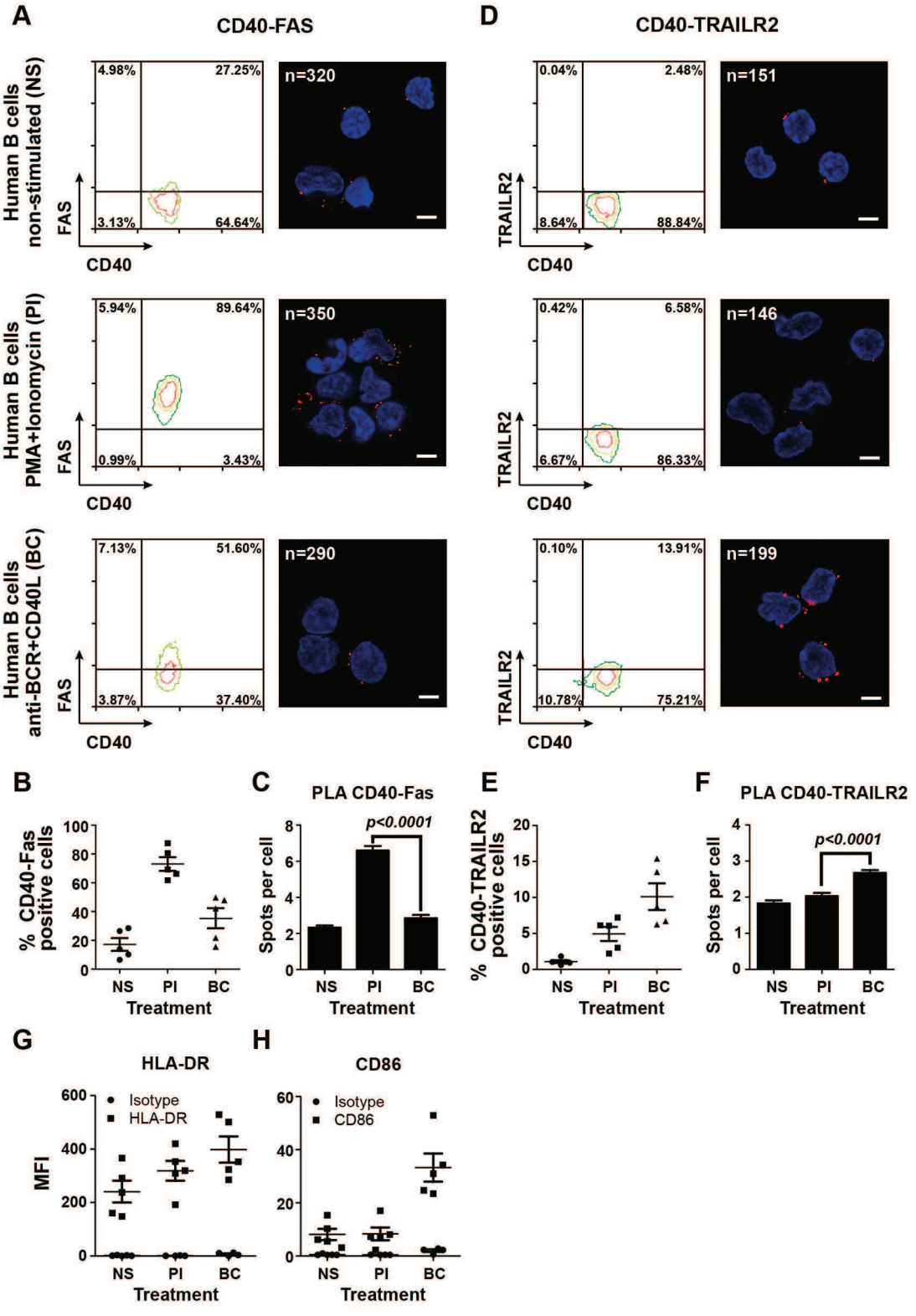

A
CD40-FAS
Human B cells non-stimulated (NS)
4.98%
27.25%
3.13%
64.64%
n=320
Human B cells PMA+Ionomycin (PI)
5.94%
89.64%
0.99%
3.43%
n=350
Human B cells anti-BCR+CD40L (BC)
7.13%
51.60%
3.87%
37.40%
n=290
FAS
CD40
D
CD40-TRAILR2
0.04%
2.48%
8.64%
88.84%
n=151
0.42%
6.58%
6.67%
86.33%
n=146
0.10%
13.91%
10.78%
75.21%
n=199
TRAILR2
B
% CD40-Fas positive cells
C
PLA CD40-Fas
p<0.0001
Spots per cell
E
% CD40-TRAILR2 positive cells
F
PLA CD40-TRAILR2
NS
PI
BC
Treatment
G
HLA-DR
Isotype
HLA-DR
MFI
H
CD86
Isotype
CD86

Figure 5

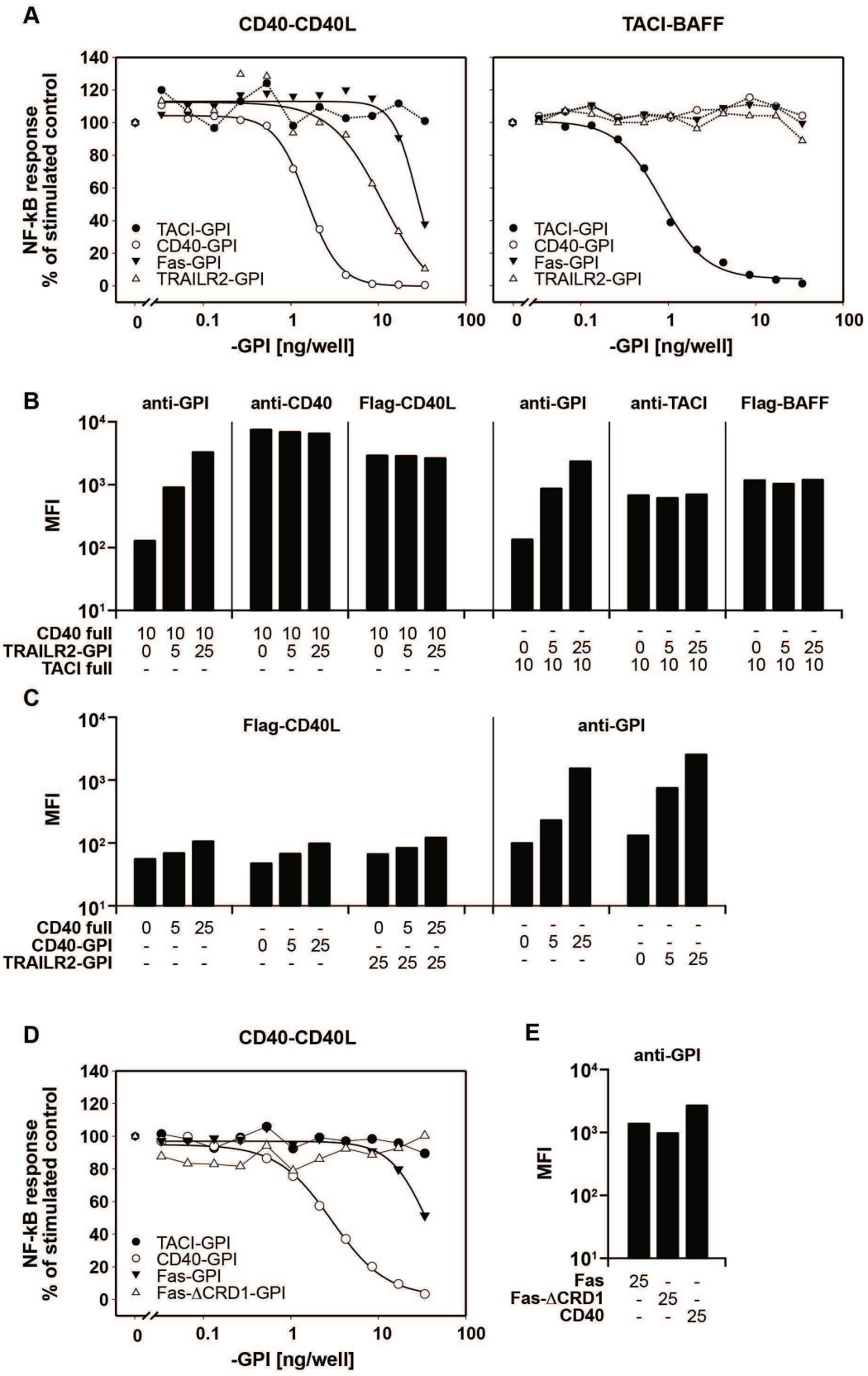

A
CD40-CD40L
TACI-BAFF
NF-kB response
% of stimulated control
TACI-GPI
CD40-GPI
Fas-GPI
TRAILR2-GPI
-GPI [ng/well]
B
anti-GPI
anti-CD40
Flag-CD40L
anti-GPI
anti-TACI
Flag-BAFF
MFI
CD40 full
TRAILR2-GPI
TACI full
C
Flag-CD40L
anti-GPI
MFI
CD40 full
CD40-GPI
TRAILR2-GPI
D
CD40-CD40L
NF-kB response
% of stimulated control
TACI-GPI
CD40-GPI
Fas-GPI
Fas-ΔCRD1-GPI
-GPI [ng/well]
E
anti-GPI
MFI
Fas
Fas-ΔCRD1
CD40

Figure 6

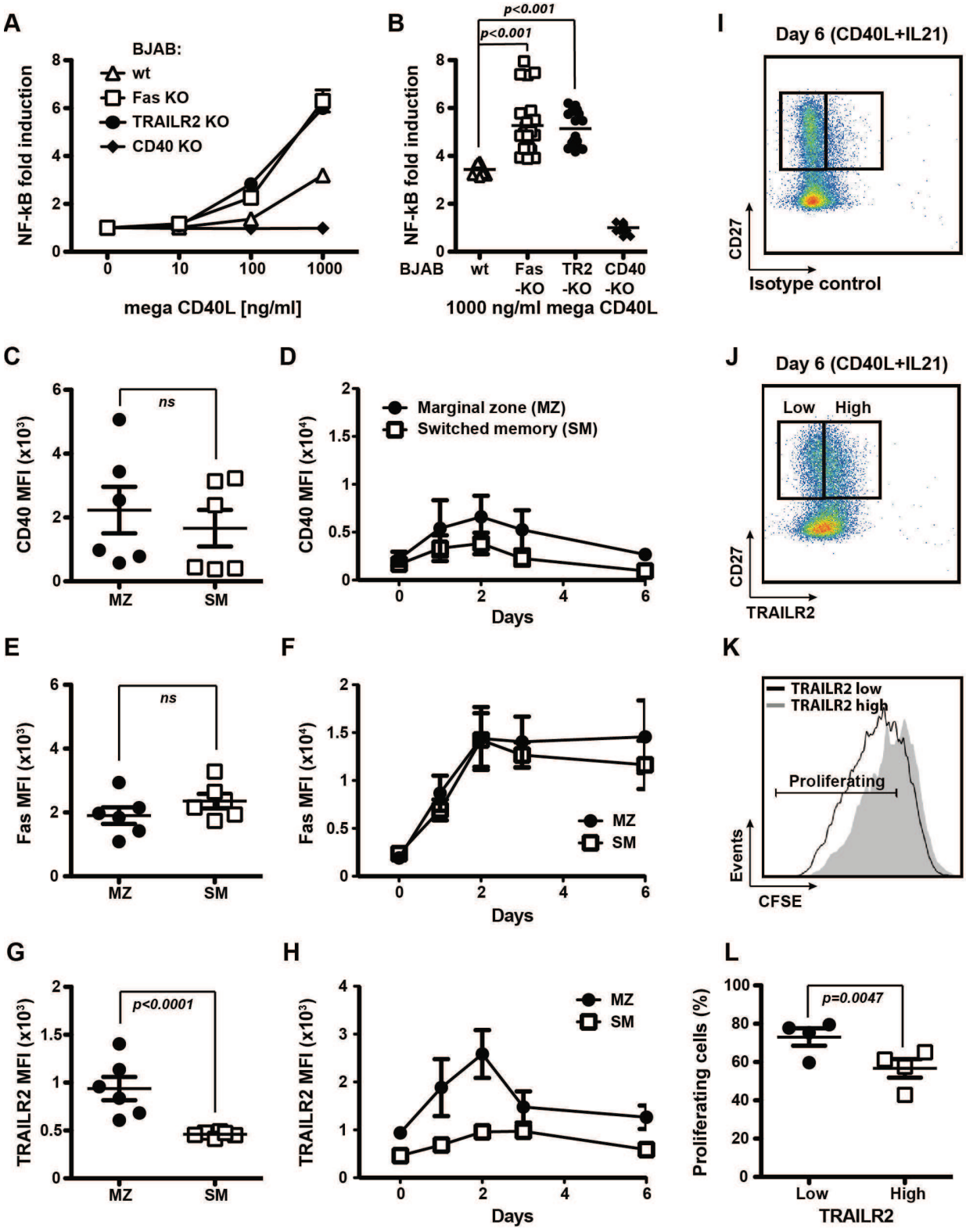

A
BJAB:
wt
Fas KO
TRAILR2 KO
CD40 KO
NF-kB fold induction
mega CD40L [ng/ml]
B
p<0.001
p<0.001
NF-kB fold induction
BJAB wt Fas -KO TR2 -KO CD40 -KO
1000 ng/ml mega CD40L
I
Day 6 (CD40L+IL21)
CD27
Isotype control
C
ns
CD40 MFI (x10³)
MZ SM
D
Marginal zone (MZ)
Switched memory (SM)
CD40 MFI (x10⁴)
Days
J
Day 6 (CD40L+IL21)
Low High
CD27
TRAILR2
E
ns
Fas MFI (x10³)
MZ SM
F
Fas MFI (x10⁴)
MZ
SM
Days
K
TRAILR2 low
TRAILR2 high
Proliferating
Events
CFSE
G
p<0.0001
TRAILR2 MFI (x10³)
MZ SM
H
MZ
SM
TRAILR2 MFI (x10³)
Days
L
p=0.0047
Proliferating cells (%)
Low High
TRAILR2

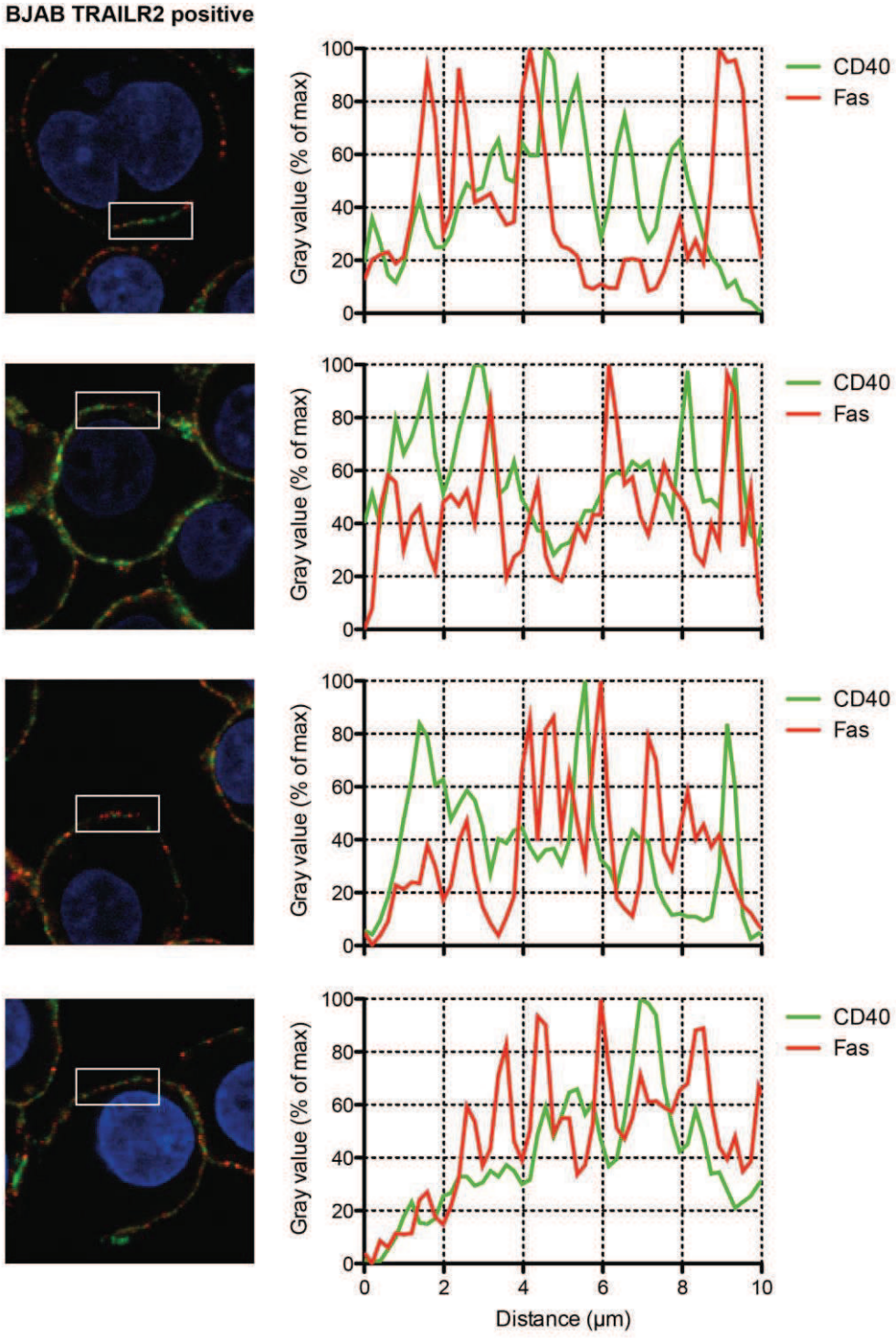
Table S1: List and description of the plasmids used in the study.

Experiment	Code	Coding for	Tag	Backbone
FRET	ps015	-	-	PCR3
	ps2155	-	EYFP	PCR3
	ps2156	-	ECFP	PCR3
	ps2967	EYFP-ECFP fusion	-	pcDNA3.1 zeo
	ps2460	hCD40 1-260	EYFP	PCR3
	ps2461	hCD40 1-260	ECFP	PCR3
	ps2159	hFas 1-227	EYFP	PCR3
	ps2160	hFas 1-227	ECFP	PCR3
	ps3074	hTRAILR1 1-363	EYFP	PCR3
	ps3076	hTRAILR2 1-327	EYFP	PCR3
	ps2948	hBCMA 4-124	EYFP	PCR3
	ps2975	hBAFFR 1-136	EYFP	PCR3
	ps2252	hTACI 1-223	EYFP	PCR3
	ps2253	hTACI 1-223	ECFP	PCR3
	-	ErbB1	EYFP	Other
	-	ErbB2	EYFP	Other
	ps3179	hCD40 1-225 (ΔICD)	EYFP	PCR3
	ps3180	hCD40 1-225 ΔICD)	ECFP	PCR3
	ps3181	hFas 1-195 (ΔICD)	EYFP	PCR3
	ps3182	hFas 1-195 (ΔICD)	ECFP	PCR3
	ps3309	hTRAILR2 1-238 (ΔICD)	EYFP	PCR3
	ps3310	hTRAILR2 1-238 (ΔICD)	ECFP	PCR3
	ps3307	hTACI 1-136 (ΔICD)	EYFP	PCR3
	ps3320	hTACI 1-136 (ΔICD)	ECFP	PCR3
NF-kB Luciferase	ps1614	NF-kB Luciferase	-	Other
	ps1615	Renilla	-	Other
	ps515	-	EGFP	pcDNA3.1 zeo
	ps1336	hCD40 full-length	-	PCR3
	ps514	hCD40L full-length	-	PCR3
	ps687	hFas 1-170	GPI	PCR3
	ps3393	HA signal hFas 84-170 (ΔCRD1)	GPI	PCR3
	ps664	hTRAILR2 1-212	GPI	PCR3
	ps3392	HA signal hTRAILR2 96-212 (ΔCRD1)	GPI	PCR3
	ps1429	hCD40 1-193	GPI	PCR3
	ps897	hTACI 2-160	GPI	PCR3
	ps1383	hTACI full-length	-	PCR3
	ps544	hBAFF full-length	-	PCR3
FACS	ps864	ACRP-hBAFF 137-285	Flag	PCR3
	ps621	ACRP-hCD40L 116-261	Flag	PCR3

CRISPR Cas9 - KO	ps3373	TRAILR2 gRNA	-	Addgene 52961
	ps3374	CD40 gRNA	-	Addgene 52961
	ps3375	Fas gRNA	-	Addgene 52961
	ps3344	Pax2	-	Addgene 12260
	ps3345	VSVg	-	Addgene 8454

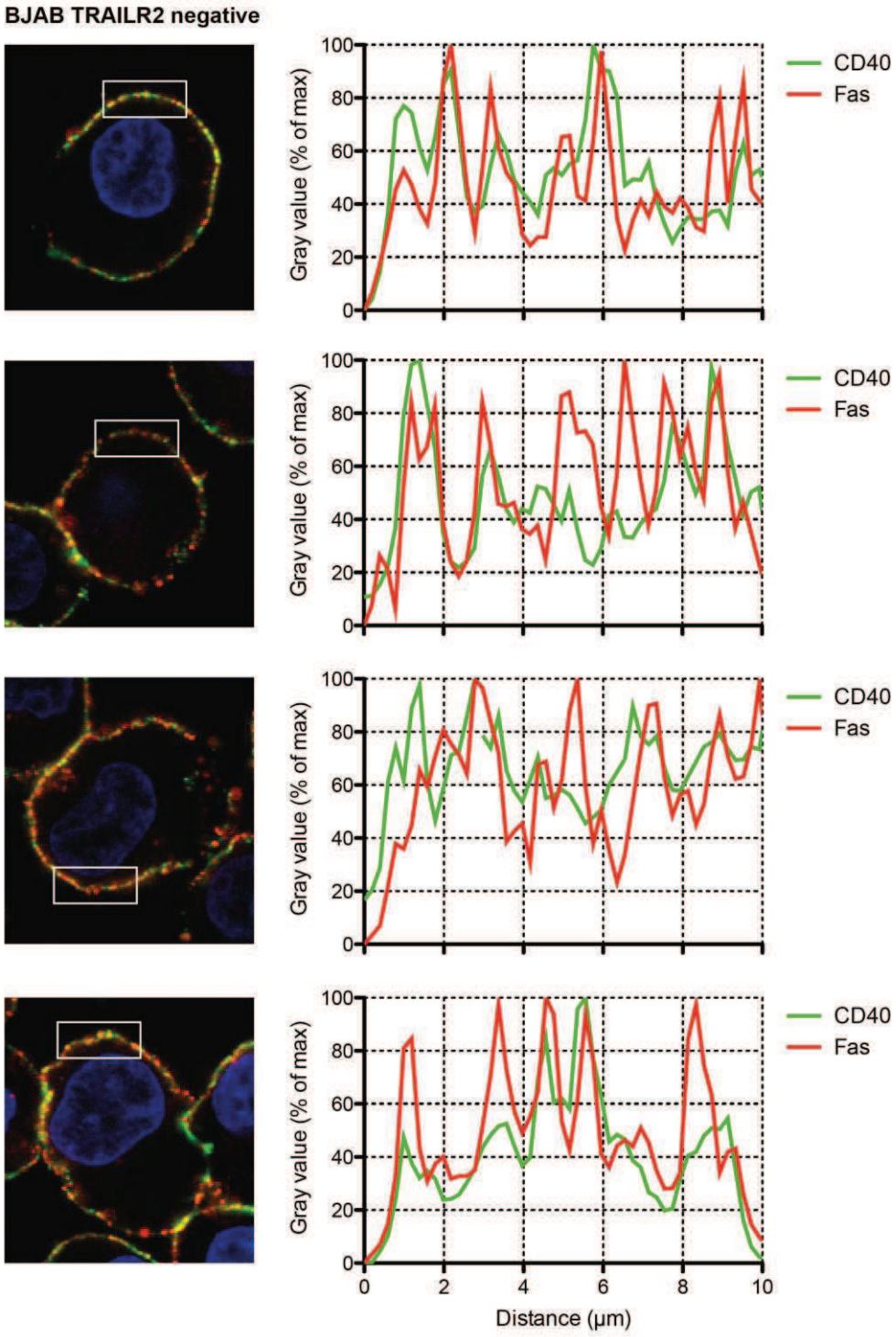
Supplementary figure 1

Immunostaining and fluorescence intensity plots across a section for CD40 and FAS in BJAB TRAILR2 positive cells.



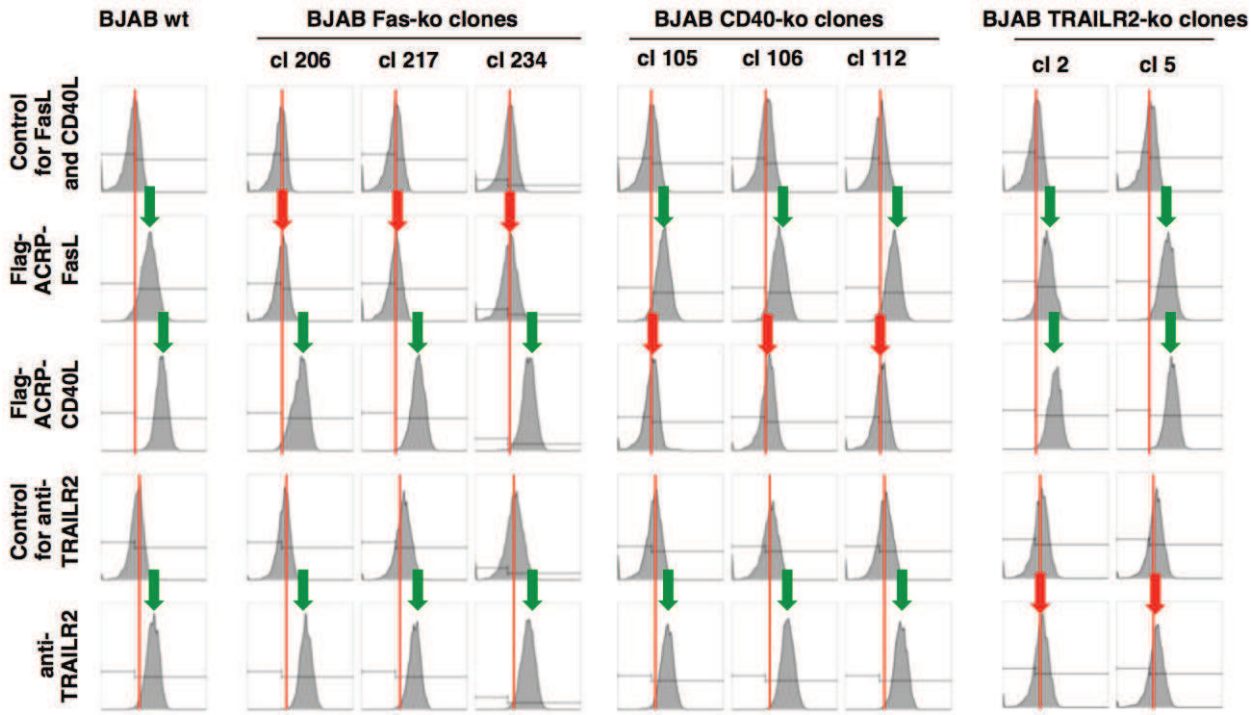
Supplementary figure 2

Immunostaining and fluorescence intensity plots across a section for CD40 and FAS in BJAB TRAILR2 negative cells.



Supplementary figure 3

Characterization of CRISPR/cas9 KO clones for Fas, CD40 and TRAILR2.



CHAPITRE 3

Evaluation du potentiel anticancéreux de complexes carbènes-N-hétérocyclique-Pt(II)

Il a été démontré dans la littérature que l'association d'agonistes de TRAIL avec des agents de chimiothérapie tels que le *cis*platine ou l'oxaliplatine permettait à la fois de potentialiser l'activité pro apoptotique des agonistes des TRAIL-Rs mais aussi de restaurer la sensibilité de certaines cellules cancéreuses fréquemment perdue lors de la progression tumorale (Lemke et al., 2014).

Malgré son efficacité qui n'est plus à démontrer l'utilisation du *cis*platine et de ses analogues en oncologie est quelque peu limitée par les propriétés même du platine. En effet le platine est difficilement soluble et instable en milieux aqueux et engendre de sévères effets secondaires par en agissant à la fois sur les cellules cancéreuses mais aussi sur les cellules qui se multiplient rapidement (Dasari and Tchounwou, 2014).

J'ai travaillé avec des chimistes (UMR 7504, Cronenbourg) qui développent des complexes carbène N-hétérocycliques portant du Pt(II) (Aher et al., 2014). Des premiers travaux avaient déjà été publiés montrant leur activité cytotoxique *in vitro* (Chardon et al., 2011). Cependant, les NHC-Pt(II) n'étaient soluble qu'en DMSO ce qui limitait leurs applications biologiques. Dans le but de solubiliser ces complexes, ils ont été associés à du PEI linéaire qui est connu pour être un agent de transfection efficace.

Mon travail est exposé dans l'article 8 : ***In Vitro* and *In Vivo* Antitumor Efficacy of complexes of N-Heterocyclic Carbene Platin(II) and Polyethylenimine** (en préparation). Les chimistes ont synthétisés des complexes qui associent le NHC-Pt(II) à du PEI linéaire d'un poids moléculaire de 25kDa, avec 3 ratios différents c'est-à-dire : un complexe NHC-Pt(II) présent tous les 10 monomères de PEI (NHC-Pt(II)-PEI10), un complexe NHC-Pt(II) présent tous les 20 monomères de PEI (NHC-Pt(II)-PEI20) un complexe NHC-Pt(II) présent tous les 30 monomères de PEI (NHC-Pt(II)-PEI30).

Les résultats indiquent que le complexe NHC-Pt(II)-PEI30 a la meilleure activité toxique sur un ensemble de lignées cancéreuses humaines et murines *in vitro* en comparaison avec les complexes NHC-Pt(II)-PEI10 et NHC-Pt(II)-PEI20 et le *cis*platine et l'oxaliplatine classiquement utilisés en clinique pour le traitement des cancers. J'ai également évalué le potentiel anti tumoral du complexe NHC-Pt(II)-PEI30 *in vivo* dans un modèle de souris immunodéficientes portant des tumeurs humaines d'un carcinome colorectal. Ces résultats montrent que le NHC-Pt(II)-PEI30 injecté en i .p toutes les 48h à une dose de 10mg/kg induit *i)* un ralentissement significatif de la prolifération des cellules cancéreuses *ii)* a une meilleure activité anti tumorale que l'oxaliplatine utilisé à la même concentration de platine. De plus contrairement à l'oxaliplatine, NHC-Pt(II)-PEI30 n'induit pas de toxicité au niveau du site d'injection.

Ces résultats encourageants montrent pour la première fois le potentiel antitumorale des complexes NHC-Pt(II)-PEI *in vivo*.

In Vitro and *In Vivo* Antitumor Efficacy of complexes of N-Heterocyclic Carbene Platin(II) and Polyethylenimine

(Article en préparation)

Neila Chekkat, Georges Dahm, Justine Sitz, Benoit Frisch, Gilles Guichard, Stéphane Bellemin-Laponnaz*, Sylvie Fournel*

N. Chekkat and G. Dahm contributed equally to this work

* Shared senior authorship

Abstract

Platinum N-heterocyclic carbene complexes are of particular interest in cancer research because of their stability, ease of functionalization and clear cytotoxicity in human cancer cells. Here, we proposed an innovative and versatile polymer drug conjugate wherein NHC-Pt(II) complexes are combined with polyethyleimine (PEI). We showed that NHC-Pt(II)-PEI compounds induced cell death of human cancer cells *in vitro* and *in vivo* in a xenograft mouse model.

Introduction

Cis-diaminedichloroplatinum (II) (Rosenberg et al., 1965), best known as cisplatin and its analogues represent the most widely used chemotherapeutic drugs in the world for treatment of cancers such as testicular, ovarian, head neck, lung cancer and non-Hodgkin lymphoma (Dasari and Bernard Tchounwou, 2014). Platinum based compounds are used either as the main treatment or in combination with surgery and/or radiotherapy. Over 50% of tumors are treated with platinum-based drugs (cisplatin, carboplatin, oxaliplatin) alone or co-administered with other chemotherapeutic agents.

In spite of its efficiency, their clinical applications are limited by severe side effects including nephrotoxicity, neurotoxicity, and ototoxicity. Furthermore, platinum treatment is frequently associated with intrinsic or acquired cell resistances. These limitations are mainly due to poor selectivity and stability of the drugs itself (Hu et al., 2011)

To circumvent the drawbacks of cisplatin and its derivatives, various strategies have been developed. (Oberoi et al., 2013). Briefly, these strategies are based on *i)* the development of new platinum-complexes that display different DNA-binding modes or have alternative cellular targets beside DNA, including mitochondria (Marrache et al., 2014) or proteins (Cubo et al.,

2010) and *ii)* the improvement of drug delivery to permit accumulation in tumor sites. Very recently, some groups pointed to the importance of N-Heterocyclic Carbene (NHC) as a new chemical structure for the development of metal based drugs (Mercs and Albrecht, 2010). These NHC are cyclic compounds containing one singlet divalent carbone atom with 6 electrons shell and bond to two nitrogen neighbors. These neutral molecules are highly σ-donators and form readily transition metal complexes (Nelson and Nolan, 2013). Their electronic parameters are easily adjustable by varying the nitrogen's substituents or NHC backbone itself. Most studies used gold, copper, palladium, or silver NHC derivatives to induce tumor toxicity (Gasser et al., 2011; Liu and Gust, 2013). Since then, few studies considered platinum-NHC (NHC-Pt(II)) complexes as potential platforms for anticancer agents (Skander et al., 2010). The group of Marinetti (Skander et al., 2010) first showed that NHC-Pt(II) complexes presented increased cytotoxic activities over cisplatin.

We previously reported the development of new post-modification approaches, so by ruthenium catalyzed 1,3-dipolar azide-alkyne cycloaddition (Chardon et al., 2011) or by ligand exchange reactions in a trans [(pyridine)Pt(NHC)X2] complexes where pyridine could be exchange with another ligand (Chardon et al., 2012a). We demonstrated the cytotoxic activity on various human cancer cell lines of NHC-Pt(II) complexes alone (Chardon et al., 2011) or conjugated with estradiol to target tumor cells that expressed estrogen receptor (Chardon et al., 2012b), that were in most case better than cisplatin. Nevertheless, one limitation of NHC as ligand for platinum is that the NHC-Pt(II) complex solubility is weak in the biological solutions thus limiting its use for *in vivo* experiments. Here, we proposed an innovative and versatile polymer drug conjugate wherein NHC-Pt(II) complexes are combined with polyethyleimine (PEI) (Silva et al., 2012). PEI is an organic polymer formed by polymerization of aziridine. There are two forms of PEI including linear PEI (L-PEI) composed only by secondary amine groups and branched PEI composed by both primary, secondary and tertiary amine groups. The first biological application of PEI was as a transfection reagent for nucleic acid transfer into cells (Godbey et al., 1999). Indeed, L-PEI has been widely used for non-viral gene or siRNA transfer *in vivo*. (Patnaik and Gupta, 2013) (Hobel and Aigner, 2013). Ongoing clinical trials for the treatment of bladder cancer (Sidi et al., 2008) or ovarian cancer (Alvarez et al., 2014) use L-PEI-mediated plasmid DNA deliver.

In the present study, hydrosoluble linear PEI, would not only serve as carrier for the poor water soluble platinum-NHC complexes to reach cells but would also protect the metal from side reactions with undesirable molecules such as serum proteins.

We used NHC-Pt(II) compounds with the 3-benzyl-1-methyl-imidazolilydene as NHC part that had already showed a cytotoxic activity against tumor cells (Chardon et al., 2012b). Using this NHC, we developed NHC-Pt(II)-PEI compounds with various ratio between $NHCH_2CH_2$ (PEI) monomers and NHC-Pt(II) and evaluated their cytotoxic activity against human cancer cells *in vitro* and *in vivo* in a xenograft mouse model.

Results and discussion

NHC-Pt(II) complexes with L-PEI 25 KDa exhibit better anti-proliferative activity

In literature, the gene delivery using low molecular weight linear polymers were described to unite low toxicity with high potential to cross the membrane and thus delivering genes into the cell, whereas higher molecular weight polymers showed an increased toxicity (Fischer et al., 2003).

We first evaluated the optimal weight of the PEI which permitted to a NHC-Pt(II) to induce a significant cell cytotoxicity when associated with PEI. For this, we synthetized complexes that associated the NHC-Pt(II), containing 3-benzyl-1-methyl-imidazolilydene as NHC part, with linear PEI of 1.8 kDa, 2.5 kDa, 25 kDa and 250 kDa in a ratio of one NHC-Pt(II) molecule every 20 monomers of PEI (**Figure 1**). The NHC-Pt(II) containing 3-benzyl-1-methyl-imidazolilydene as NHC part (**Figure 2**) were shown to induce significant cell cytotoxicity of various cancer cell lines (Chardon et al., 2012b). The NHC-Pt(II)-PEI complexes could be solubilized in ethanol at a concentration (1mM) such that the final concentration of ethanol in the cell culture medium was less than 10 %. Ethanol as solvent has the advantage to be less toxic for the cells than DMSO (classically used to solubilized NHC-metal complexes). The cytotoxicity of the various NHC-Pt(II)- PEI in ethanol was, then, assayed on the human lymphoma BJAB cell line. As showed in **Figure 2**, the best cytotoxicity on B lymphoma cells was observed with complexes that contained 25 kDa PEI or 250 kDa PEI. Complexes with PEI 250 kDa had a better activity than complexes with PEI 25kDa as showed by its half inhibitory concentration (IC_{50}) about 15µM versus 1µM. However, complexes with PEI 250 kDa were poorly soluble in aqueous medium and therefore were difficult to use for biological assays. These first results are clearly in accordance with data obtained with PEI as transfection agent showing that PEI 25 kDa is the best compromise between efficacy and toxicity (Breunig et al., 2005).

Therefore, we used PEI 25 kDa in the rest of the study and referred it as "PEI".

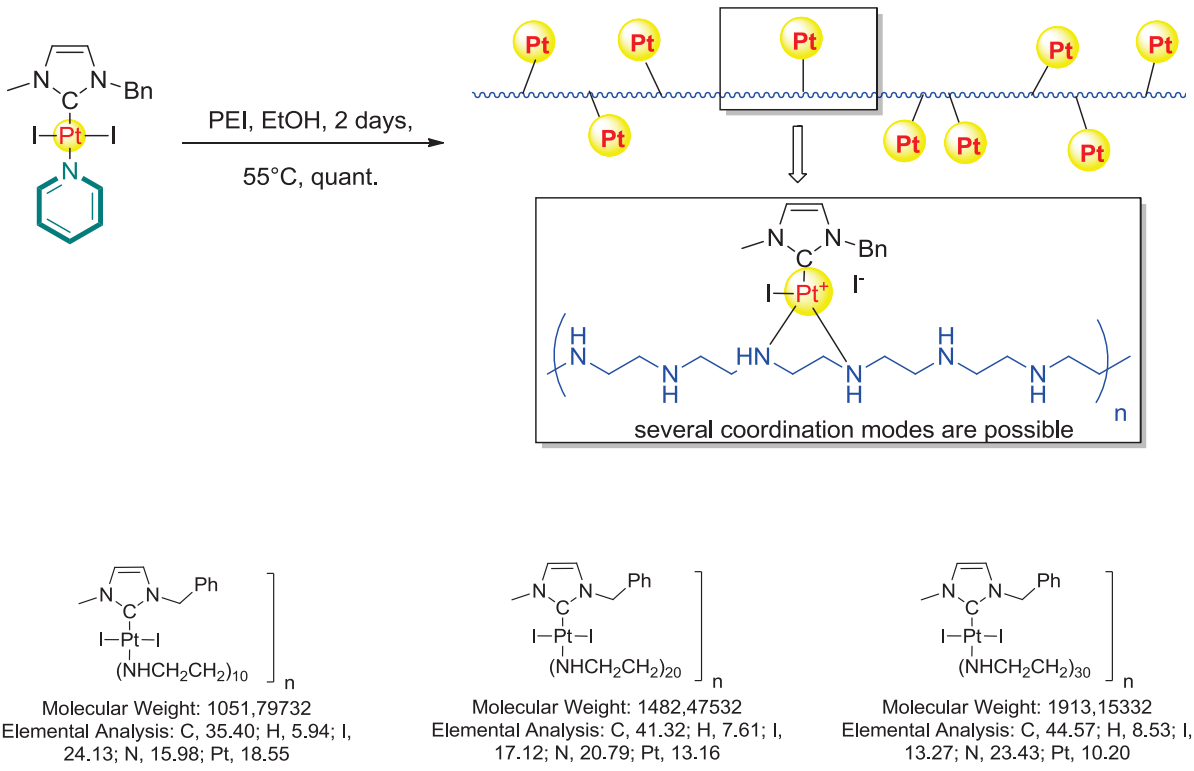


Figure 1: Synthesis of NHC-Pt(II)-PEI compounds

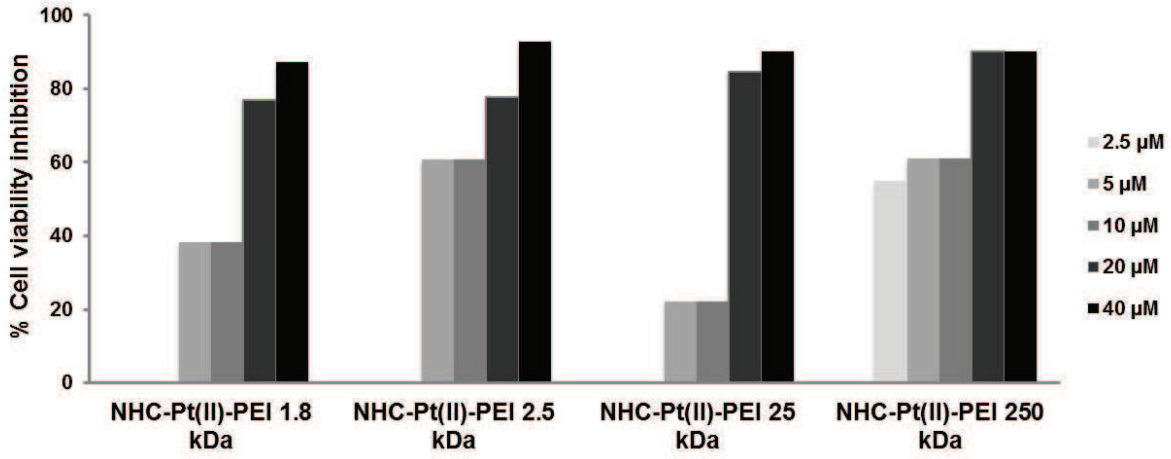


Figure 2: NHC-Pt(II) complexes with PEI 25 KDa exhibit better cytotoxic activity

BJAB cells (10^5 cells/well) were treated with various NHC-Pt(II)-PEI 20 complexes (NHC=3-benzyl-1-methyl-imidazolilydene; one Pt each 20 monomers) in which PEI molecular weight was 1.8 kDa, 2.5 kDa, 25 kDa and 250 kDa at indicated concentrations. After 24 of incubation, cell death was evaluated using MTS assay. The results are expressed as % of cell viability inhibition according to the following formula: %vviable cell = (OD (treatment) /OD(100% viability) * 100) were cells incubated with medium alone were was considered as 100% of viability.

NHC-Pt(II)-PEI30 presents the better cytotoxic activity against human and murine cancers cells lines

We used the versatility of the NHC-Pt(II)PEI to evaluate the quantity of platinum to induce optimal cancer cell cytotoxicity. For this, we synthetized complexes that associated the NHC-Pt(II) with PEI 25 kDa with various ratio of NHC-Pt(II) i.e. one NHC-Pt(II) molecule every 10 monomers of PEI (NHC-Pt(II)-PEI10), one NHC-Pt(II) molecule every 20 monomers of PEI (NHC-Pt(II)-PEI20) and one NHC-Pt(II) molecule every 30 monomers of PEI (NHC-Pt(II)-PEI30). The cytotoxic effect of these NHC-Pt(II)-PEIn complexes solubilized in ethanol were then investigated in a panel of 5 human cancer cell lines and 2 murine cell lines: HCT116 (colorectal adenocarcinoma), U87 (glioblastoma), PC3 (prostate adenocarcinoma expressing the PSMA antigen), MCF-7 (breast adenocarcinoma expressing the estrogen receptor), MDA-MB-231 (breast adenocarcinoma), a murine malignant cell line, TC1 (lung cancer), and a murine non cancer cell line, 3T3 (fibroblast). As shown in **Figure 3**, NHC-Pt(II)-PEI10 and NHC-Pt(II)-PEI30 induced cytotoxicity in all cell lines whereas NHC-Pt(II)-PEI20 was active only in HCT116, U87, TC1 and 3T3. PEI-25KDa without NHC-Pt(II) has a slight effect on PC3, MDA-MB-31 and TC1 but at very high and, therefore, non physiological concentrations (**Figure 3**). Interestingly, when IC50 were compared (**Table 1**), NHC-Pt(II)-PEI30 displayed the better cytotoxic activity whatever the cell lines suggesting that the ratio one NHC-Pt(II) molecule every 30 monomers of PEI was optimal for cytotoxic activity. These results are unexpected as NHC-Pt(II)-PEI30 contain less platinum than NHC-Pt(II)-PEI20, or NHC-Pt(II)-PEI10. We could hypothesize that the platinum biodisponibility is better with less platinum.

Finally, we also compared the cytotoxic properties of NHC-Pt(II)-PEI30 with those of cisplatin and oxaliplatin used as reference drugs (**Figure 4 and Table 1**). Interestingly, the cytotoxicity of NHC-Pt(II)-PEI30 complex was always higher than those of cisplatin and oxaliplatin.

In conclusion, NHC-Pt(II)-PEI30 complex appears as a promising anti-tumor drug.

	U87	HCT116	PC3	MCF7	MDA-MB-231	3T3	TC1	Stock solution in
NHC-Pt(II)PEI10	23±1	21±1.8	17±1.7	12±0.2	10±08	18±0.8	16±1.4	Ethanol
NHC-Pt(II)PEI20	7±0.2	6.5±0.1	>100	>100	>100	9±0.6	5±0.2	Ethanol
NHC-Pt(II)PEI30	2.5±0.1	2.8±0.07	1.8±0.1	1.4±0.06	0.9±0.07	1.8±0.1	1.8±0.1	Ethanol
L-PEI	81±4	60.5±3.8	47±4.2	>100	25.5±0.3	>100	63.5±0.3	Ethanol
Cisplatin	>100	>100	39±1.4	>100	39.5±1.7	13±0.1	>100	H_2O
Oxaliplatin	>100	>100	40	>100	37±1.2	15	>100	H_2O
L-PEI/Oxaliplatin	>100	>100	36±1.4	>100	34	10±1.7	>100	Ethanol

Table 1: Half inhibitory concentration (IC_{50}) (in µM). *In vitro* cytotoxicity activity of platinum derivatives, after 24h of incubation. The IC_{50} was determined using the software Prism Graph Pad 5.0.

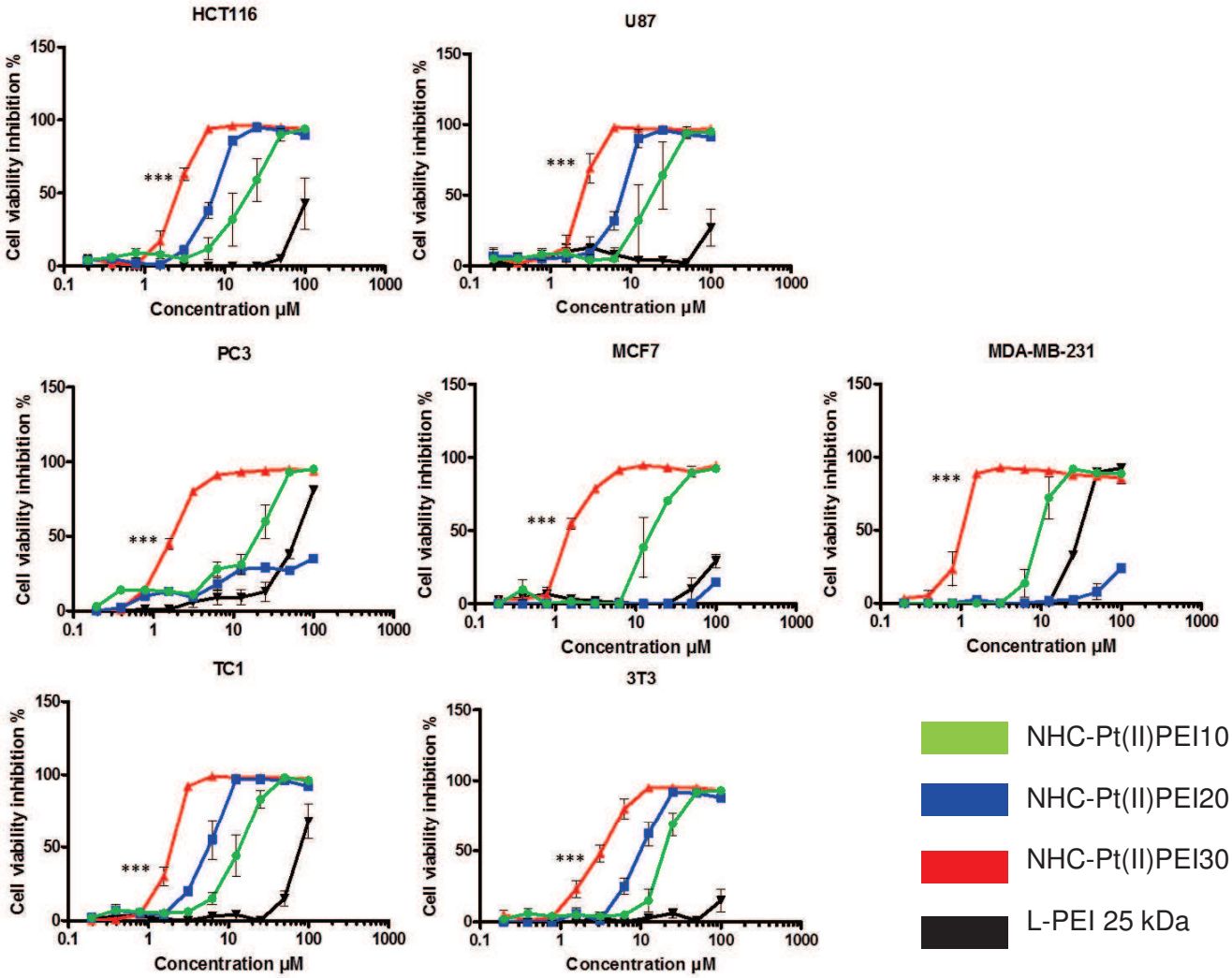


Figure 3: NHC-Pt(II)-PEI30 presents the better cytotoxic activity against human and murine cancers cells lines. HCT116, U87 PC3, MCF-7, MDA-MB-231, TC1 and 3T3 cells (10^5cells/wells) were treated with the indicated concentrations of NHC-Pt(II) (NHC=3-benzyl-1-methyl-imidazolilydene) in which PEI molecular weight was 25kDa with various ratio of platinium: one NHC-Pt(II) molecule every 10 monomers of PEI (NHC-Pt(II)-PEI10), one NHC-Pt(II) molecule every 20 monomers of PEI (NHC-Pt(II)-PEI20) and one NHC-Pt(II) molecule every 30 monomers of PEI (NHC-Pt(II)-PEI30). After 24h of treatment, cell death was evaluated using MTS Assay. Results are expressed as the mean of 3 experiments ± SEM. The statistical significance was calculated by a non-parametric ANOVA 2 way test plus a Bonferonni correction. Results with a p-value less than 0.05 were considered significant. Each experiment was made in triplicate.

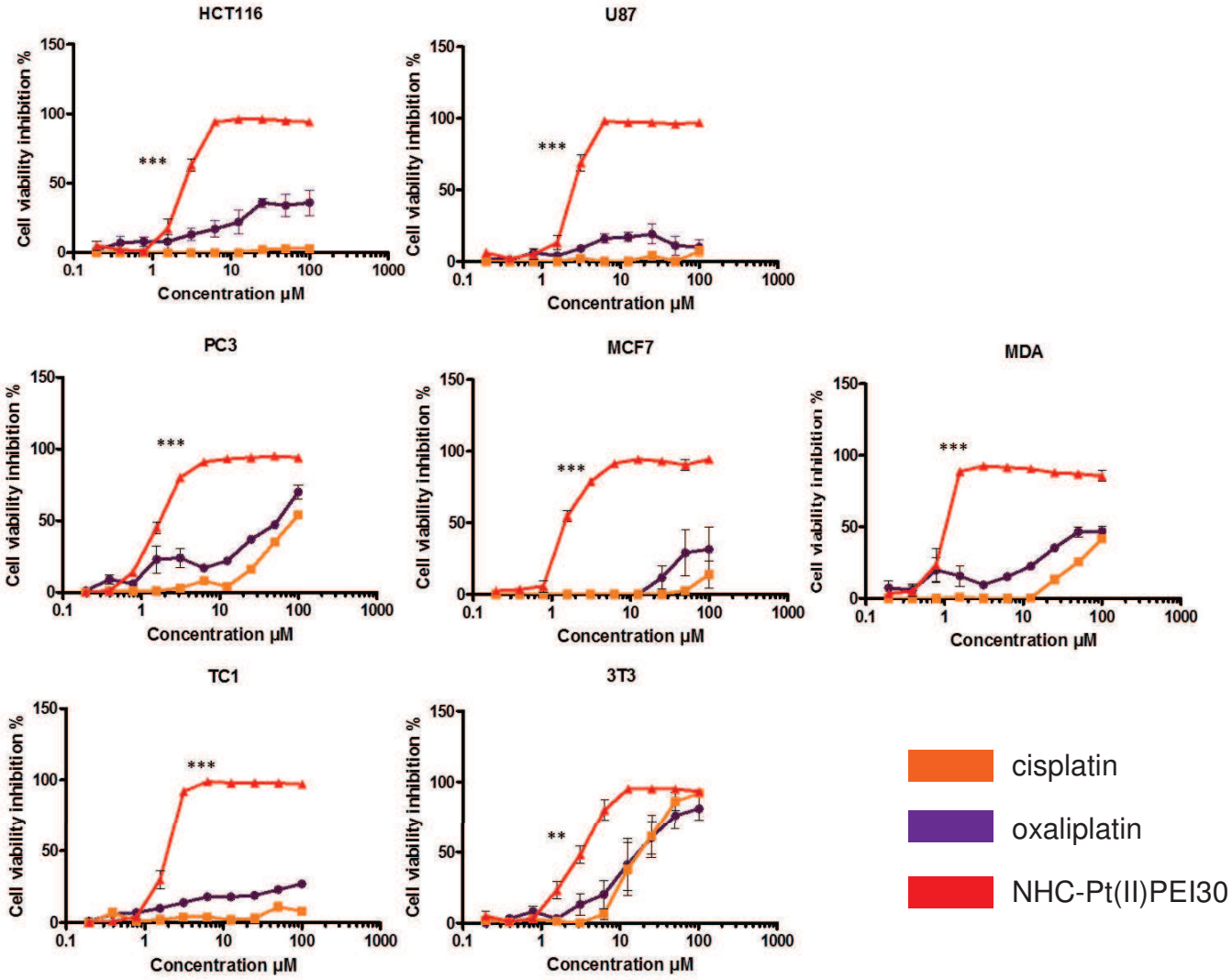


Figure 4: The NHC-PEI 30 is more efficient to induce tumor cell cytotoxicity of malignant cells than cisplatin or oxaliplatin. The same cell lines that those of figure 3 was treated with NHC-Pt(II) (PEI 25kDa with a ratio of one NHC-Pt(II) every 30 PEI monomer) or with cisplatin or oxaliplatin at the indicated concentrations. Cell death was measured after 24h treatment using MTS Assay. Results are expressed as the mean of 3 experiments ± SEM. Results with a p-value less than 0.05 were considered significant.

NHC-PEI 30 complex inhibits HCT116 colon cancer cell growth in xenograft mouse model

To assess if the NHC-Pt(II)-PEI30 complex had a relevant antitumoral activity *in vivo,* we evaluated it in a HCT116 tumor xenograft mouse model. For this, immunodeficient mice were s.c injected with 5.10^6 cells HCT116 and when the tumor became palpable (mean tumor volume about $25mm^3$), we started an i.p administration every 48h during 23 days. Dose of 10mg/kg NHC-Pt(II)-PEI30 was compared to classical dose of 10mg/kg of oxaliplatin used as reference (Wang et al., 2009). At 10 mg/kg, oxaliplatin contains five more Pt(II) than the NHC-Pt(II)-PEI30 complex at the same concentration. To homogenize the Pt(II) concentration, a dose of 2mg/kg of oxaliplatin was added in the experiment. The various compounds were injected in a solution of NaCl 0.9% (v/v) containing not more than 10% (v/v) of ethanol. As shown in **Figure 5**, NHC-Pt(II)-PEI30 drastically inhibited tumor growth with a 80% decrease of tumor volume in comparison with non-treated mice, thus confirming its anti-proliferative activity *in vivo*. Oxaliplatin at the dose of 10mg/kg has the same effect as NHC-Pt(II)-PEI30 complexes. Interestingly oxaliplatin at 2mg/kg, a dose in which the Pt(II) concentration was the same than with NHC-Pt(II)-PEI30 at 10 mg/kg, has only a slightly effect in comparison to NHC-Pt(II)-PEI30.

Note that the oxaliplatin treatment induced hemorrhagic events at the site of injection, as it has been already described in human after oxaliplatin treatment (Koutras et al., 2004) (**Figure 6**) while NHC-Pt(II)-PEI30 did not. All these results suggest that NHC-Pt(II)-PEI30 could represent an alternative to oxaliplatin for tumor treatment.

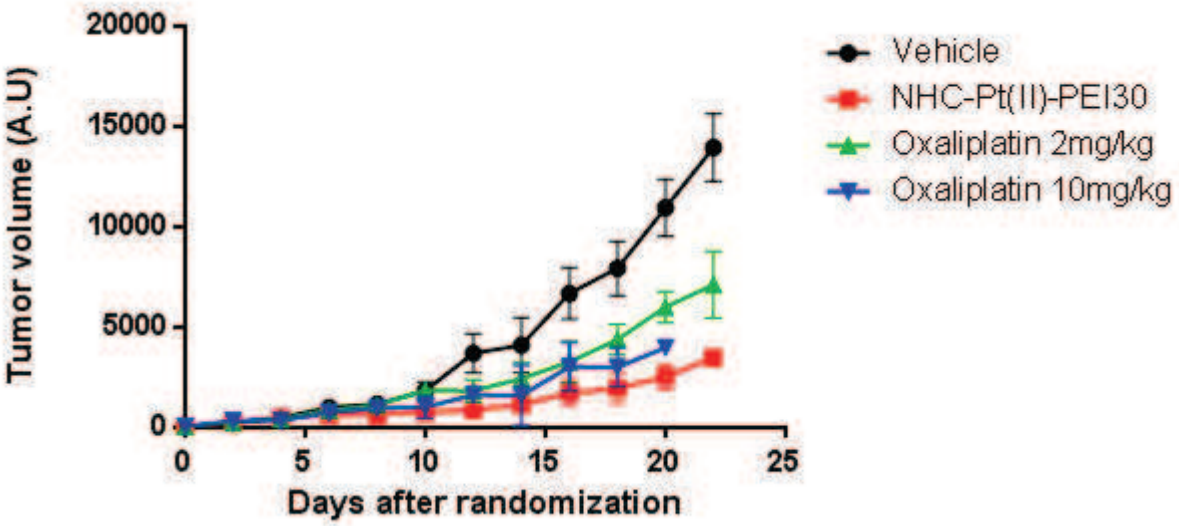


Figure 5: NHC-Pt (II)-PEI 30 complex exhibits antitumor effect in HCT116 colon cancer xenografts in mice model. 5-week-old female nude mice were s.c injected with 5.10^6 dissociated HCT116 cells in the right flank and tumors were allowed to growth until to reach the mean volume of $25mm^3$. Injections of NHC-PEI 30 (10mg/kg), oxaliplatin (2mg/kg, 10mg/kg) or vehicle (0.9% NaCl) were administered in i.p route over 48h, during 15 days. Tumor volume was determined by caliper measurement and normalized toward the tumor volume observed at the beginning of the treatment. Results are expressed as the mean of 2 experiments ± SEM (n= 18). Results with a p-value less than 0.05 were considered significant.

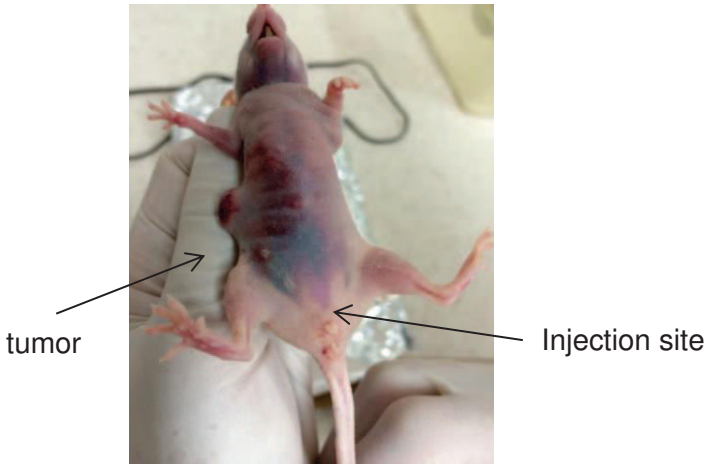


Figure 6: Oxaliplatin treatment induces hemorrhagic event at the injection site

Oxaliplatin was i.p injected at a concentration of 10m/kg each 48 hours during 13 days. After 4 treatments, sensitivity and hemorrhagic event appeared near the injection site.

Conclusion

In conclusion, we developed a new and versatile polymer drug conjugate wherein NHC-Pt(II) complexes are combined with polyethyleimine. We demonstrated that the optimal weight of a linear PEI which permit to a NHC-Pt(II)-PEI complex to induce a significant cell cytotoxicity *in vitro* is 25kDa. Surprisingly, the NHC-Pt(II)-PEI30 bearing less platinum was the most cytotoxic complexes, suggesting that this organization is optimal for platinum cytotoxic activity. Moreover we showed that NHC-Pt(II)-PEI30 was more efficient in inducing tumor cell cytotoxicity than oxaliplatin or cisplatin used as reference treatment. Interestingly, we demonstrated the antitumoral potential of NHC-Pt(II)-PEI30 complex in immunodeficient mice bearing human colon cancer cells. At similar platinum concentration, NHC-Pt(II)-PEI30 was more efficient and induced less side effects that oxaliplatin suggesting that this innovative compound could be evaluated in human for tumor treatment.

The gain in cytotoxic activity of NHC-Pt(II)-PEI30 might be due to the PEI molecule that enable cellular internalization via endocytosis through charge-charge interactions with anionic sites on cell surfaces, thus increasing the intracellular concentration of Pt. Indeed, it was described that in physiological conditions, amino nitrogen's of the PEI are protonated resulting in a highly hydrosoluble polycation. Internalization of the cationic particles is assumed to be undertaken by adsorptive endocytosis or secondarily by clathrin-coated pit mechanism (Morille et al., 2008). The proton-sponge effect would permit the release in intracellular environment by osmotic endosome swelling. After cell entering by endocytosis, acid pH in endosomes should release active platinum species (Nowotnik and Cvitkovic, 2009).

These hypotheses will be evaluated in a future study.

Materials and methods

General procedure for NHC-Pt(II)-PEI synthesis: complexes [(NHC)PtI2(pyridine)] were synthesized following procedure previously reported by our group (Chardon et al., 2013). We used the NHC-Pt(II) described in (Chardon et al., 2012b) that showed one of the best cytotoxic activity in human cancers cells. The NHC-Pt(II)-PEI complexes were synthesized as follow: under argon atmosphere, a solution of complex [(NHC)PtI2(pyridine)] (1 eq, NHC = 1-benzyl 3-methyl imidazole-2-ylidene) and linear PEI having a molecular weight of 25 kDa (n eq of CH2CH2NH) in ethanol (10 mL, dried over molecular sieves) is stirred two days at 55 °C. The solvent is removed under vacuum, the solid obtained washed by pentane and dried under vacuum to afford PEI (25, n) were the number n corresponds to the ratio of NHC-Pt(II) per (-NHCH2CH2-) monomeric unit i.e. one NHC-Pt(II) molecule every 10 monomers of PEI (NHC-Pt(II)-PEI10), one NHC-Pt(II) molecule every 20 monomers of PEI (NHC-Pt(II)-PEI20) and one

NHC-Pt(II) molecule every 30 monomers of PEI (NHC-Pt(II)-PEI30). The compounds were characterized by 1H NMR and elemental analysis.

Platinium derivative preparation for in vitro and in vivo assays: Oxaliplatin and cisplatin were purchased from Sigma Aldrich, (Saint-Louis, MO, USA) and were extemporaneously prepared in H2O. NHC-Pt(II)-PEI10, NHC-Pt(II)-PEI20, NHC-Pt(II)-PEI30 and PEI 25kDa stock solution were prepared by dissolution in absolute ethanol at 1mM, the stock solution could be conserved one month. Samples were then diluted in PBS for the *in vitro* assays and in NaCl 0.9% for the *in vivo* experiments.

Cell culture: Human cancer cell lines HCT116 (colorectal adenocarcinoma), U87 (glioblastoma), PC3 (prostate adenocarcinoma expressing the PSMA antigen), MCF-7 (breast adenocarcinoma expressing the estrogen receptor), MDA-MB-231 (breast adenocarcinoma), murine malignant cell line TC1 (lung cancer), and murine non tumoral cell line 3T3 (fibroblast) were cultured in RPMI 1640 (Sigma Aldrich) supplemented with 10% (v/v) of heat-decomplemented fetal calf serum (FCS) (Sigma Aldrich) and Penicillin-Streptomycin (10U-0.1mg, Sigma Aldrich) at 37°C with 5% CO_2, 80% humidity.

Cell viability assays: Cells were seeded in 96-well plates at 1.10^4 cells per well in 100µL of RPMI 10 % FCS, then exposed to the different compounds (NHC-Pt(II) PEI or cisplatin and oxaliplatin as control) during 24 hours at 37°C (5% CO_2). 20 µL of MTS (Promega Corporation, Madison, WI) were added in each well. MTS is composed of tetrazolium compound associated with an electron coupling reagent (phenazine methosulfate). MTS is bioreduced by dehydrogenase enzymes found in metabolically active cells. The quantity of formazan produced as measured by absorbance at 490nm is directly proportional to the number of living cells in culture. After 4h of incubation at 37°C, absorbance was measured at 490 nm (SP200, Safas, Monaco). The absorbance of the blank (RPMI + MTS) was subtracted to the values of each well. The OD of non-treated cells was considered as 100% of viability. The percentage of viability was calculated using the following formula: % viable cell = (OD (treatment) /OD(100% viability) * 100)

In vivo anti-tumor effect: Female five-week old athymic (nu/nu) mice were obtained (Charles River, Bois des Oncins, France). All of the mice were housed in the animal house of the Faculté de Pharmacie of Strasbourg University (Agreement number: E-67-218-26). The experiment procedures were approved by the Comité Régional d'Ethique en Matière d'Expérimentation Animale de Strasbourg (Approval number: AL/107/114/02/13).

Mice were injected into the right flank with 5.10^6 dissociated HCT116 cells, suspended in 100µL of NaCl 0.9% (p/v) solution. Xenografts were allowed to develop during 5 days after grafting. Tumour volume was determined by calliper measurement. Animals were randomly sorted into treatment groups presenting a mean of tumour volume about 25mm^3. The initial value for each mouse was arbitrarily established at 100 %. Change in tumour volume for each mouse was expressed as per cent change using the following formula [(tumour volume day n) x100/ (tumour volume at day 1)]. NHC-Pt(II)-PEI30 at 10mg/kg, oxaliplatin at 10mg/kg (which corresponds to the described efficient dose for *in vivo* anti-tumor activity in mice model (Wang et al., 2009)) and at 2mg/kg (in which the platinium concentration was similar to the platinium concentation of NHC-Pt(II)-PEI30 at 10mg/kg) in NaCl 0.9% were administered over 48h by i.p injection during 13 days.

Statistical Analysis: Results are expressed as the mean of independent experiments ± SEM. The statistical significance between experimental groups was calculated by a non-parametric ANOVA 2 way test plus a Bonferonni correction. Results with a *p*-value less than 0.05 were considered significant.

References

Alvarez, R.D., Sill, M.W., Davidson, S.A., Muller, C.Y., Bender, D.P., DeBernardo, R.L., Behbakht, K., and Huh, W.K. (2014). A phase II trial of intraperitoneal EGEN-001, an IL-12 plasmid formulated with PEG-PEI-cholesterol lipopolymer in the treatment of persistent or recurrent epithelial ovarian, fallopian tube or primary peritoneal cancer: A Gynecologic Oncology Group study. Gynecol Oncol *133*, 433-438.

Breunig, M., Lungwitz, U., Liebl, R., Fontanari, C., Klar, J., Kurtz, A., Blunk, T., and Goepferich, A. (2005). Gene delivery with low molecular weight linear polyethylenimines. The journal of gene medicine *7*, 1287-1298.

Chardon, E., Dahm, G., Guichard, G., and Bellemin-Laponnaz, S. (2012a). Derivatization of Preformed Platinum N-Heterocyclic Carbene Complexes with Amino Acid and Peptide Ligands and Cytotoxic Activities toward Human Cancer Cells. Organometallics *31*, 7618-7621.

Chardon, E., Dahm, G., Guichard, G., and Bellemin-Laponnaz, S. (2013). Exploring nitrogen ligand diversity in trans-N-heterocyclic carbene-amine platinum complexes: synthesis, characterization, and application to fluorescence. Chemistry, an Asian journal *8*, 1232-1242.

Chardon, E., Puleo, G.L., Dahm, G., Fournel, S., Guichard, G., and Bellemin-Laponnaz, S. (2012b). Easy Derivatisation of Group 10 N-Heterocyclic Carbene Complexes and In Vitro Evaluation of an Anticancer Oestradiol Conjugate. Chempluschem *77*, 1028-1038.

Chardon, E., Puleo, G.L., Dahm, G., Guichard, G., and Bellemin-Laponnaz, S. (2011). Direct functionalisation of group 10 N-heterocyclic carbene complexes for diversity enhancement. Chem Commun (Camb) *47*, 5864-5866.

Cubo, L., Groessl, M., Dyson, P.J., Quiroga, A.G., Navarro-Ranninger, C., and Casini, A. (2010). Proteins as possible targets for cytotoxic trans-platinum(II) complexes with aliphatic amine ligands: Further exceptions to the DNA paradigm. ChemMedChem *5*, 1335-1343.

Dasari, S., and Bernard Tchounwou, P. (2014). Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action. European journal of pharmacology *740C*, 364-378.

Fischer, D., Li, Y., Ahlemeyer, B., Krieglstein, J., and Kissel, T. (2003). In vitro cytotoxicity testing of polycations: influence of polymer structure on cell viability and hemolysis. Biomaterials *24*, 1121-1131.

Gasser, G., Ott, I., and Metzler-Nolte, N. (2011). Organometallic anticancer compounds. Journal of medicinal chemistry *54*, 3-25.

Godbey, W.T., Wu, K.K., and Mikos, A.G. (1999). Poly(ethylenimine) and its role in gene delivery. Journal of Controlled Release *60*, 149-160.

Hobel, S., and Aigner, A. (2013). Polyethylenimines for siRNA and miRNA delivery in vivo. Wires Nanomed Nanobi *5*, 484-501.

Hu, W., Luo, Q., Wu, K., Li, X., Wang, F., Chen, Y., Ma, X., Wang, J., Liu, J., Xiong, S., *et al.* (2011). The anticancer drug cisplatin can cross-link the interdomain zinc site on human albumin. Chem Commun (Camb) *47*, 6006-6008.

Koutras, A.K., Makatsoris, T., Paliogianni, F., Kopsida, G., Onyenadum, A., Gogos, C.A., Mouzaki, A., and Kalofonos, H.P. (2004). Oxaliplatin-induced acute-onset thrombocytopenia, hemorrhage and hemolysis. Oncology *67*, 179-182.

Liu, W., and Gust, R. (2013). Metal N-heterocyclic carbene complexes as potential antitumor metallodrugs. Chemical Society reviews *42*, 755-773.

Marrache, S., Pathak, R.K., and Dhar, S. (2014). Detouring of cisplatin to access mitochondrial genome for overcoming resistance. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *111*, 10444-10449.

Mercs, L., and Albrecht, M. (2010). Beyond catalysis: N-heterocyclic carbene complexes as components for medicinal, luminescent, and functional materials applications. Chemical Society reviews *39*, 1903-1912.

Morille, M., Passirani, C., Vonarbourg, A., Clavreul, A., and Benoit, J.P. (2008). Progress in developing cationic vectors for non-viral systemic gene therapy against cancer. Biomaterials *29*, 3477-3496.

Nelson, D.J., and Nolan, S.P. (2013). Quantifying and understanding the electronic properties of N-heterocyclic carbenes. Chemical Society reviews *42*, 6723-6753.

Nowotnik, D.P., and Cvitkovic, E. (2009). ProLindac (AP5346): a review of the development of an HPMA DACH platinum Polymer Therapeutic. Advanced drug delivery reviews *61*, 1214-1219.

Oberoi, H.S., Nukolova, N.V., Kabanov, A.V., and Bronich, T.K. (2013). Nanocarriers for delivery of platinum anticancer drugs. Advanced drug delivery reviews *65*, 1667-1685.

Patnaik, S., and Gupta, K.C. (2013). Novel polyethylenimine-derived nanoparticles for in vivo gene delivery. Expert Opin Drug Del *10*, 215-228.

Rosenberg, B., Vancamp, L., and Krigas, T. (1965). Inhibition of Cell Division in Escherichia Coli by Electrolysis Products from a Platinum Electrode. Nature *205*, 698-699.

Sidi, A.A., Ohana, P., Benjamin, S., Shalev, M., Ransom, J.H., Lamm, D., Hochberg, A., and Leibovitch, I. (2008). Phase I/II Marker Lesion Study of Intravesical BC-819 DNA Plasmid in H19 Over Expressing Superficial Bladder Cancer Refractory to Bacillus Calmette-Guerin. J Urology *180*, 2379-2383.

Silva, T.M., Oredsson, S., Persson, L., Woster, P., and Marques, M.P. (2012). Novel Pt(II) and Pd(II) complexes with polyamine analogues: synthesis and vibrational analysis. Journal of inorganic biochemistry *108*, 1-7.

Skander, M., Retailleau, P., Bourrie, B., Schio, L., Mailliet, P., and Marinetti, A. (2010). N-heterocyclic carbene-amine Pt(II) complexes, a new chemical space for the development of platinum-based anticancer drugs. Journal of medicinal chemistry *53*, 2146-2154.

Wang, Z., Zhou, J., Fan, J., Qiu, S.J., Yu, Y., Huang, X.W., Sun, J., Tan, C.J., and Dai, Z. (2009). Oxaliplatin induces apoptosis in hepatocellular carcinoma cells and inhibits tumor growth. Expert opinion on investigational drugs *18*, 1595-1604.

DISCUSSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

Aujourd'hui, il existe un arsenal de stratégies qui ont pour objectif d'éliminer les cellules cancéreuses. Parmi ces stratégies, celles qui tuent directement les cellules tumorales semblent être les plus évidentes mais malheureusement ne sont pas toujours les plus simples à développer. Effectivement, certaines cellules cancéreuses sont capables d'acquérir des résistances à l'apoptose (Hanahan and Weinberg, 2011) au cours de leur développement et peuvent ainsi résister aux traitements visant à induire leur apoptose. L'apoptose est un mécanisme, conduisant à la mort cellulaire, impliqué notamment dans l'élimination de cellules endommagées, infectées par des pathogènes ou des cellules cancéreuses. L'apoptose peut être initiée par 2 voies de signalisation; la voie intrinsèque et la voie extrinsèque. La voie intrinsèque orchestrée par la protéine p53 peut être induite dans les cellules cancéreuses par des drogues de chimiothérapie ou par la radiothérapie qui génèrent toutes deux des dommages au niveau de l'ADN. La voie extrinsèque est, quant à elle, induite par l'activation de récepteurs de mort cellulaire. L'avantage de cibler cette seconde voie est qu'elle ne requiert pas la protéine p53 qui est malheureusement mutée dans plus de 50% des cancers et à l'origine de résistances à l'apoptose induite par la chimiothérapie (Kandoth et al., 2013).

TRAIL qui peut se lier à 2 récepteurs de mort apoptogéniques TRAIL-R1 et TRAIL-R2, suscite un grand intérêt (Micheau et al., 2013) car l'activation de ses récepteurs exprimés sur les cellules cancéreuses et sur les cellules saines induit uniquement apoptose des cellules cancéreuses mais n'affecte pas la viabilité des cellules saines (Nesterov et al., 2004). Des Acm ciblant les récepteurs agonistes de TRAIL et une molécule recombinante ont été ainsi rapidement développés et sont évalués en essais cliniques (Lemke et al., 2014). Malheureusement, bien que les agonistes de TRAIL soient bien tolérés chez les patients, les premiers résultats de leur utilisation en monothérapie ne sont pas toujours très encourageants car dans la majorité des cas ils ne permettent pas d'éliminer complétement la tumeur. Dans la littérature, deux principales explications sont proposées. La première est que plusieurs cellules cancéreuses dont principalement les cellules de cancers primaires acquièrent rapidement une résistance à l'apoptose induite par TRAIL. Cependant, cette résistance peut être surmontée en associant des agonistes de TRAIL avec par exemple des molécules de chimiothérapie dont les dérivés du platine, qui permettent de restaurer la sensibilité des cellules cancéreuses à TRAIL. La seconde limitation des agonistes des TRAIL-R développés semblerait être due aux Amc qui ne seraient pas des agonistes suffisamment puissants pour induire l'apoptose *via* le récepteur TRAIL-R2 sur plusieurs types de cellules cancéreuses.

Une des solutions envisagées afin d'optimiser le potentiel antitumoral de TRAIL, est de développer de nouveaux agonistes des TRAIL-Rs plus efficaces.

Dans ce cadre, mon projet de thèse s'est porté sur 4 objectifs principaux :

1) Premièrement, développer de nouveaux ligands synthétiques peptidiques agonistes du récepteur TRAIL-R2 pour induire efficacement l'apoptose dans un maximum de cellules cancéreuses.

2) Dans un aspect plus fondamental, caractériser les interactions multivalentes au niveau membranaire entre des ligands de valence contrôlée et TRAIL-R2 pour tenter de comprendre l'impact de l'oligomérisation de TRAIL-R2 sur la sensibilité ou la résistance des cellules cancéreuses à l'apoptose

3) Finalement, développer des dérivés du platine présentant une meilleure activité et/ou de meilleures propriétés (stabilité, spécificité) que les molécules de références et que l'on pourrait utiliser en combinaison avec les ligands de TRAIL-R2 dans une stratégie de thérapie combinée et ainsi optimiser le potentiel anti tumoral de TRAIL.

4) En parallèle, utiliser notre expertise sur TRAIL pour développer de nouveaux ligands anti-tumoraux spécifiques du récepteur CD40 membre de la même famille que TRAIL-R2 et exprimé sur plus de 70% des cellules tumorales et 100% des lymphomes B

1. Développement de ligands spécifiques du récepteur TRAIL-R2

Malgré son intérêt thérapeutique certain, cibler les récepteurs de TRAIL ne s'avère pas toujours facile. En effet, TRAIL peut se lier à 2 récepteurs agonistes mais également à 2 récepteurs dits « inhibiteurs » qui régulent négativement la sensibilité des cellules à l'apoptose induite par TRAIL. Par conséquent, l'efficacité pro-apoptotique de la molécule TRAIL recombinante est limitée par le fait que cette molécule peut à la fois se lier sur les récepteurs agonistes mais aussi sur les récepteurs régulateurs et donc limiter l'efficacité thérapeutique. Dans ce cas il semblerait plus stratégique de développer des ligands spécifiques des récepteurs agonistes de TRAIL.

a) Pourquoi des ligands peptidiques spécifiques de TRAIL-R2 plutôt que des anticorps?

Bien que des Acm humanisés soient déjà utilisés comme agents thérapeutiques, leur utilisation pour cibler les récepteurs de TRAIL affiche plusieurs contraintes *à la fois économiques (*des coûts de production très élevés), pratiques (un haut poids moléculaire qui peut induire une immunisation lors de l'injection) mais aussi "biologiques" qui peuvent expliquer leur efficacité limitée. En effet, les premiers résultats des essais cliniques suggèrent que les Acm ne sont pas des agonistes suffisamment puissants pour induire l'apoptose *via* le récepteur TRAIL-R2 sur plusieurs types de cellules cancéreuses (Lemke et al., 2014). Comme je l'ai indiqué dans l'introduction et comme nous l'avons démontré dans nos résultats (*cf* article 2 du chapitre 1), ceci pourrait être dû à un niveau de multimérisation insuffisant. Par contre, il est relativement facile d'assembler des peptides de faible poids moléculaire sur des structures chimiques afin de contrôler leur multivalence. C'est pourquoi le laboratoire dans lequel j'ai

réalisé mes travaux de thèse propose de développer des ligands peptidiques pour cibler et activer efficacement les récepteurs agonistes de TRAIL.

- Les anticorps des molécules de haute affinité ?

Aujourd'hui il est possible de sélectionner des fragments d'anticorps humains, de modifier leur affinité voire leur spécificité et de construire des molécules chimériques (fragments d'anticorps Fab, ou scFv liés à des enzymes, des cytokines ; des toxines ou des précurseurs de médicaments) et des anticorps bispécifiques. Ces avancées permettent de générer des anticorps de très haute affinité pour une cible donnée (Reichert, 2011). Cependant, en parallèle, le nombre de peptides utilisés comme agents thérapeutiques déposé à la FDA augmente considérablement (Goodwin et al., 2012). En effet, l'utilisation des peptides a connu un développement significatif depuis quelques dizaines d'années, notamment grâce à la mise au point de méthodes de sélection et de production chimique en phase solide ou biologique, comme le phage display, pour l'obtention de peptides de haute affinité (Watt, 2006). De plus, les peptides peuvent facilement être vectorisés et multimérisés afin d'augmenter leur temps de demie vie, leur affinité, et leur spécificité.

Au cours de mes travaux, j'ai montré que la multimérisation de peptides spécifiques de TRAIL-R2 permettait d'obtenir des constantes d'affinité très élevées aussi bien sur des molécules recombinantes immobilisés en SPR qu'à la surface cellulaire en Ligand Tracer® (*cf* article 2, 3 et 4 du chapitre 1 et article 5 du chapitre 2), démontrant ainsi que la multimérisation peut pallier à la faible affinité des peptides.

Nos peptides spécifiques de TRAIL-R2 ont été identifiés par sélection en phage display (Austin et al., 2006) contre le récepteur TRAIL-R2. A ce jour, nous sommes peu d'équipes à utiliser des peptides synthétiques dans le cadre d'une stratégie anti tumorale ciblant TRAIL-R2 (Angell et al., 2009; Austin et al., 2006). Certaines équipes ont identifié les ligands de haute affinité pour les récepteurs de TRAIL grâce à une sélection par une technique de phage display mais qui utilise des fragments scFv au lieu de peptides (El-Mesery et al., 2013; Liu et al., 2013; Siegemund et al., 2012). Ces fragments d'anticorps ont, en effet, l'avantage comme les anticorps d'avoir une meilleure affinité que des peptides monovalents. Cependant, les scFv, qui sont monovalents, devront aussi être multimérisés pour augmenter leur efficacité tout comme les peptides et il est plus facile de multimériser de manière reproductible des molécules entièrement synthétiques que des molécules recombinantes.

- Un rôle de la partie Fc des anticorps ?

Dans la littérature, plusieurs auteurs prônent l'utilisation d'anticorps plutôt que des molécules recombinantes ou peptides pour la thérapie des cancers sur la base que l'activité apoptotique requiert l'engagement des récepteurs Fc *via* le domaine FCγ des anticorps. Les

récepteurs Fc sont depuis quelques années définis comme déterminants dans l'activité *in vivo* des anticorps thérapeutiques (Aissi et al., 2012; Wilson et al., 2011). Par exemple, l'activation des récepteurs Fc est indispensable pour induire le mécanisme d'ADCC, qui contribue à l'élimination des cellules cancéreuses lors d'une immunothérapie des cancers. Il existe plusieurs récepteurs Fc qui peuvent activer plusieurs voies de signalisation impliquées par exemple dans l'ADCC mais aussi des récepteurs Fc inhibiteurs qui ne jouent pas de rôle dans ces mécanismes. La nécessité de l'engagement de la partie Fc de l'anticorps semble aussi importante dans l'activité des anticorps ciblant TRAIL-R2. Cependant, c'est le récepteur inhibiteur FcγRIIB qui semble impliqué. Les résultats de la littérature (Aissi et al., 2012) indiquent que le traitement avec un Acm agoniste de TRAIL-R2 induit efficacement l'apoptose de cellules d'un carcinome colorectal murin implantées chez la souris contribuant ainsi à l'activité antitumorale. En revanche, ce traitement n'induit qu'un effet modéré chez sur les cellules déficientes pour l'expression des récepteurs FcγRIIB. Aucune étude ne démontre le mécanisme potentiel par lequel l'engagement du récepteur FcγRII favoriserait l'apoptose induite par TRAIL-R2. Selon les auteurs, la liaison du domaine Fc de l'anticorps ciblant TRAIL-R2 servirait de plateforme pour stabiliser et multimériser l'anticorps et permettre ainsi l'induction d'apoptose par TRAIL-R2. D'après eux, le manque d'efficacité des anticorps ciblant les TRAIL-R serait donc dû au fait que la majorité d'entre eux ont une faible affinité pour le récepteur FcγRIIB exprimé sur les cellules du cancer du sein et du colon.

Cependant, une autre étude montre qu'un polypeptide hexamèrique mimant TRAIL induit le regroupement des TRAIL-R à la surface cellulaire et a une activité pro-apototique efficace et cela indépendamment des récepteurs Fcγ. (Gieffers et al., 2013). Ces observations suggèrent donc fortement que dans le cadre de TRAIL-R, la partie Fc de l'anticorps ne sert qu'à augmenter le degré de multimérisation de l'anticorps. Dans ce cas, nos ligands synthétiques peptidiques peuvent aussi être facilement multimérisés grâce des plateformes chimiques et devraient dont être efficaces *in vivo* sans l'intervention des récepteurs Fcγ.

b) Pourquoi rendre les ligands peptidiques spécifiques de TRAIl-R multivalents ?

- une plateforme de type adamentane pour mulitimériser les peptides

Durant ma thèse, j'ai utilisé 2 types de plateformes chimiques pour augmenter l'oligomérisation des peptides ligands de TRAIL-R2 et donc augmenter leur efficacité biologique. Comme la molécule recombinante TRAIL est une molécule hexamérique (généralement 2 trimères qui sont liés par un peptide), nous avons d'abord utilisé une plateforme "adamantane" qui permettait d'obtenir un ligand hexamérique (Lamanna et al., 2013). De manière surprenante notre ligand hexamérique n'avait pas une activité pro apoptotique plus efficace qu'un ligand trimérique présenté sur l'adamantane (Pavet et al., 2010). Dans ce cas nous avons supposé que

la plateforme adamantane présentait les peptides selon une géométrie qui ne permettait pas aux 6 peptides de se lier aux récepteurs TRAIL-R2.

- ***une hélice oligourée comme plateforme chimique pour multimériser les peptides***

C'est pourquoi, j'ai ensuite utilisé des plateformes d'hélices oligourée qui permettent de fixer plusieurs de nos peptides selon une géométrie choisie et non contrainte comme pour l'adamantane. Ces hélices oligourées ont en plus l'avantage d'être stables et solubles en milieux aqueux contrairement à l'adamantane. Nous avons proposé 2 types d'hélices qui présentent 3 peptides (de type 1, 2 ou 3, *cf* article 4 chapitre 1) selon 2 orientations différentes (*cis* et *trans*) et nous avons mesuré leur affinité par SPR et leur activité pro-apoptotique sur les cellules du lymphome BJAB exprimant TRAIL-R2. L'orientation *trans* des peptides sur l'hélice oligourée a permis d'augmenter l'efficacité pro-apoptotique en comparaison à l'orientation *cis* des peptides. Ce gain n'est néanmoins pas aussi important qu'attendu. Il est possible que le gain d'activité soit plus marqué si l'on utilise des ligands au moins trimériques, généralement plus contraints à cause d'encombrements stériques. Dans le cas des ligands-peptides ayant une valence supérieure à 3 monomères, il est possible que plusieurs peptides ne puissent pas lier un récepteur à cause de cet encombrement. L'orientation contrôlée de ces monomères sur ces plateformes permettrait d'optimiser la liaison entre peptides et récepteurs.

- ***Affinité ou avidité ?***

L'utilisation de ligands peptidiques multivalents peut aussi avoir des défauts. Dans notre cas, les peptides monovalents ont une faible affinité pour TRAIL-R2. Cependant la dimérisation de ces peptides permet d'augmenter considérablement son affinité. Ce gain d'affinité est certainement dû à un phénomène d'avidité entre chaque peptide qui compose le ligand. Dans ce cas, les interactions entre les ligands multivalents et les récepteurs ne sont pas considérées comme indépendantes. Une étude récente en SPR montre cependant que l'avidité n'est pas déterminante dans l'interaction entre TRAIL et TRAIL-R2 (Reis et al., 2011). En effet, d'après leurs résultats, une première interaction aurait lieu entre une unité du ligand trimérique et un récepteur. Cette interaction serait de très forte affinité (de l'ordre de picomolaire). Cette interaction très forte permettrait d'initier la formation d'un complexe ligand-récepteurs très stable et permettrait ainsi aux 2 autres unités du ligand de se lier aux récepteurs. Cependant, ces 2 nouvelles interactions seraient de plus faible affinité. D'après leurs résultats, il faudrait donc développer des ligands de très forte affinité pour TRAIL-R2, et le gain d'affinité par un phénomène d'avidité ne permettrait pas la formation d'un complexe ligands-récepteurs suffisamment stable. A l'opposé, dans nos travaux nous avons montré que les peptides monomériques ciblant TRAIL-R2 ont une affinité de l'ordre du micromolaire et que le peptide

monomérique n'est pas apoptogénique. La dimérisation de ces peptides permet d'augmenter l'affinité de l'ordre du nanomolaires et d'induire efficacement l'apoptose notamment des lymphomes B. Nous pensons qu'au contraire le gain d'affinité mesuré en SPR traduit un phénomène d'avidité. Il est possible que le mécanisme proposé par les auteurs ci-dessus existe mais il est sans doute faux d'exclure l'impact de l'avidité.

2. Caractérisation des interactions entre les peptides ligands de TRAIL-R2 et le récepteur TRAIL-R2

Au cours de ces travaux, nous avons mesuré l'activité apoptotique de nos ligands multivalents sur 3 lignées de cellules tumorales humaines : un lymphome B (BJAB), un lymphome T (Jurkat) et un carcinome colorectal (HCT116), toutes sensibles à l'apoptose induite par la molécule TRAIL recombinante. Lorsqu'un effet apoptotique était visible, nous avons systématiquement vérifié la spécificité sur des cellules de la même lignée mais déficientes pour l'expression du récepteur TRAIL-R2.
Nos résultats ont montré que les peptides divalents (de type **1** ou **2**, *cf* article 2 chapitre 1 et article 5 chapitre 2) induisent efficacement l'apoptose des cellules BJAB. En revanche, ces peptides divalents n'induisent pas l'apoptose des cellules Jurkat, ni HCT116. Nous nous sommes alors intéressés aux potentiels moyens de régulation de la sensibilité des cellules à la mort induite par nos ligands peptidiques spécifiques de TRAIL-R2 et plus particulièrement au niveau membranaire. Nous avons commencé nos études avec les ligands divalents.

- *Caractérisation des interactions à la surface de la cellule vivante*

Nous avons montré en SPR que les peptides divalents se lient avec une forte affinité à TRAIL-R2 lorsqu'il est immobilisé sur une surface, (Pavet et al., 2010) (*cf* article 5 chapitre 2). De même, nous avons montré en cytométrie en flux, en utilisant des versions fluorescentes de ces peptides, qu'ils sont capables d'interagir avec les récepteurs exprimés à la surface des 3 lignées de cellules, et ceci même s'ils n'induisent pas l'apoptose. Pour comprendre pourquoi ces peptides n'induisent pas l'apoptose dans toutes les lignées, nous avons analysé les caractéristiques de l'interaction de nos ligands avec TRAIL-R2 à la surface des cellules vivantes. Pour cela, nous avons utilisé une nouvelle approche appelée Ligand Tracer® (LT) qui permet de mesurer les paramètres cinétiques de l'interaction de ligands marqués avec des récepteurs exprimés à la surface des cellules vivantes.
Le ligand Tracer est un outil récent qui était jusqu'alors uniquement utilisé avec des anticorps. Nous avons, pour la première fois, mesuré des paramètres cinétiques entre des petits peptides ligands et un récepteur à la surface de cellules vivantes. Malgré de petites variations entre les différentes expériences, nos résultats sont reproductibles. La mesure de paramètres cinétiques

à la surface de cellules vivantes offre l'avantage considérable de se placer dans les conditions physiologiques et non artificielles comme pour la SPR où l'on mesure des paramètres cinétiques entre un ligand et un récepteur recombinant immobilisé sur une surface. Grace au LT, Les valeurs cinétiques mesurées tiennent compte du nombre de récepteurs exprimés à la surface de la cellule et des événements de mouvements membranaires des récepteurs. Cet avantage est également une limite car il ajoute un degré de complexité non maîtrisé lors de l'interprétation des constantes.

Nous avons analysés nos résultats à l'aide d'un nouveau logiciel qui nous permet d'obtenir des cartes d'interaction sur lesquelles nous pouvons visualiser et quantifier les différents types d'interactions potentielles entre l'ensemble des ligands et des récepteurs. Cet outil nous permet donc d'avoir une idée du comportement du ligand c'est-à-dire s'il se lie d'une seule manière ou présente différents modes de liaison. Cependant, le modèle mathématique utilisé pour modéliser ces interactions, considère les interactions de façon indépendante c'est-à-dire qu'une interaction entre une unité monomérique du ligand et le récepteur est indépendante de l'interaction entre la seconde unité du ligand et le récepteur. Or dans le cas d'interactions multivalentes, cette interprétation n'est pas nécessairement la plus adaptée et explique sans doute les constantes cinétiques surprenantes que l'on a pu obtenir dans certains cas.

- ***Etats des récepteurs TRAIL-R2 au niveau de la membrane plasmique***

Nous avons pu montrer que les peptides divalents se lient avec une forte affinité à TRAIL-R2 exprimé sur les cellules du lymphome B (BJAB) alors que ces mêmes peptides se lient avec une faible affinité à TRAIL-R2 exprimé sur les cellules du carcinome colorectal (HCT116). Ces observations étonnantes pourraient être expliquées par une « forme » différente des récepteurs TRAIL-R2 présents à la surface des cellules BJAB ou HCT116.

Il a, par exemple, été décrit que la O-glycosylation du récepteur TRAIL-R2 est importante dans la transduction du signal apoptotique (Hamblin et al., 2007) mais les mécanismes ne sont pas encore entièrement connus. Nous pourrions envisager que les sites de O-glycosylation de TRAIL-R2 soient un motif de reconnaissance de nos ligands divalents et que le niveau de glycosylation de TRAIL-R2 sur les BJAB différeraient de celui exprimé à la surface de cellules HCT116. Dans le cas, des cellules HCT116, TRAIL-R2 serait donc moins glycosylé et donc reconnu avec une spécificité moins forte ce qui expliquerait la liaison de faible affinité. Pour répondre à cette question, il faudrait comparer le taux de glycosylation de TRAIL-R2 à la surface de ces lignées cellulaires. Nous pourrions également étudier l'impact de la O-glycosylation de TRAIL-R2 sur la liaison avec nos ligands peptidiques et des molécules commerciales, en produisant des récepteurs TRAIL-R2 plus ou moins glycosylés et caractériser l'interaction en SPR. Des modifications au niveau de la O-glycosylation pourraient également affecter la formation de réseau de récepteurs au niveau membranaire. Dans ce cas, il est possible que la

liaison des peptides à TRAIL-R2, bloque le récepteur au sein d'une interaction non productive qui ne permette pas d'induire la formation du DISC et donc d'induire l'apoptose.

- ***Impact de l'oligomerisation***

Une autre hypothèse expliquant la différence d'activité des peptides divalents sur les différents types de cellules pourrait être dû au fait que TRAIL-R2 soit oligomérisé différemment au niveau de la membrane de ces cellules. En effet, d'après quelques études, il semblerait que TRAIL-R2 soit pré-oligomérisé au niveau du domaine PLAD, en l'absence du ligand (Bereznaya and Chekhun, 2007). Les récepteurs formeraient ainsi un réseau hautement structuré. Aujourd'hui, nous ne savons pas si les récepteurs sont prédimérisés ou prétrimérisés. Quoi qu'il en soit, la liaison du ligand renforcerait ce réseau de récepteurs pré-existant et permettrait d'initier le recrutement des molécules dans le DISC. Quelques modèles de réseaux récepteurs-ligands ont été proposés mais rien n'est encore clairement démontré. Dans le cas des cellules BJAB, les peptides divalents, malgré leur faible valence seraient suffisant pour former un réseau ligands-récepteurs pour induire l'apoptose. En revanche, les cellules HCT116 ou les cellules Jurkat, nécessiteraient un degré d'oligomérisation des récepteurs-ligands plus fort et dans ce cas un ligand « plus valent » ou de plus forte affinité pourrait favoriser la formation de ce complexe. En effet, nous avons montré dans l'article 2 du chapitre 1, que le pontage d'un anticorps ciblant TRAIL-R2 pour obtenir un ligand tétramérique induit l'apoptose des cellules Jurkat alors que l'anticorps classique bivalent n'est pas efficace. Ces résultats démontrent bien l'importance de l'oligomérisation des récepteurs dépendante des ligands dans l'induction de l'apoptose.

- ***Le rôle de l'internalisation***

Le rôle de l'internalisation des complexes ligands/récepteurs n'est pas clairement établi pour l'apoptose induite par TRAIL. Nous savons que l'engagement des TRAIL-R agonistes, par la molécule SPK induit l'internalisation de ces récepteurs. Cependant, cette internalisation ne semble pas indispensable pour induire l'apoptose. Nous avons mis en évidence que les peptides divalents induisaient aussi une rapide internalisation de TRAIL-R2 dans les cellules BJAB et Jurkat. De manière surprenante, la molécule SPK provoque une internalisation de TRAIL-R2 beaucoup plus lente (*cf* article 2 du chapitre 1). Des travaux réalisés par nos collaborateurs (Didier Marguet, INSERM 631, Marseille, France) indiquent que ces peptides divalents sont également internalisés sur les cellules HCT116. L'internalisation peut avoir un rôle dans la signalisation induite par des ligands de différentes valences mais dans notre cas l'internalisation n'explique pas la différence de sensibilité des cellules aux ligands divalents.

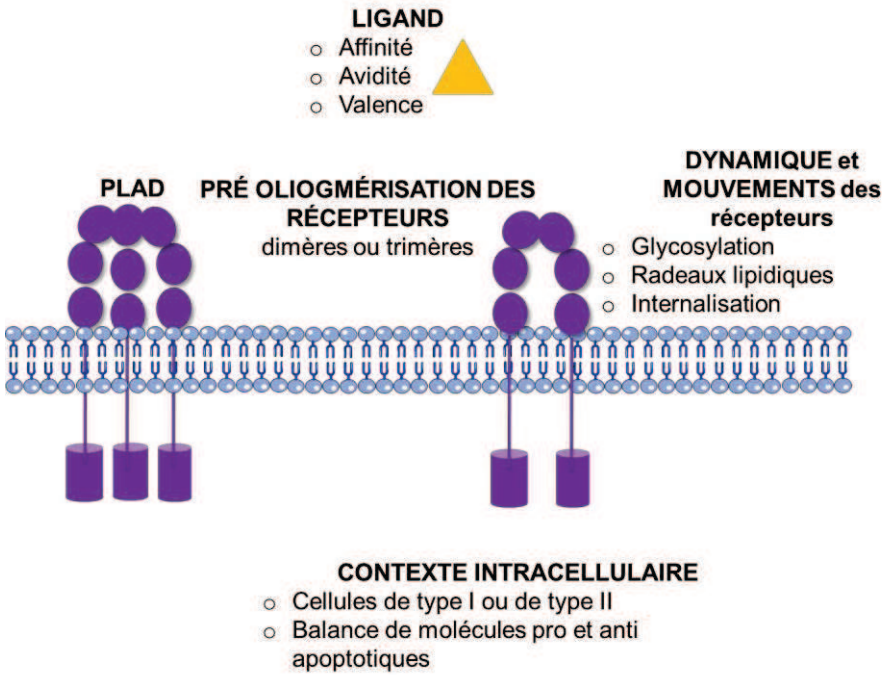


Figure 32 : Evènements membranaires qui régulent l'apoptose induite par des ligands de TRAIL-R2. Représentation schématique des évènements membranaires qui peuvent réguler l'induction de l'apoptose par des ligands de TRAIL-R2. L'efficacité des ligands développés pour cibler TRAIL-R2 en oncologie peut varier en fonction de :

1) la valence du ligand, de son affinité et de sa capacité à recruter suffisamment de récepteurs pour initier le recrutement des molécules du DISC
2) le ligand qui recrute des récepteurs prédimérisés ou prétrimérsés qui va impacter sur l'organisation du réseau de récepteurs formé et donc sur le recrutement du DISC
3) La dynamique des récepteurs au niveau de la membrane (mobilité dans les radeaux lipidiques, internalisation des récepteurs et glycosylation des récepteurs)
4) De la concentration de molécules pro et anti apoptotiques produites dans la cellule

3. Développement et évaluation du potentiel anti tumoral de nouveaux dérivés du platine.

Au cours de mes travaux de thèse, nous avons évalué le potentiel antitumoral de complexes carbène-N-hétérocycliques, portants du platine (II) et associés à des molécules de PEI linéaires (25 kDa) (NHC-Pt(II)-PEI) *in vitro* et *in vivo* dans un modèle de souris immunodéficientes porteuses de tumeurs humaines (HCT116) (*cf* article 8 du chapitre 3). Nous pensions avec ces complexes améliorer l'efficacité du platine en améliorant sa stabilité, sa solubilité et son entrée dans les cellules. Nous avons montré que, *in vivo*, le complexe NHC-Pt(II)-PEI30 (10mg/kg) a une activité anti-tumorale comparable à celle de l'oxaliplatine (10mg/kg) classiquement utilisée en chimiothérapie chez l'Homme. Il est intéressant de noter que pour une même dose, le PEI-30 comprend 5 fois moins de molécules de Pt que

l'oxaliplatine. De plus, ce complexe a l'avantage d'être stable et soluble en milieux aqueux (moins de 10% (v/v) d'éthanol). Au cours de nos études préliminaires, nous avons observé une forte toxicité lors du traitement à l'oxaliplatine au niveau du site d'injection alors que le traitement avec le complexe NHC-Pt(II)-PEI ne produisait pas cet effet, c'est pourquoi une étude complète de cytotoxicité des complexes NHC-Pt(II)-PEI serait intéressante à réaliser. Nous souhaitons également déterminer le mécanisme d'entrée et d'action de ces complexes dans la cellule cancéreuse.

Une des limites de la chimiothérapie est qu'elle n'est pas une thérapie ciblée des cellules cancéreuses et peut donc générer des effets secondaires sévères. Afin d'augmenter la spécificité de nos complexes NHC-Pt(II)-PEI, les chimistes peuvent fonctionnaliser les NHC pour y greffer des éléments de ciblage des cellules cancéreuses. Nous avons, par exemple, commencé à tester un complexe NHC-Pt(II) contenant un œstrogène dans le but de cibler les cellules exprimant un récepteur à l'œstrogène dans le cadre de cancers hormonaux dépendants. De la même manière, nous souhaitons greffer un peptide ciblant l'antigène PSMA sur exprimé à la surface des cellules cancéreuses de la prostate (Boulikas and Vougiouka, 2003). Les intégrines sont des glycoprotéines transmembranaires composées d'une chaine α et β et sont importantes notamment dans l'adhésion cellulaire à la matrice extracellulaire. Les cellules cancéreuses ont fréquemment une expression anormale de certaines intégrines qui peuvent jouer un rôle important dans la progression tumorale et le développement de métastases (Ganguly et al., 2013; Xiong et al., 2013). Il existe des peptides dont la séquence RGD (Arg-Gly-Asp) lie les intégrines $\alpha_5\beta_3$ et $\alpha_5\beta_5$ qui sont surexprimées sur la membrane cellulaire de nombreuses cellules cancéreuses (Marelli et al., 2013). Il est ainsi possible de greffer ces peptides sur les NHCs pour augmenter la sélectivité des complexes aux cellules tumorales.
A plus long terme, nous envisageons d'utiliser ces complexes NHC-Pt(II)-PEI dans le cadre d'une thérapie combinée avec les peptides TRAIL-R2 et également dans une stratégie de vaccination anti tumorale.

a) en vue d'une thérapie combinée avec les peptides ligands de TRAIL-R2

L'utilisation de TRAIL en monothérapie ne s'est pas avérée aussi prometteuse qu'espérée entre autre à cause de l'apparition de résistances à l'apoptose induite par TRAIL dans les cellules cancéreuses (Lemke et al., 2014). Suite à ces observations, les thérapies ciblant TRAIL-R ont rapidement été associées à la chimiothérapie.
Il a été montré, par exemple, que le cisplatine sensibilise les cellules cancéreuses du colon et de la prostate résistantes à l'apoptose induite par TRAIL en agissant sur les étapes initiales de la signalisation extrinsèques. Le cisplatine permet ainsi d'augmenter l'expression de TRAIL-R2 et

sa relocalisation au sein de radeaux lipidiques (Cai et al., 2014; Jiang et al., 2012). Par ailleurs, il a récemment été décrit dans la littérature que l'activation de la voie du stress du réticulum endoplasmique par des produits tels que l'inhibiteur des pompes calciques, le thapsigargine, favoriserait l'apoptose induite par TRAIL mais les mécanismes ne sont pas encore clairement déterminés. Il semblerait que le stress du RE *i)* diminuerait l'expression des molécules anti apoptotiques comme c-FLIP et Mcl-1 et *ii)* favoriserait l'expression de TRAIL-R2 à la surface de la cellule via l'activation du facteur de transcription CHOP (Aher et al., 2014). De manière intéressante, il a été montré que certaines drogues de chimiothérapie comme les dérivés du platine peuvent induire le stress du RE.

Dans ce cadre, nous envisageons de combiner nos nouveaux dérivés du platine avec les peptides ligands de TRAIL-R2 et de voir s'ils permettent de restaurer la sensibilité à l'apoptose induite par TRAIL dans des cellules résistantes.

b) dans le cadre d'une stratégie de vaccination anti tumorale

La prochaine étape consistera à évaluer l'effet des complexes NHC-Pt(II)-PEI sur la réponse immunitaire anti-tumorale dans des souris immunocompétentes porteuses de tumeurs. En effet, il a récemment été mis en évidence que certaines drogues de chimiothérapie peuvent stimuler la réponse immunitaire anti-tumorale soit en augmentant l'antigénicité ou l'immunogénicité des cellules tumorales soit en augmentant leur sensibilité à l'attaque par le système immunitaire (Pour revue voir (Kroemer et al., 2013)).

Il a, par exemple, été montré que l'induction de l'apoptose par l'oxaliplatine favorisait la libération de corps apoptotiques qui peuvent alors être capturés par les DC et ainsi servir de source de nouveaux antigènes tumoraux (Ferguson et al., 2011). De même, la mort des cellules tumorales permet la libération de molécules de dommage cellulaire (DAMPS) pouvant fournir des signaux de danger à la DC (Mellman et al., 2011).

Ce type de mort cellulaire, appelée mort immunogène est, entre autre, induite par les différentes drogues antitumorales à base de platine comme l'oxaliplatine (Apetoh et al., 2007; Hato et al., 2014). Ces drogues peuvent aussi sensibiliser les cellules tumorales à la destruction par les lymphocytes T cytotoxiques (CTL). Par exemple, le traitement de lymphomes ou de carcinomes murins par le cisplatine induit une augmentation de l'expression du récepteur au Mannose-6-P qui sensibilise les cellules à la lyse par le granzyme B produit par les CTL (Ramakrishnan et al., 2010).

Outre l'effet de mort immunogène qui pourra être induite par les complexes PEI-NHC-Pt(II), des travaux montrent que les PEI sont des adjuvants relativement puissants (Chen et al., 2010; Wegmann et al., 2012). Il a, par exemple, été montré que les PEI pouvaient induire *in vivo* la production d'IL-12 par les cellules présentatrices de l'antigène et ainsi orienter la réponse immunitaire vers une réponse adaptative de type Th1 (Chen et al., 2010) qui induirait une

réponse immunitaire anti-tumorale efficace (Huang et al., 2013). Le traitement avec des complexes PEI-NHC-Pt devrait donc induire une puissante réponde immunitaire anti-tumorale.

4. Un autre moyen d'induire l'apoptose des cellules cancéreuses grâce au récepteur CD40

a) Développement de nouveaux ligands ciblant le récepteur CD40

Nous avons précédemment vu que l'effet antitumoral de CD40 peut être dû à 2 mécanismes : CD40 peut directement induire l'apoptose des cellules cancéreuses et/ou stimuler la réponse immunitaire antitumorale. De ce fait, CD40 apparait comme une cible privilégiée dans la thérapie des cancers.

L'équipe a déjà développé des ligands agonistes de CD40 (Fournel et al., 2005). En se basant sur les données structurales des membres de la famille du TNF et notamment une modélisation de l'interaction CD40-CD40L, ils ont identifié des séquences en aa de CD40L essentielles pour sa liaison à CD40. Ces peptides ont été trimérisés à l'aide d'un cœur peptidique cyclique présentant une symétrie d'ordre C3. (Trouche et al., 2007). Ces ligands trivalents se sont avérés des agonistes puissants de CD40 (Fournel et al., 2005) et capables d'induire une réponse immunitaire efficace (Trouche et al., 2007). Malheureusement, des études dans des souris déficientes pour l'expression du récepteur CD40 ont révélé que l'action de ces ligands n'était pas exclusivement due à CD40 (Guichard et al., 2009).

Afin de développer de nouveaux ligands agonistes et plus spécifiques de CD40, nous souhaitions utiliser notre expertise sur TRAIL et utiliser une sélection par *phage display* pour identifier de nouveaux ligands peptidiques de forte affinité pour CD40. Cependant, avant la sélection, nous nous sommes interrogés i) sur l'état d'oligomérisation du récepteur CD40 à la surface cellulaire à l'état physiologique et ii) sur le rôle des différents CRD de CD40, ceci de manière à choisir « l'état » du CD40 que nous utiliserions en *phage display*. Nous avons montré que le récepteur CD40, en l'absence de son ligand, est majoritairement présent sous forme dimérique à la surface des cellules (Lamanna et al., 2013). Nos résultats montrent que l'homo-dimérisation de CD40 se fait au niveau du CRD1 et que la lysine 29 est indispensable. De plus, il a été démontré que le ligand CD40L se lie au niveau des CDR2 et 3 de CD40. Le rôle du CRD4 n'a pas encore été identifié. Suite à ces résultats nous avons produit différentes molécules CD40 pour le criblage par *phage display*. Nous avons donc transfecté des cellules HEK (Human Embryonic Kidney) humaines avec un plasmide codant pour la région extracellulaire du récepteur CD40 et produit en système procaryotes chacun des 4 CRD de CD40. J'ai participé à ces travaux au cours de mon stage de master et la première année de ma thèse.

Le criblage par *phage display* est un outil nettement plus puissant qu'une stratégie de criblage classique qui nécessite de nombreuses manipulations. Il est en effet possible de cribler jusqu'à 10^{10} peptides en une seule expérimentation. Dans la littérature, plusieurs auteurs ont déjà tenté de réaliser un phage display pour identifier des peptides spécifiques de CD40 mais la majorité d'entre eux, ont utilisé des bibliothèques phagiques présentant un peptide linéaire qui ne présentait pas une très fort spécificité pour CD40 (Cai et al., 2014; Deambrosis et al., 2009; Ellmark et al., 2008; Kitagawa et al., 2005). Nous avons choisi une banque de phages (Ph.D-C7C, New England Biolabs, Ipswich, MA) présentant chacun à leur surface un variant peptidique cyclique de 7 acides aminés présent en 5 copies. En effet, dans une étude publiée en 2010, les auteurs ont utilisé une bibliothèque de phages présentant un peptide cyclique du même type, qui leur a permis d'isoler un peptide de forte affinité pour le récepteur TRAIL-R2 et qui induit l'apoptose dans les carcinomes du colon (Vrielink et al., 2010). Le peptide cyclique et non linéaire, présenté à la surface du phage, permet de stabiliser le peptide, si bien que lorsque l'on le synthétisera il gardera sa conformation. De plus, ce peptide fusionné à la protéine phagique pIII présente uniquement en 5 copies, limite le phénomène d'avidité rendant cette banque plus adéquate pour la sélection de phages de forte affinité. Ces phages ont d'abord été sélectionnés contre la région extracellulaire de la molécule CD40 humaine. Au cours de la sélection des peptides, la nature de la cible, le type de présentation de la cible ainsi que le nombre de lavages sont décrits comme déterminants dans la sélection des phages de forte affinité. La mise au point du protocole de phage display, que j'ai réalisé, s'est donc basée sur ces 3 aspects. A l'issu de cette sélection, j'ai identifié 13 clones de bactériophages présentant un peptide de forte affinité pour CD40. A l'avenir, l'ADN des 13 bactériophages sera séquencé afin d'obtenir la séquence peptidique. Nous espérons identifier des séquences communes qui pourront nous aider à dessiner un nouveau peptide. A partir de cette étape, nous envisageons de synthétiser chimiquement les peptides et de les tester pour leur capacité de liaison à CD40 et pour leur activité agoniste/antagoniste *in vitro* sur différents modèles de lymphomes. Les peptides obtenus pourront être assemblés sur des structures chimiques déjà utilisées pour les peptides spécifiques de TRAIL-R2, afin d'augmenter le niveau d'oligomérisation. Nous disposerons ainsi d'une série de ligands présentant des degrés de valence différents.

b) Quel est l'impact de la valence des ligands sur la signalisation induite par CD40 dans les cellules cancéreuses ?

Nous avons vu que l'effet induit par l'activation de CD40 sur les cellules cancéreuses peut varier d'un type de cellule à l'autre et dans certains cas induire l'apoptose (de carcinomes, lymphomes de Burkitt, lymphomes B de haut grade et des myélomes multiples) et dans d'autres cas favoriser la prolifération (lymphomes de bas grade, CLL, les lymphomes folliculaires et leucémies à tricholeucytes). La variabilité des effets induits par le pontage de CD40 sur les

cellules tumorales semblerait être due en partie, à la nature de la molécule utilisée. Des ligands tels que les anticorps monoclonaux ou des molécules recombinantes sembleraient favoriser la survie et la prolifération des cellules alors que l'activation de CD40 avec des ligands membranaires induirait préférentiellement l'apoptose. Dans ce cadre, les ligands de différentes valences que nous aurons développés, permettront d'étudier l'impact du niveau d'oligomérisation du récepteur induit par le ligand. Ces études nous aideront peut être à mieux « raisonner » le développement de ligands thérapeutiques ciblant CD40 pour soit, induire l'apoptose des cellules cancéreuses, soit stimuler la réponse immunitaire anti tumorale.

c) Cibler CD40 pour induire l'apoptose des cellules tumorales

Nous envisageons d'utiliser des ligands de CD40 pour induire l'apoptose de cellules tumorales exprimant CD40. Ces peptides ligands pourront être utilisés seuls mais nous pensons que leur efficacité pourrait être potentialisée s'ils sont combinés à d'autres traitements. En effet, des études montrent que les CLL deviennent sensibles à l'apoptose induite par TRAIL entre 3 à 5 jours après l'activation de CD40 (Chu et al., 2002). Dans ce cas, nous envisageons de prétraiter des cellules cancéreuses avec les peptides ligands de CD40 puis avec les peptides ligands de TRAIL-R2.

Nous pourrons également optimiser l'efficacité des traitements combinés en vectorisant les peptides ligands de CD40 et de TRAIL-R2 au sein de liposomes. Les liposomes permettraient d'augmenter la stabilité des peptides, leur biodistribution et peut être leur acheminement vers le site de la tumeur (Seifert et al., 2014).

d) Cibler CD40 pour stimuler la réponse immunitaire anti tumorale

Les peptides ligands de CD40 pourront en parallèle être utilisés dans le cadre d'une immunothérapie des cancers pour activer efficacement les cellules présentatrices de l'antigène, majeures que sont les DC, pour qu'elles présentent de manière efficace les antigènes tumoraux aux cellules T cytotoxiques. Afin d'augmenter l'immunogénicité des tumeurs, nous pourrons associer le traitement de CD40 avec les dérivés du platine développés pour induire une mort immunogène des cellules cancéreuses.

5. Conclusion

Ces travaux de thèse ont permis de développer des outils pour induire efficacement l'apoptose dans les cellules tumorales. Nous avons ainsi développé en collaboration avec des chimistes, des ligands multivalents du récepteur TRAIL-R2 en utilisant des plateformes chimiques innovantes qui offrent l'avantage d'être plus simples à produire, et moins couteuses que les anticorps monoclonaux ou les molécules recombinantes. Nous proposons ainsi une

approche d'ingénierie des ligands multivalents qui peut être utilisée pour cibler d'autres récepteurs de la famille du TNF-R. C'est pourquoi nous avons utilisé notre expertise sur TRAIL pour identifier de nouveaux ligands du récepteur CD40 qui seront indispensables pour avancer dans la compréhension de l'impact de l'oligomérisation dans l'orientation de la signalisation induite par CD40.

En collaboration avec des chimistes, nous avons également développé de nouveaux dérivés de platine Pt(II) à partir de carbènes-N-hétérocycliques et nous avons démontré pour la première fois leur potentiel anti tumoral prometteur dans un modèle de souris immunodéficientes porteuses de cellules cancéreuses humaines.

Ces outils pourront à l'avenir être associés dans une stratégie anti tumorale pour optimiser l'efficacité des traitements.

Ces travaux ont également permis de caractériser pour la première fois les interactions entre des ligands et les récepteurs TRAIL-R2 à la surface de cellules vivantes et de proposer une nouvelle explication quant à l'inefficacité de certains ligands. En utilisant cette nouvelle approche, nous espérons à l'avenir pouvoir prédire l'efficacité de ligands synthétiques en fonction de la lignée de cellule cancéreuse.

Finalement, nous avons pour la première fois montré que le récepteur TRAIL-R2 et CD40 peuvent former des hétéromères via leur domaine PLAD en l'absence de leur ligand (*cf* article 7 du chapitre 2). Dans ce cas, la formation des hétéromères permet la liaison de CD40L à CD40 mais empêche l'activation de la voie de signalisation NFkB. Dans ce cadre nous pourrons utiliser les peptides spécifiques de TRAIL-R2 et ceux de CD40 actuellement développés dans l'équipe, comme outils pour comprendre les fonctions biologiques de ces hétéromères. Il est possible d'associer physiquement ces peptides sur les plateformes hélices oligourés ou des liposomes. Les 2 peptides multivalents fixés sur une même plateforme permettraient dans ce cas d'activer simultanément les récepteurs CD40 et TRAIL-R2. Dans ce cas il est possible d'envisager que le traitement combiné de CD40 et TRAIL-R2 éviterait un signal potentiel de prolifération induit par CD40.

En conclusion, ces résultats pourront peut-être nous aider dans le développement de nouveaux ligands plus efficaces et optimiser les stratégies anti tumorales en les combinant.

BIBLIOGRAPHIE

A

Aher, S.B., Muskawar, P.N., Thenmozhi, K., and Bhagat, P.R. (2014). Recent developments of metal N-heterocyclic carbenes as anticancer agents. European journal of medicinal chemistry *81*, 408-419.

Aissi, S., Ben Mrad, M., Zarraa, S., Bounedjar, A., Laabidi, S., and Boussen, H. (2012). [Targeted therapies: towards a new toxicology?]. Pathologie-biologie *60*, 234-238.

Akazawa, Y., Mott, J.L., Bronk, S.F., Werneburg, N.W., Kahraman, A., Guicciardi, M.E., Meng, X.W., Kohno, S., Shah, V.H., Kaufmann, S.H.*, et al.* (2009). Death receptor 5 internalization is required for lysosomal permeabilization by TRAIL in malignant liver cell lines. Gastroenterology *136*, 2365-2376 e2361-2367.

Altenburg, A., Baldus, S.E., Smola, H., Pfister, H., and Hess, S. (1999). CD40 ligand-CD40 interaction induces chemokines in cervical carcinoma cells in synergism with IFN-gamma. J Immunol *162*, 4140-4147.

Alvarez, R.D., Sill, M.W., Davidson, S.A., Muller, C.Y., Bender, D.P., DeBernardo, R.L., Behbakht, K., and Huh, W.K. (2014). A phase II trial of intraperitoneal EGEN-001, an IL-12 plasmid formulated with PEG-PEI-cholesterol lipopolymer in the treatment of persistent or recurrent epithelial ovarian, fallopian tube or primary peritoneal cancer: A Gynecologic Oncology Group study. Gynecol Oncol *133*, 433-438.

An, H.J., Kim, Y.J., Song, D.H., Park, B.S., Kim, H.M., Lee, J.D., Paik, S.G., Lee, J.O., and Lee, H. (2011). Crystallographic and mutational analysis of the CD40-CD154 complex and its implications for receptor activation. The Journal of biological chemistry *286*, 11226-11235.

Andersen, N.S., Larsen, J.K., Christiansen, J., Pedersen, L.B., Christophersen, N.S., Geisler, C.H., and Jurlander, J. (2000). Soluble CD40 ligand induces selective proliferation of lymphoma cells in primary mantle cell lymphoma cell cultures. Blood *96*, 2219-2225.

Angell, Y.M., Bhandari, A., De Francisco, M.N., Frederick, B.T., Green, J.M., Leu, K., Leuther, K., Sana, R., Schatz, P.J., Whitehorn, E.A.*, et al.* (2009). Discovery and optimization of a TRAIL R2 agonist for cancer therapy. Advances in experimental medicine and biology *611*, 101-103.

Apetoh, L., Obeid, M., Tesniere, A., Ghiringhelli, F., Fimia, G.M., Piacentini, M., Kroemer, G., and Zitvogel, L. (2007). Immunogenic chemotherapy: discovery of a critical protein through proteomic analyses of tumor cells. Cancer genomics & proteomics *4*, 65-70.

Araki, S., Nakayama, Y., Hori, A., and Yoshimura, K. (2010). Biomarkers for predicting the sensitivity of cancer cells to TRAIL-R1 agonistic monoclonal antibody. Cancer letters *292*, 269-279.

Arron, J.R., Walsh, M.C., and Choi, Y. (2002). TRAF-mediated TNFR-family signaling. Current protocols in immunology / edited by John E Coligan [et al] *Chapter 11*, Unit 11 19D.

Ashkenazi, A., Holland, P., and Eckhardt, S.G. (2008). Ligand-based targeting of apoptosis in cancer: the potential of recombinant human apoptosis ligand 2/Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (rhApo2L/TRAIL). Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology *26*, 3621-3630.

Ashkenazi, A., Pai, R.C., Fong, S., Leung, S., Lawrence, D.A., Marsters, S.A., Blackie, C., Chang, L., McMurtrey, A.E., Hebert, A.*, et al.* (1999). Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand. The Journal of clinical investigation *104*, 155-162.

Austin, C.D., Lawrence, D.A., Peden, A.A., Varfolomeev, E.E., Totpal, K., De Maziere, A.M., Klumperman, J., Arnott, D., Pham, V., Scheller, R.H.*, et al.* (2006). Death-receptor activation halts clathrin-dependent endocytosis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *103*, 10283-10288.

Azijli, K., Weyhenmeyer, B., Peters, G.J., de Jong, S., and Kruyt, F.A. (2013). Non-canonical kinase signaling by the death ligand TRAIL in cancer cells: discord in the death receptor family. Cell death and differentiation *20*, 858-868.

B

Bajorath, J., and Aruffo, A. (1997). Construction and analysis of a detailed three-dimensional model of the ligand binding domain of the human B cell receptor CD40. Proteins *27*, 59-70.

Beatty, G.L., Chiorean, E.G., Fishman, M.P., Saboury, B., Teitelbaum, U.R., Sun, W., Huhn, R.D., Song, W., Li, D., Sharp, L.L.*, et al.* (2011). CD40 agonists alter tumor stroma and show efficacy against pancreatic carcinoma in mice and humans. Science *331*, 1612-1616.

Bereznaya, N.M., and Chekhun, V.F. (2007). Expression of CD40 and CD40L on tumor cells: the role of their interaction and new approach to immunotherapy. Experimental oncology *29*, 2-12.

Berg, D., Lehne, M., Muller, N., Siegmund, D., Munkel, S., Sebald, W., Pfizenmaier, K., and Wajant, H. (2007). Enforced covalent trimerization increases the activity of the TNF ligand family members TRAIL and CD95L. Cell death and differentiation *14*, 2021-2034.

Berg, D., Stuhmer, T., Siegmund, D., Muller, N., Giner, T., Dittrich-Breiholz, O., Kracht, M., Bargou, R., and Wajant, H. (2009). Oligomerized tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand strongly induces cell death in myeloma cells, but also activates proinflammatory signaling pathways. The FEBS journal *276*, 6912-6927.

Bergmann, S., and Pandolfi, P.P. (2006). Giving blood: a new role for CD40 in tumorigenesis. The Journal of experimental medicine *203*, 2409-2412.

Bin, L., Thorburn, J., Thomas, L.R., Clark, P.E., Humphreys, R., and Thorburn, A. (2007). Tumor-derived mutations in the TRAIL receptor DR5 inhibit TRAIL signaling through the DR4 receptor by competing for ligand binding. The Journal of biological chemistry *282*, 28189-28194.

Bishop, G.A., Moore, C.R., Xie, P., Stunz, L.L., and Kraus, Z.J. (2007). TRAF proteins in CD40 signaling. Advances in experimental medicine and biology *597*, 131-151.

Bjorke, H., and Andersson, K. (2006). Automated, high-resolution cellular retention and uptake studies in vitro. Applied radiation and isotopes : including data, instrumentation and methods for use in agriculture, industry and medicine *64*, 901-905.

Blick, M., Sherwin, S.A., Rosenblum, M., and Gutterman, J. (1987). Phase I study of recombinant tumor necrosis factor in cancer patients. Cancer research *47*, 2986-2989.

Bodmer, J.L., Holler, N., Reynard, S., Vinciguerra, P., Schneider, P., Juo, P., Blenis, J., and Tschopp, J. (2000). TRAIL receptor-2 signals apoptosis through FADD and caspase-8. Nature cell biology *2*, 241-243.

Bodmer, J.L., Schneider, P., and Tschopp, J. (2002). The molecular architecture of the TNF superfamily. Trends in biochemical sciences *27*, 19-26.

Bossen, C., Ingold, K., Tardivel, A., Bodmer, J.L., Gaide, O., Hertig, S., Ambrose, C., Tschopp, J., and Schneider, P. (2006). Interactions of tumor necrosis factor (TNF) and TNF receptor family members in the mouse and human. The Journal of biological chemistry *281*, 13964-13971.

Boulikas, T., and Vougiouka, M. (2003). Cisplatin and platinum drugs at the molecular level. (Review). Oncology reports *10*, 1663-1682.

Bourissou, D., Guerret, O., Gabbai, F.P., and Bertrand, G. (2000). Stable Carbenes. Chemical reviews *100*, 39-92.

Breunig, M., Lungwitz, U., Liebl, R., Fontanari, C., Klar, J., Kurtz, A., Blunk, T., and Goepferich, A. (2005). Gene delivery with low molecular weight linear polyethylenimines. The journal of gene medicine *7*, 1287-1298.

Brincks, E.L., Gurung, P., Langlois, R.A., Hemann, E.A., Legge, K.L., and Griffith, T.S. (2011). The magnitude of the T cell response to a clinically significant dose of influenza virus is regulated by TRAIL. J Immunol *187*, 4581-4588.

Brozovic, A., and Osmak, M. (2007). Activation of mitogen-activated protein kinases by cisplatin and their role in cisplatin-resistance. Cancer letters *251*, 1-16.

Brunekreeft, K.L., Strohm, C., Gooden, M.J., Rybczynska, A.A., Nijman, H.W., Grigoleit, G.U., Helfrich, W., Bremer, E., Siegmund, D., Wajant, H.*, et al.* (2014). Targeted delivery of CD40L promotes restricted activation of antigen-presenting cells and induction of cancer cell death. Molecular cancer *13*, 85.

Buchsbaum, D.J., Zhou, T., and Lobuglio, A.F. (2006). TRAIL receptor-targeted therapy. Future Oncol *2*, 493-508.

Buneker, C., Mohr, A., and Zwacka, R.M. (2009). The TRAIL-receptor-1: TRAIL-receptor-3 and -4 ratio is a predictor for TRAIL sensitivity of cancer cells. Oncology reports *21*, 1289-1295.

Butler, J.S., and Sadler, P.J. (2013). Targeted delivery of platinum-based anticancer complexes. Current opinion in chemical biology *17*, 175-188.

Byrne, K.T., and Vonderheide, R.H. (2013). CD40 therapy and surgery: a potential immunologic partnership. J Immunother *36*, 359-361.

C

Cai, Z., Jitkaew, S., Zhao, J., Chiang, H.C., Choksi, S., Liu, J., Ward, Y., Wu, L.G., and Liu, Z.G. (2014). Plasma membrane translocation of trimerized MLKL protein is required for TNF-induced necroptosis. Nature cell biology *16*, 55-65.

Cande, C., Vahsen, N., Garrido, C., and Kroemer, G. (2004). Apoptosis-inducing factor (AIF): caspase-independent after all. Cell death and differentiation *11*, 591-595.

Casini, A., and Reedijk, J. (2012). Interactions of anticancer Pt compounds with proteins: an overlooked topic in medicinal inorganic chemistry? Chemical Science *3*, 3135-3144.

Cetinkaya, B., Cetinkaya, E., Kucukbay, H., and Durmaz, R. (1996). Antimicrobial activity of carbene complexes of rhodium(I) and ruthenium(II). Arzneimittel-Forschung *46*, 821-823.

Chaigne-Delalande, B., Mahfouf, W., Daburon, S., Moreau, J.F., and Legembre, P. (2009). CD95 engagement mediates actin-independent and -dependent apoptotic signals. Cell death and differentiation *16*, 1654-1664.

Challa, A., Eliopoulos, A.G., Holder, M.J., Burguete, A.S., Pound, J.D., Chamba, A., Grafton, G., Armitage, R.J., Gregory, C.D., Martinez-Valdez, H.*, et al.* (2002). Population depletion activates autonomous CD154-dependent survival in biopsylike Burkitt lymphoma cells. Blood *99*, 3411-3418.

Chan, F.K. (2007a). Three is better than one: pre-ligand receptor assembly in the regulation of TNF receptor signaling. Cytokine *37*, 101-107.

Chan, F.K.M. (2007b). Three is better than one: Pre-ligand receptor assembly in the regulation of TNF receptor signaling. Cytokine *37*, 101-107.

Chapman, E.G., and DeRose, V.J. (2010). Enzymatic processing of platinated RNAs. Journal of the American Chemical Society *132*, 1946-1952.

Chardon, E., Dahm, G., Guichard, G., and Bellemin-Laponnaz, S. (2012a). Derivatization of Preformed Platinum N-Heterocyclic Carbene Complexes with Amino Acid and Peptide Ligands and Cytotoxic Activities toward Human Cancer Cells. Organometallics *31*, 7618-7621.

Chardon, E., Dahm, G., Guichard, G., and Bellemin-Laponnaz, S. (2013). Exploring nitrogen ligand diversity in trans-N-heterocyclic carbene-amine platinum complexes: synthesis, characterization, and application to fluorescence. Chemistry, an Asian journal *8*, 1232-1242.

Chardon, E., Puleo, G.L., Dahm, G., Fournel, S., Guichard, G., and Bellemin-Laponnaz, S. (2012b). Easy Derivatisation of Group 10 N-Heterocyclic Carbene Complexes and In Vitro Evaluation of an Anticancer Oestradiol Conjugate. Chempluschem *77*, 1028-1038.

Chardon, E., Puleo, G.L., Dahm, G., Guichard, G., and Bellemin-Laponnaz, S. (2011). Direct functionalisation of group 10 N-heterocyclic carbene complexes for diversity enhancement. Chem Commun (Camb) *47*, 5864-5866.

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

Chen, J., Chen, L., Wang, G., and Tang, H. (2007). Cholesterol-dependent and -independent CD40 internalization and signaling activation in cardiovascular endothelial cells. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology *27*, 2005-2013.

Chen, Y., Chen, J., Xiong, Y., Da, Q., Xu, Y., Jiang, X., and Tang, H. (2006). Internalization of CD40 regulates its signal transduction in vascular endothelial cells. Biochemical and biophysical research communications *345*, 106-117.

Chen, Y., Pan, B., Li, H., Zhang, W., Lv, L., and Wu, J. (2010). Selective removal of Cu(II) ions by using cation-exchange resin-supported polyethyleneimine (PEI) nanoclusters. Environmental science & technology *44*, 3508-3513.

Chtchigrovsky, M., Eloy, L., Jullien, H., Saker, L., Segal-Bendirdjian, E., Poupon, J., Bombard, S., Cresteil, T., Retailleau, P., and Marinetti, A. (2013). Antitumor trans-N-Heterocyclic Carbene-Amine-Pt(II) Complexes: Synthesis of Dinuclear Species and Exploratory Investigations of DNA Binding and Cytotoxicity Mechanisms. Journal of medicinal chemistry *56*, 2074-2086.

Chu, P., Deforce, D., Pedersen, I.M., Kim, Y., Kitada, S., Reed, J.C., and Kipps, T.J. (2002). Latent sensitivity to Fas-mediated apoptosis after CD40 ligation may explain activity of CD154 gene therapy in chronic lymphocytic leukemia. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *99*, 3854-3859.

Clancy, L., Mruk, K., Archer, K., Woelfel, M., Mongkolsapaya, J., Screaton, G., Lenardo, M.J., and Chan, F.K. (2005). Preligand assembly domain-mediated ligand-independent association between TRAIL receptor 4 (TR4) and TR2 regulates TRAIL-induced apoptosis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *102*, 18099-18104.

Claudon, P., Violette, A., Lamour, K., Decossas, M., Fournel, S., Heurtault, B., Godet, J., Mely, Y., Jamart-Gregoire, B., Averlant-Petit, M.C.*, et al.* (2010). Consequences of isostructural main-chain modifications for the design of antimicrobial foldamers: helical mimics of host-defense peptides based on a heterogeneous amide/urea backbone. Angew Chem Int Ed Engl *49*, 333-336.

Colditz, G.A., Sellers, T.A., and Trapido, E. (2006). Epidemiology - identifying the causes and preventability of cancer? Nature reviews Cancer *6*, 75-83.

Coluccia, M., and Natile, G. (2007). Trans-platinum complexes in cancer therapy. Anti-cancer agents in medicinal chemistry *7*, 111-123.

Cooke, P.W., James, N.D., Ganesan, R., Wallace, D.M.A., Burton, A., and Young, L.S. (1998). CD40 expression in bladder cancer. British journal of cancer *78*, 19-19.

Cretney, E., Takeda, K., and Smyth, M.J. (2007). Cancer: novel therapeutic strategies that exploit the TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)/TRAIL receptor pathway. The international journal of biochemistry & cell biology *39*, 280-286.

Cretney, E., Takeda, K., Yagita, H., Glaccum, M., Peschon, J.J., and Smyth, M.J. (2002). Increased susceptibility to tumor initiation and metastasis in TNF-related apoptosis-inducing ligand-deficient mice. J Immunol *168*, 1356-1361.

Cubo, L., Groessl, M., Dyson, P.J., Quiroga, A.G., Navarro-Ranninger, C., and Casini, A. (2010). Proteins as possible targets for cytotoxic trans-platinum(II) complexes with aliphatic amine ligands: Further exceptions to the DNA paradigm. ChemMedChem *5*, 1335-1343.

Cummins, J.M., Kohli, M., Rago, C., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., and Bunz, F. (2004). X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) is a nonredundant modulator of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-mediated apoptosis in human cancer cells. Cancer research *64*, 3006-3008.

D

Daly-Schveitzer, N. (1999). [Radiotherapy update]. Bulletin du cancer *86*, 71-76.

Dancey, J.E., and Chen, H.X. (2006). Strategies for optimizing combinations of molecularly targeted anticancer agents. Nature reviews Drug discovery *5*, 649-659.

Daniel, D., Yang, B., Lawrence, D.A., Totpal, K., Balter, I., Lee, W.P., Gogineni, A., Cole, M.J., Yee, S.F., Ross, S.*, et al.* (2007). Cooperation of the proapoptotic receptor agonist rhApo2L/TRAIL with the CD20 antibody rituximab against non-Hodgkin lymphoma xenografts. Blood *110*, 4037-4046.

Daniels, R.A., Turley, H., Kimberley, F.C., Liu, X.S., Mongkolsapaya, J., Ch'En, P., Xu, X.N., Jin, B.Q., Pezzella, F., and Screaton, G.R. (2005). Expression of TRAIL and TRAIL receptors in normal and malignant tissues. Cell research *15*, 430-438.

Dasari, S., and Bernard Tchounwou, P. (2014). Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action. European journal of pharmacology *740C*, 364-378.

Deambrosis, I., Lamorte, S., Giaretta, F., Tei, L., Biancone, L., Bussolati, B., and Camussi, G. (2009). Inhibition of CD40-CD154 costimulatory pathway by a cyclic peptide targeting CD154. J Mol Med (Berl) *87*, 181-197.

Degli-Esposti, M. (1999). To die or not to die--the quest of the TRAIL receptors. Journal of leukocyte biology *65*, 535-542.

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

Deroose, J.P., van Geel, A.N., Burger, J.W., Eggermont, A.M., and Verhoef, C. (2012). Isolated limb perfusion with TNF-alpha and melphalan for distal parts of the limb in soft tissue sarcoma patients. Journal of surgical oncology *105*, 563-569.

Dicker, F., Kater, A.P., Fukuda, T., and Kipps, T.J. (2005). Fas-ligand (CD178) and TRAIL synergistically induce apoptosis of CD40-activated chronic lymphocytic leukemia B cells. Blood *105*, 3193-3198.

Dimberg, L.Y., Anderson, C.K., Camidge, R., Behbakht, K., Thorburn, A., and Ford, H.L. (2013). On the TRAIL to successful cancer therapy? Predicting and counteracting resistance against TRAIL-based therapeutics. Oncogene *32*, 1341-1350.

E

El-Mesery, M., Trebing, J., Schafer, V., Weisenberger, D., Siegmund, D., and Wajant, H. (2013). CD40-directed scFv-TRAIL fusion proteins induce CD40-restricted tumor cell death and activate dendritic cells. Cell death & disease *4*, e916.

Elgueta, R., Benson, M.J., de Vries, V.C., Wasiuk, A., Guo, Y., and Noelle, R.J. (2009). Molecular mechanism and function of CD40/CD40L engagement in the immune system. Immunological reviews *229*, 152-172.

Eliopoulos, A.G., Davies, C., Knox, P.G., Gallagher, N.J., Afford, S.C., Adams, D.H., and Young, L.S. (2000). CD40 induces apoptosis in carcinoma cells through activation of cytotoxic ligands of the tumor necrosis factor superfamily. Molecular and cellular biology *20*, 5503-5515.

Ellmark, P., Andersson, H., Abayneh, S., Fenyo, E.M., and Borrebaeck, C.A. (2008). Identification of a strongly activating human anti-CD40 antibody that suppresses HIV type 1 infection. AIDS research and human retroviruses *24*, 367-373.

Elmetwali, T., Young, L.S., and Palmer, D.H. (2010). CD40 ligand-induced carcinoma cell death: a balance between activation of TNFR-associated factor (TRAF) 3-dependent death signals and suppression of TRAF6-dependent survival signals. J Immunol *184*, 1111-1120.

Emery, J.G., McDonnell, P., Burke, M.B., Deen, K.C., Lyn, S., Silverman, C., Dul, E., Appelbaum, E.R., Eichman, C., DiPrinzio, R.*, et al.* (1998). Osteoprotegerin is a receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. The Journal of biological chemistry *273*, 14363-14367.

F

Falschlehner, C., Emmerich, C.H., Gerlach, B., and Walczak, H. (2007). TRAIL signalling: decisions between life and death. The international journal of biochemistry & cell biology *39*, 1462-1475.

Falschlehner, C., Schaefer, U., and Walczak, H. (2009). Following TRAIL's path in the immune system. Immunology *127*, 145-154.

Ferguson, T.A., Choi, J., and Green, D.R. (2011). Armed response: how dying cells influence T-cell functions. Immunological reviews *241*, 77-88.

Fischer, D., Li, Y., Ahlemeyer, B., Krieglstein, J., and Kissel, T. (2003). In vitro cytotoxicity testing of polycations: influence of polymer structure on cell viability and hemolysis. Biomaterials *24*, 1121-1131.

Fischer, L., and Guichard, G. (2010). Folding and self-assembly of aromatic and aliphatic urea oligomers: towards connecting structure and function. Organic & biomolecular chemistry *8*, 3101-3117.

Fournel, S., Wieckowski, S., Sun, W., Trouche, N., Dumortier, H., Bianco, A., Chaloin, O., Habib, M., Peter, J.C., Schneider, P.*, et al.* (2005). C3-symmetric peptide scaffolds are functional mimetics of trimeric CD40L. Nature chemical biology *1*, 377-382.

Fulda, S. (2014). Tumor-Necrosis-Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand (TRAIL). Advances in experimental medicine and biology *818*, 167-180.

Fulda, S., Meyer, E., and Debatin, K.M. (2002). Inhibition of TRAIL-induced apoptosis by Bcl-2 overexpression. Oncogene *21*, 2283-2294.

Fuleihan, R., Ramesh, N., and Geha, R.S. (1993). Role of Cd40-Cd40-Ligand Interaction in Lg-Isotype Switching. Curr Opin Immunol *5*, 963-967.

G

Gajate, C., and Mollinedo, F. (2011). Lipid rafts and Fas/CD95 signaling in cancer chemotherapy. Recent patents on anti-cancer drug discovery *6*, 274-283.

Gallagher, N.J., Eliopoulos, A.G., Agathangelo, A., Oates, J., Crocker, J., and Young, L.S. (2002). CD40 activation in epithelial ovarian carcinoma cells modulates growth, apoptosis, and cytokine secretion. Molecular pathology : MP *55*, 110-120.

Galluzzi, L., Senovilla, L., Vitale, I., Michels, J., Martins, I., Kepp, O., Castedo, M., and Kroemer, G. (2012). Molecular mechanisms of cisplatin resistance. Oncogene *31*, 1869-1883.

Ganguly, K.K., Pal, S., Moulik, S., and Chatterjee, A. (2013). Integrins and metastasis. Cell adhesion & migration *7*, 251-261.

Gasser, G., Ott, I., and Metzler-Nolte, N. (2011). Organometallic anticancer compounds. Journal of medicinal chemistry *54*, 3-25.

Gavins, F.N., Li, G., Russell, J., Perretti, M., and Granger, D.N. (2011). Microvascular thrombosis and CD40/CD40L signaling. Journal of thrombosis and haemostasis : JTH *9*, 574-581.

Geng, C., Hou, J., Zhao, Y., Ke, X., Wang, Z., Qiu, L., Xi, H., Wang, F., Wei, N., Liu, Y.*, et al.* (2014). A multicenter, open-label phase II study of recombinant CPT (circularly permuted TRAIL) plus thalidomide in patients with relapsed and/or refractory multiple myeloma. American journal of hematology.

Gieffers, C., Kluge, M., Merz, C., Sykora, J., Thiemann, M., Schaal, R., Fischer, C., Branschadel, M., Abhari, B.A., Hohenberger, P.*, et al.* (2013). APG350 induces superior clustering of TRAIL receptors and shows therapeutic antitumor efficacy independent of cross-linking via Fcgamma receptors. Molecular cancer therapeutics *12*, 2735-2747.

Gillissen, B., Wendt, J., Richter, A., Muer, A., Overkamp, T., Gebhardt, N., Preissner, R., Belka, C., Dorken, B., and Daniel, P.T. (2010). Endogenous Bak inhibitors Mcl-1 and Bcl-xL: differential impact on TRAIL resistance in Bax-deficient carcinoma. The Journal of cell biology *188*, 851-862.

Godbey, W.T., Wu, K.K., and Mikos, A.G. (1999). Poly(ethylenimine) and its role in gene delivery. Journal of Controlled Release *60*, 149-160.

Gonzalez, V.M., Fuertes, M.A., Alonso, C., and Perez, J.M. (2001). Is cisplatin-induced cell death always produced by apoptosis? Molecular pharmacology *59*, 657-663.

Gonzalvez, F., and Ashkenazi, A. (2010). New insights into apoptosis signaling by Apo2L/TRAIL. Oncogene *29*, 4752-4765.

Goodman, L.S., Wintrobe, M.M., and et al. (1946). Nitrogen mustard therapy; use of methyl-bis (beta-chloroethyl) amine hydrochloride and tris (beta-chloroethyl) amine hydrochloride for Hodgkin's disease, lymphosarcoma, leukemia and certain allied and miscellaneous disorders. Journal of the American Medical Association *132*, 126-132.

Goodwin, D., Simerska, P., and Toth, I. (2012). Peptides as therapeutics with enhanced bioactivity. Current medicinal chemistry *19*, 4451-4461.

Grell, M., Douni, E., Wajant, H., Lohden, M., Clauss, M., Maxeiner, B., Georgopoulos, S., Lesslauer, W., Kollias, G., Pfizenmaier, K.*, et al.* (1995). The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor. Cell *83*, 793-802.

Grell, M., Wajant, H., Zimmermann, G., and Scheurich, P. (1998). The type 1 receptor (CD120a) is the high-affinity receptor for soluble tumor necrosis factor. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *95*, 570-575.

Guichard, G., and Huc, I. (2011). Synthetic foldamers. Chem Commun (Camb) *47*, 5933-5941.

Guichard, G., Trouche, N., Wieckowski, S., Sun, W., Chaloin, O., Bianco, A., Hoebeke, J., Schneider, P., and Fournel, S. (2009). Rationally-designed multivalent architectures for mimicking homotrimers of CD40L, a member of the TNF superfamily. Advances in experimental medicine and biology *611*, 355-357.

H

Hamblin, J., Tuna, F., Bunce, S., Childs, L.J., Jackson, A., Errington, W., Alcock, N.W., Nierengarten, H., Van Dorsselaer, A., Leize-Wagner, E.*, et al.* (2007). Supramolecular circular helicates formed by destabilisation of supramolecular dimers. Chemistry *13*, 9286-9296.

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

Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. Cell *144*, 646-674.

Hanissian, S.H., and Geha, R.S. (1997). Jak3 is associated with CD40 and is critical for CD40 induction of gene expression in B cells. Immunity *6*, 379-387.

Hassan, M., Watari, H., AbuAlmaaty, A., Ohba, Y., and Sakuragi, N. (2014). Apoptosis and Molecular Targeting Therapy in Cancer. BioMed research international *2014*, 150845.

Haswell, L.E., Glennie, M.J., and Al-Shamkhani, A. (2001). Analysis of the oligomeric requirement for signaling by CD40 using soluble multimeric forms of its ligand, CD154. European journal of immunology *31*, 3094-3100.

Hato, S.V., Khong, A., de Vries, I.J., and Lesterhuis, W.J. (2014). Molecular pathways: the immunogenic effects of platinum-based chemotherapeutics. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research *20*, 2831-2837.

He, L., Wu, X., Siegel, R., and Lipsky, P.E. (2006). TRAF6 regulates cell fate decisions by inducing caspase 8-dependent apoptosis and the activation of NF-kappaB. The Journal of biological chemistry *281*, 11235-11249.

Hellwig, C.T., and Rehm, M. (2012). TRAIL signaling and synergy mechanisms used in TRAIL-based combination therapies. Molecular cancer therapeutics *11*, 3-13.

Herbst, R.S., Eckhardt, S.G., Kurzrock, R., Ebbinghaus, S., O'Dwyer, P.J., Gordon, M.S., Novotny, W., Goldwasser, M.A., Tohnya, T.M., Lum, B.L.*, et al.* (2010). Phase I dose-escalation study of recombinant human Apo2L/TRAIL, a dual proapoptotic receptor agonist, in patients with advanced cancer. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology *28*, 2839-2846.

Hill, S.C., Youde, S.J., Man, S., Teale, G.R., Baxendale, A.J., Hislop, A., Davies, C.C., Luesley, D.M., Blom, A.M., Rickinson, A.B.*, et al.* (2005). Activation of CD40 in cervical carcinoma cells facilitates CTL responses and augments chemotherapy-induced apoptosis. J Immunol *174*, 41-50.

Hirbod-Mobarakeh, A., Aghamohammadi, A., and Rezaei, N. (2014). Immunoglobulin class switch recombination deficiency type 1 or CD40 ligand deficiency: from bedside to bench and back again. Expert review of clinical immunology *10*, 91-105.

Hobel, S., and Aigner, A. (2013). Polyethylenimines for siRNA and miRNA delivery in vivo. Wires Nanomed Nanobi *5*, 484-501.

Holler, N., Tardivel, A., Kovacsovics-Bankowski, M., Hertig, S., Gaide, O., Martinon, F., Tinel, A., Deperthes, D., Calderara, S., Schulthess, T.*, et al.* (2003). Two adjacent trimeric Fas ligands are required for Fas signaling and formation of a death-inducing signaling complex. Molecular and cellular biology *23*, 1428-1440.

Holler, N., Zaru, R., Micheau, O., Thome, M., Attinger, A., Valitutti, S., Bodmer, J.L., Schneider, P., Seed, B., and Tschopp, J. (2000). Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule. Nature immunology *1*, 489-495.

Holoch, P.A., and Griffith, T.S. (2009). TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL): a new path to anti-cancer therapies. European journal of pharmacology *625*, 63-72.

Horak, P., Pils, D., Haller, G., Pribill, I., Roessler, M., Tomek, S., Horvat, R., Zeillinger, R., Zielinski, C., and Krainer, M. (2005). Contribution of epigenetic silencing of tumor necrosis factor-related

apoptosis inducing ligand receptor 1 (DR4) to TRAIL resistance and ovarian cancer. Molecular cancer research : MCR *3*, 335-343.

Hrubisko, M., McGown, A.T., and Fox, B.W. (1993). The role of metallothionein, glutathione, glutathione S-transferases and DNA repair in resistance to platinum drugs in a series of L1210 cell lines made resistant to anticancer platinum agents. Biochemical pharmacology *45*, 253-256.

Hu, W., Luo, Q., Wu, K., Li, X., Wang, F., Chen, Y., Ma, X., Wang, J., Liu, J., Xiong, S.*, et al.* (2011). The anticancer drug cisplatin can cross-link the interdomain zinc site on human albumin. Chem Commun (Camb) *47*, 6006-6008.

Huang, X., Hartley, A.V., Yin, Y., Herskowitz, J.H., Lah, J.J., and Ressler, K.J. (2013). AAV2 production with optimized N/P ratio and PEI-mediated transfection results in low toxicity and high titer for in vitro and in vivo applications. Journal of virological methods *193*, 270-277.

Hymowitz, S.G., Christinger, H.W., Fuh, G., Ultsch, M., O'Connell, M., Kelley, R.F., Ashkenazi, A., and de Vos, A.M. (1999). Triggering cell death: the crystal structure of Apo2L/TRAIL in a complex with death receptor 5. Molecular cell *4*, 563-571.

I

Indran, I.R., Tufo, G., Pervaiz, S., and Brenner, C. (2011). Recent advances in apoptosis, mitochondria and drug resistance in cancer cells. Biochimica et biophysica acta *1807*, 735-745.

Ishida, S., McCormick, F., Smith-McCune, K., and Hanahan, D. (2010). Enhancing tumor-specific uptake of the anticancer drug cisplatin with a copper chelator. Cancer cell *17*, 574-583.

J

Jamieson, E.R., and Lippard, S.J. (1999). Structure, Recognition, and Processing of Cisplatin-DNA Adducts. Chemical reviews *99*, 2467-2498.

Janson, V., Johansson, A., and Grankvist, K. (2010). Resistance to caspase-8 and -9 fragments in a malignant pleural mesothelioma cell line with acquired cisplatin-resistance. Cell death & disease *1*, e78.

Janssen, E.M., Droin, N.M., Lemmens, E.E., Pinkoski, M.J., Bensinger, S.J., Ehst, B.D., Griffith, T.S., Green, D.R., and Schoenberger, S.P. (2005). CD4+ T-cell help controls CD8+ T-cell memory via TRAIL-mediated activation-induced cell death. Nature *434*, 88-93.

Jehn, C.F., Boulikas, T., Kourvetaris, A., Possinger, K., and Luftner, D. (2007). Pharmacokinetics of liposomal cisplatin (lipoplatin) in combination with 5-FU in patients with advanced head and neck cancer: first results of a phase III study. Anticancer research *27*, 471-475.

Jemal, A., Bray, F., Center, M.M., Ferlay, J., Ward, E., and Forman, D. (2011). Global cancer statistics. CA: a cancer journal for clinicians *61*, 69-90.

Jemal, A., Siegel, R., Xu, J., and Ward, E. (2010). Cancer statistics, 2010. CA: a cancer journal for clinicians *60*, 277-300.

Jiang, Q., Zhu, H., Liang, B.Q., Huang, Y., and Li, C.M. (2012). Apoptosis-inducing effect of the DR5 monoclonal antibody, D-6, alone or in combination with cisplatin, on A2780 ovarian cancer cells. Molecular medicine reports *6*, 316-320.

Jin, Z., Li, Y., Pitti, R., Lawrence, D., Pham, V.C., Lill, J.R., and Ashkenazi, A. (2009). Cullin3-based polyubiquitination and p62-dependent aggregation of caspase-8 mediate extrinsic apoptosis signaling. Cell *137*, 721-735.

Jin, Z., McDonald, E.R., 3rd, Dicker, D.T., and El-Deiry, W.S. (2004). Deficient tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) death receptor transport to the cell surface in human colon cancer cells selected for resistance to TRAIL-induced apoptosis. The Journal of biological chemistry *279*, 35829-35839.

Jouan-Lanhouet, S., Arshad, M.I., Piquet-Pellorce, C., Martin-Chouly, C., Le Moigne-Muller, G., Van Herreweghe, F., Takahashi, N., Sergent, O., Lagadic-Gossmann, D., Vandenabeele, P.*, et al.* (2012). TRAIL induces necroptosis involving RIPK1/RIPK3-dependent PARP-1 activation. Cell death and differentiation *19*, 2003-2014.

Jundi, M., Nadiri, A., Al-Zoobi, L., Hassan, G.S., and Mourad, W. (2012). CD40-mediated cell death requires TRAF6 recruitment. Immunobiology *217*, 375-383.

K

Kandoth, C., McLellan, M.D., Vandin, F., Ye, K., Niu, B., Lu, C., Xie, M., Zhang, Q., McMichael, J.F., Wyczalkowski, M.A.*, et al.* (2013). Mutational landscape and significance across 12 major cancer types. Nature *502*, 333-339.

Karpusas, M., Hsu, Y.M., Wang, J.H., Thompson, J., Lederman, S., Chess, L., and Thomas, D. (1995). 2 A crystal structure of an extracellular fragment of human CD40 ligand. Structure *3*, 1426.

Kasparkova, J., Vojtiskova, M., Natile, G., and Brabec, V. (2008). Unique properties of DNA interstrand cross-links of antitumor oxaliplatin and the effect of chirality of the carrier ligand. Chemistry *14*, 1330-1341.

Kaykas, A., Worringer, K., and Sugden, B. (2001). CD40 and LMP-1 both signal from lipid rafts but LMP-1 assembles a distinct, more efficient signaling complex. The EMBO journal *20*, 2641-2654.

Kelland, L. (2007). The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. Nature reviews Cancer *7*, 573-584.

Kelley, R.F., Totpal, K., Lindstrom, S.H., Mathieu, M., Billeci, K., Deforge, L., Pai, R., Hymowitz, S.G., and Ashkenazi, A. (2005). Receptor-selective mutants of apoptosis-inducing ligand 2/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand reveal a greater contribution of death receptor (DR) 5 than DR4 to apoptosis signaling. The Journal of biological chemistry *280*, 2205-2212.

Khalil, M., and Vonderheide, R.H. (2007). Anti-CD40 agonist antibodies: preclinical and clinical experience. Update on cancer therapeutics *2*, 61-65.

Kim, K., Fisher, M.J., Xu, S.Q., and el-Deiry, W.S. (2000). Molecular determinants of response to TRAIL in killing of normal and cancer cells. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research *6*, 335-346.

Kimberley, F.C., and Screaton, G.R. (2004). Following a TRAIL: update on a ligand and its five receptors. Cell research *14*, 359-372.

Kirsch, D.G., and Kastan, M.B. (1998). Tumor-suppressor p53: implications for tumor development and prognosis. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology *16*, 3158-3168.

Kitagawa, M., Goto, D., Mamura, M., Matsumoto, I., Ito, S., Tsutsumi, A., and Sumida, T. (2005). Identification of three novel peptides that inhibit CD40-CD154 interaction. Modern rheumatology / the Japan Rheumatism Association *15*, 423-426.

Kohlhaas, S.L., Craxton, A., Sun, X.M., Pinkoski, M.J., and Cohen, G.M. (2007). Receptor-mediated endocytosis is not required for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis. The Journal of biological chemistry *282*, 12831-12841.

Kornbluth, R.S., Stempniak, M., and Stone, G.W. (2012). Design of CD40 agonists and their use in growing B cells for cancer immunotherapy. International reviews of immunology *31*, 279-288.

Korniluk, A., Kemona, H., and Dymicka-Piekarska, V. (2014). Multifunctional CD40L: pro- and anti-neoplastic activity. Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine.

Koutras, A.K., Makatsoris, T., Paliogianni, F., Kopsida, G., Onyenadum, A., Gogos, C.A., Mouzaki, A., and Kalofonos, H.P. (2004). Oxaliplatin-induced acute-onset thrombocytopenia, hemorrhage and hemolysis. Oncology *67*, 179-182.

Kroemer, G., Galluzzi, L., Kepp, O., and Zitvogel, L. (2013). Immunogenic cell death in cancer therapy. Annual review of immunology *31*, 51-72.

Kuwana, T., Smith, J.J., Muzio, M., Dixit, V., Newmeyer, D.D., and Kornbluth, S. (1998). Apoptosis induction by caspase-8 is amplified through the mitochondrial release of cytochrome c. The Journal of biological chemistry *273*, 16589-16594.

L

Lalaoui, N., Morle, A., Merino, D., Jacquemin, G., Iessi, E., Morizot, A., Shirley, S., Robert, B., Solary, E., Garrido, C.*, et al.* (2011). TRAIL-R4 promotes tumor growth and resistance to apoptosis in cervical carcinoma HeLa cells through AKT. PloS one *6*, e19679.

Lamanna, G., Smulski, C.R., Chekkat, N., Estieu-Gionnet, K., Guichard, G., Fournel, S., and Bianco, A. (2013). Multimerization of an apoptogenic TRAIL-mimicking peptide by using adamantane-based dendrons. Chemistry *19*, 1762-1768.

Lamhamedi-Cherradi, S.E., Zheng, S.J., Maguschak, K.A., Peschon, J., and Chen, Y.H. (2003). Defective thymocyte apoptosis and accelerated autoimmune diseases in TRAIL-/- mice. Nature immunology *4*, 255-260.

Laurie, S.A., Siu, L.L., Winquist, E., Maksymiuk, A., Harnett, E.L., Walsh, W., Tu, D., and Parulekar, W.R. (2010). A phase 2 study of platinum and gemcitabine in patients with advanced salivary gland cancer: a trial of the NCIC Clinical Trials Group. Cancer *116*, 362-368.

Lawrence, D., Shahrokh, Z., Marsters, S., Achilles, K., Shih, D., Mounho, B., Hillan, K., Totpal, K., DeForge, L., Schow, P.*, et al.* (2001). Differential hepatocyte toxicity of recombinant Apo2L/TRAIL versions. Nature medicine *7*, 383-385.

Lee, H.W., Lee, S.H., Ryu, Y.W., Kwon, M.H., and Kim, Y.S. (2005). Homomeric and heteromeric interactions of the extracellular domains of death receptors and death decoy receptors. Biochemical and biophysical research communications *330*, 1205-1212.

Lemke, J., von Karstedt, S., Zinngrebe, J., and Walczak, H. (2014). Getting TRAIL back on track for cancer therapy. Cell death and differentiation *21*, 1350-1364.

Li, B., Russell, S.J., Compaan, D.M., Totpal, K., Marsters, S.A., Ashkenazi, A., Cochran, A.G., Hymowitz, S.G., and Sidhu, S.S. (2006). Activation of the proapoptotic death receptor DR5 by oligomeric peptide and antibody agonists. Journal of molecular biology *361*, 522-536.

Liljenfeldt, L., Gkirtzimanaki, K., Vyrla, D., Svensson, E., Loskog, A.S., and Eliopoulos, A.G. (2014). Enhanced therapeutic anti-tumor immunity induced by co-administration of 5-fluorouracil and adenovirus expressing CD40 ligand. Cancer immunology, immunotherapy : CII *63*, 273-282.

Lincz, L.F., Yeh, T.X., and Spencer, A. (2001). TRAIL-induced eradication of primary tumour cells from multiple myeloma patient bone marrows is not related to TRAIL receptor expression or prior chemotherapy. Leukemia *15*, 1650-1657.

Lippman, A.J., Helson, C., Helson, L., and Krakoff, I.H. (1973). Clinical trials of cis-diamminedichloroplatinum (NSC-119875). Cancer chemotherapy reports Part 1 *57*, 191-200.

Liu, W., and Gust, R. (2013). Metal N-heterocyclic carbene complexes as potential antitumor metallodrugs. Chemical Society reviews *42*, 755-773.

Liu, X.P., Wang, J., Wang, H.B., Liu, S.H., Liang, Y., Lv, Z.D., Zhou, Q., and Ding, W.L. (2013). Combination of Ad-sTRAIL with the chemotherapeutic drug cisplatin synergistically enhances their pro-apoptotic ability in human breast cancer cells. Oncology reports *30*, 1913-1919.

Lockshin, R.A., and Zakeri, Z. (2007). Cell death in health and disease. Journal of cellular and molecular medicine *11*, 1214-1224.

Locksley, R.M., Killeen, N., and Lenardo, M.J. (2001). The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. Cell *104*, 487-501.

Lu, Y.T., Sun, X.J., Chen, C., Chen, T., and Huang, J.A. (2013). [Role of PI3K-AKT signaling pathway in CD40-mediated proliferation and invasiveness of lung cancer cell]. Zhonghua yi xue za zhi *93*, 775-779.

M

MacFarlane, M., Inoue, S., Kohlhaas, S.L., Majid, A., Harper, N., Kennedy, D.B., Dyer, M.J., and Cohen, G.M. (2005). Chronic lymphocytic leukemic cells exhibit apoptotic signaling via TRAIL-R1. Cell death and differentiation *12*, 773-782.

Mackey, M.F., Gunn, J.R., Ting, P.P., Kikutani, H., Dranoff, G., Noelle, R.J., and Barth, R.J. (1997). Protective immunity induced by tumor vaccines requires interaction between CD40 and its ligand, CD154. Cancer research *57*, 2569-2574.

Marelli, U.K., Rechenmacher, F., Sobahi, T.R., Mas-Moruno, C., and Kessler, H. (2013). Tumor Targeting via Integrin Ligands. Frontiers in oncology *3*, 222.

Mariani, S.M., and Krammer, P.H. (1998). Differential regulation of TRAIL and CD95 ligand in transformed cells of the T and B lymphocyte lineage. European journal of immunology *28*, 973-982.

Mariani, S.M., Matiba, B., Armandola, E.A., and Krammer, P.H. (1997). Interleukin 1 beta-converting enzyme related proteases/caspases are involved in TRAIL-induced apoptosis of myeloma and leukemia cells. The Journal of cell biology *137*, 221-229.

Marion, N., Lemiere, G., Correa, A., Costabile, C., Ramon, R.S., Moreau, X., de Fremont, P., Dahmane, R., Hours, A., Lesage, D.*, et al.* (2009). Gold- and platinum-catalyzed cycloisomerization of enynyl esters versus allenenyl esters: an experimental and theoretical study. Chemistry *15*, 3243-3260.

Marrache, S., Pathak, R.K., and Dhar, S. (2014). Detouring of cisplatin to access mitochondrial genome for overcoming resistance. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *111*, 10444-10449.

Marsters, S.A., Sheridan, J.P., Pitti, R.M., Huang, A., Skubatch, M., Baldwin, D., Yuan, J., Gurney, A., Goddard, A.D., Godowski, P.*, et al.* (1997). A novel receptor for Apo2L/TRAIL contains a truncated death domain. Current biology : CB *7*, 1003-1006.

Martins, I., Kepp, O., Schlemmer, F., Adjemian, S., Tailler, M., Shen, S., Michaud, M., Menger, L., Gdoura, A., Tajeddine, N.*, et al.* (2011). Restoration of the immunogenicity of cisplatin-induced cancer cell death by endoplasmic reticulum stress. Oncogene *30*, 1147-1158.

Mazurek, N., Byrd, J.C., Sun, Y., Hafley, M., Ramirez, K., Burks, J., and Bresalier, R.S. (2012). Cell-surface galectin-3 confers resistance to TRAIL by impeding trafficking of death receptors in metastatic colon adenocarcinoma cells. Cell death and differentiation *19*, 523-533.

Mellman, I., Coukos, G., and Dranoff, G. (2011). Cancer immunotherapy comes of age. Nature *480*, 480-489.

Menke, C., Bin, L., Thorburn, J., Behbakht, K., Ford, H.L., and Thorburn, A. (2011). Distinct TRAIL resistance mechanisms can be overcome by proteasome inhibition but not generally by synergizing agents. Cancer research *71*, 1883-1892.

Mercs, L., and Albrecht, M. (2010). Beyond catalysis: N-heterocyclic carbene complexes as components for medicinal, luminescent, and functional materials applications. Chemical Society reviews *39*, 1903-1912.

Merino, D., Lalaoui, N., Morizot, A., Schneider, P., Solary, E., and Micheau, O. (2006). Differential inhibition of TRAIL-mediated DR5-DISC formation by decoy receptors 1 and 2. Molecular and cellular biology *26*, 7046-7055.

Merino, D., Lalaoui, N., Morizot, A., Solary, E., and Micheau, O. (2007). TRAIL in cancer therapy: present and future challenges. Expert opinion on therapeutic targets *11*, 1299-1314.

Mi, Q.S., Ly, D., Lamhamedi-Cherradi, S.E., Salojin, K.V., Zhou, L., Grattan, M., Meagher, C., Zucker, P., Chen, Y.H., Nagle, J., *et al.* (2003). Blockade of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand exacerbates type 1 diabetes in NOD mice. Diabetes *52*, 1967-1975.

Micheau, O., Shirley, S., and Dufour, F. (2013). Death receptors as targets in cancer. British journal of pharmacology *169*, 1723-1744.

Min, H., Morony, S., Sarosi, I., Dunstan, C.R., Capparelli, C., Scully, S., Van, G., Kaufman, S., Kostenuik, P.J., Lacey, D.L., *et al.* (2000). Osteoprotegerin reverses osteoporosis by inhibiting endosteal osteoclasts and prevents vascular calcification by blocking a process resembling osteoclastogenesis. The Journal of experimental medicine *192*, 463-474.

Min, Y., Shi, J., Zhang, Y., Liu, S., Liu, Y., and Zheng, D. (2009). Death receptor 5-recruited raft components contributes to the sensitivity of Jurkat leukemia cell lines to TRAIL-induced cell death. IUBMB life *61*, 261-267.

Morille, M., Passirani, C., Vonarbourg, A., Clavreul, A., and Benoit, J.P. (2008). Progress in developing cationic vectors for non-viral systemic gene therapy against cancer. Biomaterials *29*, 3477-3496.

Muzio, M. (1998). Signalling by proteolysis: death receptors induce apoptosis. International journal of clinical & laboratory research *28*, 141-147.

Muzio, M., Natoli, G., Saccani, S., Levrero, M., and Mantovani, A. (1998a). The human toll signaling pathway: divergence of nuclear factor kappaB and JNK/SAPK activation upstream of tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6). The Journal of experimental medicine *187*, 2097-2101.

Muzio, M., Stockwell, B.R., Stennicke, H.R., Salvesen, G.S., and Dixit, V.M. (1998b). An induced proximity model for caspase-8 activation. The Journal of biological chemistry *273*, 2926-2930.

N

Naismith, J.H., Devine, T.Q., Kohno, T., and Sprang, S.R. (1996). Structures of the extracellular domain of the type I tumor necrosis factor receptor. Structure *4*, 1251-1262.

Nakayama, K., Kanzaki, A., Ogawa, K., Miyazaki, K., Neamati, N., and Takebayashi, Y. (2002). Copper-transporting P-type adenosine triphosphatase (ATP7B) as a cisplatin based chemoresistance marker in ovarian carcinoma: comparative analysis with expression of MDR1, MRP1, MRP2, LRP and BCRP. International journal of cancer Journal international du cancer *101*, 488-495.

Natoni, A., MacFarlane, M., Inoue, S., Walewska, R., Majid, A., Knee, D., Stover, D.R., Dyer, M.J., and Cohen, G.M. (2007). TRAIL signals to apoptosis in chronic lymphocytic leukaemia cells primarily through TRAIL-R1 whereas cross-linked agonistic TRAIL-R2 antibodies facilitate signalling via TRAIL-R2. British journal of haematology *139*, 568-577.

Nelson, D.J., and Nolan, S.P. (2013). Quantifying and understanding the electronic properties of N-heterocyclic carbenes. Chemical Society reviews *42*, 6723-6753.

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

Neumann, S., Hasenauer, J., Pollak, N., and Scheurich, P. (2014). Dominant Negative Effects of Tumor Necrosis Factor (TNF)-related Apoptosis-inducing Ligand (TRAIL) Receptor 4 on TRAIL Receptor 1 Signaling by Formation of Heteromeric Complexes. The Journal of biological chemistry *289*, 16576-16587.

Newsom-Davis, T., Prieske, S., and Walczak, H. (2009). Is TRAIL the holy grail of cancer therapy? Apoptosis : an international journal on programmed cell death *14*, 607-623.

Nguyen, V., Cudrici, C., Zernetkina, V., Niculescu, F., Rus, H., Drachenberg, C., and Rus, V. (2009). TRAIL, DR4 and DR5 are upregulated in kidneys from patients with lupus nephritis and exert proliferative and proinflammatory effects. Clin Immunol *132*, 32-42.

Niemoeller, O.M., and Belka, C. (2013). Radiotherapy and TRAIL for cancer therapy. Cancer letters *332*, 184-193.

Nordberg, E., Steffen, A.C., Persson, M., Sundberg, A.L., Carlsson, J., and Glimelius, B. (2005). Cellular uptake of radioiodine delivered by trastuzumab can be modified by the addition of epidermal growth factor. European journal of nuclear medicine and molecular imaging *32*, 771-777.

Nowotnik, D.P., and Cvitkovic, E. (2009). ProLindac (AP5346): a review of the development of an HPMA DACH platinum Polymer Therapeutic. Advanced drug delivery reviews *61*, 1214-1219.

Nuutinen, U., Ropponen, A., Eeva, J., Eray, M., Pellinen, R., Wahlfors, J., and Pelkonen, J. (2009). The effect of microenvironmental CD40 signals on TRAIL- and drug-induced apoptosis in follicular lymphoma cells. Scandinavian journal of immunology *70*, 565-573.

O

Oberoi, H.S., Nukolova, N.V., Kabanov, A.V., and Bronich, T.K. (2013). Nanocarriers for delivery of platinum anticancer drugs. Advanced drug delivery reviews *65*, 1667-1685.

Ouyang, L., Shi, Z., Zhao, S., Wang, F.T., Zhou, T.T., Liu, B., and Bao, J.K. (2012). Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. Cell proliferation *45*, 487-498.

Ouyang, W., Yang, C.X., Zhang, S.M., Liu, Y., Yang, B., Zhang, J.H., Zhou, F.X., Zhou, Y.F., and Xie, C.H. (2013). Absence of death receptor translocation into lipid rafts in acquired TRAIL-resistant NSCLC cells. International journal of oncology *42*, 699-711.

P

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

Pan, Y., Xu, R., Peach, M., Huang, C.P., Branstetter, D., Novotny, W., Herbst, R.S., Eckhardt, S.G., and Holland, P.M. (2011). Evaluation of pharmacodynamic biomarkers in a Phase 1a trial of dulanermin (rhApo2L/TRAIL) in patients with advanced tumours. British journal of cancer *105*, 1830-1838.

Pascutti, M.F., Jak, M., Tromp, J.M., Derks, I.A., Remmerswaal, E.B., Thijssen, R., van Attekum, M.H., van Bochove, G.G., Luijks, D.M., Pals, S.T.*, et al.* (2013). IL-21 and CD40L signals from autologous T cells can induce antigen-independent proliferation of CLL cells. Blood *122*, 3010-3019.

Patnaik, S., and Gupta, K.C. (2013). Novel polyethylenimine-derived nanoparticles for in vivo gene delivery. Expert Opin Drug Del *10*, 215-228.

Patsos, G., Andre, S., Roeckel, N., Gromes, R., Gebert, J., Kopitz, J., and Gabius, H.J. (2009). Compensation of loss of protein function in microsatellite-unstable colon cancer cells (HCT116): a gene-dependent effect on the cell surface glycan profile. Glycobiology *19*, 726-734.

Paulie, S., Ehlin-Henriksson, B., Mellstedt, H., Koho, H., Ben-Aissa, H., and Perlmann, P. (1985). A p50 surface antigen restricted to human urinary bladder carcinomas and B lymphocytes. Cancer immunology, immunotherapy : CII *20*, 23-28.

Pavet, V., Beyrath, J., Pardin, C., Morizot, A., Lechner, M.C., Briand, J.P., Wendland, M., Maison, W., Fournel, S., Micheau, O.*, et al.* (2010). Multivalent DR5 peptides activate the TRAIL death pathway and exert tumoricidal activity. Cancer research *70*, 1101-1110.

Pavet, V., Portal, M.M., Moulin, J.C., Herbrecht, R., and Gronemeyer, H. (2011). Towards novel paradigms for cancer therapy. Oncogene *30*, 1-20.

PellatDeceunynck, C., Amiot, M., Robillard, N., Wijdenes, J., and Bataille, R. (1996). CD11a-CD18 and CD102 interactions mediate human myeloma cell growth arrest induced by CD40 stimulation. Cancer research *56*, 1909-1916.

Pitti, R.M., Marsters, S.A., Ruppert, S., Donahue, C.J., Moore, A., and Ashkenazi, A. (1996). Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family. The Journal of biological chemistry *271*, 12687-12690.

Prasad, S., Kim, J.H., Gupta, S.C., and Aggarwal, B.B. (2014). Targeting death receptors for TRAIL by agents designed by Mother Nature. Trends in pharmacological sciences.

Puckett, C.A., Ernst, R.J., and Barton, J.K. (2010). Exploring the cellular accumulation of metal complexes. Dalton Trans *39*, 1159-1170.

Pullen, S.S., Labadia, M.E., Ingraham, R.H., McWhirter, S.M., Everdeen, D.S., Alber, T., Crute, J.J., and Kehry, M.R. (1999). High-affinity interactions of tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs) and CD40 require TRAF trimerization and CD40 multimerization. Biochemistry *38*, 10168-10177.

R

Ramakrishnan, R., Assudani, D., Nagaraj, S., Hunter, T., Cho, H.I., Antonia, S., Altiok, S., Celis, E., and Gabrilovich, D.I. (2010). Chemotherapy enhances tumor cell susceptibility to CTL-mediated killing during cancer immunotherapy in mice. The Journal of clinical investigation *120*, 1111-1124.

Ravi, R., Jain, A.J., Schulick, R.D., Pham, V., Prouser, T.S., Allen, H., Mayer, E.G., Yu, H., Pardoll, D.M., Ashkenazi, A.*, et al.* (2004). Elimination of hepatic metastases of colon cancer cells via p53-independent cross-talk between irinotecan and Apo2 ligand/TRAIL. Cancer research *64*, 9105-9114.

Reichert, J.M. (2011). Antibody-based therapeutics to watch in 2011. mAbs *3*, 76-99.

Reis, C.R., van Assen, A.H., Quax, W.J., and Cool, R.H. (2011). Unraveling the binding mechanism of trivalent tumor necrosis factor ligands and their receptors. Mol Cell Proteomics *10*, M110 002808.

Reis, C.R., van der Sloot, A.M., Natoni, A., Szegezdi, E., Setroikromo, R., Meijer, M., Sjollema, K., Stricher, F., Cool, R.H., Samali, A.*, et al.* (2010). Rapid and efficient cancer cell killing mediated by high-affinity death receptor homotrimerizing TRAIL variants. Cell death & disease *1*, e83.

Reyes-Moreno, C., Girouard, J., Lapointe, R., Darveau, A., and Mourad, W. (2004). CD40/CD40 homodimers are required for CD40-induced phosphatidylinositol 3-kinase-dependent expression of B7.2 by human B lymphocytes. The Journal of biological chemistry *279*, 7799-7806.

Ricci, M.S., Jin, Z., Dews, M., Yu, D., Thomas-Tikhonenko, A., Dicker, D.T., and El-Deiry, W.S. (2004). Direct repression of FLIP expression by c-myc is a major determinant of TRAIL sensitivity. Molecular and cellular biology *24*, 8541-8555.

Richman, L.P., and Vonderheide, R.H. (2014). Anti-human CD40 monoclonal antibody therapy is potent without FcR crosslinking. Oncoimmunology *3*, e28610.

Riedl, S.J., and Shi, Y. (2004). Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. Nature reviews Molecular cell biology *5*, 897-907.

Rosenberg, B., Vancamp, L., and Krigas, T. (1965). Inhibition of Cell Division in Escherichia Coli by Electrolysis Products from a Platinum Electrode. Nature *205*, 698-699.

Rosenberg, S.A. (2014). IL-2: the first effective immunotherapy for human cancer. J Immunol *192*, 5451-5458.

Ross, J.S., Sheehan, C.E., Fisher, H.A., Kaufman, R.P., Jr., Kaur, P., Gray, K., Webb, I., Gray, G.S., Mosher, R., and Kallakury, B.V. (2003). Correlation of primary tumor prostate-specific membrane antigen expression with disease recurrence in prostate cancer. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research *9*, 6357-6362.

Rossin, A., Derouet, M., Abdel-Sater, F., and Hueber, A.O. (2009). Palmitoylation of the TRAIL receptor DR4 confers an efficient TRAIL-induced cell death signalling. The Biochemical journal *419*, 185-192, 182 p following 192.

S

Safa, A.R. (2012). c-FLIP, a master anti-apoptotic regulator. Experimental oncology *34*, 176-184.

Salvesen, G.S., and Duckett, C.S. (2002). IAP proteins: blocking the road to death's door. Nature reviews Molecular cell biology *3*, 401-410.

Sanlioglu, A.D., Dirice, E., Aydin, C., Erin, N., Koksoy, S., and Sanlioglu, S. (2005). Surface TRAIL decoy receptor-4 expression is correlated with TRAIL resistance in MCF7 breast cancer cells. BMC cancer *5*, 54.

Sano, R., and Reed, J.C. (2013). ER stress-induced cell death mechanisms. Biochimica et biophysica acta *1833*, 3460-3470.

Sato, T., Terai, M., Tamura, Y., Alexeev, V., Mastrangelo, M.J., and Selvan, S.R. (2011). Interleukin 10 in the tumor microenvironment: a target for anticancer immunotherapy. Immunologic research *51*, 170-182.

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

Schleich, K., Warnken, U., Fricker, N., Ozturk, S., Richter, P., Kammerer, K., Schnolzer, M., Krammer, P.H., and Lavrik, I.N. (2012). Stoichiometry of the CD95 death-inducing signaling complex: experimental and modeling evidence for a death effector domain chain model. Molecular cell *47*, 306-319.

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

Schonbeck, U., and Libby, P. (2001). The CD40/CD154 receptor/ligand dyad. Cellular and molecular life sciences : CMLS *58*, 4-43.

Schonbeck, U., Mach, F., and Libby, P. (2000). CD154 (CD40 ligand). The international journal of biochemistry & cell biology *32*, 687-693.

Sedger, L.M., Glaccum, M.B., Schuh, J.C., Kanaly, S.T., Williamson, E., Kayagaki, N., Yun, T., Smolak, P., Le, T., Goodwin, R.*, et al.* (2002). Characterization of the in vivo function of TNF-alpha-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL/Apo2L, using TRAIL/Apo2L gene-deficient mice. European journal of immunology *32*, 2246-2254.

Seifert, O., Pollak, N., Nusser, A., Steiniger, F., Ruger, R., Pfizenmaier, K., and Kontermann, R.E. (2014). Immuno-LipoTRAIL: Targeted delivery of TRAIL-functionalized liposomal nanoparticles. Bioconjugate chemistry *25*, 879-887.

Senzer, N., Mani, S., Rosemurgy, A., Nemunaitis, J., Cunningham, C., Guha, C., Bayol, N., Gillen, M., Chu, K., Rasmussen, C.*, et al.* (2004). TNFerade biologic, an adenovector with a radiation-inducible promoter, carrying the human tumor necrosis factor alpha gene: a phase I study in patients with solid tumors. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology *22*, 592-601.

Sessler, T., Healy, S., Samali, A., and Szegezdi, E. (2013). Structural determinants of DISC function: new insights into death receptor-mediated apoptosis signalling. Pharmacology & therapeutics *140*, 186-199.

Sheikh, M.S., Burns, T.F., Huang, Y., Wu, G.S., Amundson, S., Brooks, K.S., Fornace, A.J., Jr., and el-Deiry, W.S. (1998). p53-dependent and -independent regulation of the death receptor KILLER/DR5 gene expression in response to genotoxic stress and tumor necrosis factor alpha. Cancer research *58*, 1593-1598.

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

Shimada, O., Wu, X., Jin, X., Nouh, M.A., Fiscella, M., Albert, V., Matsuda, T., and Kakehi, Y. (2007). Human agonistic antibody to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor 2 induces cytotoxicity and apoptosis in prostate cancer and bladder cancer cells. Urology *69*, 395-401.

Shimizu, M., Yoshimoto, T., Nagata, S., and Matsuzawa, A. (1996). A trial to kill tumor cells through Fas (CD95)-mediated apoptosis in vivo. Biochemical and biophysical research communications *228*, 375-379.

Shirley, S., and Micheau, O. (2013). Targeting c-FLIP in cancer. Cancer letters *332*, 141-150.

Shirley, S., Morizot, A., and Micheau, O. (2011). Regulating TRAIL receptor-induced cell death at the membrane : a deadly discussion. Recent patents on anti-cancer drug discovery *6*, 311-323.

Sidi, A.A., Ohana, P., Benjamin, S., Shalev, M., Ransom, J.H., Lamm, D., Hochberg, A., and Leibovitch, I. (2008). Phase I/II Marker Lesion Study of Intravesical BC-819 DNA Plasmid in H19 Over Expressing Superficial Bladder Cancer Refractory to Bacillus Calmette-Guerin. J Urology *180*, 2379-2383.

Siegemund, M., Pollak, N., Seifert, O., Wahl, K., Hanak, K., Vogel, A., Nussler, A.K., Gottsch, D., Munkel, S., Bantel, H.*, et al.* (2012). Superior antitumoral activity of dimerized targeted single-chain TRAIL fusion proteins under retention of tumor selectivity. Cell death & disease *3*, e295.

Silva, T.M., Oredsson, S., Persson, L., Woster, P., and Marques, M.P. (2012). Novel Pt(II) and Pd(II) complexes with polyamine analogues: synthesis and vibrational analysis. Journal of inorganic biochemistry *108*, 1-7.

Skander, M., Retailleau, P., Bourrie, B., Schio, L., Mailliet, P., and Marinetti, A. (2010). N-heterocyclic carbene-amine Pt(II) complexes, a new chemical space for the development of platinum-based anticancer drugs. Journal of medicinal chemistry *53*, 2146-2154.

Smulski, C.R., Beyrath, J., Decossas, M., Chekkat, N., Wolff, P., Estieu-Gionnet, K., Guichard, G., Speiser, D., Schneider, P., and Fournel, S. (2013). Cysteine-rich domain 1 of CD40 mediates receptor self-assembly. The Journal of biological chemistry *288*, 10914-10922.

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

Song, J.H., Tse, M.C., Bellail, A., Phuphanich, S., Khuri, F., Kneteman, N.M., and Hao, C. (2007). Lipid rafts and nonrafts mediate tumor necrosis factor related apoptosis-inducing ligand induced apoptotic and nonapoptotic signals in non small cell lung carcinoma cells. Cancer research *67*, 6946-6955.

Steinwede, K., Henken, S., Bohling, J., Maus, R., Ueberberg, B., Brumshagen, C., Brincks, E.L., Griffith, T.S., Welte, T., and Maus, U.A. (2012). TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) exerts therapeutic efficacy for the treatment of pneumococcal pneumonia in mice. The Journal of experimental medicine *209*, 1937-1952.

Stordal, B., Pavlakis, N., and Davey, R. (2007). Oxaliplatin for the treatment of cisplatin-resistant cancer: a systematic review. Cancer treatment reviews *33*, 347-357.

Stuckey, D.W., and Shah, K. (2013). TRAIL on trial: preclinical advances in cancer therapy. Trends in molecular medicine *19*, 685-694.

Suciu, D. (1983). Cellular death by apoptosis in some radiosensitive and radioresistant mammalian tissues. Journal of theoretical biology *105*, 391-401.

Sun, R.W.Y., Chow, A.L.F., Li, X.H., Yan, J.J., Chui, S.S.Y., and Che, C.M. (2011). Luminescent cyclometalated platinum(II) complexes containing N-heterocyclic carbene ligands with potent in vitro and in vivo anti-cancer properties accumulate in cytoplasmic structures of cancer cells. Chemical Science *2*, 728-736.

T

Tajeddine, N., Galluzzi, L., Kepp, O., Hangen, E., Morselli, E., Senovilla, L., Araujo, N., Pinna, G., Larochette, N., Zamzami, N.*, et al.* (2008). Hierarchical involvement of Bak, VDAC1 and Bax in cisplatin-induced cell death. Oncogene *27*, 4221-4232.

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

Teoh, G., Tai, Y.T., Urashima, M., Shirahama, S., Matsuzaki, M., Chauhan, D., Treon, S.P., Raje, N., Hideshima, T., Shima, Y.*, et al.* (2000). CD40 activation mediates p53-dependent cell cycle regulation in human multiple myeloma cell lines. Blood *95*, 1039-1046.

Thomas, L.R., Henson, A., Reed, J.C., Salsbury, F.R., and Thorburn, A. (2004). Direct binding of Fas-associated death domain (FADD) to the tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor DR5 is regulated by the death effector domain of FADD. The Journal of biological chemistry *279*, 32780-32785.

Tomihara, K., Fuse, H., Heshiki, W., Takei, R., Zhang, B., Arai, N., Nakamori, K., and Noguchi, M. (2014). Gemcitabine chemotherapy induces phenotypic alterations of tumor cells that facilitate antitumor T cell responses in a mouse model of oral cancer. Oral oncology *50*, 457-467.

Travert, M., Ame-Thomas, P., Pangault, C., Morizot, A., Micheau, O., Semana, G., Lamy, T., Fest, T., Tarte, K., and Guillaudeux, T. (2008). CD40 ligand protects from TRAIL-induced apoptosis in follicular lymphomas through NF-kappaB activation and up-regulation of c-FLIP and Bcl-xL. J Immunol *181*, 1001-1011.

Trouche, N., Wieckowski, S., Sun, W., Chaloin, O., Hoebeke, J., Fournel, S., and Guichard, G. (2007). Small multivalent architectures mimicking homotrimers of the TNF superfamily member CD40L: delineating the relationship between structure and effector function. Journal of the American Chemical Society *129*, 13480-13492.

Truneh, A., Sharma, S., Silverman, C., Khandekar, S., Reddy, M.P., Deen, K.C., McLaughlin, M.M., Srinivasula, S.M., Livi, G.P., Marshall, L.A.*, et al.* (2000). Temperature-sensitive differential affinity of TRAIL for its receptors. DR5 is the highest affinity receptor. The Journal of biological chemistry *275*, 23319-23325.

V

Valley, C.C., Lewis, A.K., Mudaliar, D.J., Perlmutter, J.D., Braun, A.R., Karim, C.B., Thomas, D.D., Brody, J.R., and Sachs, J.N. (2012). Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) induces death receptor 5 networks that are highly organized. The Journal of biological chemistry *287*, 21265-21278.

van Dijk, M., Halpin-McCormick, A., Sessler, T., Samali, A., and Szegezdi, E. (2013). Resistance to TRAIL in non-transformed cells is due to multiple redundant pathways. Cell death & disease *4*, e702.

van Mierlo, G.J., den Boer, A.T., Medema, J.P., van der Voort, E.I., Fransen, M.F., Offringa, R., Melief, C.J., and Toes, R.E. (2002). CD40 stimulation leads to effective therapy of CD40(-) tumors through induction of strong systemic cytotoxic T lymphocyte immunity. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *99*, 5561-5566.

Vaux, D.L., and Silke, J. (2005). IAPs, RINGs and ubiquitylation. Nature reviews Molecular cell biology *6*, 287-297.

Verbrugge, I., Wissink, E.H., Rooswinkel, R.W., Jongsma, J., Beltraminelli, N., Dupuis, M., Borst, J., and Verheij, M. (2009). Combining radiotherapy with APO010 in cancer treatment. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research *15*, 2031-2038.

Vidalain, P.O., Azocar, O., Lamouille, B., Astier, A., Rabourdin-Combe, C., and Servet-Delprat, C. (2000a). Measles virus induces functional TRAIL production by human dendritic cells. Journal of virology *74*, 556-559.

Vidalain, P.O., Azocar, O., Servet-Delprat, C., Rabourdin-Combe, C., Gerlier, D., and Manie, S. (2000b). CD40 signaling in human dendritic cells is initiated within membrane rafts. The EMBO journal *19*, 3304-3313.

Vonderheide, R.H., Dutcher, J.P., Anderson, J.E., Eckhardt, S.G., Stephans, K.F., Razvillas, B., Garl, S., Butine, M.D., Perry, V.P., Armitage, R.J.*, et al.* (2001). Phase I study of recombinant human CD40 ligand in cancer patients. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology *19*, 3280-3287.

Vonderheide, R.H., and Glennie, M.J. (2013). Agonistic CD40 antibodies and cancer therapy. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research *19*, 1035-1043.

Vousden, K.H., and Lane, D.P. (2007). p53 in health and disease. Nature reviews Molecular cell biology *8*, 275-283.

Vrielink, J., Heins, M.S., Setroikromo, R., Szegezdi, E., Mullally, M.M., Samali, A., and Quax, W.J. (2010). Synthetic constrained peptide selectively binds and antagonizes death receptor 5. The FEBS journal *277*, 1653-1665.

W

Wagner, K.W., Punnoose, E.A., Januario, T., Lawrence, D.A., Pitti, R.M., Lancaster, K., Lee, D., von Goetz, M., Yee, S.F., Totpal, K.*, et al.* (2007). Death-receptor O-glycosylation controls tumor-cell sensitivity to the proapoptotic ligand Apo2L/TRAIL. Nature medicine *13*, 1070-1077.

Wajant, H., Gerspach, J., and Pfizenmaier, K. (2013). Engineering death receptor ligands for cancer therapy. Cancer letters *332*, 163-174.

Wajant, H., Moosmayer, D., Wuest, T., Bartke, T., Gerlach, E., Schonherr, U., Peters, N., Scheurich, P., and Pfizenmaier, K. (2001). Differential activation of TRAIL-R1 and -2 by soluble and membrane TRAIL allows selective surface antigen-directed activation of TRAIL-R2 by a soluble TRAIL derivative. Oncogene *20*, 4101-4106.

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

Wang, J.L., Liu, D., Zhang, Z.J., Shan, S., Han, X., Srinivasula, S.M., Croce, C.M., Alnemri, E.S., and Huang, Z. (2000). Structure-based discovery of an organic compound that binds Bcl-2 protein and induces apoptosis of tumor cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *97*, 7124-7129.

Wang, X., and Guo, Z. (2013). Targeting and delivery of platinum-based anticancer drugs. Chemical Society reviews *42*, 202-224.

Wang, Z., Zhou, J., Fan, J., Qiu, S.J., Yu, Y., Huang, X.W., Sun, J., Tan, C.J., and Dai, Z. (2009). Oxaliplatin induces apoptosis in hepatocellular carcinoma cells and inhibits tumor growth. Expert opinion on investigational drugs *18*, 1595-1604.

Watt, P.M. (2006). Screening for peptide drugs from the natural repertoire of biodiverse protein folds. Nature biotechnology *24*, 177-183.

Wegmann, F., Gartlan, K.H., Harandi, A.M., Brinckmann, S.A., Coccia, M., Hillson, W.R., Kok, W.L., Cole, S., Ho, L.P., Lambe, T.*, et al.* (2012). Polyethyleneimine is a potent mucosal adjuvant for viral glycoprotein antigens. Nature biotechnology *30*, 883-888.

Wei, Q., Kullberg, E.B., and Gedda, L. (2003). Trastuzumab-conjugated boron-containing liposomes for tumor-cell targeting; development and cellular studies. International journal of oncology *23*, 1159-1165.

Weiss, J.M., Gregory Alvord, W., Quinones, O.A., Stauffer, J.K., and Wiltrout, R.H. (2014). CD40 expression in renal cell carcinoma is associated with tumor apoptosis, CD8(+) T cell frequency and patient survival. Human immunology *75*, 614-620.

Wennhold, K., Shimabukuro-Vornhagen, A., Theurich, S., and von Bergwelt-Baildon, M. (2013). CD40-activated B cells as antigen-presenting cells: the final sprint toward clinical application. Expert review of vaccines *12*, 631-637.

Wheate, N.J., Walker, S., Craig, G.E., and Oun, R. (2010). The status of platinum anticancer drugs in the clinic and in clinical trials. Dalton Trans *39*, 8113-8127.

White, A.L., Chan, H.T., Roghanian, A., French, R.R., Mockridge, C.I., Tutt, A.L., Dixon, S.V., Ajona, D., Verbeek, J.S., Al-Shamkhani, A.*, et al.* (2011). Interaction with FcgammaRIIB is critical for the agonistic activity of anti-CD40 monoclonal antibody. J Immunol *187*, 1754-1763.

Wiley, S.R., Schooley, K., Smolak, P.J., Din, W.S., Huang, C.P., Nicholl, J.K., Sutherland, G.R., Smith, T.D., Rauch, C., Smith, C.A.*, et al.* (1995). Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. Immunity *3*, 673-682.

Wilson, N.S., Yang, B., Yang, A., Loeser, S., Marsters, S., Lawrence, D., Li, Y., Pitti, R., Totpal, K., Yee, S.*, et al.* (2011). An Fcgamma receptor-dependent mechanism drives antibody-mediated target-receptor signaling in cancer cells. Cancer cell *19*, 101-113.

Wu, G.S., Burns, T.F., Zhan, Y., Alnemri, E.S., and El-Deiry, W.S. (1999). Molecular cloning and functional analysis of the mouse homologue of the KILLER/DR5 tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) death receptor. Cancer research *59*, 2770-2775.

X

Xiong, J., Balcioglu, H.E., and Danen, E.H. (2013). Integrin signaling in control of tumor growth and progression. The international journal of biochemistry & cell biology *45*, 1012-1015.

Xu, L., Qu, X., Luo, Y., Zhang, Y., Liu, J., Qu, J., Zhang, L., and Liu, Y. (2011). Epirubicin enhances TRAIL-induced apoptosis in gastric cancer cells by promoting death receptor clustering in lipid rafts. Molecular medicine reports *4*, 407-411.

Xu, L., Qu, X., Zhang, Y., Hu, X., Yang, X., Hou, K., Teng, Y., Zhang, J., Sada, K., and Liu, Y. (2009). Oxaliplatin enhances TRAIL-induced apoptosis in gastric cancer cells by CBL-regulated death receptor redistribution in lipid rafts. FEBS letters *583*, 943-948.

Xu, Y., Lin, Z., Zhao, N., Zhou, L., Liu, F., Cichacz, Z., Zhang, L., Zhan, Q., and Zhao, X. (2014). Receptor interactive protein kinase 3 promotes Cisplatin-triggered necrosis in apoptosis-resistant esophageal squamous cell carcinoma cells. PloS one *9*, e100127.

Y

Yan, Q., McDonald, J.M., Zhou, T., and Song, Y.H. (2013). Structural insight for the roles of fas death domain binding to fadd and oligomerization degree of the fas-fadd complex in the death-inducing signaling complex formation: A computational study. Proteins-Structure Function and Bioinformatics *81*, 377-385.

Yang, A., Wilson, N.S., and Ashkenazi, A. (2010). Proapoptotic DR4 and DR5 signaling in cancer cells: toward clinical translation. Current opinion in cell biology *22*, 837-844.

Yeh, P.Y., Chuang, S.E., Yeh, K.H., Song, Y.C., Ea, C.K., and Cheng, A.L. (2002). Increase of the resistance of human cervical carcinoma cells to cisplatin by inhibition of the MEK to ERK signaling pathway partly via enhancement of anticancer drug-induced NF kappa B activation. Biochemical pharmacology *63*, 1423-1430.

Yoshida, T., Shiraishi, T., Horinaka, M., Wakada, M., and Sakai, T. (2007). Glycosylation modulates TRAIL-R1/death receptor 4 protein: different regulations of two pro-apoptotic receptors for TRAIL by tunicamycin. Oncology reports *18*, 1239-1242.

Z

Zang, F., Wei, X., Leng, X., Yu, M., and Sun, B. (2014). C-FLIP(L) contributes to TRAIL resistance in HER2-positive breast cancer. Biochemical and biophysical research communications *450*, 267-273.

Zeng, Y., Wu, X.X., Fiscella, M., Shimada, O., Humphreys, R., Albert, V., and Kakehi, Y. (2006). Monoclonal antibody to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor 2 (TRAIL-R2) induces apoptosis in primary renal cell carcinoma cells in vitro and inhibits tumor growth in vivo. International journal of oncology *28*, 421-430.

Zerafa, N., Westwood, J.A., Cretney, E., Mitchell, S., Waring, P., Iezzi, M., and Smyth, M.J. (2005). Cutting edge: TRAIL deficiency accelerates hematological malignancies. J Immunol *175*, 5586-5590.

Zhang, Y., Yoshida, T., and Zhang, B. (2009). TRAIL induces endocytosis of its death receptors in MDA-MB-231 breast cancer cells. Cancer biology & therapy *8*, 917-922.

Zhang, Y., and Zhang, B. (2008). TRAIL resistance of breast cancer cells is associated with constitutive endocytosis of death receptors 4 and 5. Molecular cancer research : MCR *6*, 1861-1871.

Zitvogel, L., Kepp, O., and Kroemer, G. (2011). Immune parameters affecting the efficacy of chemotherapeutic regimens. Nature reviews Clinical oncology *8*, 151-160.

Neila CHEKKAT

Etude de stratégies innovantes pour augmenter l'efficacité antitumorale de ligands synthétiques de TRAIL-R2 et CD40

TRAIL (TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand) et **CD40Ligand**, membre de la superfamille (SF) du TNF (Tumor Necrosis Factor) apparaissent comme des cibles attractives pour la thérapie ciblée du cancer. Une caractéristique commune des membres de la SF-TNF est la structure homotrimérique du ligand qui oligomérise les récepteurs pour induire la signalisation cellulaire. Cette interaction multivalente entre ligands et récepteurs est déterminante dans l'induction de la réponse cellulaire.
L'objectif de cette thèse est de *i)* développer des ligands multivalents de TRAIL-R2 et CD40 afin d'améliorer leur efficacité anti-tumorale puis de les associer dans des stratégies anti-tumorales innovantes et *ii)* de caractériser les interactions entre ces ligands et les récepteurs à la surface de la cellule pour comprendre l'impact de l'oligomerisation sur l'initiation de l'apoptose au niveau membranaire.
Ainsi nous avons utilisé des peptides cycliques spécifiques du récepteur de TRAIL-R2 ($TRAIL^{mim/DR5}$) que nous avons multimérisés sur des plateformes chimiques innovantes. Nous nous sommes également intéressés à l'état d'oligomérisation des récepteurs avant leur contact avec le ligand dans le but de mieux comprendre les interactions multivalentes. Enfin, nous avons caractérisé à l'aide de la technique de résonance plasmonique de surface et d'un biocapteur basé sur la fluorescence les interactions entre ces ligands multivalents et le récepteur TRAIL-R2.
Ces travaux nous ont donc montré la nécessité d'analyser les interactions entre ligands et récepteurs directement à la surface de la cellule pour améliorer le développement de ligands pro apoptotiques efficaces.

Mots clés : cancer, TRAIL, CD40, apoptose, ligands peptidiques multivalents, oligomérisation

TRAIL (TNF- Related Apoptosis Inducing Ligand) and **CD40Ligand,** members of the superfamily (SF) of TNF (Tumor Necrosis Factor), appear as attractive targets for cancer therapy. A common feature of members of the TNF-SF is the homotrimeric structure that oligomerized their receptors to induce cell signaling. This multivalent interaction between ligands and receptors is crucial for apoptosis induction.
The aims of this thesis is to *i)* develop multivalent ligands of TRAIL -R2 and CD40 to enhance their antitumor efficacy and to associate them in innovative strategies and *ii)* to characterize the interactions between ligands and receptors at cell surface to understand the impact of oligomerization on the initiation of apoptosis at membrane level.
We used cyclic peptides specific of TRAIL-R2 ($TRAIL^{mim/DR5}$) that we multimerized on innovative chemical scaffolds. We also interested in the state of receptor oligomerization before their contact with the ligand in order to better understand the multivalent interactions. Finally, we characterized using the technique of surface plasmon resonance and biosensor based fluorescence interactions between multivalent ligands and TRAIL- R2.
In this work we showed the need to analyze the interactions between ligands and receptors directly on the surface of the cell to improve the development of effective pro -apoptotic ligands

Keywords: cancer, TRAIL, CD40, apoptosis, multivalent peptidic ligands, oligomerization