



HAL
open science

Développement et caractérisation de l'effet thérapeutique de peptides pénétrants dérivés de la protéine AAC-11 dans le contexte de cancers cutanés et/ou hématologiques.

Justine Habault

► **To cite this version:**

Justine Habault. Développement et caractérisation de l'effet thérapeutique de peptides pénétrants dérivés de la protéine AAC-11 dans le contexte de cancers cutanés et/ou hématologiques.. Santé. Université Paris Cité, 2020. Français. NNT : 2020UNIP7016 . tel-03696363

HAL Id: tel-03696363

<https://theses.hal.science/tel-03696363v1>

Submitted on 16 Jun 2022

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 Paris

École doctorale Hématologie, Oncogénèse, Biothérapies (ED 561)

Laboratoire Onco-dermatologie et Thérapies

Institut de Recherche Saint-Louis (UMRS 976)

DÉVELOPPEMENT ET CARACTÉRISATION DE L'EFFET THÉRAPEUTIQUE DE PEPTIDES PÉNÉTRANTS DÉRIVÉS DE LA PROTÉINE AAC-11 DANS LE CONTEXTE DE CANCERS CUTANÉS ET/OU HÉMATOLOGIQUES

Par Justine Habault

Thèse de doctorat de Biologie, médecine, santé - spécialité Oncogénèse

Dirigée par Dr. Jean-Luc Poyet

Présentée et soutenue publiquement le 15 juin 2020

Devant un jury composé de :

Dr. Jean-Luc Poyet (DR2), Institut de Recherche Saint-Louis (Directeur de thèse)

Dr. Armand Bensussan (DRCE), Institut de Recherche Saint-Louis (Président)

Pr. Éric Solary (PU-PH), Institut Gustave Roussy (Rapporteur)

Dr. Joëlle Wiels (DREM), Institut Gustave Roussy (Rapporteuse)

Dr. Adèle De Masson (CCA APHP), Institut de Recherche Saint-Louis (Examinatrice)

Dr. Jean-Christophe Rain (CEO), Société Hybrigenics (Examinateur)



DÉVELOPPEMENT ET CARACTÉRISATION DE L'EFFET THÉRAPEUTIQUE DE PEPTIDES PÉNÉTRANTS DÉRIVÉS DE LA PROTÉINE AAC-11 DANS LE CONTEXTE DE CANCERS CUTANÉS ET/OU HÉMATOLOGIQUES

L'équipe du Dr. Poyet s'intéresse à l'étude des interactions protéine-protéine (PPIs) dans le contrôle de l'apoptose et leur modulation dans le cadre de nouvelles stratégies médicamenteuses et a démontré le rôle important de la protéine AAC-11 pour le développement et la progression tumorale. AAC-11 est une protéine anti-apoptotique, surexprimée dans de nombreux tissus et cellules néoplasiques. Elle possède un rôle crucial dans la survie de ces cellules et leur sensibilité aux agents anti-cancéreux, dû à des PPIs impliquant son domaine Leucin-Zipper (LZ).

Notre équipe a donc eu l'idée de concevoir des peptides pénétrants (CPPs) dérivés du domaine LZ d'AAC-11 et agissant comme inhibiteurs compétitifs de son activité. Les CPPs sont de petites séquences d'acides aminés capables de traverser la membrane plasmique des cellules pour y délivrer un cargo. Ils ont l'avantage d'être faciles à synthétiser et à modifier et surtout d'être généralement non-toxiques *in vivo*. Nos peptides sont constitués de deux domaines : la pénétratine (séquence de pénétration cellulaire), couplée à des portions du domaine LZ d'AAC-11. Ces peptides appelés LZDPs ont été brevetés (PCT/EP2015/053307) sur la base de la démonstration de leur activité anti-tumorale dans divers modèles de cancers, parmi lesquels le mélanome.

Mon projet de thèse visait à évaluer les propriétés anti-tumorales de ces peptides dans d'autres types de cancers, en particulier le Syndrome de Sézary (SS) et les Leucémies Aigües Myéloïdes (LAMs). Les résultats obtenus dans ces pathologies ont mis en évidence un fort effet cytotoxique des peptides LZDPs vis-à-vis des cellules malignes, mais pas des cellules saines environnantes. Cette activité anti-tumorale spécifique est non seulement observée *in vitro* sur des lignées cellulaires, mais aussi *ex vivo* sur des prélèvements de patients et *in vivo* dans des modèles murins pré-cliniques.

J'avais également pour objectif d'approfondir nos connaissances concernant le mécanisme d'action des peptides LZDPs. Les données obtenues au cours de ma thèse ont montré qu'ils agissaient en induisant une rupture de la membrane des cellules cancéreuses qui semble due à l'interaction avec un ou des partenaires exprimés uniquement à la membrane des cellules tumorales. Un de ces partenaires est la protéine PAK1, exprimée à la membrane des cellules de Sézary et des cellules leucémiques et dont la présence est nécessaire à l'activité membranolytique des peptides. PAK1 est particulièrement intéressante car elle est connue pour être impliquée dans plusieurs étapes de la tumorigénèse, et son interaction avec AAC-11 pourrait potentiellement expliquer le développement de certains cancers.

Fait intéressant, nos résultats indiquent que les peptides LZDPs induisent une mort cellulaire immunogène des cellules cancéreuses. Dans des modèles murins immunocompétents, nous avons mis en évidence que cela permettait l'activation du système immunitaire. Ainsi, dans ces modèles, il est possible d'utiliser les lysats cellulaires obtenus après exposition de cellules cancéreuses aux peptides en tant que vaccins prophylactiques ou thérapeutiques.

Enfin, un autre axe de ma thèse consistait à optimiser la séquence de pénétration et la séquence active des peptides dérivés d'AAC-11. D'une part, nous avons amélioré la portion LZ du peptide, en concevant des peptides plus courts, conservant les propriétés anti-tumorales du peptide original. D'autre part, nous avons construit une séquence de pénétration plus courte et plus efficace en termes de pénétration cellulaire que la pénétratine. Les peptides « seconde génération » constitués de cette séquence associée à celle du LZ d'AAC-11 possèdent des propriétés anti-tumorales comparables à celles des peptides de première génération.

Forts de ces résultats, nous espérons désormais débiter un ou plusieurs essai(s) clinique(s) dans les contextes du SS et de la LAM, en collaboration avec les équipes médicales de l'hôpital St-Louis.

Mots clés : apoptose, cancer, AAC-11, Cell-Penetrating-Peptides, Leucin-Zipper, PAK1, Syndrome de Sézary, Leucémie Aigüe Myélocytaire, vaccin anti-cancéreux

DEVELOPMENT AND CHARACTERIZATION OF THE THERAPEUTIC POTENTIAL OF AAC-11-DERIVED CELL PENETRATING PEPTIDES IN THE CONTEXT OF CUTANEOUS AND/OR HEMATOLOGICAL CANCERS

The team of Dr. Poyet is interested in the study of protein-protein interactions (PPIs) in the control of apoptosis, and their modulation in the context of novel therapeutic strategies. They demonstrated the important role of the protein AAC-11 in the development and progression of tumors. AAC-11 is an anti-apoptotic protein, overexpressed in several malignant tissues and cells. It exhibits a crucial role in the survival of transformed cells and in their sensitivity to anti-cancer agents, due to several PPIs involving its Leucin-Zipper (LZ) domain.

My team had therefore the idea to conceive Cell-Penetrating-Peptides (CPPs) derived from AAC-11 LZ domain, and able to act as competitive inhibitors of its activity. CPPs are small amino-acids sequences able to cross plasma membrane to deliver a cargo inside the cells. They have the advantages of being easy to synthesize and modify and most importantly to be generally non-toxic *in vivo*. Our peptides are made of two domains: penetratin (a well-known cell-penetrating sequence) linked to portions of AAC-11 LZ domain. Those peptides called LZDPs have been patented (PCT/EP2015/053307) based on the demonstration of their antitumoral activity in various models of cancers, among which melanoma.

My PhD project aim was to assess the antitumoral properties of the peptides in others cancers, such as Sézary Syndrome (SS) and Acute Myeloid Leukemia (AML). The results highlighted a strong cytotoxic effect of the LZDPs peptides toward malignant cells in those pathologies, but not toward healthy cells in the surrounding environment. This specific antitumoral activity is not only observed *in vitro* in different cell lines, but also *ex vivo* on patients' samples, and in murine preclinical models. Another objective of my thesis was to deepen our knowledge concerning the LZDPs peptide's mechanism of action. Data obtained during my research allowed to show that they act by inducing cancer cells membranolytic activity. This effect seems to be due to the peptide's interaction with one or several partners, expressed only at the membrane of malignant cells. One of these partners is the protein PAK1, expressed at the membrane of Sézary cells and leukemic cells and which presence is necessary to the peptide's membranolytic activity. PAK1 is particularly interesting because it is known to be involved in many steps of tumorigenesis and its interaction with AAC-11 might explain the development of some cancers.

In immunocompetent mice models, we also highlighted the ability of the peptides to induce an immunogenic cell death of cancer cells, that is to say a type of cell death that activates the immune system. Experiments showed that it is possible to use the peptides-treated tumor cells as prophylactic or therapeutic vaccines in those murine models.

Finally, another axis of my thesis was to optimize the cell penetrating and the active sequences of AAC-11-derived-peptides. On the one hand, we improved the active sequence of the peptide (LZ part), by conceiving shorter peptides, with maintained antitumoral properties. On the other hand, we designed a shorter and more efficient cell penetrating sequence compared to penetratin, and able to transport high molecular weight cargos

inside cells. The “second-generation” peptides, made of this sequence linked to AAC-11 LZ exhibit antitumoral properties similar to that of the first-generation peptides.

Because of these promising results, we now hope to start one or several clinical trial(s) in the context of SS and AML, in collaboration with the medical teams of St Louis Research Hospital.

Keywords: apoptosis, cancer, AAC-11, Cell-Penetrating-Peptides, Leucin-Zipper, PAK1, Sézary Syndrome, Acute Myeloid Leukemia, anti-cancer vaccine

Remerciements

Tout d'abord je tiens à remercier mon directeur de thèse le **Dr. Jean-Luc Poyet** pour m'avoir accueillie dans son laboratoire, formée et encadrée tout au long de ces quatre années de master et doctorat. Merci pour tes conseils avisés, tes encouragements et ta disponibilité. Nos nombreuses heures de discussions m'ont beaucoup apporté tant d'un point de vue personnel que d'un point de vue scientifique, et je garderai un excellent souvenir de ces années passées sous ta direction. Je te suis très reconnaissante de m'avoir accordé ta confiance, de m'avoir toujours laissé prendre des initiatives et de m'avoir donné beaucoup d'indépendance dans mon travail. Je suis confiante quant à l'avenir de nos peptides, et j'espère avoir la chance de continuer à participer, de près ou de loin, à ce projet passionnant !

Je souhaite également exprimer ma plus sincère gratitude au **Dr. Anne Marie-Cardine**. Dès le début du master tu m'as prise sous ton aile et tu as toujours été là pour moi depuis, alors merci pour ce soutien précieux. Malgré les difficultés (et le manque de prélèvements !), merci aussi de m'avoir fait découvrir le monde du Sézary. Enfin, merci pour ta rigueur scientifique grâce à laquelle j'ai beaucoup appris, pour ton humour, et pour m'avoir fait de la place dans tes frigos...C'était vraiment « tip-top » d'avoir la chance de travailler à tes côtés !

Je voudrais aussi remercier chaleureusement le **Dr. Marika Pla**. Cela a été un réel bonheur et un véritable privilège de collaborer avec toi et de partager tous ces moments au, et en dehors du labo. Merci pour tout ce que tu m'as transmis, tu es pour moi un modèle de réussite dans la vie comme dans la science et j'espère avoir une aussi belle et longue carrière que la tienne !

Je remercie très sincèrement le **Dr. Armand Bensussan** pour l'honneur qu'il me fait de présider mon jury de thèse. Je remercie également les **Pr. Éric Solary** et **Dr. Joëlle Wiels** d'avoir accepté d'être mes rapporteurs et pour leur présence dans le jury. Je leur suis extrêmement reconnaissante du temps consacré à la relecture de ma thèse et de m'avoir fait bénéficier de leur expertise scientifique. Enfin, je remercie **Dr. Jean-Christophe Rain** et **Dr. Adèle De Masson** d'avoir accepté d'être examinateurs.

Je remercie également les membres de mon comité de thèse **Dr. Robin Farhaeus**, **Dr. Angelita Rebollo** et **Dr. Nicolas Dumaz**, pour m'avoir suivie et conseillée tout au long de mon projet.

Je remercie l'**INSERM** et l'**Université de Paris (anciennement Paris 7)** ainsi que **La Ligue Nationale Contre le Cancer** de m'avoir financé durant ces trois années et demi de thèse, ainsi que **l'école doctorale HOB** et le **Magistère Européen de Génétique**.

J'adresse toute mon amitié à **Ewa**, qui m'a tout appris lorsque je suis arrivée dans le laboratoire et sans qui la réalisation de ce travail n'aurait pas été possible. Merci pour toutes les fois où tu as su me conseiller et me remonter le moral, tu es devenue une véritable amie. Merci également à **Claire** pour sa participation à mon projet de thèse, et pour avoir été ma voisine de paillasse préférée !

I also would like to express my friendship to the Farhaeus team (**Rodrigo, Mathilde, Laurence, Chrys, Irène, Sarah, Avesta, Leïla, Katerina, Alice, Maria, Ewa, Agata, Norman, Siva, Salwa, Konstantinos, Nacho** and the

others). You were a like an « adoption lab » for me! I was so lucky to have you to take me out of my loneliness and share with me not only scientific advices, protocols and reagents but most importantly lunches, raclettes, wine and coffee breaks full of laughter's and gossips... Thank you for all the good memories and for helping me practicing my English! I will miss you all so much.

Merci aussi à ma toute nouvelle équipe « Onco-dermato » pour les chouettes moments passés à Bazin. Je souhaite en particulier beaucoup de courage et de chance à **Alhem, Alexandra, Marie-Léa, Coralie** et **Stessy** pour la suite de leurs travaux et/ou la fin de leur thèse !

Je voudrais aussi remercier toutes les personnes qui, de près ou de loin, ont participé à mon projet de recherche, notamment **Nicolas T., Anna, Jeannig, Hanane, Émilie, Mélanie** et **Thorsten** avec qui j'ai étroitement collaboré, ainsi que tous les étudiants qui ont travaillé au sein de notre équipe. Merci également à **Véronique, Martine, Niclas, Sophie** et **Christelle** pour leur sympathie et leur aide précieuse à l'animalerie et sur la plateforme technologique de St Louis, ainsi qu'à **Rachel, Fabiola, Marilyn** et **Alain** sur les plateformes d'histologie et de microscopie électronique de l'Institut Cochin.

Pour finir, je voudrais adresser à **mes amis** et **ma famille** toute mon affection. Je ne vous remercierais jamais assez d'avoir été à mes côtés durant toutes ces années.

Comme promis, petite dédicace à mes meilleurs amis **Romano, Momo, Élo, Kéké, Fanny, Antoine, Annaëlle, Camille, Cécile**. Merci d'être des personnes plus que géniales, sur lesquelles je peux compter depuis si longtemps. Merci pour tous les bons moments passés ensemble, et les soirées mémorables qui ont rendu cette période beaucoup plus agréable (malgré les lendemains difficiles...). Une pensée pour tous les autres, que je n'ai pas oublié. Le temps passe vite quand on est bien entouré !

Une pensée particulière pour mes parents, ma grande sœur et mon petit frère. **Papa, maman**, merci de m'avoir appris les valeurs les plus belles et les plus importantes de la vie, d'avoir toujours tout fait pour que je sois heureuse et de m'avoir donné le goût des voyages et des découvertes. **Marine, Antonin**, merci d'avoir toujours été là pour moi. Je n'aurais pas pu y arriver sans votre soutien à tous les 4, qui représente tout pour moi. Ma vraie fierté, c'est de partager mes échecs comme mes réussites avec vous et je sais que rien ne pourra nous éloigner, pas même 6000km... Et, promis, les études c'est fini ! (Pour l'instant...)

J'embrasse aussi ma marraine **Ginette**, mes **grands-parents, Ben**, mes **oncle** et **tantes**, mes **cousin(e)s** ainsi que ma **belle-famille**. Merci de m'avoir suivie et encouragée tout au long de mon parcours, même s'il n'était pas toujours facile à comprendre !

Enfin, un petit mot pour mon **Léo**. Tu sais déjà tout, alors pour faire court : merci pour ta présence, ton soutien et la bonne humeur que tu apportes à la maison au quotidien. Je sais que de belles et folles aventures nous attendent, et j'ai hâte de les vivre avec toi ! Si je devais retenir une seule chose de ces longues années d'études, c'est que je t'ai rencontré.

Table des matières

Liste des figures.....	1
Glossaire.....	3
Abréviations.....	6
Préambule.....	10
INTRODUCTION.....	12
CHAPITRE 1 : Mort cellulaire et cancer	13
I. Apoptose	13
1) Vue d'ensemble.....	13
2) Voie intrinsèque.....	15
3) Voie extrinsèque.....	16
4) Apoptose et cancer.....	17
II. Autres voies de mort cellulaire	17
1) Pyroptose.....	18
3) Nécrose.....	21
4) Nécroptose.....	23
5) Interactions entre les voies de mort cellulaire et techniques d'analyse.....	24
III. Mort cellulaire et immunité anti-tumorale	25
1) Immunosurveillance et immunoediting du cancer.....	26
2) Différentes approches d'immunothérapie.....	28
3) Mort cellulaire immunogène.....	29
CHAPITRE 2 : AAC-11, nouvelle cible thérapeutique dans le cancer	31
I. Approches pour la découverte de nouvelles cibles thérapeutiques	31
1) Rôle des interactions protéine-protéine dans les processus biologiques.....	31
2) Notion d'addiction non-oncogénique.....	32
II. AAC-11	33
1) Le gène <i>API5</i>	33
2) La protéine AAC-11.....	35
3) AAC-11 et apoptose.....	36
4) AAC-11 et cancer.....	38
CHAPITRE 3 : Utilisation de peptides pénétrants en tant que nouvelle stratégie thérapeutique dans le cancer	42
I. Généralités sur les CPPs	42
1) Historique.....	42
2) Transport.....	43
II. Thérapies basées sur l'utilisation de CPPs	45
1) Généralités.....	45

2) Utilisation dans le cancer	46
III. Optimisation des CPPs.....	47
1) Transport et stabilité.....	48
2) Spécificité et toxicité.....	48
IV. Peptides pénétrants dérivés d'AAC-11.....	50
1) RT53 : Design et structure.....	50
2) Activité anti-tumorale <i>in vitro</i>	51
3) Activité anti-tumorale <i>in vivo</i>	52
4) Mécanisme d'action.....	53
5) Mort cellulaire immunogène	54
CHAPITRE 4 : Cancers cutanés et/ou hématologiques	55
I. Syndrome de Sézary	55
1) Présentation de la maladie	55
2) Phénotype de la cellule de Sézary.....	56
3) Traitements existants.....	58
4) Cellule de Sézary et résistance à l'apoptose	60
5) Modèles murins d'étude de la pathologie	60
II. Leucémies Aigües Myéloïdes	61
1) Présentation de la maladie	61
2) Traitements existants.....	64
3) Cellules souches leucémiques.....	66
4) Modèles murins d'étude de la pathologie	68
OBJECTIFS DE LA THÈSE.....	70
RÉSULTATS.....	72
CHAPITRE 1 : Effet anti-tumoral et activation de l'immunité adaptative par le peptide RT53	73
I. Mort cellulaire immunogène induite par RT53 dans les cancers solides	73
II. Mort cellulaire induite par RT53 dans le contexte des leucémies aigües myéloïdes.....	91
CHAPITRE 2 : Effet anti-tumoral du peptide RT39 dans le contexte des leucémies aigües et du Syndrome de Sézary	102
II. Effet anti-tumoral du peptide RT39 dans le Syndrome de Sézary	102
1) Évaluation <i>in vitro</i> , <i>ex vivo</i> et <i>in vivo</i> et étude du mécanisme d'action	102
2) Mise au point d'un modèle PDX du Syndrome de Sézary et validation de l'effet anti-tumoral de RT39	122
II. Effet anti-tumoral du peptide RT39 dans les leucémies aigües.....	131
1) Activité cytotoxique de RT39 <i>in vitro</i> et <i>ex vivo</i>	131
2) Étude du mécanisme d'action du peptide RT39	133
3) Activité anti-tumorale de RT39 dans différents modèles murins de leucémie aigüe myéloïde	136
CHAPITRE 3 : Optimisation des peptides LZDPs dérivés d'AAC-11	138

DISCUSSION	154
I. Rappel du contexte.....	155
II. Effet anti-tumoral des peptides LZDPs dans le Syndrome de Sézary et les leucémies aiguës.....	156
III. Activité membranolytique des peptides LZDPs et découverte du rôle de PAK1	158
III. Mort cellulaire immunogène induite par les peptides LZDPs et effets sur le système immunitaire	161
IV. Optimisation des peptides LZDPs	164
CONCLUSION	166
RÉFÉRENCES	168
ANNEXE	195

Liste des figures

Figure 1. Différents types morphologiques de mort cellulaire (microscopie électronique à transmission)	13
Figure 2. Structure des caspases.....	14
Figure 3. Membres de la famille BCL-2.....	16
Figure 4. Bases moléculaires de l'apoptose.....	17
Figure 5. L'inflammasome.....	18
Figure 6. Étapes de l'autophagie.....	20
Figure 7. Séquence d'évènements fréquemment observés au cours de la nécrose.....	21
Figure 8. Signalisation de la nécroptose.....	24
Figure 9. Obtention de clones CTL anti-tumoraux autologues.....	27
Figure 10. Concept d'immunoediting.....	28
Figure 11. Caractéristiques de la mort cellulaire immunogène.....	30
Figure 12. Mécanisme d'action des BH3 mimétiques.....	32
Figure 13. Position génétique du gène <i>API5</i>	33
Figure 14. Arbre phylogénétique du gène <i>API5</i>	34
Figure 15. Structure primaire d'AAC-11.....	36
Figure 16. Mécanismes de l'apoptose induite par E2F1.....	37
Figure 17. Représentation schématique du rôle d'AAC-11 dans le cancer.....	40
Figure 18. Interprétation schématique de la résistance immunitaire régulée par AAC-11.....	41
Figure 19. Classification des CPPs.....	43
Figure 20. Mécanismes de translocation des CPPs.....	44
Figure 21. Sélection de thérapies basées sur des CPPs en développement clinique.....	46
Figure 22. Stratégies pour augmenter la spécificité des thérapies basées sur des CPPs.....	49
Figure 23. Séquences des peptides RT53 et RT53M.....	50
Figure 24. Analyse structurale de RT53.....	51
Figure 25. RT53 induit une mort cellulaire spécifique des cellules tumorales.....	52
Figure 26. RT53 réduit la croissance tumorale dans des modèles de xénogreffe de mélanome.....	53
Figure 27. Tableau clinique du SS.....	56
Figure 28. Exemple de morphologie d'une cellule de Sézary.....	56
Figure 29. Biomarqueurs pour le diagnostic du SS.....	57
Figure 30. Mécanisme d'action de IPH4102 (anticorps monoclonal anti-KIR3DL2).....	59
Figure 31. Représentation simplifiée de l'hématopoïèse et du développement de la lignée myéloïde.....	62

Figure 32. Conséquences moléculaires des mutations les plus communes dans les LAMs.....	63
Figure 33. Principe de la thérapie CAR-T.....	65
Figure 34. Nouvelles thérapies contre les LAMs.....	66
Figure 35. Schéma de la théorie actuelle des cellules souches cancéreuses.....	67

Glossaire

Alopécie : Maladie auto-immune caractérisée par la chute complète des cheveux ou des poils sur de petites superficies de peau.

Angiogenèse : Processus de croissance de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux préexistants. Il s'agit d'un processus physiologique, qui se produit notamment lors du développement embryonnaire. Il peut aussi s'agir d'un processus pathologique, déterminant pour la croissance des tumeurs malignes et l'apparition des métastases.

Antigène : Toute substance capable de déclencher une réponse immunitaire.

Barrière hémato-encéphalique : Membrane qui sépare la circulation sanguine et le liquide céphalo-rachidien, fluide dans lequel baignent le cerveau et la moëlle épinière. Cette barrière permet la régulation et le maintien de l'homéostasie des cellules cérébrales. Elle protège également le cerveau et la moëlle épinière contre le passage de substances toxiques et de microorganismes pathogènes.

Calpaïne : Protéase à cystéine, non-lysosomiale, dont l'activité, de type papaïne, est dépendante du calcium.

Caspase : Classe de protéases à cystéine qui reconnaissent chacune une séquence particulière sur certaines protéines et hydrolysent la liaison peptidique côté carboxyle d'un résidu d'aspartate de cette séquence.

β-caténine : Protéine impliquée dans l'adhésion cellulaire, la signalisation cellulaire et la transcription.

Cathépsine : Endoprotéase lysosomiale, fonctionnant à pH acide, dont l'activité protéolytique cible la matrice extracellulaire et la membrane basale. Les cathépsines participent à l'autolyse apoptotique et à la digestion intracellulaire.

Cavéoline : Famille de protéines membranaires constitutives des cavéoles et impliquées dans le phénomène d'endocytose.

Cellule dendritique : Cellule immunitaire faisant partie du système phagocytaire mononucléaire. Ce sont des cellules présentatrices d'antigènes et qui peuvent présenter des prolongements cytoplasmiques appelés dendrites dans certaines conditions.

Cellule NK (Natural Killer) : Lymphocyte CD56+ capable d'éliminer des cellules tumorales et des cellules infectées. Les cellules NK sécrètent également des cytokines qui participent à l'orientation de la réponse immunitaire adaptative.

Chimiokine : Cytokine chimiotactique qui contrôle les motifs de migration et le positionnement des cellules immunitaires. La fonction la plus étudiée des chimiokines est l'attraction (chimiotactisme) et le contrôle de l'état d'activation des cellules du système immunitaire. D'autres fonctions leur ont été aussi attribuées, dans le développement embryologique ou la physiologie du système nerveux par exemple. Elles sont caractérisées par la présence de quatre résidus cystéine en des positions conservées nécessaires à la formation de leur structure tridimensionnelle.

Clathrine : Protéine structurelle, constituant l'enveloppe (ou manteau) de certaines vésicules (on parle de vésicules mantelées). Les clathrines présentent une forme en triskèle appelés triskélions dont les branches s'assemblent pour former une structure polyédrale. Cet assemblage permet l'invagination de la membrane et la formation de vésicules, impliquées dans l'endocytose.

Complexe Majeur d'Histocompatibilité : Système de reconnaissance du soi présent chez la plupart des vertébrés. Chez l'humain, on parle d'antigène HLA. Les molécules du CMH sont à la surface de toutes les cellules nucléées pour le CMH de classe I et les cellules présentatrices de l'antigène pour le CMH de classe II qui assurent la présentation de l'antigène aux lymphocytes T afin de les activer.

Cytokine : Glycoprotéine, qui peut être membranaire ou sécrétée suite à une stimulation. Parmi les cytokines on trouve le TNF- α , les interleukines, les chimiokines et les interférons. Elles sont impliquées dans la régulation des fonctions immunitaires, mais aussi dans l'hématopoïèse et l'hémostase.

Éctropion : Éversion du bord libre de la paupière.

Endocytose : Pénétration dans une cellule de matériel extracellulaire, par invagination de la membrane plasmique suivie de la formation de vésicules s'isolant dans le cytoplasme. Il existe deux types d'endocytose : la pinocytose et la phagocytose.

Érythrodermie : Syndrome rare consistant en une rougeur de la peau confluente, très étendue, s'accompagnant d'une desquamation. Elle est caractérisée par une évolution prolongée, et peut s'accompagner d'un prurit important ainsi que d'un œdème. Les muqueuses (bouche, conjonctive oculaire...) peuvent également être atteintes.

Hématopoïèse : Ensemble des mécanismes impliqués dans la production des diverses cellules sanguines à partir de la cellule souche hématopoïétique, incluant la mise en place d'un microenvironnement spécifique ; l'auto-renouvellement des cellules souches ; la différenciation vers l'une ou l'autre des cellules du sang ; l'intervention de molécules extracellulaires (facteurs de croissance), intracytoplasmiques (récepteurs et voies de transduction du signal), et intranucléaires (facteurs de transcription et gènes spécifiques).

Hépatosplénomégalie : Association d'une augmentation de volume du foie (hépatomégalie) et de la rate (splénomégalie).

Hypoxie : Carence d'apport en oxygène.

Kératodermie palmoplantaire : Épaississement de la peau des paumes des mains et des plantes des pieds.

Kinase : Enzyme du groupe des transférases catalysant les réactions de phosphorylation par l'ajout d'un ion phosphate à une molécule cible, à partir de l'ATP.

Lymphocyte T auxiliaire (helper) : Lymphocyte T CD4+ agissant seulement comme intermédiaire de la réponse immunitaire. Ces lymphocytes prolifèrent seulement lorsqu'ils sont liés à certains antigènes pathogènes, pour activer une quantité d'autres types de cellules qui agiront de manière plus directe sur la réponse. Une fois activés, ils prolifèrent et sécrètent des cytokines, des protéines ou des peptides qui stimulent d'autres lymphocytes. Ils peuvent se différencier en plusieurs sous-types, définis en fonction des cytokines spécifiques qu'ils produisent.

Lymphocyte T cytotoxique (CTL) : Lymphocyte T qui présente à sa surface des récepteurs pouvant se lier à des complexes formés par un peptide présenté par une molécule CMH de classe I. Ces lymphocytes sont capables d'éliminer une cellule cible, comme les cellules infectées (par des virus ou autres pathogènes intracellulaire), les cellules cancéreuses ou les cellules provenant d'allogreffes. Les lymphocytes T cytotoxiques jouent donc un rôle essentiel dans la réponse immunitaire. Une fois activées par un complexe CMHI-peptide, les lymphocytes T cytotoxiques libèrent la perforine, une protéine qui entraîne la formation de pores dans la membrane plasmique des cellules cibles et provoque leur lyse. Les lymphocytes T cytotoxiques libèrent également la granzyme, une protéase à sérine, capable de pénétrer dans la cellule cible par ces pores, puis d'induire l'apoptose.

Maladie résiduelle minime (MRD) : Persistance de cellules malignes en dessous du seuil de détection par les techniques conventionnelles, au terme d'une séquence thérapeutique à visée éradicatrice.

Oncogène : Gène dont l'expression favorise la survenue d'un cancer.

Onychodystrophie : Trouble de la croissance des ongles.

Polyadénopathie : Présence de plusieurs ganglions augmentés de volume localisés en différents territoires ganglionnaires.

Prurit : Démangeaison liée à une affection cutanée ou générale.

Suppresseur de tumeur : Gène qui a pour fonction d'empêcher l'emballement de la division cellulaire. S'il est introduit dans une cellule cancéreuse, il a tendance à ralentir la prolifération cellulaire. Ces gènes peuvent par exemple favoriser la mort cellulaire programmée ou ralentir le cycle cellulaire.

Thrombopénie : Diminution du nombre de plaquettes sanguines en dessous du seuil de 150 000 plaquettes par millimètre cube (ou diminution de 50 % par rapport au niveau de référence).

Abréviations

AAC-11 : Anti-Apoptosis Clone 11

ACPP : Activatable Cell-Penetrating Peptide

AD : Dermatose Atopique

ADN : Acide Désoxyribonucléique

APAF-1 : Apoptotic Peptidase Activating Factor 1

API-5 : Apoptosis Inhibitor 5

ARN : Acide Ribonucléique

ATO : Arsenic Trioxide

ATP : Adénosine Triphosphate

ATRA : Acide Transrétinoïque

ATTEMPS : Antibody Targeted Triggered Electrically Modified Prodrug Type Strategy

AV : Annexin V

Ca²⁺ : Calcium

CAR-T : Chimeric Antigen Receptor T cell

CD : Cellule Dendritique

Cdc42 : Cell Control Division Protein 42

CEA : CarcinoEmbryonic Antigen

CLEC9 : C-type LECTin domain family 9 member A

CMHI : Complexe Majeur d'Histocompatibilité I

CMHII : Complexe Majeur d'Histocompatibilité II

CPA : Cellule Présentatrice d'Antigène

CPP : Cell-Penetrating Peptide

CRT : Calréticuline

CSC : Cellule Souche Cancéreuse

CSH : Cellule Souche Hématopoïétique

CSL : Cellule Souche Leucémique

CTCL : Cutaneous T Cell Lymphoma ou lymphome T cutané

CTL : Cytotoxic T Lymphocyte ou lymphocyte T cytotoxique

DAMP : Damage-Associated Molecular Pattern

DISC : Death-Inducing Signaling Complex

EORTC : European Organization for Research and Treatment of Cancer

FDA : Food and Drug Administration

GvHD : Graft-vs-Host Disease ou réaction du greffon contre l'hôte

HER2 : Human Epidermal Growth Factor Receptor 2

HLX : H2.0-Like Homeobox

HMGB1 : High-Mobility Group Box 1

HSP : Heat Shock Protein

IL : Interleukin

IFN : Interféron

ITIM : Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motifs

K⁺ : Potassium

KIR : Killer Immunoglobulin-like Receptors

LAL : Leucémie Aigüe Lymphoblastique

LAM : Leucémie Aigüe Myéloïde

LAM-CBF : Leucémie Aigüe Myéloïde à Core-Binding Factor

LAP : Leucémie Aigüe Promyélocytaire

LDH : Lactate Déshydrogénase

LLC : Leucémie Lymphoïde Chronique

LZ : Leucin-Zipper ou glissière à leucines

LZDP : Leucin-Zipper-Derived Peptide

MAGE : Melanoma-Associated Antigen

MCI : Mort cellulaire immunogène

MIG8 : Migration-Inducing Protein 8

MF : Mycosis Fungoïde

MRD : Maladie Résiduelle minime

MUC1 : Mucine 1

Na⁺ : Sodium

NLRP3 : NOD-Like Receptor family, Pyrin domain containing 3

NLS : Nuclear Localisation Sequence

NOA : Non-Oncogenic Antigen

NOD/SCID : Non-obese Diabetic/Severe Combined Immunodeficient mouse

NSCLC : Cancers Bronchiques Non à Petites Cellules

NSG : NOD/SCID Y mouse

PAK1 : P21 (RAC1) Activated Kinase 1

PAMP : Pathogen-Associated Molecular Pattern

PBMC : Peripheral Blood Mononuclear Cell ou cellule mononuclée de sang périphérique

PDL-1 : Programmed Death-Ligand 1

PDX : Patient-Derived-Xenograft ou xéno greffe dérivée de patients

PI : Propidium Iodide ou iodure de propidium

PI-3 : Phosphoinositide-3

PPI : Interaction Protéine-Protéine

PRR : Pathogen-Recognition Receptor

PTD : Protein Transduction Domain

RAGE : Receptor for Advanced Glycation Endproducts

Rac1 : RAS-related C3 botulinum toxin substrate 1

ROS : Oxygen Reactive Species

SS : Syndrome de Sézary

TGF : Transforming Growth Factor

TH : T Helper

TK : Tyrosine Kinase

TLR : Toll-Like Receptor

TNF : Tumor-Necrosis Factor

TRADD : Tumor Necrosis Factor Receptor type 1-associated Death Domain

TRAIL : Tumor-Necrosis-Factor Related Apoptosis Inducing Ligand

TUNEL : Terminal deoxynucleotidyl Transferase dUTP Nick End Labeling

WT : Wild Type (sauvage)

Préambule

D'après les données épidémiologiques de l'Institut National du Cancer, 382 000 nouveaux cas de cancer ont été diagnostiqués en France métropolitaine au cours de l'année 2018 (205 000 hommes et 177 000 femmes). Parmi les cancers les plus fréquents, on retrouve le cancer du sein, le cancer du poumon, le mélanome ou encore les leucémies. Malgré des progrès considérables au cours des dernières décennies dans la détection précoce et la prise en charge des patients, le cancer reste la première cause de décès en France. Il est donc urgent de proposer de nouvelles options thérapeutiques innovantes, afin de permettre une amélioration du taux de mortalité dû aux cancers ainsi que de la qualité de vie des patients.

Actuellement, la stratégie de traitement des cancers consiste le plus souvent en l'association d'une opération chirurgicale (ablation totale ou partielle de la tumeur), d'une irradiation locale et l'administration de chimiothérapies. Les chimiothérapies sont des molécules cytotoxiques (qui tuent les cellules malignes) ou cytostatiques (qui bloquent la prolifération des cellules en phase de division rapide), généralement très efficaces mais aussi responsables de nombreux effets indésirables. Une telle toxicité limite souvent l'utilisation de ces agents anti-cancéreux à leur dose optimale, menant à des rechutes, au développement de résistances aux chimiothérapies et à une mauvaise prise en charge des malades. De plus, puisque les cellules tumorales ont de nombreuses caractéristiques communes avec les cellules normales, concevoir un médicament qui détruit uniquement les cellules cancéreuses sans affecter les cellules saines avoisinantes représente un véritable défi pour le développement thérapeutique en oncologie.

Depuis l'avènement du séquençage à haut débit des génomes, de nombreux laboratoires se sont penchés sur la recherche et la mise au point de thérapies dites ciblées. Ces thérapies ciblées agissent spécifiquement sur des molécules associées au cancer, tandis que les chimiothérapies classiques agissent sur les cellules en division rapide qui peuvent être soit normales soit cancéreuses.

Les thérapies ciblées sont basées sur la médecine de précision qui consiste à rechercher chez les patients des marqueurs moléculaires de diagnostic et de sensibilité aux traitements. Un grand nombre d'entre-elles ont déjà été approuvées par la FDA (Food and Drug Administration) et proposées sur le marché. D'autres sont actuellement au stade d'évaluation pré-clinique ou clinique.

On peut classer les thérapies ciblées en plusieurs classes. La famille la plus représentée est celle des inhibiteurs de protéines kinases, qui ont la capacité d'entrer dans les cellules et de bloquer l'activation des tyrosines kinases impliquées dans la prolifération des cellules cancéreuses. Il y a également les anticorps monoclonaux, qui sont capables de se fixer sur des récepteurs exprimés exclusivement à la surface des cellules tumorales et capables de freiner leur multiplication. D'autres traitements ciblés s'attaquent à l'oncogène lui-même, en induisant sa dégradation, ou bien à des mécanismes comme l'angiogénèse.

Le développement de telles thérapies ciblées constitue une véritable révolution dans le domaine du traitement du cancer. Cependant, la découverte de nouveaux médicaments s'est sensiblement ralentie au cours des dernières années. A l'heure actuelle, la fonction de près de 40% des 30 000 gènes humains reste inconnue, et les 100 médicaments les plus vendus agissent sur moins de 50 protéines différentes. De plus, puisque l'intérêt de

ces nouvelles thérapies vient de leur spécificité vis-à-vis d'une ou plusieurs anomalies particulières, il n'est pas rare que selon le profil biologique du patient (et le statut mutationnel de la tumeur), les options thérapeutiques restent limitées.

C'est dans ce contexte que notre équipe s'adonne à la recherche de nouvelles cibles thérapeutiques, tout aussi spécifiques des cellules tumorales, mais plus universelles (communes à la majorité des cancers et des patients). Les interactions protéine-protéine (PPIs) sont une classe émergente de cibles thérapeutiques. Les réseaux de PPIs manipulent l'essentiel des activités cellulaires et sont donc au centre du développement et de la progression des maladies. Contrairement aux cibles thérapeutiques classiques, la modulation des PPIs est une forme de régulation plus subtile et plus spécifique avec l'avantage d'avoir très peu d'effets secondaires, et de ne pas perturber totalement l'activité d'une protéine.

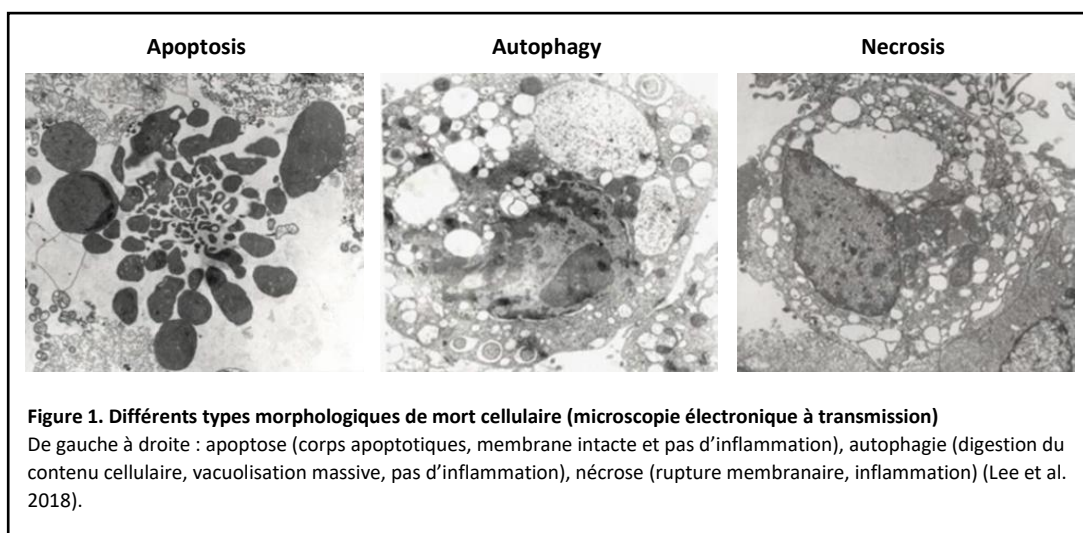
Une protéine cible particulièrement intéressante est la protéine anti-apoptotique AAC-11, qui joue un rôle clé dans plusieurs étapes de la tumorigénèse en interagissant avec de nombreuses protéines impliquées dans des fonctions cellulaires telles que l'apoptose, la différenciation, la migration et l'invasion tumorale. La stratégie utilisée dans notre équipe est de bloquer l'activité d'AAC-11 grâce à l'utilisation de peptides pénétrants, capables d'interférer avec ces différentes interactions. Nos peptides, appelés LZDPs, sont de petites molécules naturelles et non-toxiques, présentant un grand nombre de propriétés anti-tumorales, non seulement *in vitro*, mais aussi *in vivo*.

INTRODUCTION

CHAPITRE 1 : Mort cellulaire et cancer

Actuellement, douze formes de mort cellulaire sont reconnues par le comité de nomenclature (Galluzzi et al., 2012). En termes de morphologie, on classe la mort cellulaire en trois grandes catégories (Lee et al., 2018) (Figure 1) :

- L'apoptose/pyroptose, caractérisée par un rétrécissement cellulaire, la condensation de la chromatine, la fragmentation nucléaire, la formation de blebs (proéminence de la membrane plasmique) et la formation de corps apoptotiques (petites vésicules).
- L'autophagie, caractérisée par la formation d'un grand nombre de vacuoles cytoplasmiques (autophagosomes).
- La nécrose/nécroptose, caractérisées par le gonflement des mitochondries et la rupture de la membrane plasmique.



Des défauts dans l'une ou plusieurs de ces voies de mort cellulaire ou leur modulation peuvent être à l'origine du développement de nombreuses pathologies, en particulier l'initiation et la progression de cancers. C'est pourquoi certains agents thérapeutiques agissent directement sur ce processus. La plupart déclenchent l'apoptose des cellules tumorales (Belmar et Fesik, 2015), mais il a été montré que les cellules cancéreuses pouvaient également être éliminées de manière efficace par nécrose ou par modulation de l'autophagie (Brown et Attardi, 2005). Parfois, les protéines cibles peuvent être mutées, ce qui conduit à des résistances aux traitements (Housman et al., 2014). Afin d'améliorer la réponse aux thérapies anti-cancéreuses, il est donc important de bien comprendre les mécanismes et les voies de signalisation impliqués dans les différentes formes de mort cellulaire, ainsi que leurs réseaux d'interactions complexes.

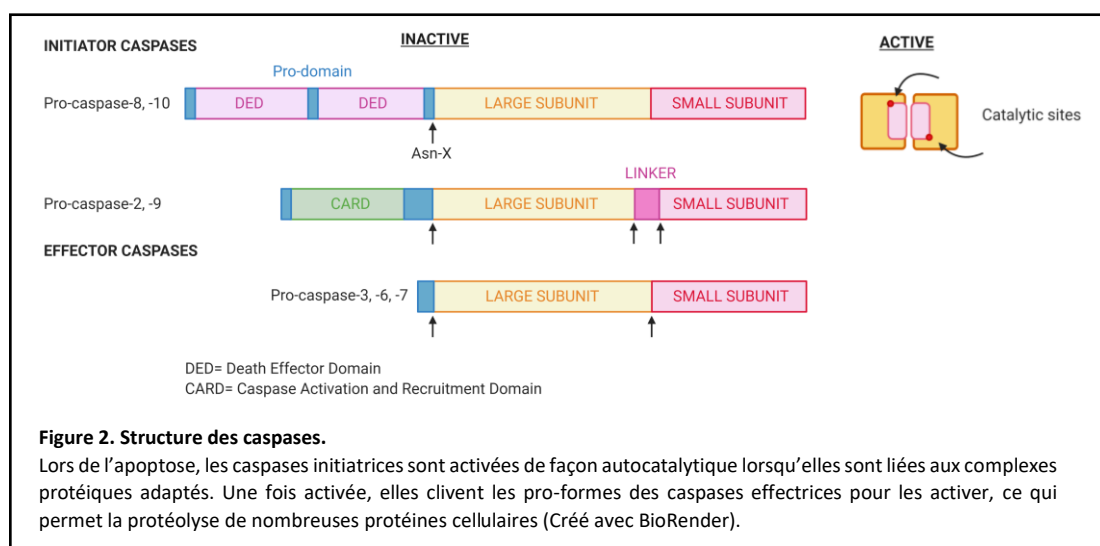
I. Apoptose

1) Vue d'ensemble

Le mot apoptose a été introduit en 1972 pour décrire une mort cellulaire présentant des caractéristiques morphologiques particulières (Kerr et al., 1972). Il s'agit d'un processus génétiquement contrôlé jouant un rôle fondamental dans le développement et l'homéostasie cellulaire (Lee et Overholtzer, 2019).

Les cellules apoptotiques sont caractérisées par des modifications morphologiques : boursofflements de la membrane plasmique, rétrécissement du noyau et du cytoplasme, condensation de la chromatine dans le noyau. Ces événements s'accompagnent d'une fragmentation de la cellule et de la formation de corps apoptotiques (Doonan et Cotter, 2008). D'un point de vue biochimique, elles sont caractérisées par une externalisation des phosphatidylsérines membranaires, une dégradation spécifique de l'ADN (en fragments de haut poids moléculaire et/ou en fragments oligonucléosomiaux) et une dégradation sélective de certaines protéines cellulaires (Savill et al., 1989).

Les cellules ont la capacité de répondre à des signaux très différents en activant un ensemble d'événements conduisant à leur mort par apoptose. L'initiation de l'apoptose est dépendante de l'activation d'une série de protéases à cystéines connues sous le nom de caspases (Figure 2). Il existe deux catégories de caspases, les caspases initiateuses et les caspases effectrices (Elmore, 2007). Une fois l'anomalie cellulaire détectée, les procaspases initiateuses (procaspases 8 et 9) sont activées. Elles vont ensuite elles-mêmes activer, en les clivant, les caspases effectrices (caspases 3, 6 et 7). Le clivage par les caspases effectrices de leurs substrats provoque une cascade d'événements qui aboutit entre-autres à la fragmentation de l'ADN, à l'expression de ligands pour les cellules phagocytaires et à la formation de corps apoptotiques (Doonan et Cotter, 2008). Les corps apoptotiques formés sont ensuite phagocytés par les macrophages. La formation de corps apoptotiques avec membrane plasmique intacte prévient le relargage des constituants intracellulaires et donc la réaction inflammatoire.



Le mécanisme d'apoptose est très conservé entre les organismes multicellulaires, et est contrôlé génétiquement (Lockshin et Zakeri, 2007). L'apoptose peut être initiée par la cellule elle-même lorsqu'elle détecte une anomalie grâce à ses différents senseurs intracellulaires. Cette voie est connue sous le nom de voie mitochondriale ou voie

intrinsèque. Elle peut également résulter de l'interaction de la cellule endommagée avec une cellule du système immunitaire, mieux connue sous le nom de voie des récepteurs de mort ou voie extrinsèque (Oppenheim, 1991; Oppenheim et al., 2001). Dans le corps humain, on estime à 10^9 le nombre de cellules qui entrent en apoptose par jour (Elliott et Ravichandran, 2010). Les deux voies fonctionnent de manière synergique pour assurer un maintien de la bonne santé de l'organisme, via l'élimination des cellules délétères.

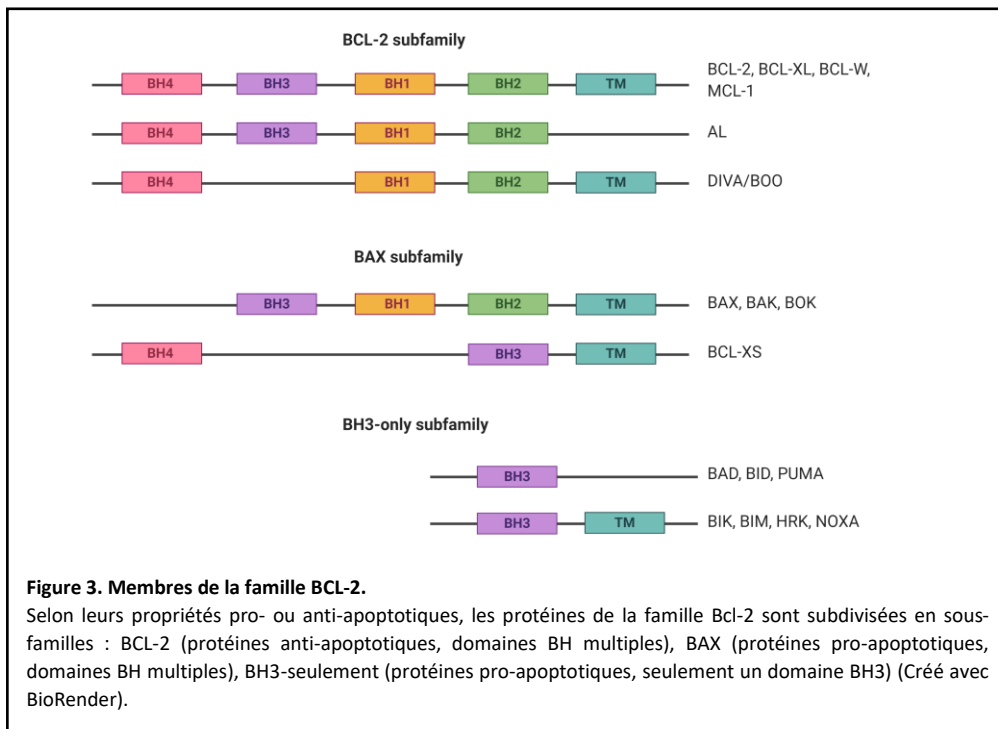
Cependant, le dérèglement pathologique du processus d'apoptose ou de son contrôle est à l'origine de nombreuses maladies : certains désordres immuns, les maladies neuro-dégénératives (Alzheimer, Parkinson), les maladies cardio-vasculaires (infarctus), le sida (caractérisé par la disparition des lymphocytes T CD4+) et le cancer entre-autres.

2) Voie intrinsèque

La voie intrinsèque est caractérisée par trois étapes principales : (1) Phase d'induction au cours de laquelle des signaux inducteurs de l'apoptose sont reçus. (2) Phase effectrice au cours de laquelle ces signaux sont intégrés, menant au franchissement ou non d'un point de non-retour, l'activation des caspases. (3) Phase de destruction au cours de laquelle les cellules sont dégradées et les corps apoptotiques éliminés.

Au cours de la phase d'induction, la voie intrinsèque se produit en réponse à des signaux internes pro-apoptotiques comme les dommages à l'ADN. Ceux-ci peuvent être induits par de nombreux facteurs externes, parmi lesquels les rayons ultraviolets, un stress osmotique ou encore une absence de facteurs de croissance (Opferman et Korsmeyer, 2003).

Lors de la phase effectrice, une cascade d'activation de protéines de la famille BCL-2 est enclenchée (Roset et al., 2007) (Figure 3). Les dommages à l'ADN activent les protéines pro-apoptotiques « à BH3-seulement » (PUMA, BIM, BAD, NOXA), menant à l'inhibition de ces membres anti-apoptotiques BCL-XL et BCL-2. Une fois libérés de l'action inhibitrice de BCL-XL et BCL-2, les protéines pro-apoptotiques BAK et BAX changent de conformation pour former des homo-oligomères qui peuvent s'insérer dans la membrane mitochondriale, conduisant à une perte d'intégrité de la membrane mitochondriale (Decaudin et al., 1997; Decaudin et al., 1998; Green et Kroemer, 2004).



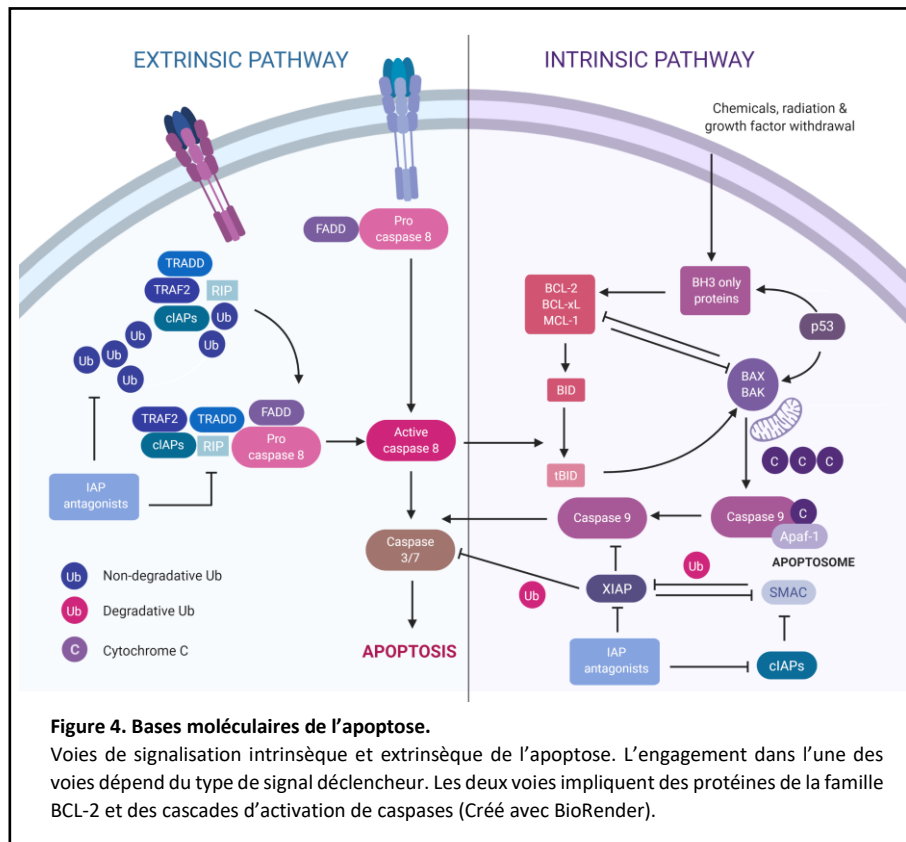
La voie intrinsèque est caractérisée par la perméabilisation et la dépolarisation de la membrane mitochondriale. De nombreux facteurs, dont le Ca^{2+} , et de nombreuses protéines, parmi lesquelles le cytochrome c, sont relargués dans le cytoplasme de la cellule (Candé et al., 2002; Saelens et al., 2004). Cette perte d'intégrité membranaire constitue un point de non-retour pour la cellule : elle se dirige de manière irréversible vers la mort. Dans le cytoplasme, le cytochrome c, APAF-1 et la procaspase 9 s'assemblent pour former l'apoptosome (Solary 1998; Cain et al., 2000; Saelens et al. 2004;). La caspase-9 est alors activée, et va elle-même activer des caspases effectrices (caspases 3 et 7), ce qui provoque, entre-autres, l'exposition de la phosphatidylsérine du côté extracellulaire de la membrane plasmique, la fragmentation de l'ADN et la formation des corps apoptotiques (Czabotar et al., 2014; Galluzzi et al., 2018).

La phase de destruction de l'apoptose est caractérisée par le rétrécissement de la cellule et la phagocytose des corps apoptotiques (Doonan et Cotter, 2008).

3) Voie extrinsèque

La voie extrinsèque est initiée lorsque des membres de la famille TNFR (ex : récepteurs FAS et TNF) sont stimulés par leurs ligands (ex : FasL, TNF ou TRAIL) au niveau de la membrane plasmique. La liaison des substrats aux récepteurs de mort induit la formation de complexes multiprotéiques au niveau de la surface cytoplasmique du récepteur. Ces plateformes moléculaires sont appelées DISC, et médient l'activation de la caspase 8. La caspase 8 active ensuite les caspases effectrices ce qui induit le clivage de la protéine pro-apoptotique BID en fragment tronqué (tBID). A ce niveau, BAK et BAX sont activées, ce qui en fait un point d'intersection entre les deux voies

apoptotiques (Czabotar et al., 2014; Galluzzi et al., 2018). Un schéma récapitulatif des bases moléculaires des voies intrinsèque et extrinsèque est représenté ci-dessous (Figure 4).



4) Apoptose et cancer

A l'heure actuelle, de nombreux oncogènes et gènes suppresseurs de tumeurs ont été découverts et mis en cause dans le contrôle de l'apoptose :

- Gènes impliqués dans la voie de signalisation RAS (ex : oncogène *BRAF*)
- Gènes impliqués dans la voie de signalisation AKT (ex : oncogènes *AKT* et *BAX*, gènes suppresseurs de tumeurs *PTEN* et *BCL-2*)
- Gènes impliqués dans le cycle cellulaire et en particulier la transition G2/M (ex : oncogène *MDM2*, gène suppresseur de tumeur *TP53*)

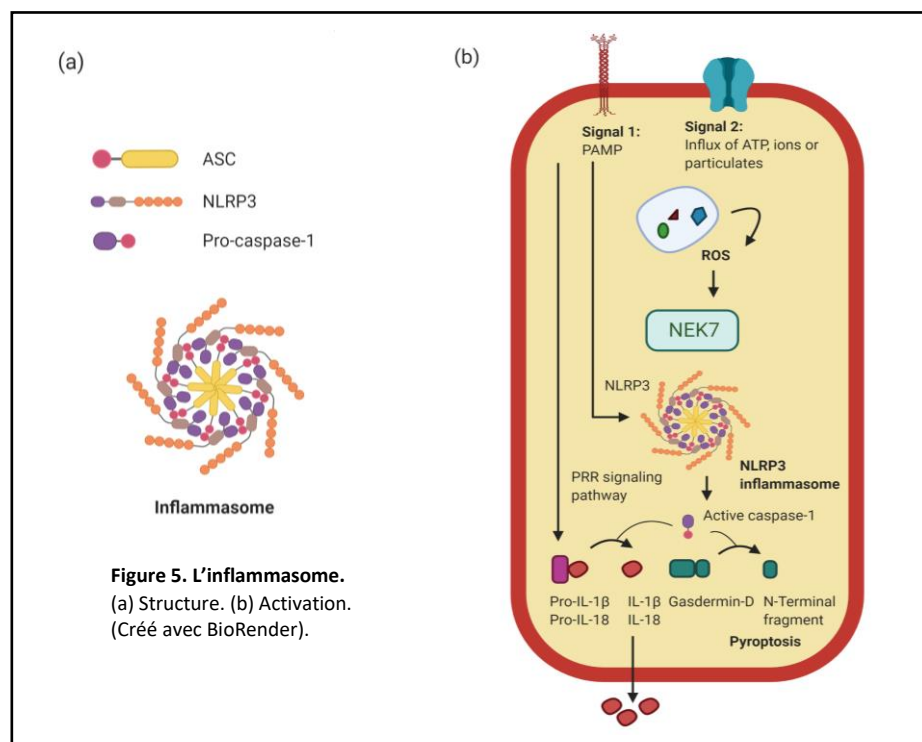
L'expression de ces gènes affecte l'initiation de la tumorigénèse, la progression de la tumeur et la résistance aux traitements. Ceci illustre le fait que l'apoptose constitue un véritable lien biologique entre génétique du cancer et traitement du cancer. C'est pourquoi les gènes et les protéines contrôlant l'apoptose sont considérés comme des cibles particulièrement prometteuses pour le développement de nouvelles thérapies anticancéreuses (Houghton, 1999; Zhivotovsky et Orrenius, 2003; Garrido et al., 2007; Letai, 2008; Ledgerwood et Morison, 2009).

II. Autres voies de mort cellulaire

1) Pyroptose

L'apoptose classique est caractérisée par la compartimentalisation de composés intracellulaires de la cellule, et l'élimination des débris cellulaires sans dommages collatéraux dans les tissus voisins. Une forme alternative d'apoptose a récemment été identifiée (Boise et Collins, 2001; Cookson et Brennan, 2001), qui, bien que suivant une série d'évènements programmés caspases-dépendants, est pro-inflammatoire. Cette forme de mort cellulaire, appelée pyroptose (Fink et Cookson, 2005), a été identifiée dans des macrophages infectés par *Salmonelle* ou *Shigella*, et n'est pas observée dans les cellules déficientes en caspase-1 (Allen et al., 2005).

La liaison d'un PAMP (Pathogen-Associated Molecular Pattern) à un PRR (Pathogen-Recognition Receptor) active les voies de signalisation MAPK et NF κ B, ce qui induit la transcription et la synthèse de précurseurs de cytokines pro-IL-1 β et pro-IL-18, et de l'inflammasome NLRP3. Ce processus constitue un premier signal pour la génération de cytokines IL-1 β et IL-18 matures (Figure 5a). Le second signal est dû à l'activation du NLRP3 par des activateurs stériles ou pathogènes. Cela initie des modifications telles qu'un influx d'ion, d'ATP ou de petites particules menant à la formation de ROS (Oxygen Reactive Species). Ces ROS induisent la liaison d'une protéine kinase appelée NEK7 au NLRP3, ce qui aboutit à la formation (assemblage avec la protéine adaptatrice ASC et la procaspase-1) et l'activation de l'inflammasome (Figure 5b). La procaspase-1 est clivée, ce qui permet la génération d'une caspase-1 active, qui clive les précurseurs de cytokines pro-IL-1 β et pro-IL-18 en cytokines matures. La caspase-1 génère également un fragment de gasdermine D (fragment N-terminal) qui transloque dans le feuillet interne de la membrane plasmique, conduisant à la formation de pores. Ces pores permettent la sécrétion des cytokines matures IL-1 β et IL-18, un efflux de K $^{+}$ (Gutierrez et al., 2017), la perméabilisation de la membrane plasmique et la lyse cellulaire (Jorgensen et Miao, 2015; Galluzzi et al., 2018). Dans le cas de la pyroptose, contrairement à l'apoptose, l'intégrité nucléaire est maintenue (pas de fragmentation), bien qu'une condensation de la chromatine puisse être observée (Fink et Cookson, 2005).



Contrairement à l'apoptose, le rôle de la pyroptose dans le cancer et dans la réponse aux chimiothérapies est peu connu, mais il n'est pas sans intérêt (Nagarajan et al., 2019).

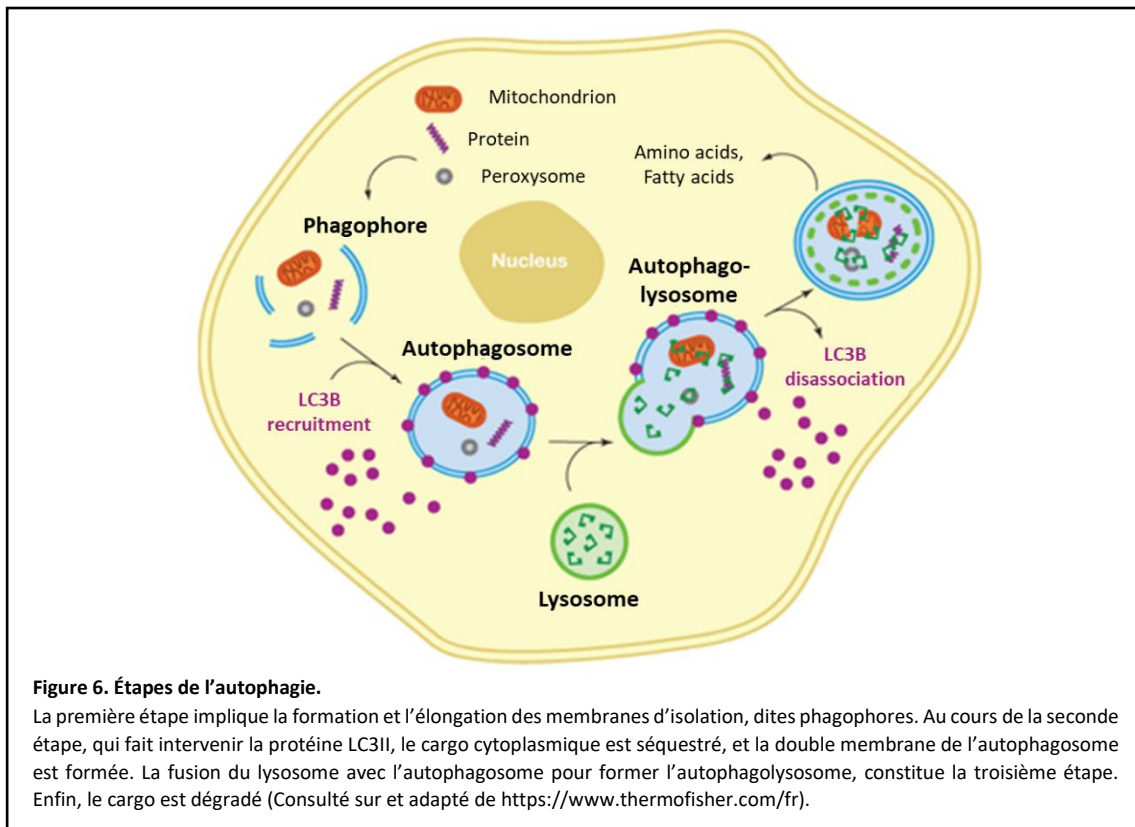
On sait que la pyroptose est activée principalement par la caspase-1, et que son absence peut mener à la formation de tumeurs liée à une inflammation. Dans des modèles de souris déficientes en caspase-1, il n'y a plus de production d'IL-18, elle-même connue pour son rôle inhibiteur dans la formation de tumeurs et l'angiogenèse (Hegardt et al., 2001; Cao et al., 2007). De plus, l'inflammasome NLRP3 a un rôle protecteur, et la dérégulation de ces composants est observée dans plusieurs cancers dont l'hépatocarcinome (Zaki et al., 2011; Wei et al., 2014).

Récemment, il a également été montré que certains agents chimiothérapeutiques ciblant l'ADN (cisplatine, doxorubicine, actinomycine-D) pouvaient induire une pyroptose des cellules cancéreuses, via l'activation de la caspase-3 (Wang et al., 2017). Il est aussi connu que certaines chimiothérapies affectent les mitochondries, et induisent une production accrue de ROS. Plusieurs études ont montré que ce phénomène pourrait faciliter la formation de l'inflammasome et aboutir à une mort des cellules cancéreuses par pyroptose (Guo et al., 2015; Gurung et al., 2015).

2) Autophagie

L'autophagie est un processus par lequel des composés cellulaires comme les macromolécules ou bien des organelles entières sont séquestrés dans des lysosomes afin d'être dégradés (Klionsky et Emr, 2000). Les lysosomes sont ensuite capables de digérer ces substrats, qui peuvent être soit recyclés pour créer de nouvelles structures et/ou organelles ou bien être utilisés comme source d'énergie pour la cellule. L'autophagie peut être induite par de nombreux signaux de stress, notamment le manque de nutriments (Mizushima et al., 2008). Bien que l'autophagie soit la plupart du temps un moyen de recycler des composés cellulaires, elle peut aboutir à la destruction de la cellule, comme dans le cas de l'élimination des cellules sénescents et la destruction des lésions néoplasiques (Mizushima et al., 2008).

Dans la forme la mieux décrite de l'autophagie, dite « macroautophagie », des régions entières de la cellule sont séquestrées dans des vésicules à double-membrane appelées autophagosomes (Li et Vierstra, 2012). Chronologiquement, l'autophagie est médiée par les complexes ULK1 et PI-3K qui permettent la formation d'un phagophore. Un autre complexe composé de plusieurs sous-unités, dont la protéine LC3II est nécessaire pour l'élongation du phagophore et la formation de l'autophagosome. Puis, la protéine p60 se lie aux protéines ubiquitinées, qui sont ciblées pour la dégradation. P60 se lie alors à LC3II au moment de la formation de l'autophagosome et les protéines et organelles ciblées pour la dégradation sont engloutis. Après fusion de l'autophagosome avec le lysosome, son contenu est digéré (Ndoye et Weeraratna, 2016). Les étapes les plus importantes sont schématisées ci-dessous (Figure 6).



En fonction du contexte physiologique ou pathophysiologique de la cellule, l'autophagie peut être considérée comme une alliée ou un ennemi du cancer (Amaravadi et al., 2016).

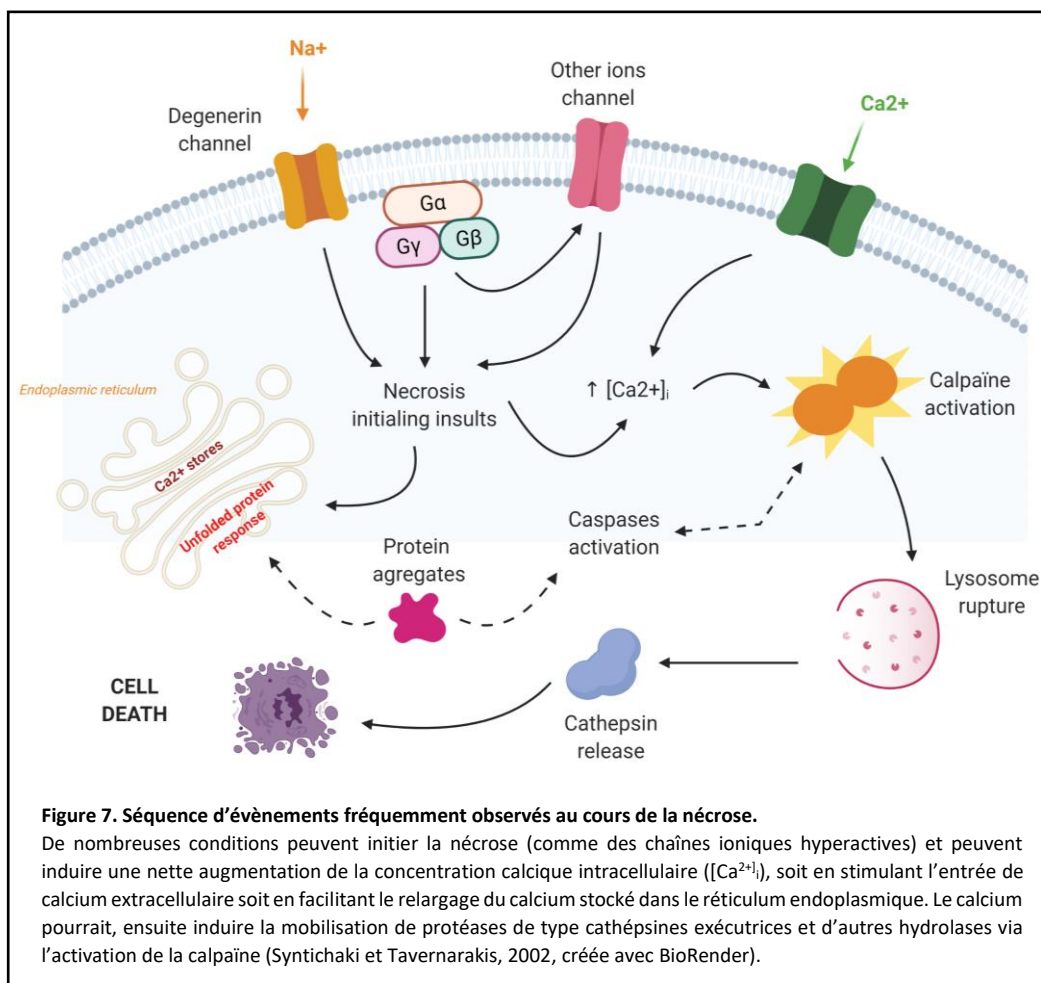
L'autophagie se produit à des niveaux faibles dans tous les tissus, permettant l'élimination des organelles endommagées et des protéines incorrectement repliées. Dans ces conditions physiologiques (lorsque les niveaux en nutriments sont normaux), l'autophagie protège l'organisme du développement de nombreuses maladies, notamment les cardiopathies, les maladies infectieuses, les maladies neurodégénératives et le cancer (Nixon et Yang, 2011; McLendon et al., 2014; Chen et al., 2014; Cuervo et Wong, 2014; Kimmelman et White, 2017).

Au contraire, dans un contexte pathologique (manque de nutriments, hypoxie ou infection bactérienne), l'autophagie se produit à des niveaux élevés, ce qui contribue à l'adaptation des cellules au stress, mais également à la survie des cellules cancéreuses. De nombreuses études ont montré que des thérapies ciblées variées pouvaient induire l'autophagie des cellules cancéreuses. Cependant, dans la plupart de ces études, bien que l'objectif soit de renforcer l'autophagie au point d'induire la mort cellulaire, cette autophagie était plutôt cytoprotectrice que cytotoxique, avec activation de nombreuses voies de réponse au stress (Katayama et al., 2007; Kapuy et al., 2014; Onorati et al., 2018). A l'inverse, des études ayant pour objectif d'inhiber l'autophagie semblent très prometteuses dans de nombreux types de cancers, tels que le glioblastome, le cancer du pancréas, le mélanome, le sarcome ou encore le myélome multiple (Tanida, 201; Ndoye et Weeraratna, 2016; Amaravadi et al., 2016; Muller et al., 2017; Levy et al., 2017). Par exemple, dans un modèle murin de cancer du sein triple-négatif, il a été montré que l'inhibition de l'autophagie augmentait significativement l'efficacité des chimiothérapies (Lefort et al., 2014). Il a également été montré que la suppression de l'autophagie dans un modèle murin de tumorigénèse permettait l'arrêt de la croissance tumorale, puis l'élimination progressive de la

tumeur (Karsli-Uzunbas et al., 2014). Compte tenu de l'importance de l'autophagie pour l'homéostasie des cellules normales, il reste important d'évaluer prudemment ce nouveau type de thérapies, et leur potentielle toxicité.

3) Nécrose

A l'inverse de l'apoptose, la nécrose a initialement été décrite comme une forme de mort cellulaire non-contrôlée, induite par des signaux extérieurs tels qu'une blessure, l'hypoxie ou encore l'inflammation d'un tissu (Elmore, 2007). La séquence d'évènements intracellulaires le plus souvent observée dans le cadre d'une mort par nécrose inclue des signes précoces de dysfonctionnement mitochondrial, c'est-à-dire la formation de ROS par la mitochondrie et le gonflement des mitochondries ; la déplétion en ATP, la perte de l'homéostasie du Ca^{2+} ; le regroupement des organelles autour du noyau, l'activation de certaines protéases comme les calpaïnes et les cathépsines ; la rupture des lysosomes puis de la membrane plasmique. Ce scénario est résumé ci-dessous (Syntichaki et Tavernarakis, 2002) (Figure 7). Le contenu cellulaire est donc directement relargué dans l'environnement, ce qui enclenche une cascade de réactions inflammatoires, et des dommages aux tissus adjacents.



La nécrose est classiquement définie comme une conséquence accidentelle d'un stress non-physiologique. Cependant, on peut aussi considérer la nécrose comme un processus bien orchestré, du moins en termes d'occurrence (Chautan et al., 1999). Tout d'abord, la nécrose n'est pas toujours une mort par défaut. Elle peut se produire au cours du développement (ex : mort des chondrocytes qui contrôlent la croissance longitudinale des os) (Roach et Clarke, 2000) et dans les tissus adultes pour assurer le maintien de l'homéostasie (ex : cellules épithéliales de l'intestin) (Barkla et Gibson, 1999). De plus, la nécrose peut être induite via l'occupation de récepteurs de la membrane plasmique par leurs ligands physiologiques (Festjens et al., 2006; Chan et al. 2003). Cette observation suggère que l'activation de certaines voies de signalisation est spécifiquement connectée à l'induction de la nécrose plutôt que d'autres formes de mort cellulaire. Enfin, la susceptibilité à la nécrose peut être régulée par des facteurs génétiques et épigénétiques (Mattson et Cheng, 2006) ainsi que la modulation de certaines enzymes (Chautan et al., 1999; Candé et al., 2002; Golstein et Kroemer, 2007). En particulier, l'inhibition des caspases, qui sont souvent nécessaires à la manifestation morphologique de l'apoptose/pyroptose, peut provoquer un switch vers une mort cellulaire présentant une morphologie de type nécrotique (Chautan et al., 1999; Kroemer et Martin, 2005; Golstein et Kroemer, 2007).

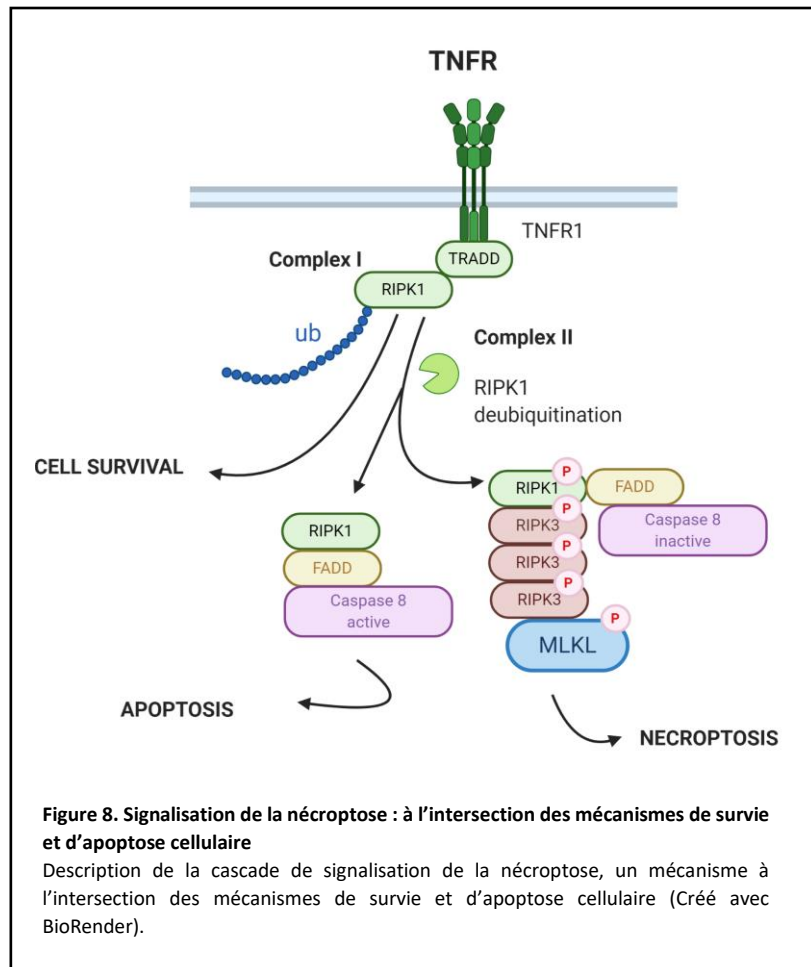
Intuitivement, il semblerait que la nécrose soit plutôt en faveur du cancer. Dans les tumeurs, on observe souvent de la nécrose, due à un manque d'approvisionnement en sang, en oxygène et en glucose (Carlin et al., 2007). Le développement d'un centre nécrotique chez les patients atteints de cancer est corrélé à une augmentation de la taille de la tumeur, une augmentation de sa vitesse de progression et un mauvais pronostic, en lien avec le développement de chimiorésistances et de métastases (Tomes et al., 2003; Kunz et Ibrahim, 2003; Gatenby et al., 2007). Deux causes majeures peuvent expliquer ces observations : d'une part, la nécrose engendre un relargage de DAMPs (Damage-Associated Molecular Patterns) dans le milieu extracellulaire (ex : HMGB1) ce qui induit une inflammation locale et promeut la progression tumorale. D'autre part, l'inflammation chronique peut progresser en cancer par un modèle en 4 étapes : (1) inflammation chronique (2) mutation de gènes suppresseurs (3) nécrose (4) mutation de proto-oncogènes (Vakkila et Lotze, 2004). La liaison de la protéine HMGB1 aux récepteurs RAGE et TLR4 n'est pas suffisante pour activer les macrophages, mais amplifie plutôt la production de cytokines pro-inflammatoires par les macrophages activés par d'autres facteurs environnementaux tels que les complexes protéines-ADN (Tian et al., 2007). Le recrutement des macrophages induits par la nécrose et la production subséquente de facteurs angiogéniques et de facteurs de croissance pourrait expliquer comment les cancers surviennent dans un contexte d'inflammation chronique, et comment l'inflammation induite par la nécrose tumorale peut accélérer la tumorigénèse (Vakkila et Lotze, 2004; Degenhardt et al., 2006).

Cependant, dans le contexte de thérapies anti-cancéreuses ciblant des tumeurs établies, le relargage de DAMPs tels que HMGB1 est également capable de promouvoir une immunité anti-tumorale. HMGB1 est un adjuvant efficace qui favorise la migration et la maturation des cellules dendritiques (CDs) ainsi que la sélection clonale, l'expansion et la survie des cellules T naïves. Des études *in vivo* ont montré qu'une immunogénisation avec HMGB1 active l'immunité anti-tumorale contre des tumeurs apoptotiques peu immunogéniques (Rovere-Querini et al., 2004). Le lien entre nécrose et immunité adaptative pourrait par exemple expliquer comment des chimiothérapies alkylantes peuvent induire des rémissions à long-terme et des guérisons dans des lymphomes agressifs indolents, naturellement résistants à l'apoptose.

4) Nécroptose

La nécroptose, décrite il y a quelques années (Degterev et al., 2005) est une forme de mort cellulaire dont les caractéristiques sont proches de celles de la nécrose. En effet, en termes de morphologie, on peut observer un gonflement cellulaire, une perméabilisation rapide de la membrane plasmique, un noyau intact et une absence d'activation des caspases (Moreno-Gonzalez et al., 2016). A l'inverse de la nécrose, il s'agit d'une mort cellulaire fortement régulée (Wu et al., 2012).

Le processus de nécroptose se produit dans un environnement déficient en apoptose, et est contrôlé par les kinases RIP1 et RIP3. La voie la plus connue est celle de l'activation de la nécroptose par le TNFR1 (Degterev et al., 2005). Lorsqu'un ligand se lie au TNFR1, il recrute le complexe I, qui consiste en l'association de TRADD, de RIP1 et de nombreuses ubiquitine-ligases E3. Dans ce complexe, RIP1 est poly-ubiquitinée. Lorsque RIP1 est désubiquitinée, il y a formation des complexes IIa ou IIb. La plupart du temps, le complexe IIa active la caspase 8 et résulte en l'apoptose de la cellule. Cependant, lorsque la caspase 8 est inhibée, c'est le complexe IIb qui est activé, ce qui provoque une nécroptose de la cellule. Pour initier la nécroptose via ce complexe IIb, RIP1 recrute RIP3 et induit des événements d'auto- et transphosphorylation, menant à l'oligomérisation de la kinase RIP3 phosphorylée. Ceci provoque l'assemblage du nécrosome. Il y a également phosphorylation d'une autre kinase appelée MLKL (Tait et al., 2013; Vanden Berghe et al., 2014; Moreno-Gonzalez et al., 2016). Les kinases activées RIPK3 et MLKL sont relocalisées à la membrane plasmique (Moreno-Gonzalez et al., 2016). MLKL s'oligomérisse et peut former des pores à la membrane plasmique menant soit directement à une rupture de la membrane plasmique due à un influx de Ca^{2+} soit à la formation de canaux ioniques permettant l'influx de Na^+ ou de Ca^{2+} responsables de la mort cellulaire (Van den Berghe et al. 2014). Ces différents événements sont schématisés ci-dessous (Figure 8).



Le rôle de la nécroptose dans le cancer est complexe. L'expression de régulateurs clés de la nécroptose est généralement régulée négativement dans les cellules cancéreuses, suggérant que les cellules cancéreuses peuvent échapper à la nécroptose pour survivre (Koo et al., 2015; Geserick et al., 2015; Höckendorf et al., 2016). Cependant, dans certains types de cancers, le niveau d'expression de ces facteurs clés est plus élevé (Wang et al., 2014; Park et al., 2018). La nécroptose peut induire une forte réponse immunitaire adaptative qui pourrait participer à la défense contre la progression tumorale (Moriwaki et al., 2014; Yatim et al., 2015; Galluzzi et al., 2017) ; cependant la réponse inflammatoire induite pourrait aussi promouvoir la tumorigénèse et la formation de métastases (Grivennikov et al., 2010; Hanahan et Weinberg 2011), et la nécroptose pourrait générer un environnement tumoral immunosuppresseur (Seifert et al., 2016).

Un grand nombre de composés thérapeutiques ciblent la nécroptose et possèdent des propriétés anti-tumorales, mais leur faisabilité clinique doit encore être validée (Xuan et Hu, 2009; Fu et al., 2013; Werthmüller et al., 2015; Schmidt et al., 2015; Chen et al., 2016; Gong et al., 2019).

5) Interactions entre les voies de mort cellulaire et techniques d'analyse

L'apoptose, l'autophagie et la nécrose sont souvent initiées par les mêmes stimuli, et sont régulées par des voies de signalisation relativement proches, ou qui se rejoignent, avec des facteurs initiateurs ou des molécules

effectrices qui agissent dans plusieurs de ces voies. C'est le contexte cellulaire (type de stimulus, environnement cellulaire, inhibition de certaines voies) qui détermine quel programme de mort va se mettre en place. De plus, ces trois voies coexistent souvent, et peuvent coopérer ou alterner par une balance complexe, mais manifestement bien régulée. Ainsi, elles permettent la destruction cellulaire de manière complémentaire (Nikoletopoulou et al., 2013; Lee et al., 2018). De nombreux facteurs, parmi lesquels les niveaux en ATP/énergie, l'ampleur du stress ou du dommage cellulaire et la présence d'inhibiteurs de voies de signalisation spécifiques détermine la voie que la cellule va emprunter (Galluzzi et al., 2012). C'est mieux comprendre et maîtriser ces interactions complexes qui permettra de concevoir des médicaments plus efficaces.

Comme décrit précédemment, la nécrose, l'autophagie et l'apoptose peuvent facilement être distinguées de par la morphologie des cellules mourantes. Une méthode très fiable pour les identifier est donc la microscopie électronique. Puisqu'elles sont caractérisées par des propriétés biochimiques relativement différentes, les cellules peuvent aussi être analysées par un grand nombre de techniques expérimentales, parmi lesquelles :

- Le double marquage Annexin V (AV)/Iodure de Propidium (PI). L'AV est une protéine qui se lie avec une forte affinité aux phosphatidylsérines, qui sont exposées à la surface des cellules lors de la phase précoce de l'apoptose. Le PI pénètre dans les cellules dont la membrane est endommagée (nécrotiques).
- Le marquage enzymatique TUNEL (fragmentation de l'ADN des cellules apoptotiques).
- Les tests de relargage de HMGB1 ou de lactate déshydrogénase (LDH), caractéristiques d'une nécrose.
- Les méthodes de coloration du compartiment autophagolysosomal par des marqueurs faiblement basiques pour reconnaître l'autophagie.

Il est également possible d'utiliser des inhibiteurs chimiques ou enzymatiques, afin, par exemple, de discriminer les voies de mort induites par un agent thérapeutique (inhibiteur de caspases zVAD-fmk, inhibiteur de RIPK1 necrostatine-1, inhibiteur de stress oxydatif IM-54, inhibiteur d'autophagie 3-MA).

III. Mort cellulaire et immunité anti-tumorale

Les thérapies cancéreuses peuvent directement agir sur les cellules tumorales en ciblant l'une ou l'autre des voies de mort cellulaire. Cependant, le succès à long-terme d'une thérapie anti-cancéreuse repose sur le fait que celle-ci éradique totalement le pool de cellules cancéreuses, incluant les cellules souches cancéreuses. Malheureusement, il reste généralement un petit réservoir de cellules tumorales, qui peuvent être à l'origine de rechutes. De plus, la plupart des chimiothérapies sont peu spécifiques, et affectent les cellules immunitaires des patients. Elles sont communément accompagnées d'une immunosuppression sévère. Enfin, les chimiothérapies provoquent généralement l'apoptose des cellules tumorales, qui est, comme nous venons de le voir, une mort cellulaire immunologiquement « silencieuse », voire même tolérogénique. Le rôle du système immunitaire dans le succès des thérapies anti-cancéreuses a trop longtemps été oublié.

Les connaissances fondamentales concernant l'immunité des tumeurs ont explosé, ce qui a permis à une nouvelle approche thérapeutique de voir le jour : l'immunothérapie. Plutôt que de s'attaquer directement aux

cellules tumorales, l'idée est de booster le système immunitaire pour l'aider à reconnaître et détruire ces cellules indésirables.

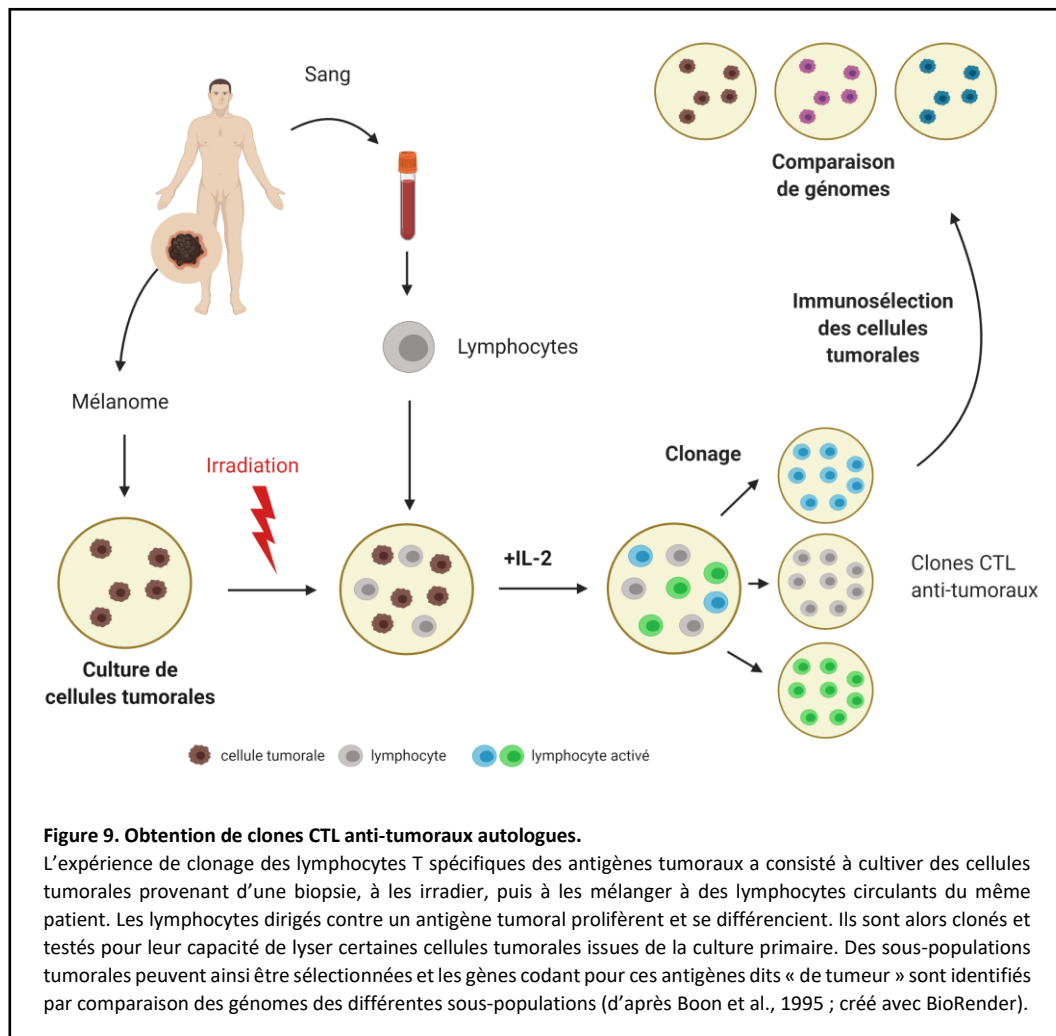
1) Immunosurveillance et immunoediting du cancer

L'une des théories les plus controversées en matière d'immunologie au cours des dernières décennies a été celle de l'immunosurveillance du cancer, théorie selon laquelle le système immunitaire serait capable de détecter et éliminer les cellules tumorales. La découverte de l'immunité anti-tumorale remonte à la fin du XIX^{ème} siècle, lorsque le chirurgien W. Coley observa la rémission spontanée chez des malades atteints de sarcome et présentant en parallèle un épisode infectieux (Coley, 1991). Ce n'est que plus tard, grâce au développement des nouvelles technologies en immunologie et la mise au point de modèles murins immunodéficients, que cette théorie a pu être confirmée expérimentalement.

Ainsi, plusieurs travaux ont démontré que les souris immunodéficientes (système adaptatif et/ou inné) présentaient une fréquence d'apparition de tumeurs spontanées ou chimio-induites plus importante que les souris immunocompétentes (Stutman, 1974; Stutman, 1979; Girardi et al., 2001; Smyth et al., 2001; Teng et al., 2008).

Chez l'humain, des arguments épidémiologiques ont pu être apportés. Ainsi, dans les tumeurs, on retrouve des infiltrats de cellules immunitaires très différents d'un patient à l'autre. L'analyse de ces différentes populations (macrophages, CD8, lymphocytes NK, B et T) a permis de mettre en évidence des contextes immuns soit bénéfiques soit délétères pour ces patients (Fridman et al., 2012). Il a également été constaté une corrélation entre l'augmentation de l'apparition de certains cancers et certaines situations cliniques associées à une immunodéficiência du patient. Par exemple, les personnes atteintes de trisomie 21, associée à un déficit fonctionnel de cellules T, sont 20 fois plus touchées par la leucémie que les personnes non atteintes. De plus, l'incidence de certains cancers est plus élevée chez des patients traités par des immunosuppresseurs pour une transplantation d'organes (Collins et al., 2019).

Enfin, des antigènes tumoraux ont pu être mis en évidence, grâce à une stratégie mise au point par T. Boon (Boon et al., 1995) (Figure 9). Parmi les nombreux antigènes tumoraux, certains sont issus de gènes exprimés uniquement dans les cellules malignes (ex : gènes *MAGE* dans le mélanome), d'autres sont issus d'un défaut de glycosylation/modification post-traductionnelle (ex : protéine *MUC1* dans le cancer du sein) ou encore de mutations/translocations dans des gènes suppresseurs de tumeurs (ex : *p53*) ou des oncogènes (ex : *RAS*). Ces gènes codent pour des protéines qui sont dégradées en peptides présentés par les molécules du CMH I, à l'origine de la mise en place de la réponse adaptative. Celle-ci est assortie d'une réponse mémoire qui permet d'améliorer la réactivité du système immunitaire en cas de nouvelle rencontre avec l'antigène tumoral (Catros-Quemener et al., 2003).



Cependant, il faut savoir que le système immunitaire peut aussi favoriser le développement tumoral. Les cellules très immunogènes sont reconnues et éliminées chez les hôtes immunocompétents, tandis que les cellules peu immunogènes échappent à l'immunosurveillance (Khong et Restifo, 2002). Ces cellules peuvent alors se multiplier et être à l'origine de variants tumoraux insensibles et à l'apparition de tumeurs agressives (Smyth et al., 2006). Certaines cellules tumorales peuvent aussi échapper de manière active au SI, par exemple en induisant la sécrétion de cytokines (TGF- β ou IL-10) ou de ligands (PDL-1) menant à la mise en place d'un microenvironnement immunosuppresseur. Cette notion de dualité entre rôle protecteur et rôle délétère du système immunitaire dans le cancer est appelée « immunoediting ». Elle est définie par les trois Es : élimination, équilibre et échappement (Dunn et al., 2006; Schreiber et al., 2011) (Figure 10).

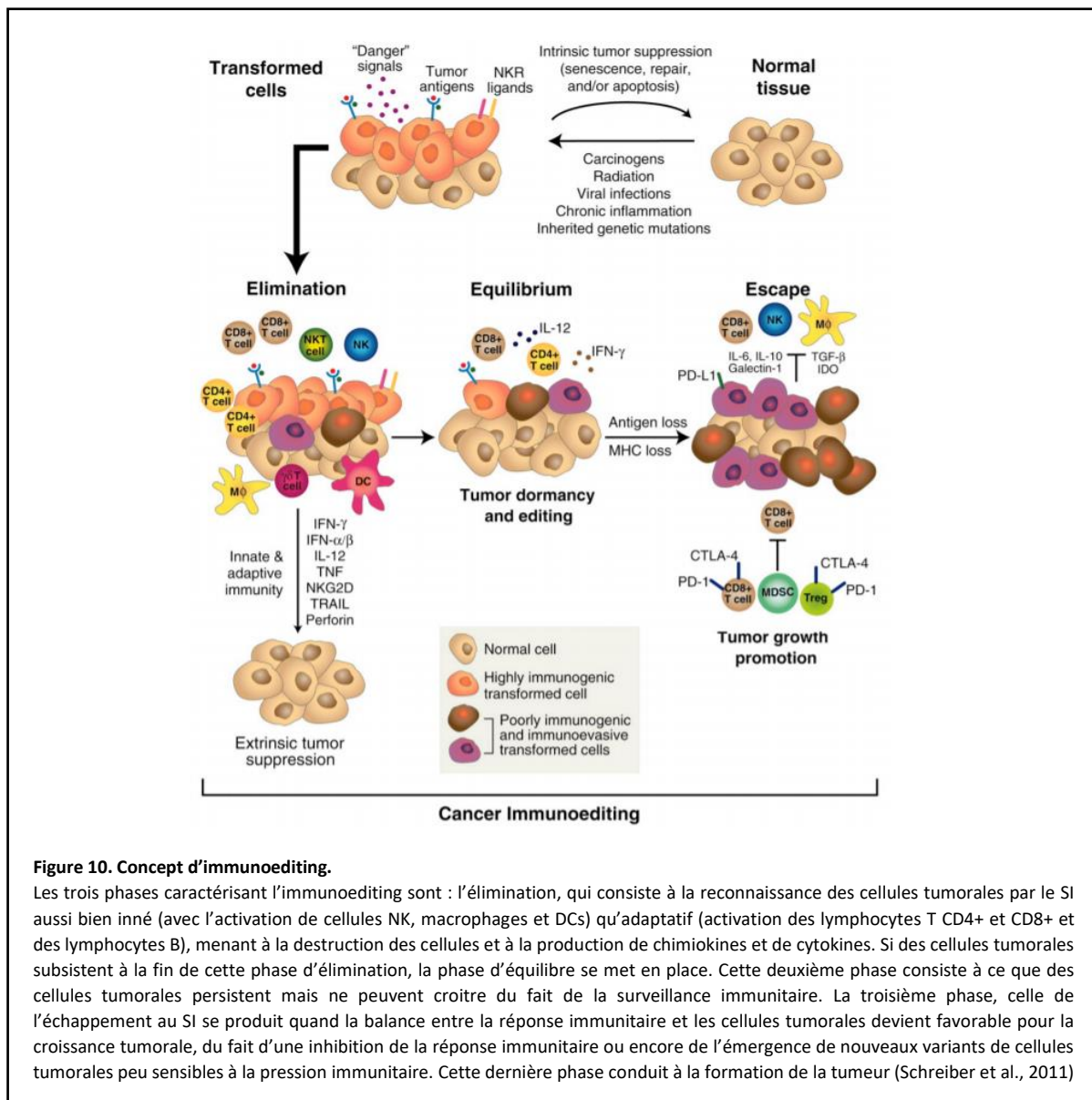


Figure 10. Concept d'immunoediting.

Les trois phases caractérisant l'immunoediting sont : l'élimination, qui consiste à la reconnaissance des cellules tumorales par le SI aussi bien inné (avec l'activation de cellules NK, macrophages et DCs) qu'adaptatif (activation des lymphocytes T CD4+ et CD8+ et des lymphocytes B), menant à la destruction des cellules et à la production de chimiokines et de cytokines. Si des cellules tumorales subsistent à la fin de cette phase d'élimination, la phase d'équilibre se met en place. Cette deuxième phase consiste à ce que des cellules tumorales persistent mais ne peuvent croître du fait de la surveillance immunitaire. La troisième phase, celle de l'échappement au SI se produit quand la balance entre la réponse immunitaire et les cellules tumorales devient favorable pour la croissance tumorale, du fait d'une inhibition de la réponse immunitaire ou encore de l'émergence de nouveaux variants de cellules tumorales peu sensibles à la pression immunitaire. Cette dernière phase conduit à la formation de la tumeur (Schreiber et al., 2011)

2) Différentes approches d'immunothérapie

L'objectif de l'immunothérapie est de booster la réponse immunitaire, afin qu'elle puisse surpasser ces mécanismes d'immunoediting. Plusieurs approches sont actuellement utilisées. (1) Une stratégie consiste à administrer des cytokines afin de stimuler la réponse immunitaire globale (ex : IL-2 dans le cancer du rein) (Rosenberg, 2014). (2) Une autre stratégie est d'utiliser des anticorps monoclonaux pour reconnaître un récepteur spécifiquement exprimé à la surface des cellules cancéreuses afin de les détruire et/ou bloquer les signaux tumoraux associés (ex : rituximab qui exerce une activité cytotoxique directe et indirecte en se fixant sur le récepteur CD20 exprimé à la surface des cellules de lymphome B) (Bosly, 2006). Un cas particulier est celui des anticorps bispécifiques qui reconnaissent deux molécules distinctes et permettent de rapprocher deux types cellulaires différents (généralement la cellule tumorale et une cellule cytotoxique). D'autres anticorps monoclonaux sont appelés immunomodulateurs, puisqu'ils sont capables de lever les mécanismes d'inhibition

du système immunitaire induits par la cellule tumorale (ex : nivolumab qui bloque l'interaction PDL-1/PD1 qui rend les cellules tumorales invisibles par les cellules T) (Smith et Desai, 2018). (3) Il est aussi possible d'éduquer les cellules T du patient afin qu'elles reconnaissent les cellules tumorales, en faisant intervenir des outils de thérapie génique et cellulaire (stratégie des cellules CAR-T, détaillée dans le chapitre dédié aux LAMs). (4) Enfin, une stratégie émergente consiste en la mise au point de vaccins thérapeutiques. Ces vaccins ont pour but de diriger le système immunitaire spécifiquement contre les cellules cancéreuses, en lui présentant un antigène tumoral capable de déclencher une réaction immunitaire efficace. Ils ont l'avantage non-négligeable de permettre le déclenchement d'une réponse immunitaire mémoire, qui devrait théoriquement protéger le patient contre une éventuelle rechute. De nombreuses études se penchent actuellement sur le développement de tels vaccins, mais le seul commercialisé à l'heure actuelle est le Sipuleucel-T dans le cancer de la prostate. Il consiste en la réinjection de CD8 prélevées chez le patient et mise en présence *in vivo* d'un antigène tumoral retrouvé dans près de 95% des cancers de la prostate, la phosphatase acide prostatique (Handy et Antonarakis, 2018).

3) Mort cellulaire immunogène

Récemment, une nouvelle notion a émergé en immunologie : celle de MCI (mort cellulaire immunogène). La MCI désigne tout type de mort cellulaire (programmée ou accidentelle) capable d'engendrer une réponse immunitaire.

Le modèle communément accepté est que l'apoptose se produit en l'absence de DAMPs, et favorise une tolérance immunogène. A l'inverse, la nécrose est accompagnée d'une exposition des DAMPs, ce qui résulte en l'activation des effecteurs immunitaires et inflammatoires puisque les DAMPs possèdent le même type de récepteurs que les PAMPs (Kono et Rock, 2008). Cependant, plusieurs travaux récents ont montré que ce paradigme pouvait être remis en question. En effet, dans certains cas les antigènes provenant de cellules apoptotiques peuvent déclencher des réponses immunitaires efficaces (Green et al., 2009; Zitvogel et al., 2004). De plus, certaines chimiothérapies comme les anthracyclines, le mitoxantrone ou l'oxiplatine ainsi que les radiothérapies peuvent induire une apoptose immunogène (Apetoh et al., 2007; Obeid et al., 2007). De manière intéressante, il a été montré en 2005 qu'il était possible de concevoir des vaccins basés sur ce phénomène : les cellules tumorales sont traitées *in vitro* par ces agents chimiothérapeutiques, puis injectées dans des souris, qui développent une réponse immunitaire spécifique via une prise en charge par les CD8 et une présentation antigénique. Ces souris sont alors protégées contre un nouveau challenge avec des cellules tumorales (Casares et al., 2005).

Compte tenu du rôle crucial de l'activation du système immunitaire pour le succès à long-terme des thérapies anti-cancéreuses, un nombre croissant de chercheurs concentrent leurs efforts sur la découverte de nouveaux inducteurs de MCI, ainsi que la mise au point de vaccins anti-cancéreux de ce type. Il est à noter que, bien qu'elle ait été initialement décrite comme étant associée à une mort apoptotique caspase-dépendante (Casares et al., 2005; Kroemer et al., 2013; Vacchelli et al., 2014; Serrano-del Valle et al., 2019), plusieurs études récentes ont démontré que la MCI pouvait également être associée à une mort par nécrose ou par nécroptose (Yatim et al.,

2015; Koks et al., 2015; Aaes et al., 2016; Zhou et al., 2019). En fait, l'induction d'une MCI peut subvenir dans des contextes thérapeutiques très différents (voies de signalisations ciblées, agents anti-cancéreux, type de mort induite), et il semble que la meilleure façon de concevoir l'immunogénicité de la mort cellulaire soit non pas la forme de mort cellulaire concernée, mais l'induction de signaux de danger (Medzhitov, 2002).

La MCI implique des changements se produisant selon un modèle spatio-temporel précis. Dans un premier temps, les cellules succombant à une MCI vont exposer la CRT (calréticuline) à leur surface. La CRT agit comme un signal « eat me », c'est-à-dire qu'il permet aux cellules qui l'exposent à leur surface d'être rapidement phagocytées par les CD (Obeid et al. 2007). L'inhibition de l'exposition de la CRT abolit ce mécanisme, ainsi que l'immunogénicité des cellules cancéreuses. A l'inverse, l'ajout d'une CRT recombinante à des cellules déficientes restaure leur immunogénicité (Obeid et al., 2007). Au cours d'une MCI, les cellules peuvent aussi exposer ou relarguer d'autres protéines chaperonnes dont les membres de la famille des HSP (Heat Shock Proteins), comme HSP70 et HSP90 (Panaretakis et al., 2009; Zhou et al., 2019). Ces différents facteurs agissent comme des signaux de danger et facilitent la reconnaissance puis la phagocytose des cellules mourantes par les CD.

Dans un second temps, les cellules vont sécréter plusieurs facteurs, tels que l'ATP capable d'activer l'inflammasome NLRP3 puis la polarisation des cellules T CD8+ productrices d'IFN- γ . Lors de la phase terminale, les cellules relarguent un facteur pro-immunogène HGMB1 reconnu par les CD via les récepteurs RAGE, TLR2 ou TLR4, ce qui favorise la présentation antigénique aux cellules T CD4+ et CD8+. Ces cellules T activées enclenchent respectivement des réponses TH1 (T helper 1) et CTL. CLEC9A a récemment été démontré comme pouvant coupler la reconnaissance des cellules nécrotiques à une présentation croisée des antigènes aux CTLs (Green et al., 2009; Garg et al., 2015; Zhou et al., 2019). Ces différents événements sont représentés ci-dessous (Green et al., 2009) (Figure 11).

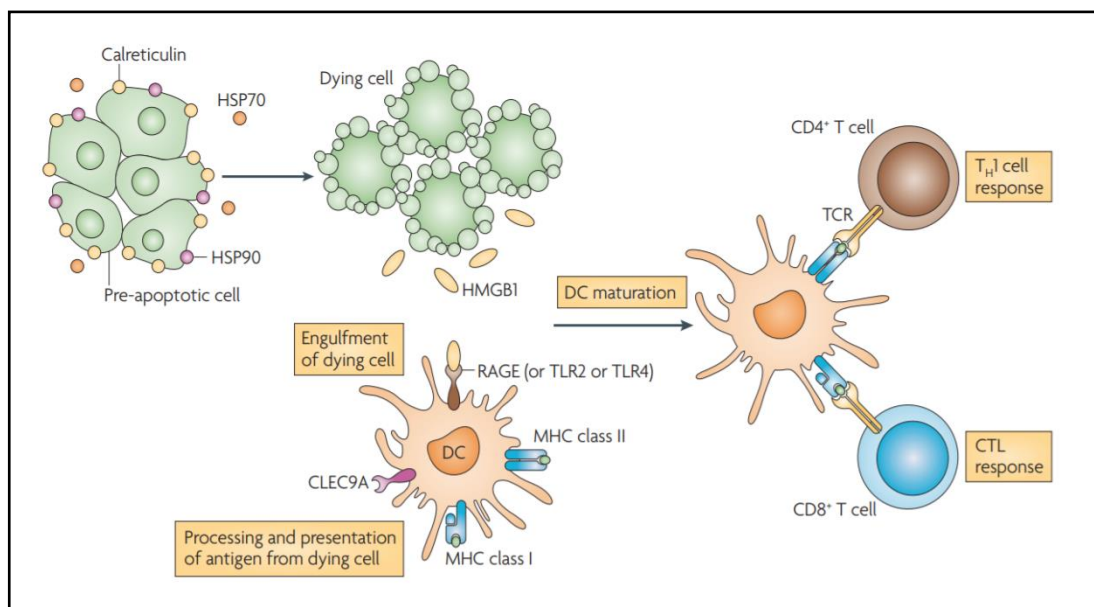


Figure 11. Caractéristiques de la mort cellulaire immunogène.

Lorsque les cellules succombent à une MCI, elles exposent la CRT à leur surface. De plus, elles peuvent exposer ou relarguer des protéines chaperonnes comme les HSP (HSP70 et HSP90). Ces facteurs facilitent la phagocytose des cellules mourantes. Les cellules relarguent aussi la molécule HMGB1, reconnue par les CD via les récepteurs RAGE, TLR2 et TLR4. Les CD peuvent activer les cellules T CD4+ et CD8+ et provoquer des réponses TH1 et CTL respectivement. CLEC9 permet de coupler la reconnaissance des cellules nécrotiques à une présentation croisée des antigènes aux CTL, mais son ligand est encore inconnu. (Green et al., 2009).

CHAPITRE 2 : AAC-11, nouvelle cible thérapeutique dans le cancer

I. Approches pour la découverte de nouvelles cibles thérapeutiques

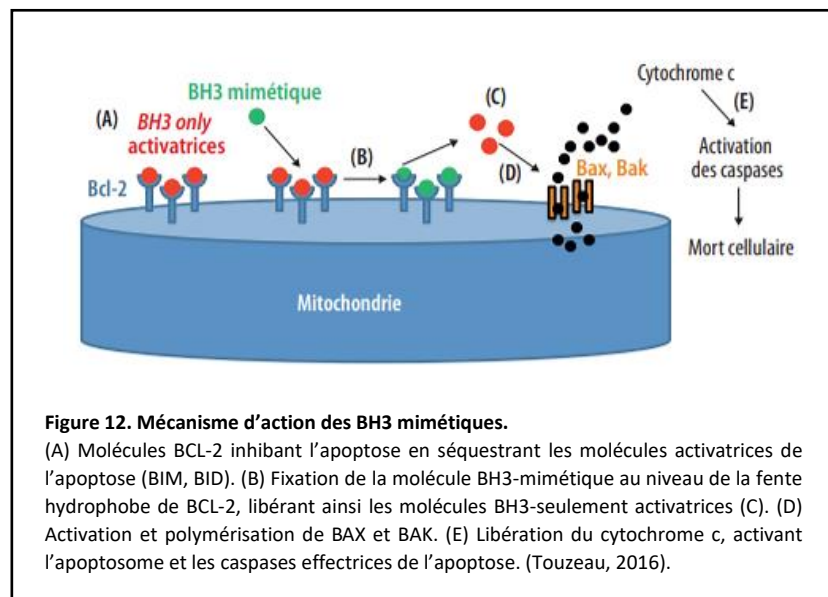
1) Rôle des interactions protéine-protéine dans les processus biologiques

Au cours des dernières décennies, l'accès au séquençage à haut débit a permis l'essor de nouvelles disciplines, dont les études de génomique fonctionnelle. Ces études s'intéressent à un grand nombre de processus tels que la transcription, la traduction et la régulation épigénétique, dans l'espoir de répondre à des questions biologiques pertinentes, en particulier concernant la fonction et la régulation des protéines dans l'organisme ; l'objectif étant de comprendre les relations complexes qui existent entre génotype et phénotype.

Les PPIs (interactions protéine-protéine) jouent un rôle fondamental dans toutes les fonctions cellulaires, notamment la signalisation intracellulaire, la croissance et la survie, le transport et l'organisation structurale (Braun et Gingras, 2012; Winter et al., 2012; Legrain et Rain, 2014). Le nombre de PPIs différentes qui se produisent dans les cellules humaines est estimé à 130 000 sur la base de données biochimiques et d'études d'interactomes à haut débit (Kar et al., 2009). Chronologiquement, des signaux sont détectés par des récepteurs présents à la surface des cellules, puis transduits par des réseaux complexes de signalisation intracellulaire. Étant donné leur importance pour l'activité des cellules, les PPIs semblent représenter une cible de choix pour le développement de nouvelles thérapies. La modulation des PPIs présente plusieurs avantages en comparaison avec des cibles plus classiques (le blocage de sites actifs enzymatiques par exemple). En effet, leur régulation est plus subtile, plus fine, ce qui permet de limiter les risques d'effets indésirables (Zanzoni et al., 2009).

Dans le cas particulier de l'apoptose, c'est l'occurrence ou non de certaines interactions cruciales qui va entraîner la cellule vers une destinée de mort ou de survie. Contrairement à la plupart des voies de signalisation, l'apoptose est peu dépendante de réactions de phosphorylation par les kinases et de déphosphorylation par les phosphatases. À l'inverse, il s'agit d'un système finement régulé, où les signaux sont transmis par une multitude d'interactions dynamiques entre protéines, conduisant à des homo- ou hétéro-oligomérisation de protéines. La possibilité de cibler les PPIs impliquées dans l'apoptose a déjà été démontrée à plusieurs reprises. Par exemple, des petites molécules pharmacologiques appelées nutlines bloquent l'interaction entre p53 et son inhibiteur MDM2 (surexprimé dans de nombreux cancers), permettant à p53 de jouer son rôle pro-apoptotique (Vassilev et al., 2004; Renouf et al., 2009). Il est également possible de cibler les interactions entre protéines de la famille BCL-2, qui, comme décrit précédemment, jouent un rôle critique dans l'homéostasie cellulaire et la régulation de la voie intrinsèque de l'apoptose. Les protéines anti-apoptotiques de la famille BCL-2 (BCL-2, BCL-XL, MCL-1) sont surexprimées dans la majorité des cancers (Gilmore et King 2019). Elles inhibent l'apoptose en séquestrant, au sein d'une poche hydrophobe créée par leurs domaines BH, les protéines pro-apoptotiques BAX et BAK. Les protéines pro-apoptotiques à BH3-seulement (BIM, PUMA, NOXA, BID) peuvent quant à elles se lier spécifiquement aux protéines anti-apoptotiques au niveau de cette poche hydrophobe, libérant les protéines activatrices BAX et BAK par liaison compétitive (Schenk et al., 2017). Ces observations ont mené au

développement de nombreuses petites molécules et de peptidomimétiques, dits BH3-mimétiques (Lessene, Czabotar, et Colman 2008; Besbes et al. 2015). En imitant le domaine BH3 des protéines pro-apoptotiques, ils peuvent séquestrer et antagoniser les protéines anti-apoptotiques, permettant l'apoptose des cellules malignes (Figure 12) (Touzeau 2016). Parmi ces nouveaux agents thérapeutiques, plusieurs ont déjà été testés au cours d'essai cliniques, et certains ont montré des résultats très impressionnants, comme le vénétoclax (qui cible BCL-2) dans la leucémie lymphoïde chronique (LLC) et la leucémie aigüe myéloïde (LAM) (Roberts et al. 2016; Konopleva et al. 2016).



2) Notion d'addiction non-oncogénique

La plupart des traits phénotypiques associés au cancer sont le résultat d'altérations génétiques qui impliquent des mutations gain-de-fonction, l'amplification ou la surexpression d'oncogènes, des mutations perte-de-fonction et/ou le silencing épigénétique de suppresseurs de tumeurs clés permettant l'acquisition d'avantages sélectifs. Chaque tumeur possède une combinaison complexe de ces mutations, et le répertoire de mutations somatiques dans différents types de cancers est extrêmement hétérogène. Cette grande hétérogénéité pose un problème considérable pour le développement de traitements. Cependant, comme la biologie des cellules cancéreuses repose essentiellement sur les voies de signalisation de croissance et de survie, on peut supposer que l'identification et l'inhibition d'un nœud fonctionnel critique pour le bon fonctionnement de ces voies oncogéniques sont la clé d'une thérapie réussie. Les agents thérapeutiques ciblant ces nœuds doivent avoir une fenêtre d'action suffisamment large pour détruire les cellules tumorales, tout en épargnant les cellules normales.

Il est bien connu que supprimer l'activité d'un oncogène ou restaurer la fonction d'un suppresseur de tumeur est délétère pour les cellules tumorales. Cet état de dépendance des cellules cancéreuses envers les oncogènes et la perte des suppresseurs de tumeurs sont connus sous les noms « d'addiction oncogénique » et « d'hypersensibilité aux gènes suppresseurs de tumeurs » respectivement (Weinstein, 2002; Weinstein et Joe,

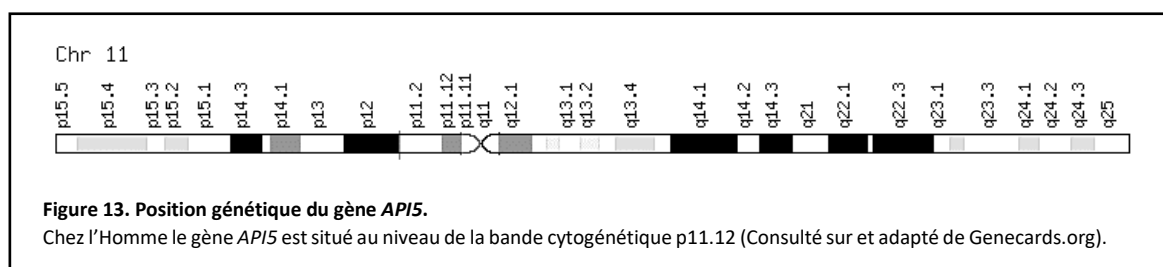
2006). Cependant, les cellules tumorales peuvent aussi présenter une dépendance accrue à des gènes responsables de fonctions cellulaires normales, et qui ne sont donc pas définis comme des oncogènes, car non mutés dans le cancer. Cette observation a abouti à la notion d'addiction non-oncogénique (Solimini et al., 2007). Ces non-oncogènes addictifs (NOA) sont essentiels pour le phénotype des cellules cancéreuses, alors qu'ils ne sont pas requis au même degré pour la viabilité des cellules normales. Un exemple de NOA sont les gènes impliqués dans le stress cellulaire. En effet, les cellules tumorales sont soumises à de nombreux stress, et sont donc fortement dépendantes des voies de signalisation qui leur permettent de réagir face à ces différents stress. En cas de stress additionnel ou d'inhibition de ces voies de secours, les cellules tumorales meurent tandis que les cellules normales peuvent s'accommoder de ces perturbations (Luo et al., 2009; Nagel et al., 2016). De part cette spécificité, les NOA constituent des cibles particulièrement intéressantes pour le traitement des cancers.

II. AAC-11

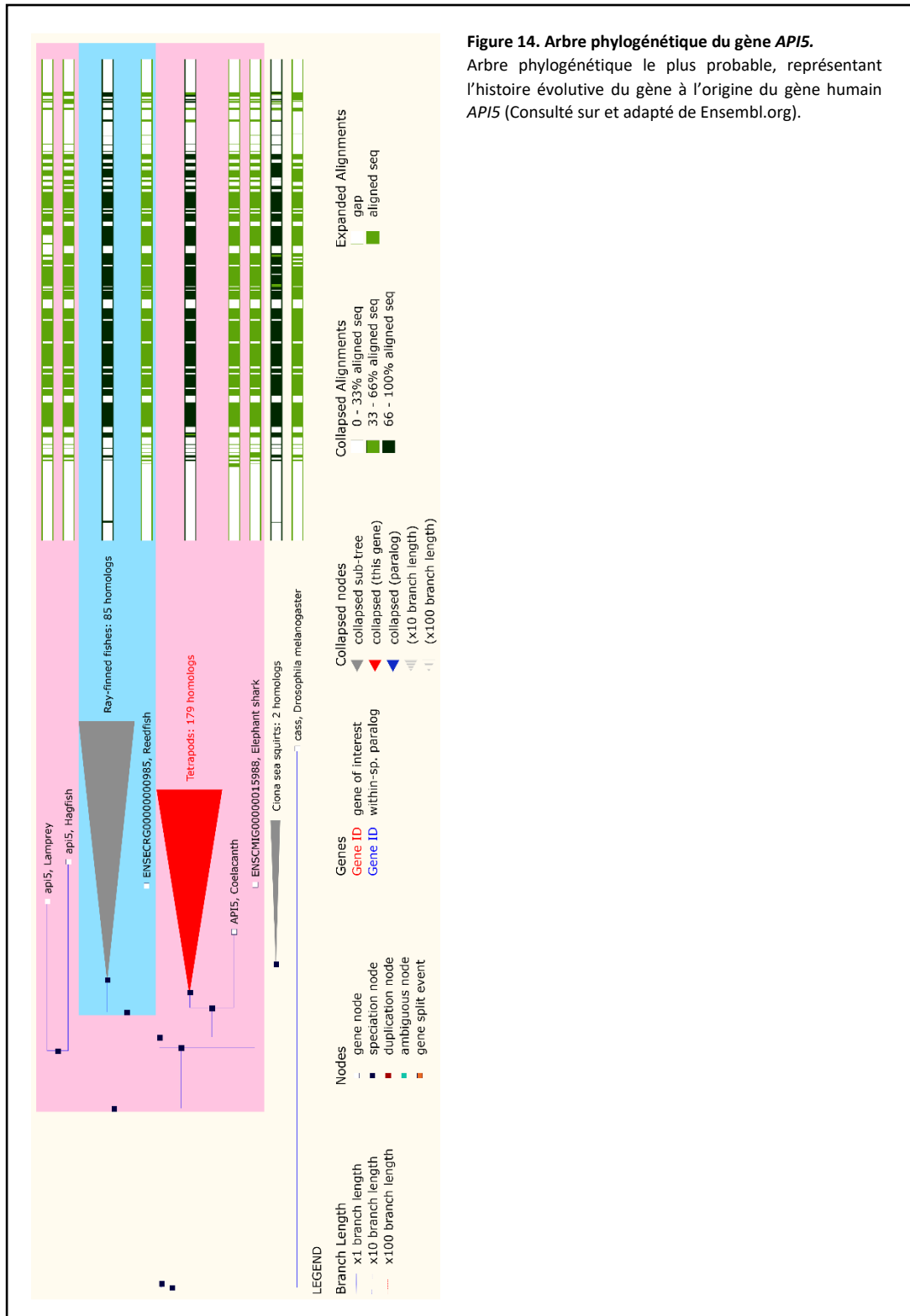
L'ambition de notre équipe est d'étudier de manière approfondie les réseaux de PPIs dans le contexte de l'apoptose, en mettant l'accent sur la recherche de cibles originales pour le traitement des cancers, notamment des NOA impliqués dans la réponse au stress. Pour tous ces critères et compte tenu de ses nombreux rôles dans la biologie des cellules tumorales, une cible qui nous est apparue comme particulièrement intéressante est la protéine AAC-11.

1) Le gène *API5*

Le gène *API5* est localisé chez l'humain sur le chromosome 11 (p11.2) et constitué de 15 exons (Figure 13).



Il est très conservé des protistes jusqu'aux plantes et aux animaux (Li et al., 2011; Han et al., 2012). En particulier, les séquences du gène sont très proches chez le chimpanzé, le singe rhésus, le chien, la vache, la souris, le rat, le poulet, le zebrafish, le moustique, la drosophile et la grenouille (Figure 14). 292 espèces possèdent des gènes orthologues au gène humain *API5*.



Ce gène possède 11 variants d'épissage et deux pseudogènes, *API5P1* et *API5P2* localisés respectivement sur les chromosomes X (Xq24) et 2 (2q31.2) (Gianfrancesco et al., 1999). L'ADNc d'*API5* fut découvert au cours d'un crible dont le but était d'identifier des facteurs de survie à partir d'une banque d'ADNc de souris (Tewari et al., 1997). Peu de temps après, un ADNc quasiment identique fut identifié dans un crible double-hybride visant à

déterminer les interacteurs de la protéine FGF2 (Fibroblast Growth Factor 2) (Van den Berghe et al., 2000). Dans la littérature, on retrouve la protéine sous différents noms : API-5 (Apoptosis-Inhibitor 5), AAC-11 (Anti-Apoptosis Clone-11), FIF (FGF2-interacting factor), MIG8 (Migration-Inducing Protein 8). La séquence de la protéine humaine présente 98% d'homologie avec la séquence murine.

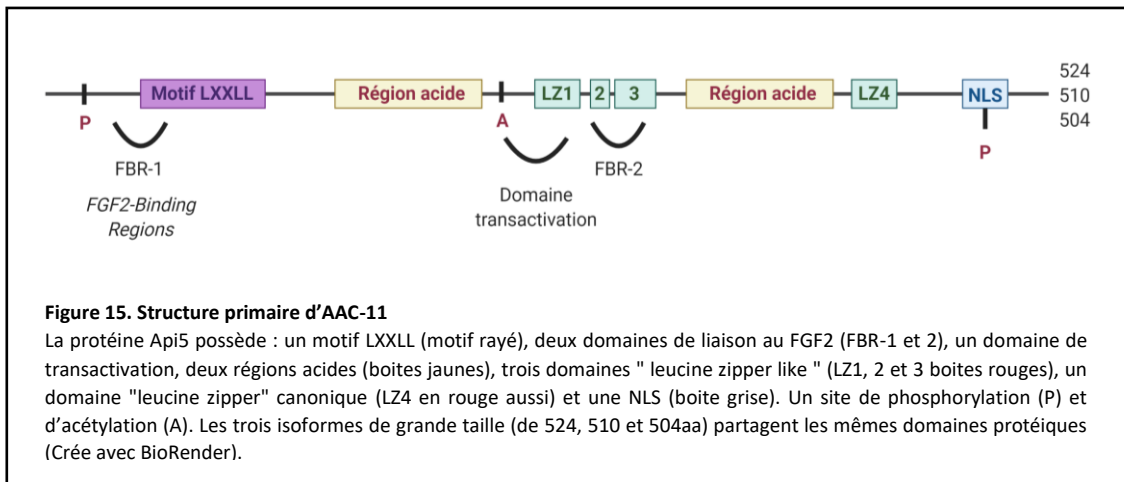
Le gène *API5* est exprimé de façon ubiquitaire, avec une légère surexpression dans le pancréas, le cœur et le placenta. Chez la souris, des knock-out de ce gène sont létaux au cours du développement fœtal, démontrant son rôle crucial pour ce processus (Tewari et al., 1997; Van den Berghe et al., 2000).

2) La protéine AAC-11

Dans la cellule humaine, il existe plusieurs isoformes de la protéine AAC-11. En recoupant les données issues de la littérature et les données répertoriées par le NCBI, au moins 5 isoformes ont été rapportés (de 331, 445, 504, 510 et 524 acides aminés respectivement). Aucune différence fonctionnelle n'a été démontrée à ce jour. Dans le cas des isoformes longs (504, 510 et 524 acides aminés chez l'humain), la séquence est constituée des mêmes domaines conservés, à savoir de l'extrémité N-terminale à l'extrémité C-terminale (Figure 15) :

- Un motif LXXLL (L102-106) où L est une leucine et X n'importe quel acide aminé. On retrouve ce motif chez de nombreux facteurs de transcription (Heery et al., 1997; Plevin et al., 2005). Il se trouve au sein de la région FBR1, une des deux régions nécessaires à la liaison d'AAC-11 avec FGF2, mais n'est pas impliqué dans cette interaction (Van den Berghe et al., 2000).
- Deux régions acides (résidus 161 à 190 et 323 à 335), souvent associées avec la fonction transactivatrice des facteurs de transcription.
- Un domaine de transactivation entre les deux régions acides (résidus 231 à 273), mis en évidence dans les isoformes de petite taille (sans la région C-Ter). Il semblerait que ce domaine soit masqué et que des modifications post-traductionnelles ou un changement de conformation puissent activer et exposer ce domaine (Van den Berghe et al., 2000).
- Trois domaines de type glissière à leucine non canoniques, c'est-à-dire des répétitions d'heptamères hydrophobes (259-287, 263-284, 286-313), dont l'une contient le seul domaine d'interaction avec FGF2 (FBR2).
- Un domaine de type glissière à leucine canonique (370-391). Ces domaines structuraux, dits « Leucin-Zipper » sont constitués de deux motifs : une région basique qui reconnaît une séquence spécifique d'ADN, et une série de leucines (tous les 7 résidus) formant une hélice α amphipathique et exposant une face hydrophobe. Ces motifs tridimensionnels fonctionnent comme des domaines de dimérisation : l'interaction hydrophobe génère des ponts entre les leucines des hélices α des deux protéines. Ces domaines sont fréquemment retrouvés au sein des domaines de liaison à l'ADN de différents facteurs de transcription. Ils sont également des domaines d'interaction protéine-protéine. En particulier, ce domaine pourrait être un motif de dimérisation pour AAC-11 (Rigou et al., 2009).

- Une séquence NLS (Nuclear Localisation Sequence) localisée en C-ter (résidus 454 à 474). Certains isoformes d'AAC-11 n'ont pas cette séquence (formes de 331 et 445 résidus) et ont par conséquent une localisation exclusivement cytoplasmique.



En termes de modifications post-traductionnelles, il a été montré que la protéine AAC-11 pouvait être phosphorylée au niveau des résidus tyrosine 28 et sérine 464 (Gauci et al., 2009 ; Olsen et al., 2006). Parmi les kinases qui régulent l'activité d'AAC-11, on peut citer les kinase CK1 (Caseine Kinase-1), Cdk1, Cdk2 et Cdk5 (Cdk pour Cyclin-Dependent Kinase), connues pour être impliquées dans la régulation du cycle cellulaire, ainsi que les kinases de la famille Pim (Peng et al., 2007), connues pour être impliquées dans la prolifération, la survie et la différenciation cellulaire. Il a également été montré que la protéine AAC-11 pouvait être acétylée au niveau du résidu lysine 251 (Choudhary et al., 2009). Il semble que l'activité anti-apoptotique d'AAC-11 soit régulée négativement par cette acétylation (Han et al., 2012).

3) AAC-11 et apoptose

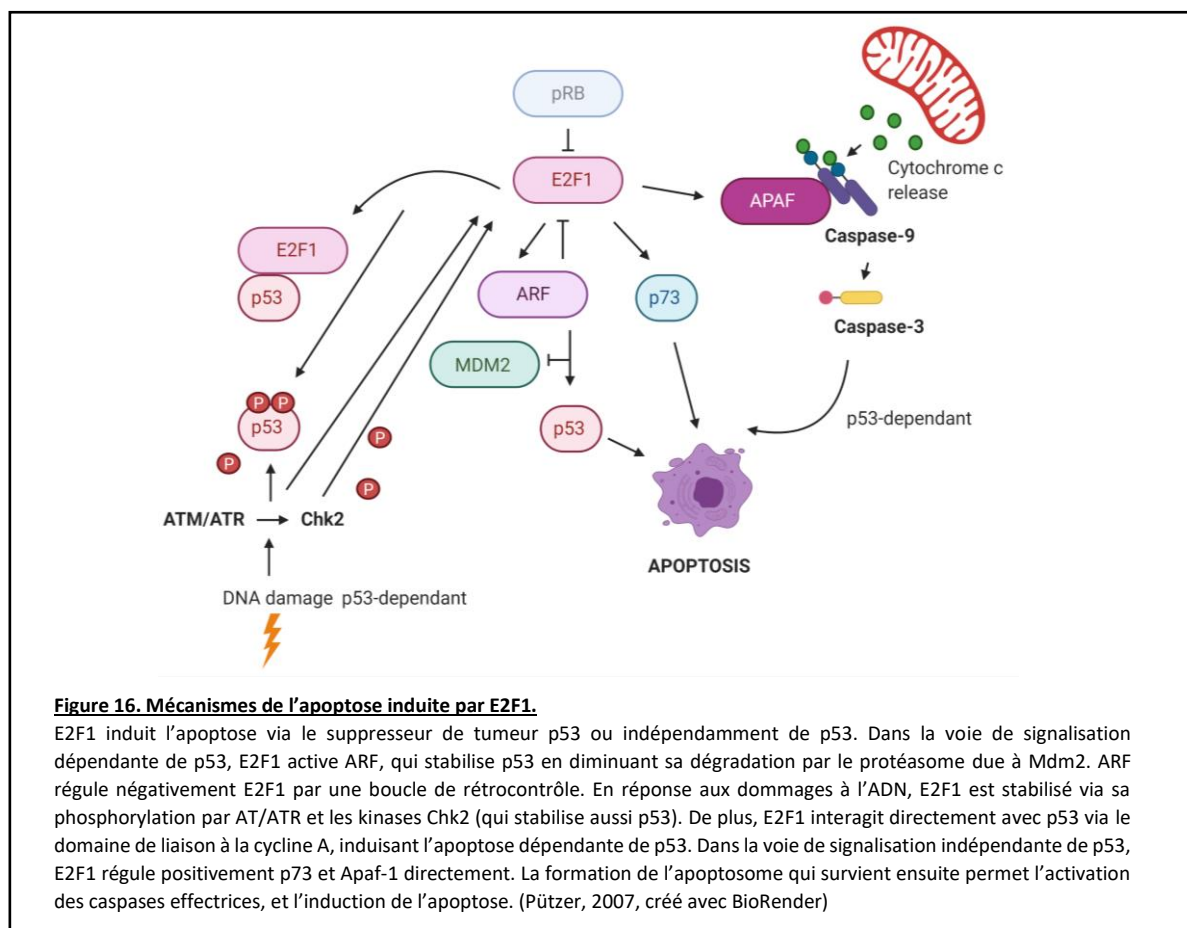
L'ADNc codant pour la forme courte d'AAC-11 (25kDa) a pour la première fois été identifié au cours d'une étude visant à mettre en évidence des gènes de survie (Tewari et al., 1997). Dans cette étude, un crible est réalisé à partir d'une banque d'ADNc de fibroblastes murins. Les auteurs montrent que le gène codant pour AAC-11 est très conservé entre les espèces, et exprimé de manière ubiquitaire, y compris dans de nombreuses lignées cellulaires cancéreuses. De manière importante, ils montrent que la protéine AAC-11 joue un rôle de facteur de survie pour des cellules en culture en l'absence de sérum (jusqu'à 12 semaines). Cet effet est aboli lorsque les leucines du domaine LZ sont mutées en arginines, démontrant le rôle crucial de ce domaine pour l'activité de la protéine AAC-11.

En accord avec ces résultats, une étude réalisée dans une lignée de cancer du col de l'utérus a montré que la surexpression d'AAC-11 conférait aux cellules un avantage de survie dans un milieu sans sérum (8 semaines contre 4 semaines pour les cellules contrôle) (Kim et al., 2000).

Il est à noter que chez la plante, la fonction d'AAC-11 est opposée : dans une étude réalisée chez *Oriya sativa*, AAC-11 se comporte comme un facteur pro-apoptotique (Li et al., 2011). Son interaction avec deux hélicases, AP-1 et AP-2 est nécessaire à la dégénérescence du tapetum (tissu permettant la maturation des grains de pollen). Pour expliquer cet effet contradictoire, les auteurs suggèrent que, bien que l'implication d'AAC-11 dans l'apoptose soit très conservée au cours de l'évolution, son activité peut être soit inhibitrice (chez les animaux) soit activatrice (chez les plantes).

De manière intéressante, un crible double-hybride a permis de mettre en évidence l'interaction d'AAC-11 avec la protéine FGF2 dans le noyau, via les sites FBR1 et FBR2 (Van den Berghe et al., 2000). FGF2 est un facteur de croissance, connu pour stimuler la prolifération, l'angiogenèse et la différenciation cellulaire et pour être impliqué dans la tumorigénèse. Parmi les différentes isoforme, celle de 34kDa est connue pour être un facteur de survie cellulaire (Arnaud et al., 1999).

Quelques années plus tard, une étude a mis en évidence le rôle critique d'AAC-11 dans l'apoptose induite par E2F1 lors d'un crible réalisé chez la drosophile et visant à identifier des partenaires d'E2F1 (Morris et al., 2006). L'apoptose induite par E2F1 passe par de multiples voies de signalisation, dont certaines conduisent à la stabilisation et l'activation de la protéine p53 (Ginsberg, 2002; Pützer, 2007) (Figure 16). D'après les résultats obtenus par Morris et al. (2006), AAC-11 agit en aval d'E2F1 et inhibe son activité pro-apoptotique, non seulement *in vitro*, mais aussi *in vivo*. Plus précisément, AAC-11 agit en aval de l'action transcriptionnelle d'E2F1, en empêchant, entre autres, le clivage de la caspase 3.



Au cours d'une autre étude réalisée au sein de notre équipe de recherche visant à identifier des partenaires protéiques d'AAC-11 par la méthode double-hybride, il a été montré qu'AAC-11 interagissait avec la protéine Acinus via son domaine LZ (Rigou et al., 2009). Acinus est connue pour être impliquée dans la condensation de l'ADN après clivage par la caspase-3 (Sahara et al., 1999; Hu et al., 2005) ainsi que la fragmentation de l'ADN (Joselin et al., 2006) qui ont lieu lors de l'apoptose. D'après les résultats obtenus, l'interaction entre AAC-11 et Acinus empêche vraisemblablement le clivage de cette dernière par la caspase-3 et inhibe ses fonctions pro-apoptotiques.

De manière intéressante, c'est au cours de cette même étude qu'il a été montré pour la première fois qu'un peptide pénétrant, mimant le domaine LZ d'AAC-11 et agissant comme inhibiteur compétitif de son interaction avec Acinus pouvait bloquer la fonction anti-apoptotique d'AAC-11 (Rigou et al., 2009). C'est à partir de ces résultats préliminaires que mon travail de thèse a été initié.

4) AAC-11 et cancer

Comme décrit précédemment, l'expression d'AAC-11 est ubiquitaire (Tewari et al. 1997; Van den Berghe et al., 2000; Kim et al., 2000; Morris et al., 2006; Krejci, 2012). Il est intéressant de noter que le gène qui code pour AAC-11 est situé sur le chromosome 11 chez l'humain, dans une région amplifiée dans les gliomes et les cellules de cancer du sein (Janka et al., 1996; Forozan et al., 1999). De plus, AAC-11 est fortement exprimée (aux niveaux ARNm et protéique) dans de nombreuses lignées cellulaires tumorales (Tewari et al., 1997; Kim et al., 2000; Van den Berghe et al., 2000; Morris et al., 2006; Rigou et al., 2009; Krejci 2012), et dans certaines tumeurs humaines telles que les carcinomes squameux et les NSCLC (Cancers Bronchiques Non à Petites Cellules) (Sasaki et al., 2001). Il a été montré que cette expression pouvait être corrélée à un mauvais pronostic dans le cas des patients atteints de NSCLC (Sasaki et al., 2001). Il semble également que le taux d'expression d'AAC-11 soit plus élevé dans les tissus de certains nœuds lymphatiques métastatiques par rapport aux tissus cervicaux normaux et aux tissus cancéreux cervicaux primaires, ce qui suggère que le gène codant pour AAC-11 est un oncogène métastatique (Kim et al., 2000). Enfin, une surexpression d'AAC-11 et de son partenaire FGF2 a été mise en évidence dans les cellules B de patients atteints de LLC (Krejci, 2012). Étant donné le rôle de FGF2 dans la croissance tumorale, l'angiogenèse, la formation de métastases et la résistance à la radiothérapie, il n'est pas impossible que l'interaction entre AAC-11 et FGF2 contribue au développement de la LLC (Delrieu, 2000; Presta et al., 2005; Ishihara et al., 2006; Cao et al., 2012).

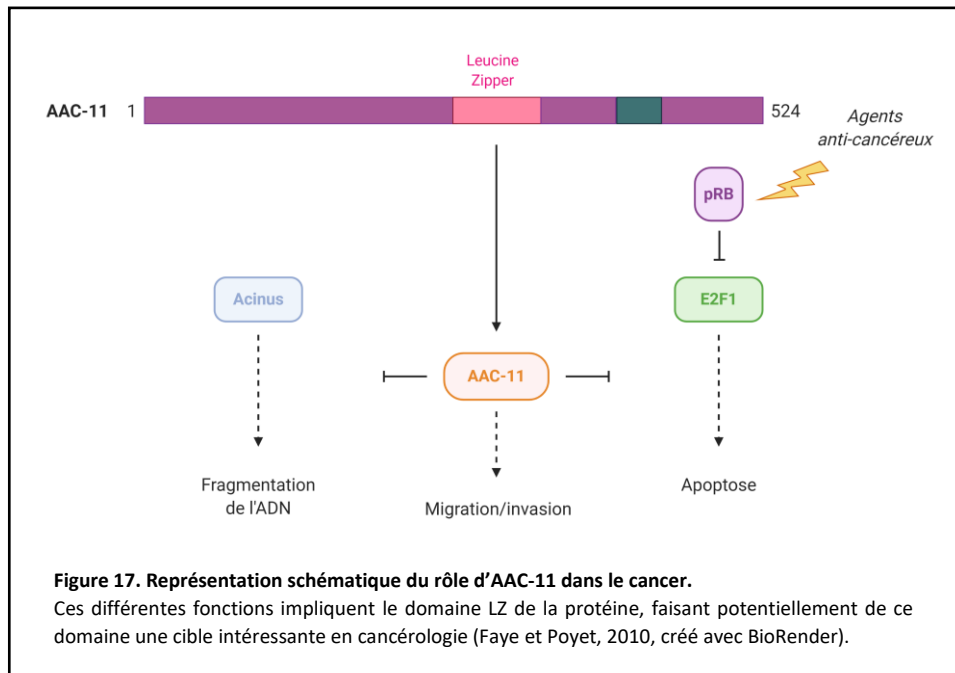
Ces différentes observations suggèrent que la protéine AAC-11 est impliquée dans l'agressivité des tumeurs chez l'humain. En accord avec cette hypothèse, une étude a montré que la surexpression d'AAC-11 augmente de manière significative la croissance, l'invasion et l'adhésion d'une lignée cellulaire de cancer cervical (Kim et al., 2000). Il a également été montré que les protéines de la matrice extracellulaire MMP-2 (gélatinase A) et des métalloprotéases membranaires de type 1 (MT1) étaient plus élevées dans les cellules exprimant AAC-11. À l'inverse, l'expression d'AAC-11 est complètement abrogée dans les tissus déficients en MMP-2. Cette observation est particulièrement intéressante, puisque les MMPs jouent un rôle bien connu dans le

développement et l'invasion des tumeurs, et sont généralement liées à un mauvais pronostic (Yoshizaki et al., 2002; Kikuchi et Yamamoto, 2008; Jezierska et Motyl, 2009). La surexpression d'AAC-11 régule positivement l'expression de la β -caténine, un cofacteur de transcription impliqué plusieurs étapes de la tumorigénèse, en particulier l'invasion cellulaire (Logan et Nusse, 2004; Clevers, 2006; Huang et He, 2008).

Une étude pionnière réalisée au sein de notre équipe de recherche, évoquée plus haut, a démontré qu'il était possible de cibler l'activité anti-apoptotique d'AAC-11 grâce à un peptide interférant, agissant comme inhibiteur compétitif pour l'interaction avec ses partenaires (Rigou et al., 2009). D'après les résultats obtenus, l'inhibition de l'activité d'AAC-11 permet une diminution de la motilité et des capacités invasives d'une lignée d'ostéosarcome humain, possiblement via l'inhibition de l'activités des protéines MMP-2, MT1-MMP et β -caténine.

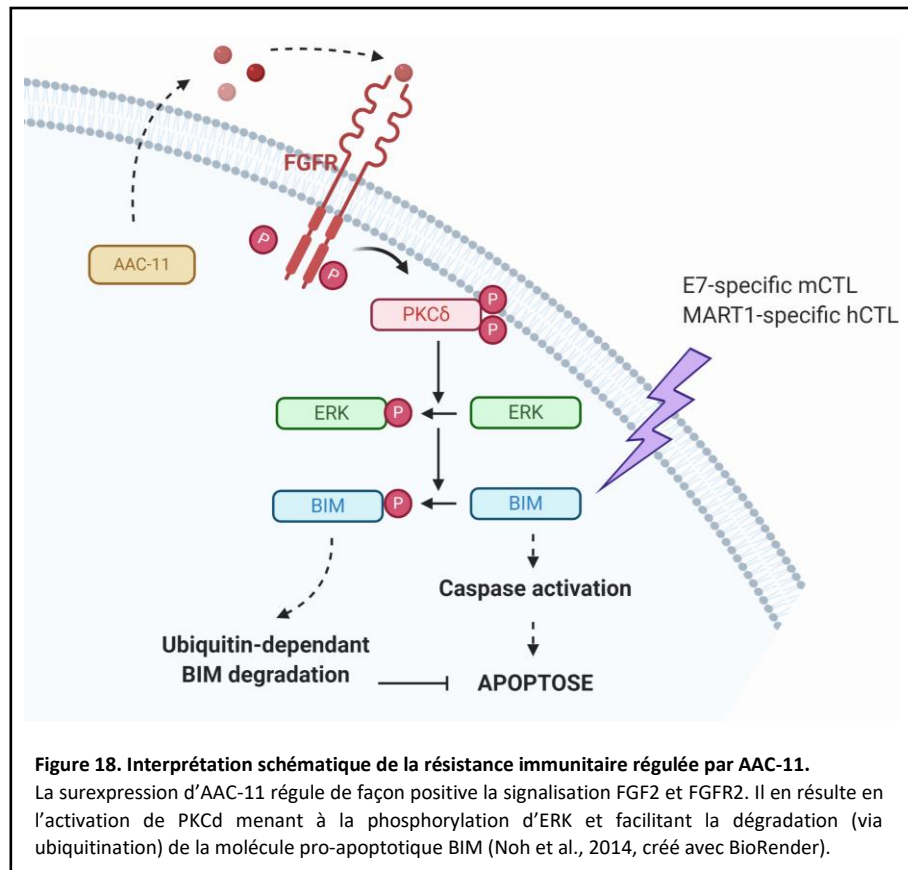
Plus récemment, il a été montré qu'AAC-11 régule positivement la protéine MMP-9, induisant une augmentation de la capacité métastatique cellules cancéreuses cervicales (Song et al., 2015). Il semblerait que cet effet métastatique soit dépendant de la voie de signalisation Erk. En effet, lorsque l'expression d'AAC-11 est inhibée par siRNA ; le niveau de phospho-Erk, l'activité des MMP, l'invasion *in vitro* ainsi que la formation de métastases pulmonaires *in vivo* sont inhibées. De manière intéressante, l'activité pro-métastatique d'AAC-11 dépendante de Erk et abrogée lorsqu'AAC-11 est mutée au niveau de son domaine LZ d'interaction protéine-protéine.

En plus d'un rôle manifeste dans l'invasion cellulaire, AAC-11 est impliquée dans la résistance à l'apoptose des cellules tumorales. Plusieurs auteurs ont mis en évidence le rôle d'AAC-11 survie des cellules néoplasiques (Tewari et al., 1997; Kim et al., 2000; Morris et al., 2006; Wang et al., 2010). Il est important de noter que ces propriétés anti-apoptotiques passent elles aussi par le domaine LZ d'AAC-11 (Tewari et al., 1997). Des études, dont certaines réalisées au sein de notre équipe, ont également montré qu'AAC-11 était impliquée dans la résistance des cellules tumorales aux chimiothérapies (Follis et al., 2008; Rigou et al., 2009). Ainsi, lorsque l'expression d'AAC-11 est inhibée dans des lignées cellulaires malignes ou normales, celles-ci deviennent plus sensibles aux agents anti-cancéreux tels que la camptothécine et l'étoposide. A l'inverse, lorsqu'AAC-11 est surexprimée, les cellules deviennent plus résistantes (Rigou et al., 2009). Là encore, l'intégrité du domaine LZ d'AAC-11 est nécessaire à ses fonctions anti-apoptotique, car lorsque celui-ci est muté (leucines en arginines aux positions 384 et 391), AAC-11 devient inactive. D'après les expériences réalisées, AAC-11 agit en aval de la caspase-3, puisque sa surexpression n'inhibe pas l'activation des caspases induite par les chimiothérapies. De plus, AAC-11 régule négativement l'apoptose dépendante de Fas dans les cellules cancéreuses (Rigou et al., 2009). Toutes ces observations confirment les propriétés anti-apoptotiques d'AAC-11. Les différentes fonctions d'AAC-11 dans le cancer sont représentées ci-dessous (Faye et Poyet, 2010) (Figure 17).



Nous avons également observé au sein de l'équipe que l'expression d'AAC-11 dans les cellules cancéreuses est induite par de nombreuses conditions de stress, comme l'hypoxie, le stress oxydatif, les dommages de l'ADN ou encore la privation en sérum (données non publiées). Au cours d'un criblé double-hybride réalisé chez la levure en collaboration avec la société Hybrigenics, plusieurs partenaires impliqués dans la réponse des cellules au stress ont été identifiés (Acinus, OXSR1, PRKAB1, STK39). Toutes ces interactions passent par le domaine LZ d'AAC-11. Ces observations suggèrent qu'AAC-11 pourrait agir comme senseur de stress dans les cellules tumorales, et que son activité est médiée par un large réseau d'interactions avec des protéines impliquées dans la survie, le cycle cellulaire et la réponse au stress.

AAC-11 semble également jouer un rôle dans l'échappement des cellules cancéreuses au système immunitaire (Noh et al., 2014). En effet, AAC-11 serait capable de rendre les cellules cancéreuses résistantes à l'apoptose déclenchée par les cellules T spécifiques des antigènes tumoraux. D'après les données obtenues par Noh et al. (2014), l'inhibition de l'expression d'AAC-11 dans les cellules tumorales les rend sensibles au système immunitaire, tandis que sa surexpression confère aux cellules déjà sensibles une résistance élevée. En termes de mécanistique, AAC-11 agirait en régulant positivement la voie de signalisation du FGF2, via une voie effectrice FGFR1/PKCδ/Erk permettant la dégradation de la protéine pro-apoptotique BIM. Le blocage de cette voie a en effet des conséquences similaires à celles du silencing d'AAC-11 (Noh et al., 2014) (Figure 18).



CHAPITRE 3 : Utilisation de peptides pénétrants en tant que nouvelle stratégie thérapeutique dans le cancer

Une des causes pouvant expliquer le manque d'efficacité de certains agents thérapeutiques est leur faible capacité de pénétration dans les cellules tumorales (Schaffhausen, 2015). En effet, la membrane plasmique, une barrière hydrophobe semi-perméable qui permet l'intégrité cellulaire, constitue un véritable obstacle à la délivrance des composés pharmacologiques (Groves, 2019). C'est pourquoi de nombreuses équipes de recherche concentrent leurs efforts sur le développement de systèmes alternatifs pour délivrer ces agents thérapeutiques, comme par exemple des vecteurs viraux, des nanoparticules ou des peptides pénétrants qui augmentent la pénétration cellulaire (Deshpande et al., 2013; Ye et al. 2015; Swain et al. 2016).

I. Généralités sur les CPPs

1) Historique

Les CPPs aussi connus sous le nom de PTDs (Protein Transduction Domains) sont de courtes séquences d'acides aminés (moins de 30 acides aminés) caractérisés par leur capacité à traverser les membranes cellulaires de manière énergie dépendante ou indépendante (Ye et al., 2015).

En 1988, Joliot et son équipe découvrent l'homéodomaine Antennapedia chez la drosophile, un facteur de transcription capable de rentrer dans les cellules nerveuses et de moduler l'expression de gènes impliqués dans la morphogénèse neuronale (Joliot et al., 1991). Peu après, Derossi et ses collègues identifient le premier CPP en démontrant que la troisième hélice de l'homéodomaine Antennapedia, appelée pénétratine, était la séquence minimale nécessaire pour l'entrée cellulaire (Derossi et al., 1996). Depuis, plus de 1700 CPPs ont été caractérisés et listés dans la base de données CPPsite 2.0. Ils ont été validés expérimentalement pour leur capacité à délivrer un cargo bioactif de petite ou grande taille (jusqu'à 120kDa) dans des cellules, *in vitro* et *in vivo*. De nombreuses revues décrivent différentes façons de classer les CPPs, selon leur origine (dérivés de protéines, synthétiques ou chimériques), leurs propriétés physiologiques (cationiques, amphipatiques ou hydrophobiques) ou leurs mécanismes de transport (Wender et al., 2000; Bechara et Sagan, 2013; Copolovici et al. 2014; Ye et al., 2015). Une liste non-exhaustive est représentée ci-dessous ([Habault et Poyet 2019](#)) (Figure 19).

Peptide	Sequence	Type	Length	Origin	References
Antennapedia Penetratin (43-58)	ROIKIWFQNRMRMKWKK	Cationic and amphipatic	16	Protein-derived	Derossi et al., 1996 [7]
HIV-1 TAT protein (48-60)	GRKKRRQRPPQ	Cationic	13	Protein-derived	Green and Loewenstein., 1988 ; Frankel and Pabo., 1988 [8, 9]
pVEC Cadherin (615-632)	LLIILRRIRKQAHASK	Amphipatic	18	Protein-derived	Elmqvist et al., 2001 [10]
Transportan Galanine/ Mastoparan	GWTLSAGYLLKINLKALAALAKKIL	Amphipatic	27	Chimeric	Pooga et al., 1998 [11] ; Langel et al., 1996 [12]
MPG HIV-gp41/SV40 T-antigen	GALFGLGAAGSTMGAWSPKPKKR KV	Amphipatic	27	Chimeric	Morris et al., 1997 [13]
Pep-1 HIV-reverse transcriptase/SV40 T-antigen	KETWWETWTEWSQPKPKRKV	Amphipatic	21	Chimeric	Morris et al., 2001 [14]
Polyarginines	R(n); 6<n<12	Cationic	6-12	Synthetic	Wender et al., 2000 [15]
MAP	KLALKLALKALKALKLA	Amphipatic	18	Synthetic	Oehlke et al., 1998 [16]
R6W3	RRWRRRR	Cationic	9	Synthetic	Delaroché et al., 2007 [17]
NLS	CGYGPKKRKVGG	Cationic	13	Protein-derived	Ragin et al., 2002 [18]
8-lysines	KKKKKKKK	Cationic	8	Synthetic	Mai et al., 2002 [19]
ARF (1-22)	MVRRFLVLRIRACGPPRRV	Amphipatic	22	Protein-derived	Johansson et al., 2008 [20]
Azurin-p28	LSTAADMGGVTDGMASGLDKDYLK PDD	Anionic	28	Protein-derived	Taylor BN et al., 2009 [21]

Figure 19. Classification des CPPs

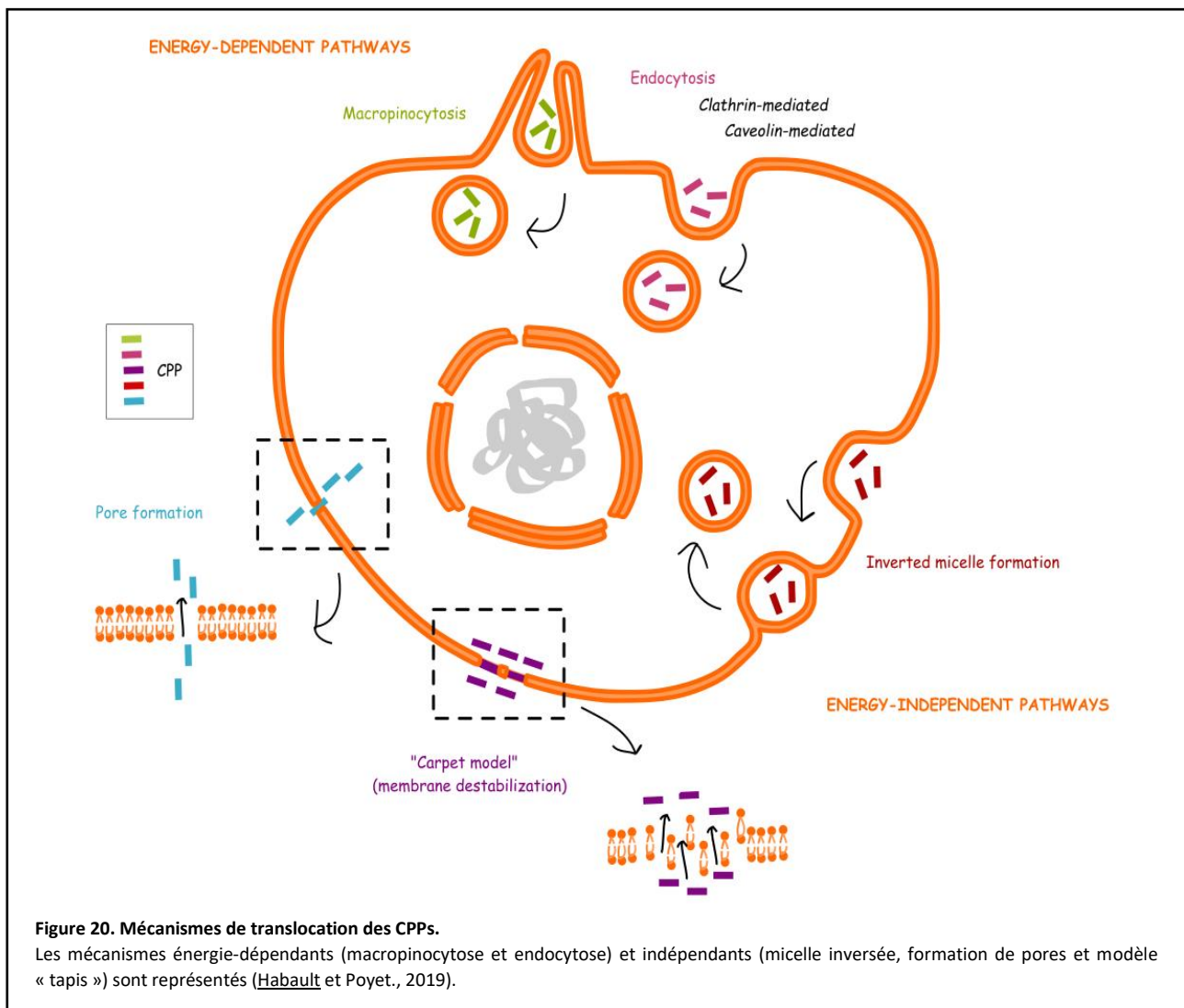
Liste des peptides pénétrants les plus connus et les mieux caractérisés (Habault et Poyet, 2019)

2) Transport

Les CPPs et leurs cargos peuvent être liés selon deux approches différentes. Une possibilité est de les lier de manière non-covalente par des interactions électrostatiques. Par exemple, les transporteurs peptidiques amphipatiques comme MPG et Pep-1 peuvent former des complexes avec leurs cargos sans la moindre altération chimique (Feni et Neundorff, 2017; Bolhassani et al., 2017). L'autre possibilité, plus fréquente, est d'ajouter un

lien covalent entre les deux molécules. Cette méthode a montré de très bons résultats avec la pénétratine, TAT ou encore les Polyarginines (Nischan et al., 2015; Bolhassani et al., 2017).

De nombreux modèles ont été proposés pour expliquer l'internalisation des CPPs, mais le mécanisme exact reste mal compris. Cependant, des études suggèrent qu'il existe à la fois des processus de translocation directe (énergie-indépendants) et des mécanismes d'endocytose (énergie-dépendants) (Duchardt et al. 2007; Trabulo et al., 2010; Madani et al., 2011). Concernant la translocation directe, au moins trois modèles ont été décrits : le modèle de micelle inversée due à l'interaction du peptide avec la bicouche lipidique (Kawamoto et al., 2011), le modèle de formation de pores (Allolio et al., 2018) et le modèle « tapis » dû à une déstabilisation membranaire (Matsuzaki et al., 1999). Pour l'endocytose, des mécanismes cavéoline- ou clathrine-dépendants et indépendants ont été rapportés (Ferrari et al., 2003; Richard et al., 2005; Mayor et Pagano, 2007), ainsi que des mécanismes de macropinocytose (Nakase et al., 2017; Niu et al., 2018). Il semble que de nombreux facteurs, comme les conditions expérimentales (température et pH), le type cellulaire, la nature du CPP, la nature du cargo, la quantité de CPP et de cargo, influencent le processus de translocation, ainsi que l'efficacité d'échappement aux endosomes (Duchardt et al., 2007; Trabulo et al., 2010; Madani et al., 2011). Un schéma résumant les différentes voies d'entrée dans la cellule est proposé ci-dessous (Habault et Poyet 2019) (Figure 20).



II. Thérapies basées sur l'utilisation de CPPs

1) Généralités

Le champ d'application des CPPs est très varié. En effet, grâce à leur capacité unique de transporter des cargos variés à l'intérieur des cellules avec une toxicité limitée (Guidotti et al., 2017), les CPPs sont désormais considérés comme des outils puissants à la fois en biologie fondamentale et pour des applications médicales. Par exemple, ils peuvent délivrer des agents de contraste, tels que des Quantum dots (Derivery et al., 2017) ou des chélateurs métalliques (Cosgrave et al., 2010) pour l'imagerie cellulaire. De plus, ils peuvent transporter des acides nucléiques (siRNA, oligomères antisens, plasmides) pour lesquels la délivrance intracellulaire est souvent limitée de par leur haut poids moléculaire et leur charge négative, facilitant la régulation génique (Ramsey et Flynn, 2015). Enfin, ils permettent la délivrance de médicaments allant des nanoparticules aux protéines thérapeutiques, et ont été utilisés dans un grand nombre d'études *in vitro* et *in vivo*. De manière importante, alors que les CPPs sont capables de traverser les membranes cellulaires, de nombreuses études ont montré qu'ils ne pouvaient pas traverser la barrière hémato-encéphalique, qui protège le système nerveux central d'une potentielle toxicité.

Plus de 25 conjugués CPP-drogue sont actuellement en cours de développement clinique dans des applications aussi diverses que l'inflammation (Fu et al., 2017; Gurney et al., 2018), la douleur (Garcia-Caballero et al., 2016; Peng et al., 2017), le cancer (Jia et al., 2011), les maladies cardiovasculaires (Betts et Wood, 2013; Koutsokeras et al., 2014; Gurbel et al., 2016) et le vieillissement (Nasrollahi et al., 2012). Une version actualisée des essais cliniques de phase I et II terminés est représentée ci-dessous ([Habault et Poyet 2019](#)) (Figure 21).

CPP	Cargo	Application	Status	Compound	Company	ClinicalTrial.gov ID
R7	Cyclosporine A	Psoriasis	Phase II terminated 2003	PsorBan	CellGate, Inc	N/A
TAT	δPKC inhibitor	Heart attack	Phase II completed 2011	KAI-9803	KAI Pharmaceutical	NCT00785954
PTD4	HSP20 phosphopeptide	Wound healing	Phase II completed 2012	AZX-100	Capstone Therapeutics	NCT00825916
P28	P28	Central Nervous System Tumors	Phase I completed 2013	P28	Pediatric Brain Tumor Consortium	NCT01975116
P28	P28	Solid tumors	Phase I completed 2014	P28	CDG Therapeutics, Inc	NCT00914914
N/A	N/A	Duchenne Muscular Dystrophy (DMD)	Phase II completed 2015	AVI-4658	Sarepta Therapeutics	NCT00844597
TAT	JNK-1	Intraocular inflammation and pain	Phase III completed 2016	XG-102	Xigen SA	NCT02235272
TAT	JNK-1	Acute inner ear hearing loss	Phase III completed 2017	AM-111	Auris Medical	NCT02561091
MTS	Botulinum toxin A	Cervical Dystonia	Phase II completed 2018	R-002	Revance Therapeutics	NCT02706795

Figure 21. Sélection de thérapies basées sur des CPPs en développement clinique

Essais cliniques de thérapies basées sur des CPPs terminés ou interrompus (Habault et Poyet., 2019)

2) Utilisation dans le cancer

Au cours des dernières années, un grand nombre d'études a montré qu'il était possible d'améliorer l'efficacité des chimiothérapies en les associant avec une séquence de pénétration. Par exemple, le méthotrexate, la

doxorubicine et le paclitaxel agissent plus efficacement contre les cellules tumorales *in vitro* et *in vivo* lorsqu'ils sont associés à des CPPs (Szabó et al., 2016; Duan et al., 2017; Movafegh et al., 2018).

Une autre stratégie est d'utiliser les CPPs pour transporter des acides nucléiques, dans le contexte de thérapies géniques dirigées contre le cancer. Plusieurs études ont montré la faisabilité d'un tel système pour cibler des oncogènes, par exemples le *VEGF*, impliqué dans l'angiogénèse ou encore la chimiokine CCL2 impliquée dans la capacité d'invasion des tumeurs (Baoum et al., 2009; Fang et al., 2016; Viillard et Larrivée, 2017).

Enfin, il est possible de délivrer de larges protéines bioactives dans les cellules tumorales, non seulement dans le cadre de thérapies protéiques, mais aussi dans le cadre de vaccins peptidiques. L'objectif de ces vaccins est de délivrer des peptides antigéniques à des CPA (Cellules Présentatrices d'Antigènes), comme les CD, afin de favoriser le traitement et la présentation par induction d'une réponse immunitaire. Par exemple, plusieurs études récentes s'intéressent à des systèmes de délivrance d'épitopes dérivés de l'ovalbumine ou de MUC1 basés sur des peptides pénétrants (ex : pénétratine). Ces études ont montré que de tels systèmes permettaient de stimuler une réponse immunitaire (cellules T CD4+ et CD8+), agissant contre la formation de tumeurs B16.OVA (Pouniotis et al., 2006; Pouniotis et al., 2016; Brooks et al., 2018). Concernant les thérapies basées sur des complexes CPP-protéines, plusieurs cibles et peptides ont d'ores et déjà été validées dans des études *in vitro* et/ou *in vivo*. Ainsi, il a été montré qu'un peptide appelé p28 pouvait empêcher l'ubiquitination et donc la dégradation de la protéine p53, inhibant l'angiogénèse et la croissance tumorale (Jia et al., 2011; Mehta et al., 2011; Yamada et al., 2013). Les peptides interférant Mut3DPT-SET et Mut3DPT-PP2A sont quant à eux capables d'empêcher l'interaction entre SET et PP2A, responsable de l'inhibition de SET, un suppresseur de tumeur bien connu (Hung et Chen, 2017; Tian et al. 2018). D'autres exemples sont présentés dans notre revue sur les CPPs, consultable en **Annexe I** (Habault et Poyet 2019).

III. Optimisation des CPPs

La diversité des voies de signalisation et des types cellulaires pouvant être ciblés par des CPPs démontre leur potentiel illimité pour le développement de nouvelles thérapies. Leur succès provient non seulement de leur excellente capacité de délivrance, mais aussi de leur versatilité : ils sont faciles à synthétiser, à modifier et à améliorer. Cependant, à l'heure actuelle, il n'existe toujours pas de thérapie basée sur des CPPs approuvée par la FDA, et plusieurs essais cliniques ont été interrompus. Parmi les raisons que l'on peut citer : (1) des problèmes de stabilité *in vivo*, en raison d'une trop forte sensibilité à la dégradation protéique (Pujals et al., 2008) ; (2) des problèmes d'immunogénicité ; (3) une faible efficacité en raison de l'échec du médicament à échapper aux endosomes après l'internalisation par les cellules ; (4) une toxicité due à la dégradation des excipients non-protéiques ; (5) une toxicité ou un manque d'efficacité lié au manque de spécificité du CPPs. En effet, bien qu'il soit connu que les CPPs cationiques interagissent avec les protéoglycanes, il n'a pas encore été établi s'ils sont capables de se fixer à des récepteurs membranaires spécifiques. Une large biodistribution des agents thérapeutiques conjugués à un CPP peut mener à une réduction de leur efficacité en raison d'une plus faible concentration locale. Le coût doit également être considéré, ainsi que les risques d'effets indésirables. De

nombreuses études se sont penchées sur l'amélioration de ces paramètres (voir **Annexe I**, [Habault](#) et Poyet, 2019).

1) *Transport et stabilité*

Bien que les séquences des CPPs soient très variables, certains traits structurels sont communément retrouvés. Par exemple, les CPPs sont généralement composés d'acides aminés chargés positivement, avec un avantage des arginines par rapport aux lysines pour l'internalisation, en raison de la présence d'un groupe guanidium (Zhang et al., 2013). Ils possèdent souvent des régions α -hélicoïdales, qui permettent une bonne pénétration dans les membranes (Yamashita et al., 2017). Une taille et une hydrophobicité optimale sont aussi des facteurs importants. Grâce à ces éléments connus, il est aujourd'hui relativement facile de prédire la capacité d'un court peptide à transloquer à travers les membranes, notamment par l'utilisation d'approches computationnelles, comme l'algorithme Hällbrink/Hansen ou la méthode de modélisation AAN (Hällbrink et al., 2005; Hansen et al., 2008; Karelson et Dobchev, 2011).

De nombreux groupes de recherche travaillent sur la synthèse de nouvelles séquences de pénétration ou l'optimisation de séquences connues. Afin d'améliorer la translocation, l'échappement aux endosomes ainsi que la stabilité des peptides, plusieurs approches existent :

- Remplacement d'acides aminés pour limiter la dégradation (ex : lysines en ornithines non-naturelles, acides aminés L en D) (Pujals et al., 2008; Schmidt et al., 2010).
- Utilisation de stratégies de « shielding » (ou « bouclier ») pour augmenter la stabilité (ex : ajout de polymères négativement chargés comme le polyéthylène glycol) (Osman et al., 2018).
- Modification de la structure (ex : cyclisation, dendrimères, transformation des chaînes latérales) (Tesei et al., 2017; Panigrahi et al., 2018; Kozhikhova et al., 2018)
- Ajout de domaines particuliers pour favoriser l'échappement endosomal (ex : ajout d'histidines) (El-Sayed et al., 2018)

Des précautions particulières doivent être prises lors de telles modifications, l'objectif étant de ne pas altérer la solubilité et la facilité de synthèse des peptides, et de ne pas les rendre toxiques ou immunogènes. Pour plus de détails, se référer à l'**Annexe I** ([Habault](#) et Poyet 2019).

2) *Spécificité et toxicité*

Afin de garantir l'absence de toxicité, les agents thérapeutiques doivent agir de manière très spécifique. Concernant les complexes CPPs-protéine, une meilleure spécificité peut être obtenue soit :

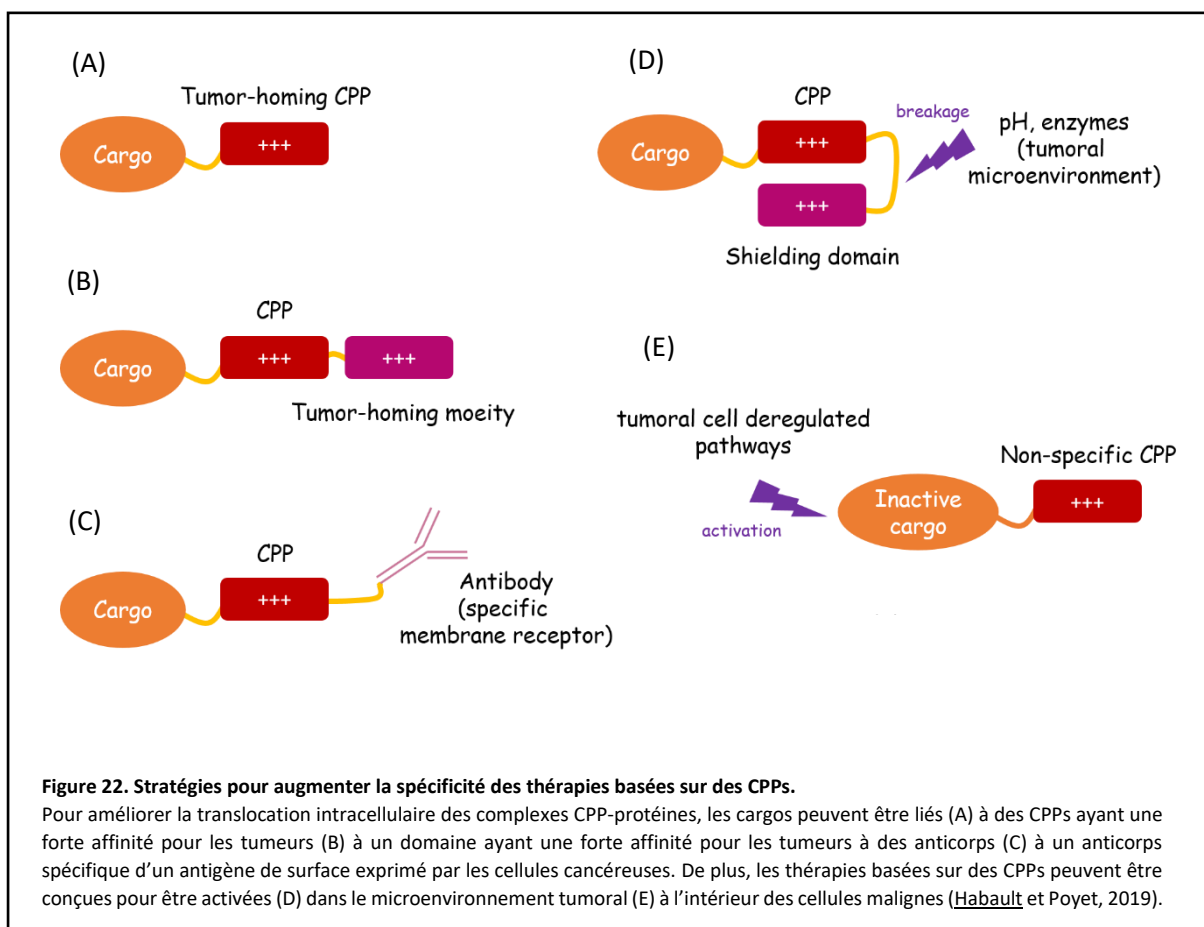
(1) par l'utilisation d'un CPP capable de rentrer uniquement dans un type de tissu ou de cellule (« tumor-homing CPP »). Plusieurs peptides présentant une affinité particulière pour les tissus et cellules cancéreuses ont été identifiés au cours des dernières années. Parmi les exemples, on peut citer le CPP RGD capable de se lier à des intégrines spécifiques présentes à la surface des cellules cancéreuses ou le peptide basique KRP qui tend à

s'accumuler dans le microenvironnement acide des tumeurs et se lier aux charges négatives des héparines D présentes à la surface des cellules cancéreuses (Pasqualini et al., 1995; Yu et al. 2018).

(2) par la conjugaison des complexes CPPs-protéine à un autre domaine qui apporte une spécificité vis-à-vis d'un type cellulaire ou tissulaire. C'est le cas de la stratégie « ATTEMPS » (Antibody Targeted Triggered Electrically Modified Prodrug Type Strategy), qui consiste à lier le CPP à un anticorps qui reconnaît un antigène de surface spécifique des cellules cancéreuses, comme par exemple la protéine CEA (Shin et al., 2014).

(3) par l'utilisation d'un CPP dont l'activité est spécifique. Les ACPPs (Activatable Cell-Penetrating Peptides) sont des systèmes où la fonction pénétrante du CPP est initialement masquée, et peut être activée uniquement dans le microenvironnement tumoral. Cette activation est due à un changement de conformation ou au clivage d'un groupement inhibiteur induit par une protéine exprimée dans les tumeurs ou des conditions microenvironnementales comme le pH (Olson et al., 2009; Cheng et al., 2015; Xiang et al., 2017). Une stratégie similaire consiste à exploiter l'environnement intratumoral (hypoxie, expression de protéines particulières) pour activer les complexes CPPs-protéines uniquement dans les cellules malignes (Minet et al., 2000; Karagiota et al., 2018; Darwish et al. 2019).

Ces différentes stratégies sont détaillées en **Annexe I** (Habault et Poyet 2019), et un résumé schématique présenté ci-dessous (Figure 22).



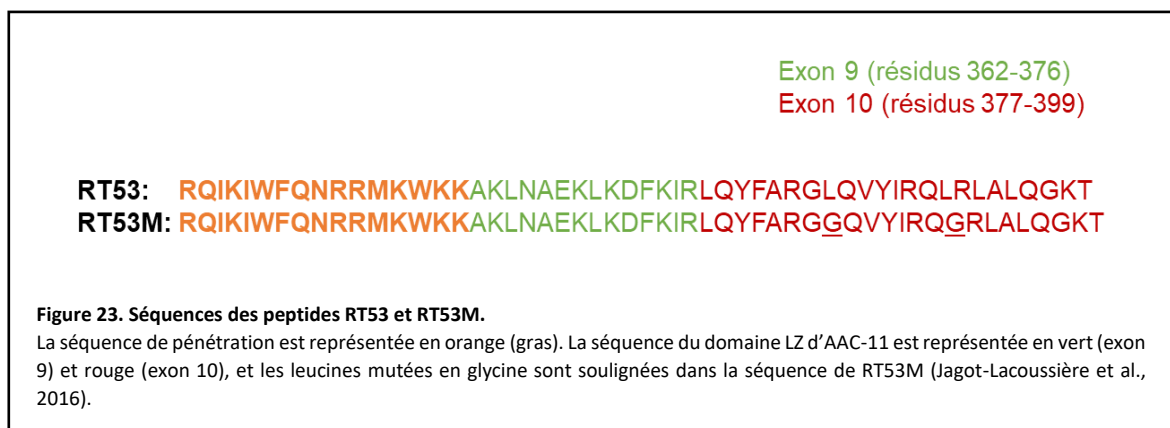
IV. Peptides pénétrants dérivés d'AAC-11

Comme décrit précédemment, AAC-11 joue un rôle de protéine chaperonne pour de nombreuses protéines impliquées dans l'apoptose, la réponse au stress et la réponse aux chimiothérapies (Van den Berghe et al., 2000; Ahel et al., 2009; Rigou et al. 2009). Cette fonction de chaperonne joue un rôle capital dans la biologie et la survie des cellules tumorales. AAC-11 est constituée de plusieurs sites d'interaction protéine-protéine, en particulier des motifs de type LZ. De manière intéressante, il a été montré que des mutations inactivatrices dans le domaine LZ empêchait l'interaction d'AAC-11 avec la protéine Acinus. De plus, ces mutations du domaine LZ d'AAC-11 inhibent son activité anti-apoptotique et ses effets pro-métastatiques, indiquant un rôle crucial de ce domaine pour son activité (Tewari et al., 1997; Rigou et al., 2009; Song et al., 2015).

Ainsi, inhiber les interactions de la protéine AAC-11 avec ses partenaires pourrait être une stratégie thérapeutique intéressante.

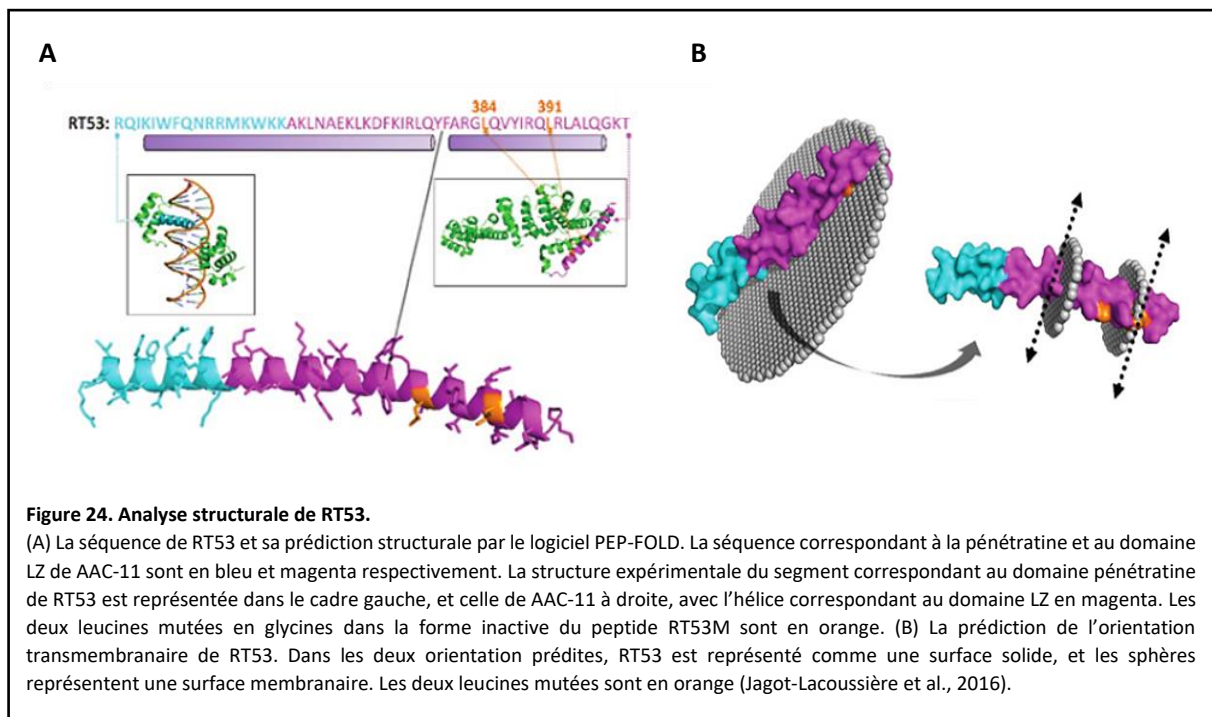
1) RT53 : Design et structure

L'équipe de Dr. Jean-Luc Poyet a donc développé un peptide pénétrant nommé RT53. La nomenclature correspond au premier acide aminé R (arginine), au dernier acide aminé T (thréonine) et au nombre de résidus (53). RT53 correspond au domaine LZ d'AAC-11 (résidus 363-399) lié à la région N-terminale de la pénétratine, une des séquences de pénétration les plus courtes et efficaces et les mieux caractérisées (Rigou et al. 2009; Jagot-Lacoussière et al. 2016). Une version mutée au niveau du domaine LZ (leucines 384 et 391 en glycines), supposément inactive nommée RT53M, a également été conçue. Les séquences de ces peptides LZDPs sont représentées ci-dessous (Jagot-Lacoussière et al., 2016) (Figure 23).



Afin d'obtenir des informations structurales sur RT53, l'équipe a utilisé deux logiciels bien connus de prédiction, PSIPRED (Buchan et al., 2013) et JPred4 (Drozdetskiy et al., 2015), ainsi que le méta-serveur MESSA pour une analyse en détails de la séquence et de recherche de modèles de structure homologue (Cong et Grishin, 2012). Les résultats de ces différentes analyses indiquent que RT53 devrait majoritairement adopter une structure α -hélicoïdale, en accord avec les structures 3D connues des deux parties du peptide, la pénétratine (Piper et al.,

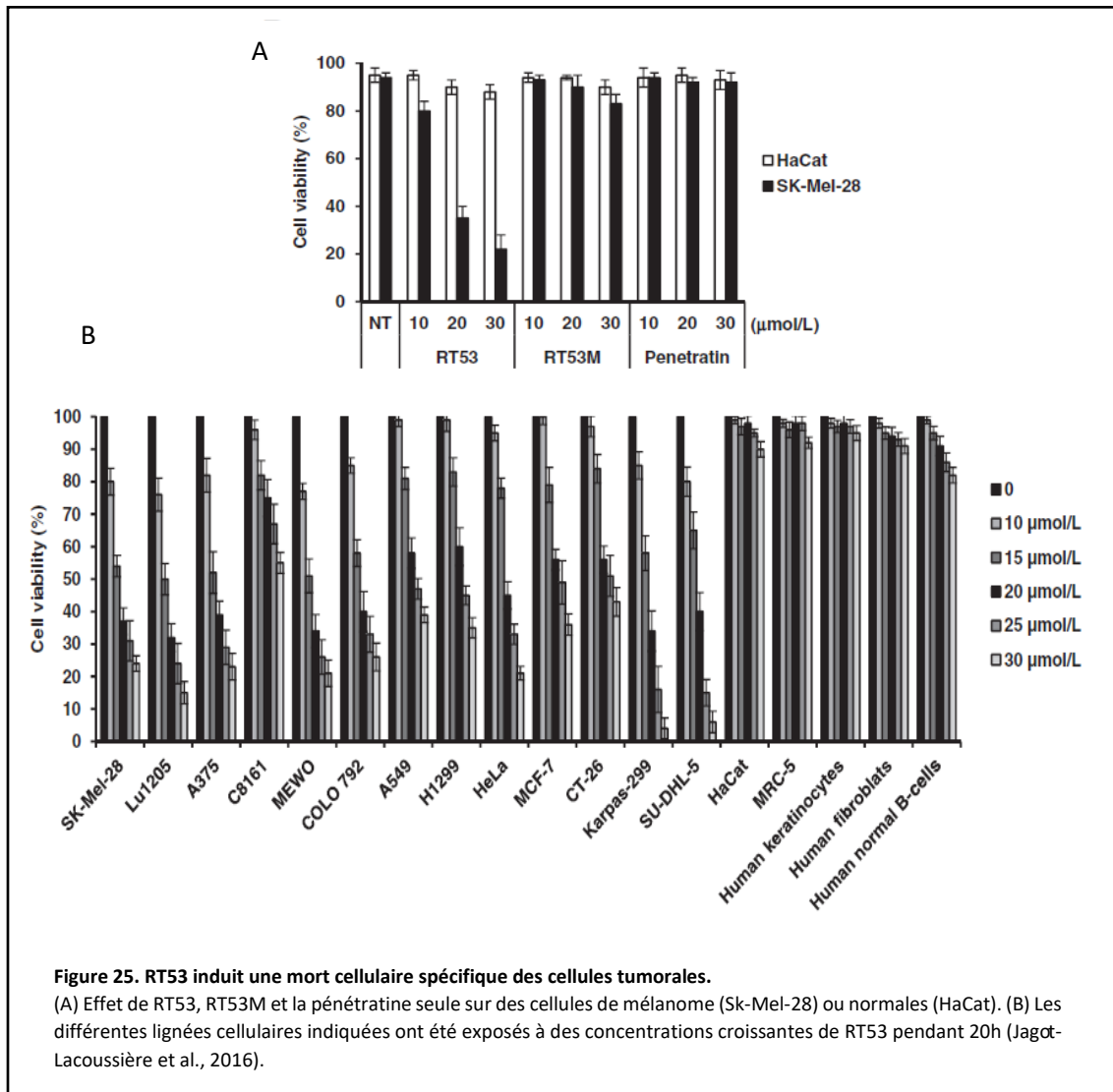
1999) et le domaine LZ d'AAC-11 (Han et al., 2012). Il est possible, mais peu probable, que l'hélice soit coupée au niveau des résidus FARGL. La structure tridimensionnelle prédite par le serveur PEP-FOLD suggère également une structure essentiellement en hélice α (Jagot-Lacoussiere et al., 2016) (Figure 21). L'analyse prédictive des positions spatiales indique que RT53 devrait appartenir au groupe des protéines périphériques, puisque l'énergie de transfert du solvant à la membrane serait d'environ 8.6 kcal/mol. Ainsi, le peptide pourrait avoir une orientation de surface, où son axe long serait parallèle à la membrane, en raison de la nature amphipatique partielle de la molécule (Figure 24). Cependant, une orientation transmembranaire alternative est possible, en raison de la présence d'un segment majoritairement hydrophobe et relativement long (résidus FARGLQVYIRQL) (Jagot-Lacoussiere et al., 2016).



2) Activité anti-tumorale *in vitro*

Les premiers résultats obtenus ont montré que le peptide RT53 était capable d'interrompre l'interaction d'AAC-11 avec son partenaire Acinus et d'augmenter de manière drastique la sensibilité de cellules tumorales aux agents anti-cancéreux (Rigou et al., 2009). Dans une étude plus approfondie des effets de ce peptide dans le mélanome, ces résultats ont été confirmés et étendus. Tout d'abord, la version mutée du peptide RT53M est bien inactive, puisqu'il n'inhibe pas l'interaction entre Acinus et AAC-11, et ne sensibilise pas les cellules tumorales aux agents anti-cancéreux, démontrant la nécessité de l'intégrité du domaine LZ d'AAC-11 (Jagot-Lacoussiere et al., 2016). D'après les résultats obtenus, RT53 induit une mort cellulaire dose-dépendante dans plusieurs lignées cellulaires cancéreuses, notamment de mélanome, alors qu'une toxicité négligeable est observée dans les cellules normales (Rigou et al., 2009; Jagot-Lacoussiere et al., 2016). RT53M n'est quant à lui pas cytotoxique vis-à-vis des cellules tumorales (Jagot-Lacoussiere et al., 2016) (Figure 25). Il est à noter que la position de la

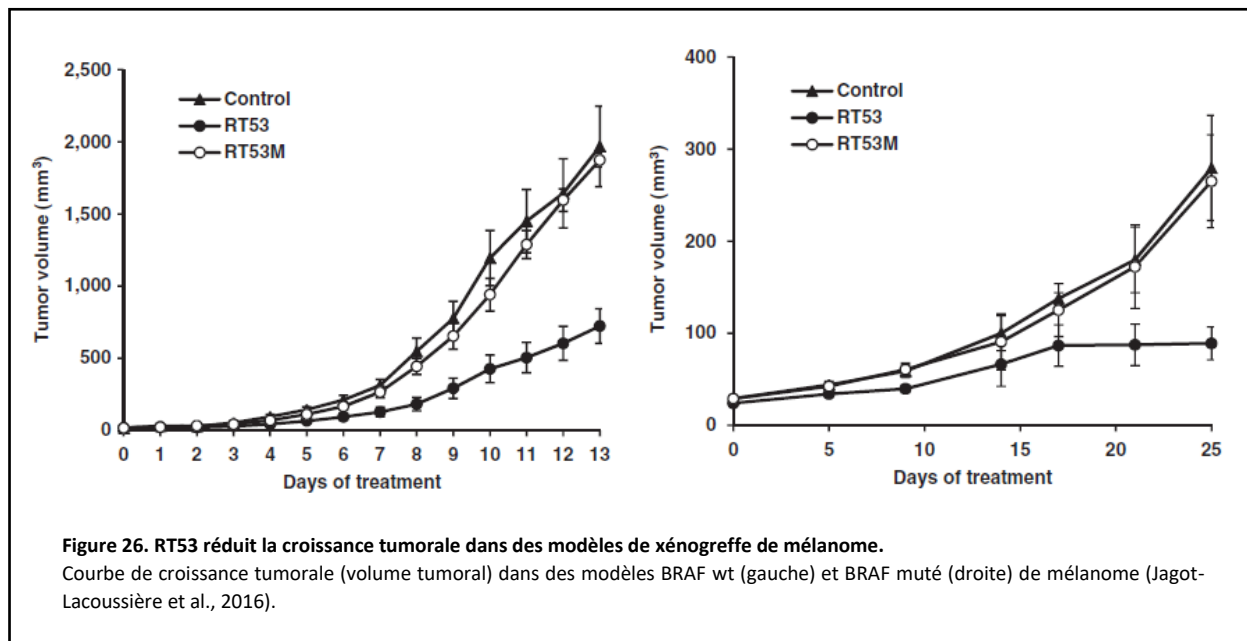
pénétratine (N-Ter ou C-Ter) n'influence pas les propriétés anti-tumorales de RT53, et que la pénétratine peut être remplacée par d'autres séquences de pénétration comme TAT. Cependant, plusieurs études ont montré que TAT pouvait être toxique, c'est pourquoi il a été décidé de choisir la pénétratine pour la suite des études au sein de notre laboratoire (Jagot-Lacoussiere et al., 2016).



3) Activité anti-tumorale *in vivo*

Selon les résultats d'une étude préliminaire de toxicité dans des souris Nude, ni des injections répétées par voie intrapéritonéale à des doses moyennes (jusqu'à 60mg/kg), ni une injection unique à des doses élevées (jusqu'à 100mg/kg) n'ont d'effet sur le comportement et la croissance des souris. Il n'a pas été noté de changements dans la numération sanguine, ni de toxicité au niveau des organes. De manière importante, il n'a pas été trouvé de réponse anticorps chez des souris immunocompétentes après 5 semaines d'injections quotidiennes. Toutes ces données suggèrent que RT53 n'est pas toxique ni immunogène chez la souris (Jagot-Lacoussiere et al., 2016).

L'effet anti-tumoral de RT53 a ensuite été testé dans deux modèles murins de xénogreffe de mélanome (BRAF mutant et WT). Il a été montré que RT53, mais pas RT53M induit une inhibition significative de la croissance tumorale dans ces deux modèles, indépendamment du statut BRAF de la tumeur (Jagot-Lacoussiere et al., 2016) (Figure 26). En termes de biodistribution, le peptide est détecté dans le foie, les poumons, la rate, les reins et en grande quantité dans les tumeurs, mais pas dans le cerveau, suggérant qu'il ne peut pas traverser la barrière hémato-encéphalique (Jagot-Lacoussiere et al. 2016; Kotula et al. 2016).



4) Mécanisme d'action

Au cours de cette même étude, les auteurs ont exploré le mécanisme d'action de RT53. D'après les résultats obtenus, l'inhibition des caspases ou de la protéine RIPK-1 par différents inhibiteurs ne modifie pas la mort cellulaire induite par le peptide, suggérant qu'il agit de façon caspase et RIPK-1 indépendante (Jagot-Lacoussiere et al., 2016). De plus, les auteurs démontrent l'absence de relargage de protéine mitochondriales spécifiques d'une mort par apoptose (cytochrome c, smac, AIF). Enfin, l'utilisation d'un inhibiteur d'autophagie n'affecte pas la mort cellulaire induite par RT53. Ces différentes observations suggèrent que la mort cellulaire observée n'est ni une apoptose, ni une nécroptose, ni une autophagie des cellules cancéreuses. Au contraire, la morphologie des cellules, la rapidité de la mort cellulaire observée (quelques minutes à quelques heures) et le relargage de plusieurs facteurs spécifiques (ATP, HMGB1, LDH) suggèrent que les cellules meurent par un mécanisme de type nécrose non-régulée. *In vivo*, l'analyse histologique des tumeurs confirme une augmentation des zones de nécroses dans les tumeurs après traitement au peptide. Il est à noter que la déplétion d'AAC-11 n'a pas d'effet sur l'activité de RT53, indiquant qu'elle ne dépend pas du niveau d'expression de la protéine. Dans cet article, les auteurs posent l'hypothèse que les cellules meurent par un mécanisme de membranolyse dû à l'accumulation locale du peptide à la membrane des cellules cancéreuses, peut-être lié à l'expression d'un partenaire

membranaire. Dans ce sens, des expériences de microscopie utilisant le peptide RT53 couplé à la molécule fluorescente Rhodamine, montrent une accumulation du peptide uniquement à la membrane des cellules cancéreuses. Cependant, le travail pour élucider le mécanisme d'action de RT53 est encore inachevé, et a fait l'objet d'une grande partie de ma thèse.

5) *Mort cellulaire immunogène*

Toujours dans la même étude, les auteurs investiguent la capacité de RT53 à induire une réponse immunitaire (Jagot-Lacoussiere et al., 2016). Dans le contexte du mélanome, ils utilisent un modèle de vaccination bien connu de xénogreffe de cellules B16F10 chez des souris C57/BL6. *In vitro*, les cellules de mélanome traitées par RT53 relarguent à la fois de l'ATP et le facteur HMGB1, deux molécules connues pour être des marqueurs de MCI. De manière très intéressante, la vaccination des souris avec des cellules tuées *in vitro* par le peptide inhibe la croissance des tumeurs correspondantes au site d'injection (Jagot-Lacoussiere et al., 2016). Cela suggère que RT53 est capable d'activer le système immunitaire adaptatif, et nous a encouragé à poursuivre les études concernant cette propriété très prometteuse du peptide.

CHAPITRE 4 : Cancers cutanés et/ou hématologiques

L'ensemble des données obtenus au sein de l'équipe procurait un bon rationnel pour tester l'intérêt du ciblage peptidique des fonctions de survie d'AAC-11 dans d'autres pathologies que le mélanome. En effet, il semblerait qu'AAC-11 soit une cible universelle dans le cancer, et on peut donc supposer que l'activité des peptides LZDPs n'est pas tumeur-dépendante. Dans ce sens, nous nous sommes intéressés à deux pathologies très agressives et pour lesquelles les options thérapeutiques sont très limitées, le Syndrome de Sézary (SS) et les Leucémies Aigües Myéloïdes (LAM). De plus, nous disposons d'un accès à des échantillons de patients sur site, à l'hôpital St Louis.

I. Syndrome de Sézary

1) Présentation de la maladie

Décrit en 1938 par Albert Sézary, le SS appartient à la famille des lymphomes T cutanés épidermotropes (CTCL). Cette maladie très agressive apparaît habituellement chez les sujets de plus de 50 ans, et touche majoritairement les hommes. Avec une incidence de 1/10 000 000 cas par an, le SS représente 3% de tous les lymphomes cutanés. A cause de son évolution très rapide, le pronostic associé à cette maladie est sombre, avec une survie des patients ne dépassant pas 24% à 5 ans après le diagnostic (Willemze et al., 1997; Prince et al., 2009; Olsen et al., 2011; Caudron et al., 2012).

Selon l'EORTC (European Organization for Research and Treatment of Cancer), le SS est défini par la triade érythrodermie, lymphadénopathie diffuse et présence de lymphocytes atypiques circulants ($> 1000/\text{mm}^3$ de sang) (Vonderheid et al., 2002). Le SS est également caractérisé par la présence d'un clone T dominant dans le sang, la peau et les ganglions (cellules de Sézary), une augmentation des cellules CD4 positives conduisant à un ratio CD4/CD8 supérieur ou égal à 10 et une expression aberrante des marqueurs pan-lymphocytaires T. Le tableau clinique du SS associe une érythrodermie, un prurit, une polyadénopathie, une kératodermie palmoplantaire, un ectropion, une onychodystrophie, une alopécie et parfois une hépatosplénomégalie (Caudron et al., 2012; Martinez et al. 2019) (Figure 27). La biopsie cutanée montre un infiltrat monomorphe constitué de lymphocytes atypiques en bande sous-épidermique ou parfois seulement en localisation péri-vasculaire. L'épidermotropisme (lymphocytes atypiques intraépidermiques ou micro-abcès de Pautrier) peut être absent. Les ganglions lymphatiques peuvent également être envahis par cet infiltrat (Caudron et al., 2012).



2) Phénotype de la cellule de Sézary

D'un point de vue génétique, le SS est associé à un grand nombre d'anomalies chromosomiques conduisant à des altérations du proto-oncogène *MYB*, du gène de la sous-unité alpha-2 du récepteur de l'IL-22 (*IL22RA2*) ou encore de la région *TP53* (Vermeer et al. 2008). Un réarrangement monoclonal des gènes du *TCR-γ* peut être détecté chez 82 % des patients atteints de CTCL (Caudron et al., 2012).

En termes de morphologie, les cellules malignes sont de petite à moyenne taille, avec un noyau cérébriforme irrégulier (Figure 28).

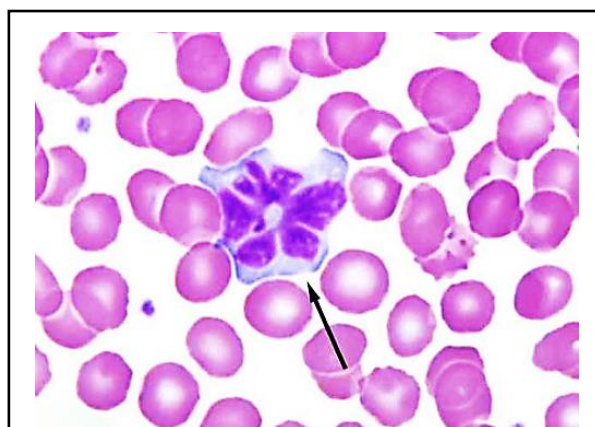
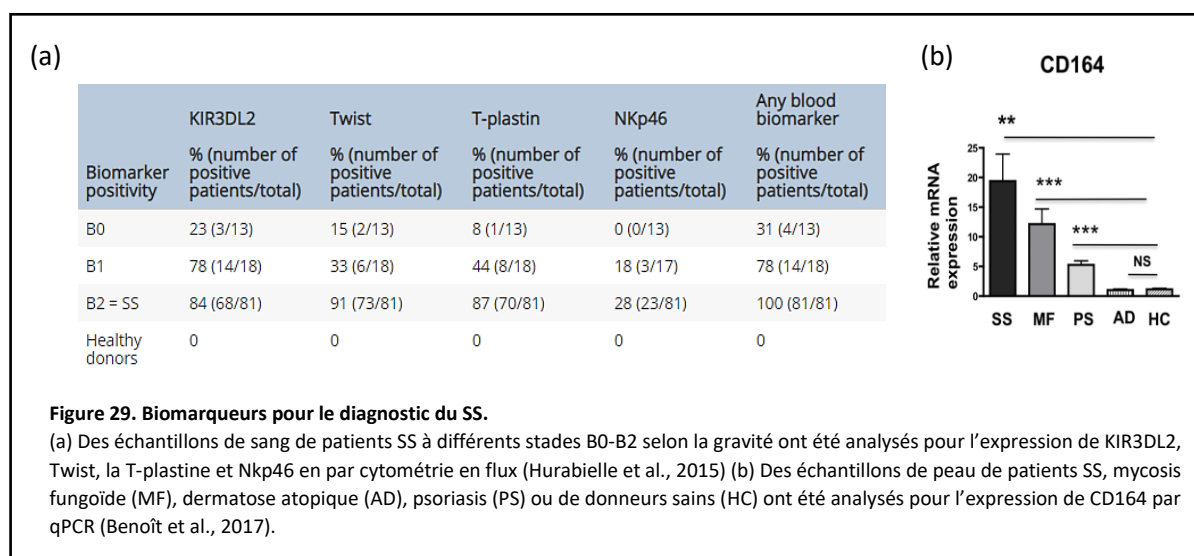


Figure 28. Exemple de morphologie d'une cellule de Sézary.
 Cellule atypique, présentant un noyau cérébriforme (Consulté sur et adapté de <https://wiki.clinicalflow.com/mycosis-fungoidess%C3%A9zary-syndrome-mfss>).

Les cellules de Sézary sont très hétérogènes en termes de phénotype et de signature moléculaire, ainsi qu'en termes d'expression des récepteurs de cytokines/chimiokines (Roelens et al., 2017). Habituellement, ce sont des lymphocytes T matures CD2+CD3+, souvent CD4+ (rarement CD8+), de phénotype mémoire CD45RO+ CD45RA-. Elles sont caractérisées par l'expression aberrante d'au moins un antigène pan-lymphocytaire T (CD7, CD26, TCRβ et/ou CD5) (Willemze et al., 1997; Edelman et Meyerson, 2000). Elles expriment également des marqueurs de domiciliation cutanée, tels que CCR4, CCR10, CLA et CCR6, CXCR3. Dans le sang, les cellules tumorales expriment aussi CCR7 (domiciliation ganglionnaire) et la L-sélectine (Campbell et al., 2010). Concernant le profil cytokinique, les cellules de Sézary peuvent aussi bien sécréter des cytokines de type Th2 helper (IL4, IL5 et IL10), que de type Th1 ou Th3 (Yagi et al., 1996; Poszepczynska et al., 2000; Bagot et al., 2001).

L'identification de marqueurs spécifiques des cellules de Sézary qui amélioreraient le diagnostic des patients atteints de SS est un vrai challenge depuis des années (Delfau-Larue et al., 2000). Une approche pour identifier les cellules T néoplasiques est l'utilisation d'anticorps anti-TCR-Vβ, mais seulement 80% des réarrangements peuvent être détectés avec les anticorps actuellement disponibles (Schwab et al., 2002; Morice et al., 2006). L'utilisation de la cytométrie en flux a quant à elle permis de mettre en évidence plusieurs biomarqueurs fréquemment retrouvés dans le SS (KIR3DL2, Twist, T-plastine, NKp46, CD164) (Hurabielle et al., 2016; Roelens et al., 2017; Benoit et al., 2017) (Figure 29). Très récemment un autre récepteur, CD39, a été identifié comme étant fréquemment retrouvé dans les cellules tumorales de patients, mais pas dans les cellules T CD4+ de donneurs sains (Bensussan et al., 2019)



Parmi ces marqueurs, KIR3DL2 (CD158k) est particulièrement utile en tant qu'outil diagnostique. Il s'agit d'un récepteur de la famille des KIR (Killer Immunoglobulin-like Receptors), identifié en 2001 au sein de notre unité de recherche (UMRS 976) (Bagot et al., 2001). Les récepteurs KIR interagissent avec les molécules du CMHI et transduisent des signaux activateurs ou inhibiteurs des fonctions cellulaires effectrices et immunorégulatrices. Ils participent à la régulation de la tolérance au soi par le système immunitaire non-adaptatif. Ainsi, le récepteur KIR3DL2 possède trois domaines extracellulaires et joue un rôle inhibiteur, grâce aux motifs ITIM

(Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motifs) contenus dans sa partie longue intracytoplasmique (Ortonne et al., 2006; Schmitt et al., 2017).

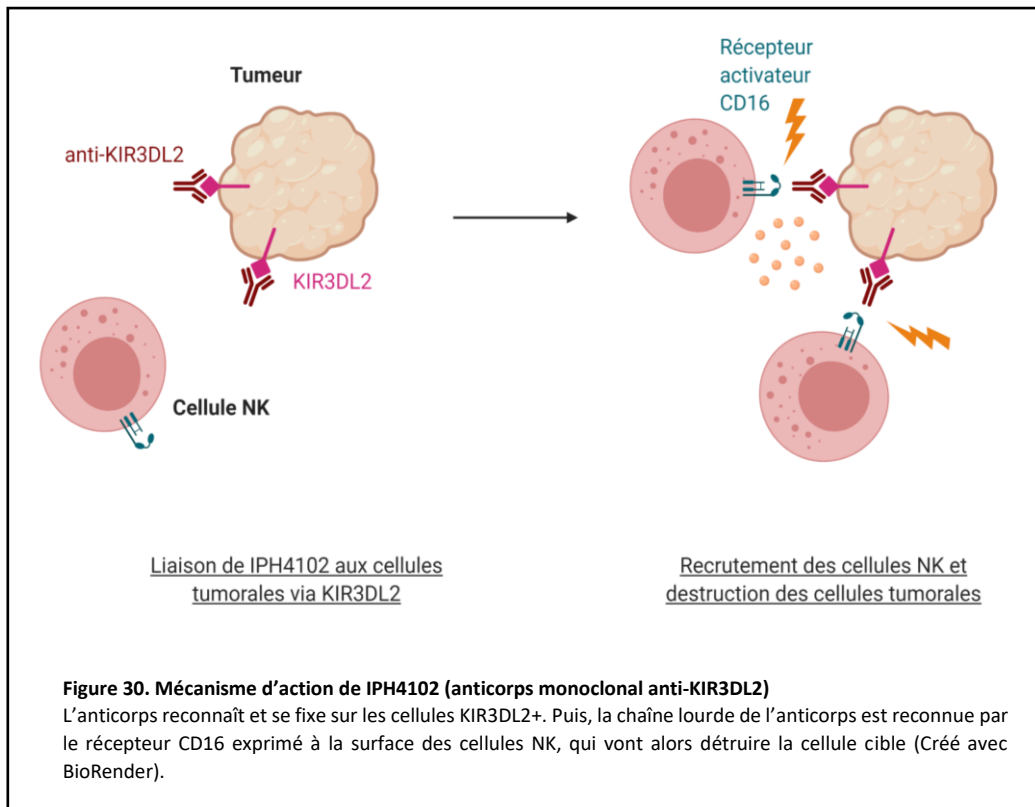
KIR3DL2 est trouvé à la surface des lymphocytes T atypiques dans le sang et/ou la peau des patients atteints de SS et son expression est spécifique aux cellules de Sézary, permettant la distinction entre une érythrodermie inflammatoire et un authentique SS (Bagot et al., 2001; Wechsler et al., 2003; Poszepczynska-Guigné et al., 2004; Ortonne et al., 2006; Ortonne et al., 2008; Caudron et al., 2012). De plus, son taux d'expression est généralement bien corrélé à l'avancement de la maladie (Hurabielle et al., 2017; Roelens et al., 2019).

3) Traitements existants

Généralement, des traitements locaux sont utilisés en association avec un traitement systémique. Ci-dessous, une liste non-exhaustive des thérapies auxquelles les médecins ont habituellement recours (de Masson et al., 2014; Bagot, 2019; Ramelyte et al., 2019) :

- Dermocorticoïdes puissants pour le traitement de l'érythrodermie
- Thérapies par les rayons ultraviolets : PUVA-thérapies (rayons UVA + psoralène) ou rayons UVB
- Radiothérapie (locale ou totale)
- Chimiothérapie topique (directement sur la peau) qui agit sur la composante inflammatoire pour les formes précoces (méchlorétamine, carmustine) ou systémique pour les formes plus avancées (fludarabine, doxorubicine, méthotrexate, étoposide, chrolambucil, gemcitabine entres autres)
- Interféron α
- Rétinoïdes/réxinoïdes (bexarotène)
- Inhibiteurs des histones déacétylases (iHDAC) qui sont souvent surexprimées dans le cancer
- Immunothérapie (rituximab, alemtuzumab, mogamulizumab)
- Photophorèse ou photochimiothérapie extracorporelle (PCE) qui consiste à traiter les cellules du sang du patient par PUVA-thérapie en dehors de l'organisme puis à les réinjecter au patient
- Greffe de cellules souches hématopoïétiques allogénique

Récemment, un anticorps monoclonal humanisé spécifique du récepteur KIR3DL2 a été conçu au sein de notre équipe de recherche (IPH4102). Il permet la déplétion efficace et spécifique des cellules KIR3DL2+ grâce à leur reconnaissance par les cellules NK cytotoxiques via le récepteur CD16 (Figure 30). Cette nouvelle thérapie est actuellement en phase d'évaluation clinique (essai clinique NCT03902184). Les résultats obtenus sur une cohorte de patients SS présentant une rechute ou une résistance aux thérapies standard sont extrêmement prometteurs (Bagot, 2019).



Malheureusement, à l'heure actuelle, le pronostic des patients atteints de SS est mauvais. Bien souvent, il est incurable en l'absence de transplantation de cellules souches allogéniques. Les traitements actuels, bien qu'efficaces au début, ne permettent pas une guérison complète. En effet, la plupart d'entre eux agissent seulement sur un type de symptômes (érythrodermie, réaction inflammatoire) ou un type de cellules tumorales (sang ou peau). Par exemple, le bexarotène (agoniste synthétique des rétinoïdes) a une action pro-apoptotique restreinte aux cellules de Sézary présentes dans la peau puisqu'il inhibe l'expression de la molécule d'adhésion E-sélectine sur l'endothélium. D'autres ne sont pas suffisamment spécifiques et affaiblissent le patient. C'est par exemple le cas des immunothérapies ciblant les antigènes CD52 et CD4, puisqu'ils sont aussi exprimés chez les cellules immunitaires normales. La plupart ont une toxicité élevée, avec un ratio bénéfice/risque faible. Les effets secondaires sont très nombreux et très handicapants, et le taux de rechute élevé, à cause du développement de résistances et de l'incapacité des agents anti-cancéreux à éliminer la totalité des cellules tumorales.

Il est indéniable que la médecine personnalisée a permis une nette amélioration de la prise en charge des patients. De nombreux agents thérapeutiques innovants, en particulier les immunothérapies telles que le mogamulizumab ou l'IPH4102 donnent des résultats encourageants (Bonnet et al., 2019; Bagot, 2019). Cependant, aux stades avancés de la maladie, le système immunitaire du patient est compromis, et l'utilisation d'immunothérapies, inefficace. A ce stade, les traitements sont généralement palliatifs, d'où un besoin urgent en nouvelles thérapies complémentaires tout aussi spécifiques, mais ne faisant pas intervenir le système immunitaire.

4) Cellule de Sézary et résistance à l'apoptose

Le mécanisme d'accumulation des cellules de Sézary dans la peau n'est pas encore bien compris. En effet, les cellules de Sézary prolifèrent très peu (Dereure et al., 2000). C'est pourquoi il semble qu'une résistance de ces cellules à l'apoptose soit plutôt en cause dans le développement de cette pathologie. Cette théorie est supportée par le fait que ki67, un marqueur de prolifération, n'est trouvé qu'aux stades avancés de la maladie (Dummer et al., 1995). Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer la résistance des cellules de Sézary à l'apoptose :

- Une surexpression de BCL-2 a été mise en évidence dans certains rare cas (Osella-Abate et al. 2001), mais cette observation est controversée (Garatti et al., 1995).
- Une perte d'expression de Fas (CD95), qui permet le déclenchement de la voie extrinsèque de l'apoptose a été mise en évidence (Dereure et al., 2000; Osella-Abate et al., 2001 ; Contassot et al., 2008). Dans les cellules présentant des niveaux normaux de Fas, une surexpression de cFLIP et/ou une résistance à FasL et TRAIL a été observée (Contassot et al., 2008).
- Une résistance des cellules de Sézary CD7- à l'apoptose des cellules T induite par la galectine-1 (Pace et al., 2000; Rappl et al., 2001).
- Une activation constitutive du facteur nucléaire NFκB par régulation positive de la kinase IKK2. Elle jouerait un rôle dans la résistance aux chimiothérapie (Sors et al., 2008).
- L'expression de NKp46 et KIR3DL2 qui agissent comme récepteur co-inhibiteur de la mort cellulaire dépendante de la voie de signalisation CD3 (Bensussan et al., 2011; Thonnart et al. 2014).
- L'expression de Twist qui semble favoriser la progression tumorale en bloquant p53 et inhibant l'apoptose induite par c-myc (Maestro et al., 1999; Goswami et al., 2012).
- L'expression constitutive de la T-plastine qui est impliquée dans la résistance à l'apoptose induite par les agents antinéoplasiques, comme l'étoposide (Bégué et al., 2012).

5) Modèles murins d'étude de la pathologie

Des lignées cellulaires de cellules de Sézary ont été développées à partir du clone tumoral de patients (Pno, Cou, HUT78, MyLA, SeAx, H9) et sont utilisées par de nombreux laboratoires pour établir des modèles *in vivo* de xénogreffes sous-cutanées, dans des souris immunodéficientes CB-17 SCID ou NOD/SCID (Yano et al., 2007; Doebbeling, 2010; Jain et al., 2015). Les souris $\beta 2m(\text{null})$ NOD/SCID présentent un allèle nul au locus $\beta 2$ -microglobuline (Kollet et al., 2000). Les souris NOD/SCID γ (NSG) présentent quant à elles une troncation dans la chaîne γ du récepteur commun aux cytokines (Ito et al., 2009; Hiramatsu et al. 2003). Dans ces souris NOD/SCID, les cellules NK ainsi que les lymphocytes T et B sont absents, puisque la $\beta 2$ -microglobuline est nécessaire pour l'immunité innée médiée par le CMHI (souris $\beta 2m(\text{null})$), et que la chaîne γ du récepteur commun aux cytokines est un composant indispensable pour la reconnaissance des cytokines telles que l'IL-2, l'IL-7, l'IL-12, l'IL-9, l'IL-15 et l'IL-21 (souris NSG) (Leonard, 2001).

Cependant, ces modèles ne permettent pas une représentation fidèle des caractéristiques anatomopathologiques de la maladie : bien qu'il y ait croissance tumorale, les cellules malignes ne sont pas retrouvées dans le sang, la peau ou les ganglions lymphatiques. De plus, ils sont basés sur l'utilisation de lignées cellulaires qui sont très agressives et ne représentent pas la diversité des cellules tumorales rencontrées chez les patients. Il serait donc intéressant de mettre au point un modèle de souris basé sur la transplantation de PBMC (Cellules Mononuclées de Sang Périphérique) humaines, obtenu chez des patients Sézary (modèle dit PDX ou Patient-Derived-Xenograft). Un des problèmes majeurs rencontré pour la mise au point de ce type de modèle est le risque de réaction du greffon contre l'hôte ou GvHD (Graft-versus-Host-Disease), qui se développe environ 4 semaines après l'injection de PBMC par voie intraveineuse (Ali et al., 2012; Bi et al., 2016). Un autre problème est la faible capacité de prolifération des cellules de Sézary. Une piste à explorer est l'injection synergique de cytokines, aidant la prise de greffe et la prolifération des cellules de Sézary. Ainsi, il a été montré que l'IL-7 est un facteur de croissance des cellules de Sézary (Dalloul et al., 1992), et qu'il était possible d'établir une culture à long terme de cellules de Sézary en présence d'IL-7 et d'IL-2 (Poszepczynska et al., 2000).

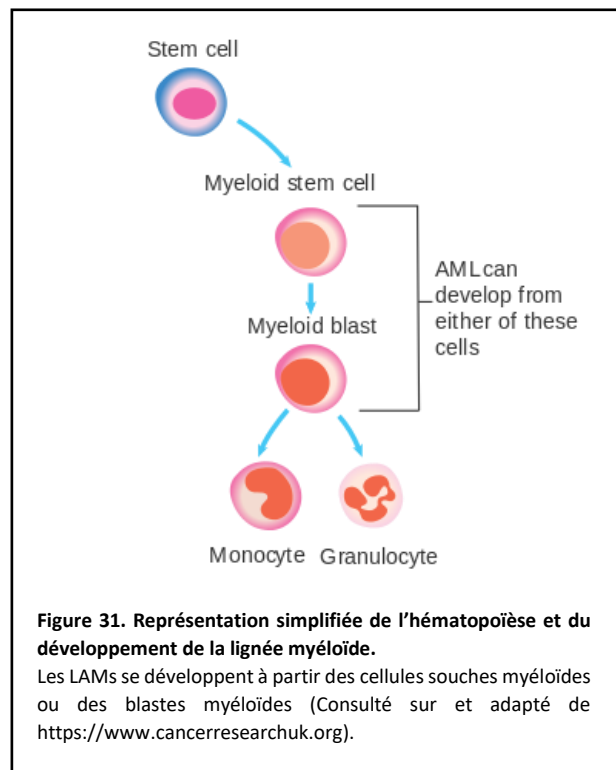
Dans une étude récente, Van der Fits et ses collègues ont développé un nouveau modèle murin de la maladie, utilisant des souris RAG2 $\gamma c^{-/-}$ (Van der Fits et al., 2012). Ces souris, comme les souris NSG, ne possèdent pas de cellules NK, T et B et sont en plus caractérisées par l'absence de macrophages. Dans ce modèle, les cellules (SeAx, HUT78 ou cellules T CD4+ de patients) sont injectées de manière intrahépatique, chez des nouveau-nés. Les cellules prolifèrent bien et envahissent plusieurs organes (ganglions lymphatiques, foie, thymus, rate et sang périphérique). De manière intéressante, des cellules humaines CD3+ sont retrouvées dans le derme, uniquement dans le cas des cellules de patients. Cette étude démontre la possibilité de greffer des cellules de patients à des souris immunodéficientes, et la capacité de ces cellules à coloniser d'autres organes. Cependant ce modèle n'est pas parfait, d'un part puisque qu'il est compliqué d'un point de vue technique (réalisé chez des souris nouveau-nés), d'autre part car il ne reproduit pas exactement les caractéristiques de la pathologie (les métastases sont partout).

II. Leucémies Aigües Myéloïdes

1) Présentation de la maladie

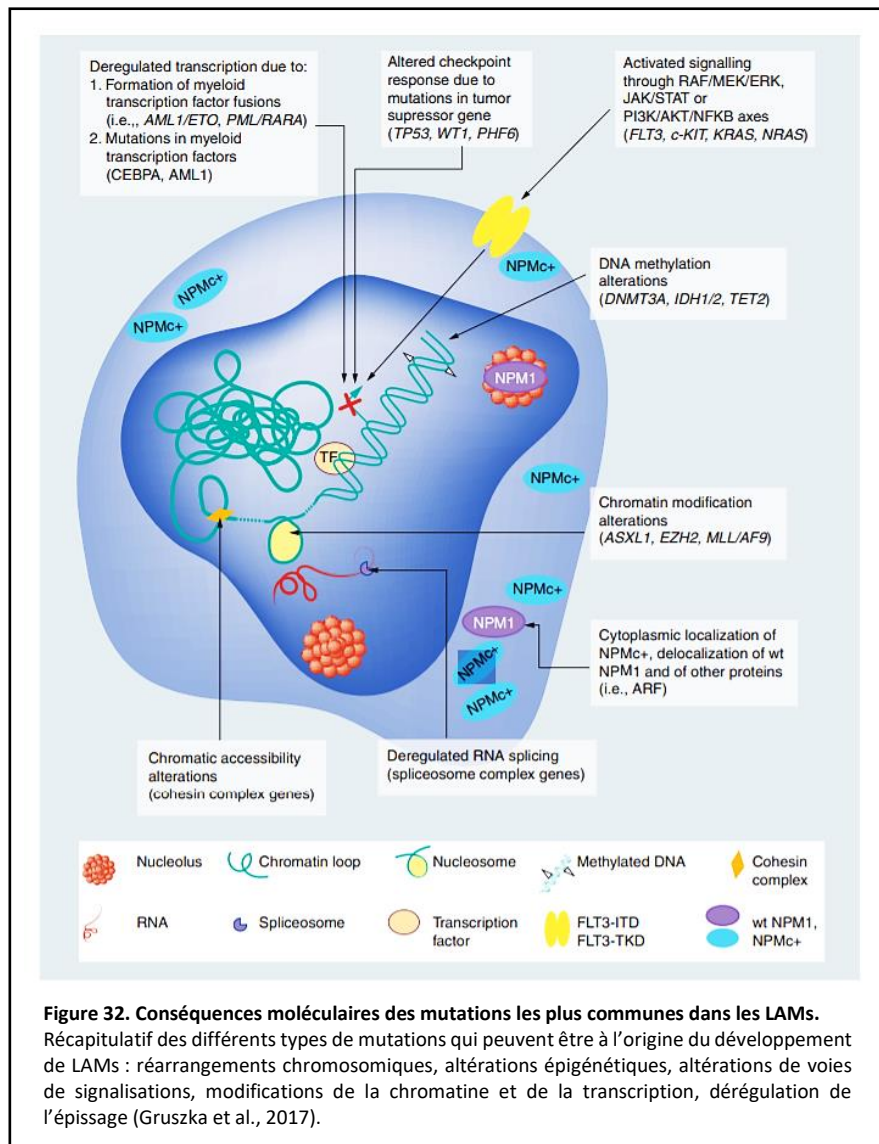
La LAM est la forme la plus fréquente de leucémie aigüe chez l'adulte (80% des cas) (Yamamoto et Goodman, 2008). En France, environ 3000 nouveaux cas sont diagnostiqués par an (4 à 5 nouveaux cas/100 000 habitants), avec un ratio homme/femme de 1.5. Cette maladie touche généralement les personnes âgées, avec un âge médian de diagnostic de 70 ans. Malgré de nombreuses avancées dans le traitement des patients et de bons taux de rémissions chez les jeunes individus, le pronostic est mauvais chez les patients plus âgés (au moins 70% des patients de plus de 65 ans décèdent au cours de l'année qui suit la découverte de la maladie) (Meyer et al., 2013; Andersson et al., 2015).

La LAM est définie par une prolifération et une différenciation anormale d'une population clonale de cellules souches myéloïdes au cours de l'hématopoïèse (plus de 20% de blastes dans la moëlle osseuse et le sang) (Figure 31).



On parle de LAM pour décrire un groupe très hétérogène de maladies, à tel point qu'il n'a pas été possible d'identifier une seule mutation prévalente, présente chez tous (ni même la majorité) des patients. Dans les 10 mutations les plus fréquentes (<5%), on retrouve des mutations dans les gènes *FLT3*, *NPM1*, *DNMT3A*, *IDH1/2*, *TET2*, *AML1*, *TP53*, *NRAS*, *CEBPA* and *WT1* (Cancer Genome Atlas Research Network et al. 2013). Certaines translocations chromosomales à l'origine des LAMs sont bien caractérisées, comme par exemple la translocation t(8 :21) dans les LAM-CBF (LAM à core-binding factor) ou la translocation t(15 :17) dans les LAP (leucémie aigüe promyélocytaire). Ces translocations résultent en la formation de protéines chimériques RUNX1-RUNX1T1 et PML-RAR α respectivement, qui altèrent la maturation normale des précurseurs de cellules myéloïdes. En plus de ces larges réarrangements chromosomiques, des changements moléculaires sont aussi impliqués dans le développement des LAMs. En effet, des mutations génétiques sont identifiées dans 97% des cas en absence de réarrangements chromosomiques (Patel et al., 2012; Cancer Genome Atlas Research Network, 2013). Ces mutations sont catégorisées en mutations de classe I qui résultent en l'activation de voies de signalisation pro-prolifératives (ex : *TP53*, *FLT3*, *c-kit*), mutations de classe II qui affectent la différenciation hématopoïétique (ex : *NPM1*, *CEBPA*) et mutations de classe III qui affectent ces deux processus en même temps (ex : gènes de méthylation de l'ADN *DNMT3A*, *TET-2* et *IDH-1*) (Patel et al., 2012; Cancer Genome Atlas Research Network, 2013). On trouve également des mutations qui affectent la structure de la chromatine, résultant en l'altération

de la transcription et la dérégulation de voies de signalisations qui contrôlent l'hématopoïèse normale, tels que RAF/MEK/Erk, JAK/STAT ou PI3K/AKT/NFκB (Figure 32) (Gruszka et al., 2017).



Bien que l'acquisition d'anormalités génétiques soit récurrente dans les blasts leucémiques, les causes exactes et directes des LAMs sont inconnues dans la plupart des cas. Un des facteurs de risque est le vieillissement. Ainsi, les CSCs (Cellules Souches Hématopoïétiques) acquièrent, au long de leur vie, des mutations et des altérations microenvironnementales qui peuvent être à l'origine du développement de maladie hématologiques. Différents mécanismes moléculaires comme le raccourcissement des télomères, le stress réplicatif, les changements de la structure de la chromatine, l'hyperméthylation des îlots CpG, les altérations métaboliques et des défauts dans la réparation de la chromatine et dans la ségrégation chromosomique contribuent aux dommages à l'ADN, l'accumulation des mutations et les aberrations génomiques au cours du vieillissement (Greer et al., 2010 ; Holohan et al., 2014 ; Walter et al., 2015 ; Adams et al., 2015) . D'autres facteurs peuvent être mis en cause dans

le développement des LAMs, comme l'exposition à des agents chimiques, les radiations, le tabagisme, et des prédispositions familiales (Godley, 2014; Fircanis et al., 2014; Poynter et al., 2017).

L'hétérogénéité génétique se reflète au niveau morphologique : les blasts AML présentent des défauts de maturations correspondant à des étapes spécifiques de la différenciation hématopoïétique. La plupart des manifestations cliniques des LAMs reflètent l'accumulation des cellules non-différenciées malignes dans le moëlle osseuse, le sang périphérique et parfois les autres organes. Parmi les symptômes souvent décrits, on retrouve une leucocytose (accumulation des globules blancs) et des signes tels qu'une anémie ou une thrombopénie, une fatigue intense, une anorexie et une perte de poids. Généralement, les patients meurent d'une infection due à l'affaiblissement du système immunitaire ou d'une hémorragie interne.

2) Traitements existants

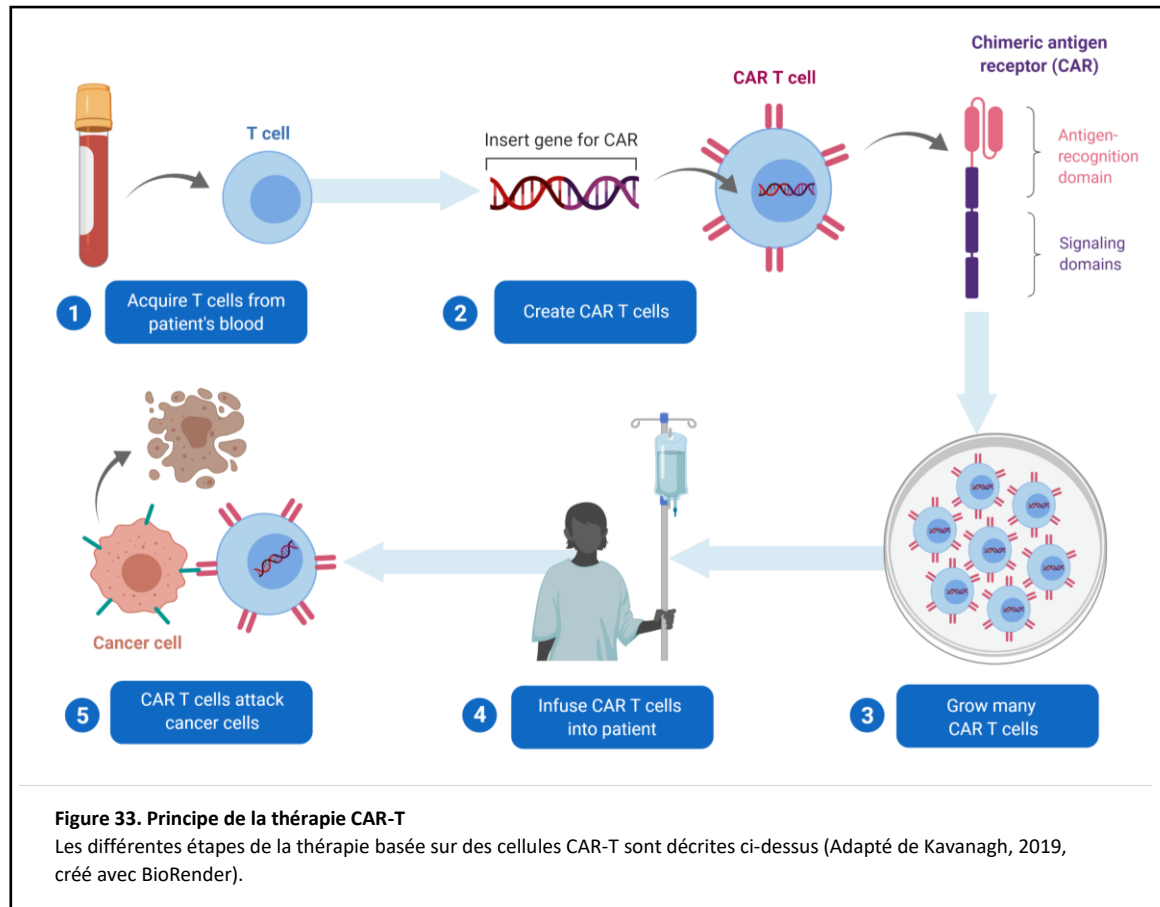
Le traitement des LAMs repose sur la combinaison d'une thérapie d'induction avec une thérapie de consolidation.

La chimiothérapie, très utilisée, associe deux molécules, une anthracycline et de l'aracytine, protocole qui permet d'obtenir de bons taux de rémission. Cependant, une maladie résiduelle persiste souvent, en raison de la présence de cellules résistantes. Les taux de rechutes sont donc élevés. De plus, ce type de thérapie est associé à de nombreux effets indésirables.

Ces dernières années, plusieurs thérapies ciblées (basées sur le profil mutationnel du patient) ont donné des résultats encourageants. Par exemple, des inhibiteurs de récepteurs aux TKs (Tyrosine Kinases) (sorafenib, midostaurin, quizartinib, crenolanib) ont été utilisés avec succès dans de certaines formes de cancers hématologiques (Cortes et al., 2013; Randhawa et al., 2014; Cooper et Brown, 2015; Zhang et al., 2018). On peut également citer des inhibiteurs de la protéine STAT, surexprimée dans 50% des LAMs (Hayakawa et al., 2013; Krueger et al., 2015) et des inhibiteurs des protéines IDH-1 et IDH-2 qui sont constitutivement actives dans 20% des LAMs (Wang et al.; 2013; Pollyea et al., 2014). Les patients peuvent également être traités par immunothérapie, par le biais de l'utilisation d'anticorps monoclonaux qui exercent une activité anti-tumorale directe ou bien via la conjugaison avec un agent cytotoxique. Parmi les plus utilisés, le Gemtuzumab qui cible la protéine CD33 exprimée à la membrane des cellules de la lignée myéloïde et qui permet la délivrance d'un agent cytotoxique (calicheamicine) (Hills et al., 2014; Amadori et al., 2016).

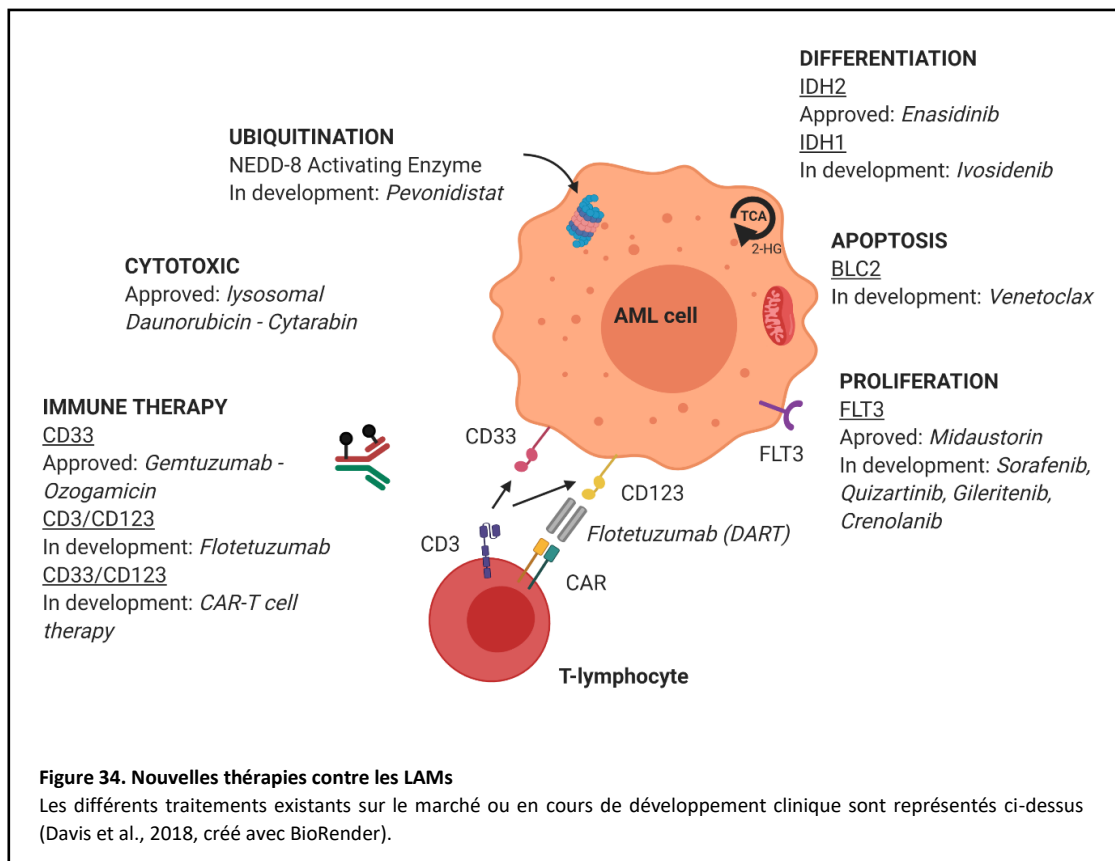
Plus récemment encore, l'immunothérapie à base de cellules CAR-T a révolutionné la recherche contre les leucémies. Cette thérapie fait intervenir les lymphocytes T du patient pour reconnaître et attaquer les cellules cancéreuses. Ces cellules sont modifiées *in vivo* afin d'être dotées d'un récepteur spécifique qui permet la reconnaissance des cellules exprimant l'antigène cible. Les cellules ainsi modifiées sont amplifiées et réinjectées au patient (Figure 33). Dans le contexte des LAM, des thérapies CAR-T dirigées contre les cellules CD33+ sont actuellement en développement et ont montré des résultats intéressants (Kenderian et al., 2015). Cependant,

les cellules normales de la lignée myéloïdes expriment elles aussi CD33, et les effets anti-tumoraux sont donc associés à une cytopénie importante.



Les LAP sont un cas particulier de LAMs, caractérisées par la translocation $t(15;17)$ qui fusionne le gène *PML* sur le chromosome 15 au gène codant pour le récepteur à l'acide transrétinoïque (*RAR α*), pour former le gène de fusion puis la protéine PML-RAR α responsable de la leucémie (Kakizuka et al., 1991; de Thé et al., 1991; de Thé et al., 2012). Les cellules LAP peuvent se différencier grâce à un traitement à l'ATRA (Acide Transrétinoïque), qui clive la protéine de fusion. Les thérapies basées sur l'utilisation d'ATRA permettent un taux de rémission proche de 90%, et une guérison complète allant de 60 à 70% en combinaison avec une chimiothérapie (Huang et al., 1988; Warrell et al., 1991; Degos et al., 1995; Mandelli et al., 1997; Slack, 1999). Cependant, le risque de rechute est considérable, et la maladie résiduelle peut être résistante à une seconde vague de traitement à l'ATRA et aux chimiothérapies (Tallman, 1998). Il a été montré que ces patients en rechute pouvaient être traités à l'ATO (Arsenic Trioxide), qui dégrade la protéine PML-RAR α , permettant une rémission durable (Shen et al., 1997; Soignet et al., 1998; Zhang et al., 2001). La combinaison des deux traitements permet même de guérir la plupart des patients, notamment grâce à l'élimination des cellules initiatrices de la leucémie (Lallemand-Breitenbach et al., 1999; Nasr et al., 2008; de Thé et al., 2012; Lallemand-Breitenbach et al., 2012). Malheureusement, l'ATO est associé à une toxicité chronique et une carcinogénéité importante (Goering et al., 1999).

Globalement, bien que les options thérapeutiques pour le traitement des LAMs soient nombreuses (Davis et al., 2018) (Figure 34), celles-ci sont souvent associées à de nombreux effets indésirables. De plus, le taux de rechute est important, à cause de la présence d'une maladie résiduelle (cellules qui persistent après le traitement) et de cellules souches cancéreuses, résistantes aux thérapies classiques. C'est la raison pour laquelle il est indispensable de proposer de nouvelles thérapies innovantes aux patients, afin d'offrir aux patients de meilleures chances de rémission complète.



3) Cellules souches leucémiques

Pendant des décennies, les thérapies cancéreuses étaient basées sur le modèle d'évolution clonale du cancer (modèle stochastique) (Greaves et Maley, 2012). Cette théorie réductionniste propose que les cellules tumorales dérivent de cellules normales qui subissent au moins 5 modifications génétiques et sont caractérisées par des marqueurs clés de la tumorigénèse (prolifération accrue, inhibition de l'apoptose et de la différenciation notamment) (Hanahan et Weinberg, 2011). Puis est apparu le concept des CSCs (Cellules Souches Cancéreuses), qui est quant à lui basé sur des observations montrant que le statut des différentes cellules cancéreuses dans une tumeur n'est pas le même, et que certaines cellules non-différenciées, rares, sont en haut de la hiérarchie permettant la maintenance de la population cellulaire dans une tumeur. Ces cellules partagent de nombreuses propriétés avec les cellules souches normales (Antoniou et al., 2013), notamment en termes de capacité d'auto-renouveau à un stade non-différencié. Leur seconde propriété est la division asymétrique, permettant la

production de différentes cellules filles à l'origine de la masse de cellules tumorales. Les CSCs sont capables d'initier la formation de tumeurs (Clevers, 2011; Kermi, 2016) (Figure 34). Cette théorie, longtemps controversée, est désormais admise au sein de la communauté scientifique. Elle permet de mieux comprendre les rechutes chez les patients atteints de cancers. En effet, en raison de leurs propriétés très particulières, les CSCs sont résistantes à la plupart des agents thérapeutiques qui ciblent la masse tumorale. Ainsi, les CSCs expriment de manière intrinsèque de nombreuses molécules qui les rendent résistantes aux chimiothérapies classiques. De plus, leur capacité à entrer en quiescence les protège des agents anticancéreux antimitotiques, qui ciblent les cellules en division. En fonction de leur nombre, elles peuvent être à l'origine d'une rechute plusieurs mois, voire années après le traitement initial. Bien que l'identité des CSCs soit encore mal comprise (rôle du microenvironnement, origine, facteurs épigénétiques) (Laplane et Solary 2017; Laplane et Solary, 2019), développer de nouvelles thérapies capables de cibler les CSCs et leur niche pourrait représenter un enjeu majeur dans le traitement des cancers, et permettre, peut-être, une véritable éradication de la maladie (Atlasi, Looijenga, et Fodde 2014).

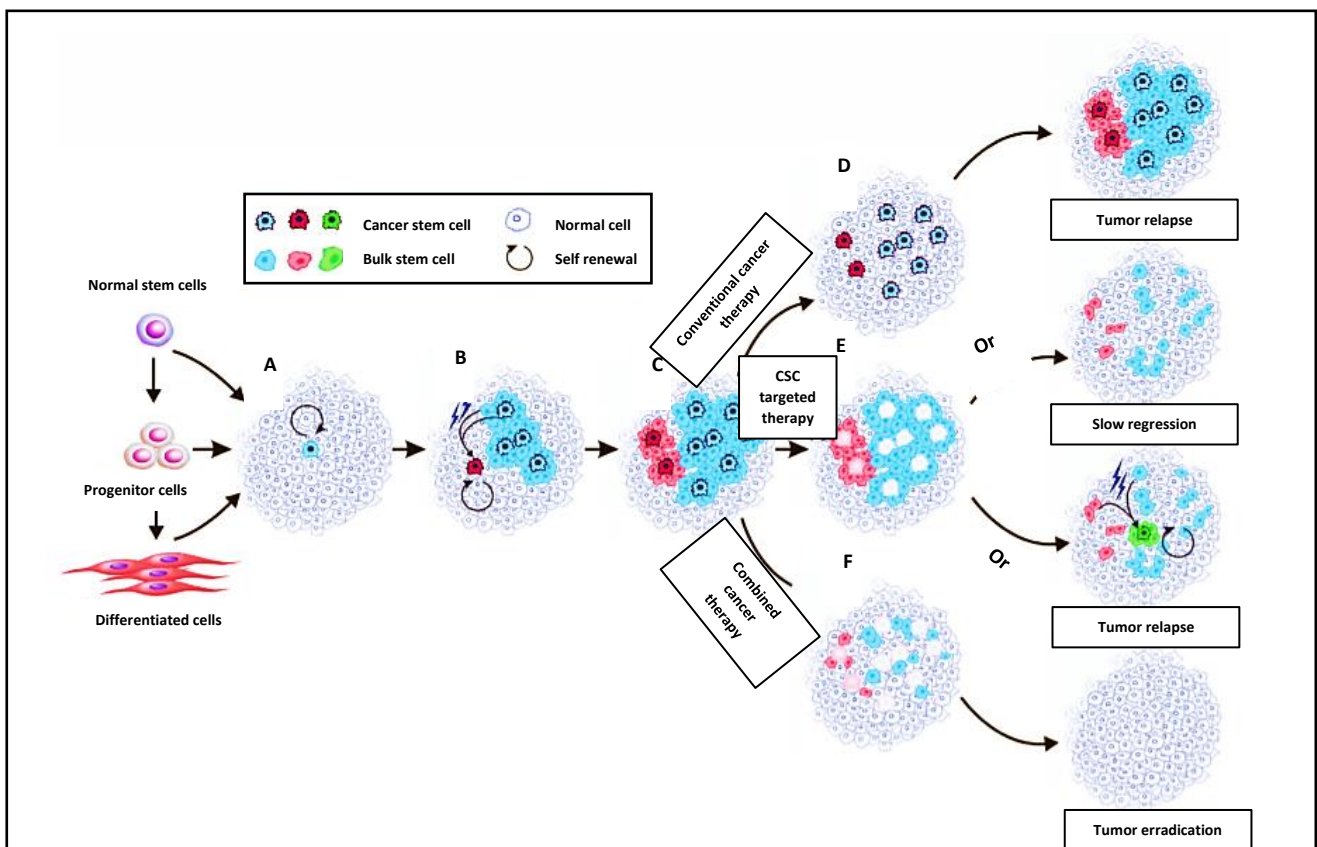


Figure 34. Schéma de la théorie actuelle des cellules souches cancéreuses.

Les CSCs sont seules capables d'auto-renouveau et de réplication illimitées, et responsables du maintien de la tumeur. Les CSCs ont une plasticité élevée, permettant la transformation de cellules souches normales en CSCs dans certains microenvironnements. (A) Une CSC se forme en raison de mutations dans une cellule souche normale, une cellule progénitrice ou une cellule différenciée (B) La CSCs formée se divise de manière asymétrique et génère des CSCs filles et des cellules différenciées qui forment le contingent de cellules tumorales et qui peuvent acquérir d'autres mutations. Au même moment, d'autres CSCs peuvent être formées à partir de CSCs mutées ou de cellules de la masse tumorale (C) Plusieurs types de CSCs coexistent et sont responsables de l'hétérogénéité observée dans la tumeur (D) Les chimiothérapies conventionnelles tuent les cellules de la masse tumorale mais laissent les CSCs résistantes intactes, menant à une rechute du cancer (E) Tuer les CSCs mène à une éradication graduelle de la tumeur, au cours de laquelle de nouvelles CSCs peuvent se former à partir de cellules du contingent tumoral mutées à l'origine de rechutes (F) Cibler à la fois les CSCs et les cellules de la masse tumorale pourrait résulter en l'éradication totale de la tumeur (Adapté de Kermi et al., 2016).

Dans le contexte particulier des leucémies, on parle de CSLs (Cellules Souches Leucémiques) (Dick 2005). L'échec de l'élimination des CSLs par les thérapies conventionnelles est considéré comme la cause principale à l'origine des rechutes, et le nombre des CSLs dans la moëlle osseuse des patients corrèle fortement avec un mauvais pronostic et une issue clinique défavorable. Ainsi, une forte proportion de cellules souches au moment du diagnostic est associée à une bonne prise de greffe dans des modèles murin PDX, une maladie résiduelle minimale (MRD) importante après la chimiothérapie ainsi qu'une courte survie du patient (Van Rhenen et al. 2005).

La complexité de cibler les CSLs (CD34+CD38-) est de les distinguer des CSHs normales (également CD34+CD38-) par l'identification de marqueurs immunophénotypiques de surface. En effet, les cellules leucémiques sont extrêmement hétérogènes (non seulement entre différents individus mais également au sein d'un même individu). Malgré ces difficultés, plusieurs marqueurs de surfaces ont été identifiés comme étant surexprimés dans les CSLs comparé aux CSHs normales, parmi lesquels CD131, CD47, TIM3, CD96, CLL-1, CD32, CD25 et IL1RAP (Jin et al. 2009; Jaiswal et al. 2009; Jan et al. 2011; Hosen et al. 2007; Moshaver et al. 2008; Saito et al. 2010; Askmyr et al. 2013). Des anticorps monoclonaux ciblant les fonctions de ces antigènes ont d'ores et déjà été testés et ont montré des résultats encourageants quant à l'élimination des cellules initiatrices de la leucémie dans des modèles pré-cliniques de LAM (Majeti 2011). Il existe également des thérapies basées sur des petites molécules qui agissent en inhibant des voies de signalisation (ex : NFκB) et des fonctions cellulaires (ex : phosphorylation oxydative) qui sont nécessaires uniquement à la survie et/ou la maintenance des CSLs (Reinisch et al. 2015). D'autres traitements agissent en induisant des stress (ex : stress oxydatif) qui compromettent préférentiellement l'activité des CSLs (Reinisch et al. 2015). Enfin, il a été montré que la maintenance du pool de CSLs dépend d'interactions spécifiques au sein de la niche hématopoïétique. La plupart des CSLs résident dans des niches endostéales ou vasculaires chimio-protectrices (Ishikawa et al. 2007). Les déloger de ce microenvironnement protecteur pourrait donc les sensibiliser aux chimiothérapies et garantir un succès à long-terme des traitements. Un exemple est le blocage de l'interaction des facteurs CXCL12 exprimé par les cellules de la niche et CXCR4 exprimé par les CSLs par des inhibiteurs de CXCR4 (Zeng et al. 2009). Toutes ces approches thérapeutiques semblent prometteuses, puisqu'elles permettraient d'attaquer les CSLs sans affecter les progéniteurs hématopoïétiques normaux.

4) Modèles murins d'étude de la pathologie

Comme pour le SS, des lignées cellulaires leucémiques ont été développées à partir du clone tumoral de patients (OCI-AML3, RS4-11, NB4, MV4-1, THP-1, U937) et sont utilisées par de nombreux laboratoires pour établir des modèles *in vivo* de xénogreffes (intraveineuses ou sous-cutanées) dans des souris CB-17 SCID ou NOD/SCID (Faderl et al., 2011; Lin et al., 2011; Suojanen et al., 2014). Bien qu'admis par la communauté scientifique, ces modèles ont le désavantage d'être basés sur des souris immunodéficientes, ce qui rend impossible leur utilisation dans les études qui concernent le système immunitaire.

Une alternative repose sur l'utilisation de modèles spontanés de LAM. Cependant, ceux-ci se développent de manière aléatoire, l'induction de la maladie étant généralement longue et peu reproductible. Une autre

possibilité est l'emploi de modèles basés sur l'induction de la maladie par des virus ou des transposons. Cette méthode est discutable, puisque l'induction d'une LAM chez l'humain par ces deux biais n'est pas connue. Enfin, la grande majorité des modèles knock-in de LAM reproduisent mal le phénotype observé chez les patients, car la plupart des événements oncogéniques sont nécessaires à la transformation totale des cellules (Gilliland, 2001; Dorrance et al., 2008; Zhang et al., 2012).

Il existe en revanche un modèle pré-clinique de LAP qui récapitule très fidèlement la maladie et mime les réponses aux traitements standards chez l'humain, dans un contexte immunocompétent (Brown et al., 1997; Lallemand-Breitenbach et al., 1999; Soignet et Maslak, 2004; Lallemand-Breitenbach et al., 2005). Il s'agit d'un modèle bien établi de transplantation syngénique de blastes leucémiques obtenus chez des souris transgéniques PML/RAR α . Chronologiquement, la maladie se développe en 3 phases : la phase d'établissement de la maladie (D0 à D10), la phase où la maladie est bien établie (D10 à D20) au cours de laquelle il est possible d'obtenir une guérison complète des souris par un traitement à l'ATRA, et la phase où la maladie est complètement établie (D20) au cours de laquelle la maladie devient incurable (point de non-retour), jusqu'à une mort certaine aux alentours de 35 jours après l'injection des blastes leucémiques. Comme chez l'humain, les souris présentent une baisse des plaquettes dans le sang, et meurent d'hémorragie interne.

OBJECTIFS DE LA THÈSE

Depuis plusieurs années, notre équipe a pour objectif la mise au point de nouvelles stratégies médicamenteuses pour le traitement de cancers solides et circulants. Un des axes de recherche principaux est l'étude et la modulation des interactions protéine-protéine dans le contrôle de l'apoptose. Une cible particulièrement prometteuse est la protéine AAC-11, qui est impliquée dans de nombreuses étapes clés de la tumorigénèse, et dont l'activité anti-apoptotique et pro-métastatique passe par des interactions avec des partenaires variés (dont la plupart restent inconnus à l'heure actuelle) (Rigou et al., 2009). La stratégie utilisée au laboratoire pour bloquer les effets d'AAC-11 dans le cancer est l'utilisation de peptides pénétrants LZDPs dérivés du domaine LZ d'AAC-11 (à savoir son domaine d'interaction protéine-protéine), et agissant comme inhibiteurs compétitifs de son activité. Plusieurs études réalisées au sein de l'équipe ont déjà montré le fort potentiel anti-tumoral du peptide RT53, qui correspond au domaine LZ d'AAC-11 dans son intégralité, lié à une séquence de pénétration appelée pénétratine (Rigou et al., 2009; Jagot-Lacoussiere et al., 2016). Ainsi, RT53 est capable d'inhiber l'interaction d'AAC-11 avec ses partenaires, et d'induire une mort cellulaire spécifique des cellules tumorales, à la fois *in vitro* et *in vivo*, notamment dans le contexte du mélanome. En termes de mécanistique, RT53 induit une membranolyse des cellules tumorales, mais pas des cellules normales, probablement en interagissant avec un partenaire présent uniquement à la surface des cellules cancéreuses, mais inconnu à l'heure actuelle. Pour finir, RT53 est capable d'induire une mort cellulaire immunogène, et semble être une stratégie immunothérapeutique prometteuse en tant que vaccin prophylactique dans ce modèle de cancer solide (Jagot-Lacoussiere et al. 2016).

Les objectifs de ma thèse sont les suivants : (1) Évaluer le potentiel thérapeutique des peptides LZDPs dans d'autres pathologies cancéreuses, et notamment des cancers circulants. Nous avons choisi le SS et les LAMs comme modèles d'étude principaux, car ce sont deux pathologies très agressives. Concernant le SS, une étape clé pour les études pré-cliniques est également la mise au point d'un modèle murin de la pathologie. (2) Étudier plus en détails le mécanisme d'action des peptides LZDPs, en particulier explorer notre hypothèse concernant l'interaction des peptides avec un partenaire membranaire spécifique des cellules tumorales (et si elle se confirme, mettre en évidence ce partenaire). (3) Poursuivre les études concernant les propriétés immunothérapeutique des peptides LZDPs, tout d'abord dans les cancers solides, puis dans les modèles hématologiques. (4) Optimiser la séquence des peptides LZDPs afin de les rendre plus courts et moins coûteux dans la perspective d'un développement clinique. Deux approches seront utilisées : l'optimisation de la séquence de pénétration et l'optimisation de la séquence active correspondant à des portions du domaine LZ d'AAC-11. Ces nouveaux peptides seront ensuite caractérisés.

RÉSULTATS

CHAPITRE 1 : Effet anti-tumoral et activation de l'immunité adaptative par le peptide RT53

I. Mort cellulaire immunogène induite par RT53 dans les cancers solides

D'après les résultats préliminaires obtenus dans le contexte du mélanome, RT53 est capable d'induire une mort cellulaire de type membranolytique, présentant les caractéristiques d'un MCI *in vitro* (relargage d'ATP et de HMGB1). *In vivo*, la vaccination des souris avec des cellules B16F10 exposées *in vitro* au peptide empêche la croissance de tumeurs B16F10 au niveau du site d'injection (Jagot-Lacoussiere et al. 2016).

Ce premier chapitre est consacré à la poursuite de nos travaux concernant les propriétés anti-tumorales et immunologiques du peptide RT53, dans un premier temps dans un autre type de cancer solide, le fibrosarcome. Dans ce modèle, nous avons confirmé la capacité de RT53 à induire une membranolyse spécifique des cellules tumorales, associée aux caractéristiques d'une MCI *in vitro* (exposition de la calréticuline, relargage de HMGB1 et d'ATP). De manière très intéressante, la vaccination de souris avec des cellules de fibrosarcomes pré-traitées *in vitro* avec RT53 bloque la croissance tumorale au site d'injection. De plus, l'injection intratumorale du peptide dans des souris présentant des tumeurs établies induit une régression de la tumeur, accompagnée d'une infiltration de cellules T et de la mise en place d'une réponse inflammatoire. Ces résultats, en lien avec les résultats précédemment obtenus dans le mélanome, suggèrent que RT53 peut induire une MCI dans des modèles de tumeurs solides et illustrent son usage potentiel en tant que nouvelle stratégie anti-tumorale et immunothérapeutique. Ce travail a fait l'objet d'une publication scientifique dans le journal PLOS One (**ARTICLE 1 « The anticancer peptide RT53 induces immunogenic cell death »**, Pasquereau-Kotula, [Habault](#) et al. 2018).

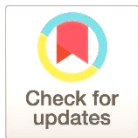
RESEARCH ARTICLE

The anticancer peptide RT53 induces immunogenic cell death

Ewa Pasquereau-Kotula¹, Justine Habault^{1,2}, Guido Kroemer^{3,4,5,6,7,8,9}, Jean-Luc Poyet^{1,2,10*}

1 INSERM UMRS1160, Institut Universitaire d'Hématologie, Hôpital Saint-Louis, Paris, France, **2** Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Paris, France, **3** Equipe 11 labellisée par la Ligue Nationale contre le Cancer, Center de Recherche des Cordeliers, Paris, France, **4** INSERM, Paris, France, **5** Université Paris Descartes/Paris V, Sorbonne Paris Cité, Paris, France, **6** Université Pierre et Marie Curie, Paris, France, **7** Metabolomics and Cell Biology Platforms, GRCC, Villejuif, France, **8** Pôle de Biologie, Hôpital Européen Georges Pompidou, AP-HP, Paris, France, **9** Karolinska Institute, Department of Women's and Children's Health, Karolinska University Hospital, Stockholm, Sweden, **10** c-Dithem, Inserm Consortium for Discovery and Innovation in Therapy and Medicine, Paris, France

* jean-luc.poyet@inserm.fr



OPEN ACCESS

Citation: Pasquereau-Kotula E, Habault J, Kroemer G, Poyet J-L (2018) The anticancer peptide RT53 induces immunogenic cell death. *PLoS ONE* 13(8): e0201220. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201220>

Editor: Wen-Lung Ma, China Medical University, TAIWAN

Received: March 16, 2018

Accepted: July 11, 2018

Published: August 6, 2018

Copyright: © 2018 Pasquereau-Kotula et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This study was funded by La Ligue Contre le Cancer (Grant No SR1775-38) to J-L.P. GK is supported by the Ligue contre le Cancer (équipe labellisée); Agence National de la Recherche (ANR) – Projets blancs; ANR under the frame of the ERA-Net for Research on Rare Diseases (E-Rare-2); Association pour la recherche sur le cancer (ARC); Cancéropôle Ile-de-France; Chancellerie des universités de Paris (Legs Poix);

Abstract

In recent years, immunogenic cell death (ICD) has emerged as a revolutionary concept in the development of novel anticancer therapies. This particular form of cell death is able, through the spatiotemporally defined emission of danger signals by the dying cell, to induce an effective antitumor immune response, allowing the immune system to recognize and eradicate malignant cells. To date, only a restricted number of chemotherapeutics can trigger ICD of cancer cells. We previously reported that a peptide, called RT53, spanning the heptad leucine repeat region of the survival protein AAC-11 fused to a penetrating sequence, selectively induces cancer cell death *in vitro* and *in vivo*. Interestingly, B16F10 melanoma cells treated by RT53 were able to mediate anticancer effects in a tumor vaccination model. Stimulated by this observation, we investigated whether RT53 might mediate ICD of cancer cells. Here, we report that RT53 treatment induces all the hallmarks of immunogenic cell death, as defined by the plasma membrane exposure of calreticulin, release of ATP and the exodus of high-mobility group box 1 protein (HMGB1) from dying cancer cells, through a non-regulated, membranolytic mode of action. In a prophylactic mouse model, vaccination with RT53-treated fibrosarcomas prevented tumor growth at the challenge site. Finally, local intratumoral injection of RT53 into established cancers led to tumor regression together with T-cell infiltration and the mounting of an inflammatory response in the treated animals. Collectively, our results strongly suggest that RT53 can induce *bona fide* ICD of cancer cells and illustrate its potential use as a novel antitumor and immunotherapeutic strategy.

Introduction

Most anticancer drugs have low therapeutic indices due to their toxicity to normal tissues. Moreover, drug resistance is a recurring problem, emphasizing the need for alternative

Adaptive and innovative Radiation Treatment FOR improving Cancer patients treatment outcomE (ARTFORCE), European Commission; European Research Area Network on Cardiovascular Diseases (ERA-CVD); Fondation Carrefour; Institut National du Cancer (INCa); Inserm; Institut Universitaire de France; LeDucq Foundation; the Laboratoires d'excellence (LabEx) Immuno-Oncology; the Recherche Hospitalo-Universitaire en santé (RHU) Torino Lumière; the Seerave Foundation; the Site de Recherche Intégré sur le Cancer (SIRIC) Stratified Oncology Cell DNA Repair and Tumor Immune Elimination (SOCRATE) and the SIRIC Cancer Research and Personalized Medicine (CARPEM). Additionally, Elior Group provided an unrestricted donation (i.e. no obligations stipulated from the donor) of an instrument to GK. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing interests: Elior Group provided an unrestricted donation (i.e. no obligations stipulated from the donor) of an instrument to GK. This does not alter our adherence to PLOS ONE policies on sharing data and materials.

strategies that selectively and efficiently kill the malignant cell population without affecting normal cells. Recent years have seen much interest in cancer therapies that do not only kill cancer cells but also stimulate, through the emission of danger signals from dying cells, anti-cancer immunosurveillance, hence inducing a systemic immune response in the host that can control, and even sometimes eliminate neoplastic cells [1–3]. This cell death routine, termed "immunogenic cell death" (ICD), is characterized by the release of damage-associated molecular patterns (DAMPs) and cytokines by the dying cells that mediate chemotactic and adjuvant-like effects, hence eliciting an immune response against tumor-associated antigens [4]. Such DAMPs are sequestered within various subcellular compartments under homeostatic conditions, yet are surface-exposed or released in the context of ICD. Thus, ICD is linked to the exposure of calreticulin and other endoplasmic reticulum proteins at the cell surface [5], as well as the release of ATP [6, 7] and of the non-histone chromatin-binding protein high-mobility group box 1 (HMGB1) [8, 9] into the extracellular milieu. Whereas ICD was originally described as an apoptotic, caspase-dependent form of cellular demise [1, 5], recent data have demonstrated that other forms of cell death, namely necroptosis and necrosis, can also be strongly immunogenic *in vivo*, resulting in long-lasting anti-cancer immunity [10]. Hence, necroptosis induced by chemical dimerization of receptor-interacting protein kinase-3 (RIPK3) or the death domain of Fas-associated death domain (FADD) results in ICD, with necroptotic cancer cells giving a immunogenic preparation in prophylactic tumor vaccination models [11, 12]. In the same line, the oncolytic Newcastle disease virus can induce necroptotic ICD of cancer cells, thus igniting a long-term, tumor-specific immunological memory in an orthotopic mouse model [13]. While freeze-thaw induced necrosis of cancer cells is known to be non-immunogenic [1, 12, 14], it has recently be documented that LTX-315, a synthetic, cationic peptide that permeabilizes the inner mitochondrial membrane, induces a necrotic cell death phenotype exhibiting the hallmarks of ICD [15–18]. Furthermore, when injected into tumors, LTX-315 induced a systemic protective immune response in immunocompetent mice [19–21]. Altogether, these data indicate that several pathways leading to necrosis can lead to ICD.

We previously demonstrated that a peptide comprising the heptad leucine repeat region of the survival protein AAC-11, which acts as a protein-protein interaction domain, fused to the cell-penetrating sequence penetratin selectively killed cancer cells *in vitro* and *in vivo*, while sparing normal cells [22–24]. This peptide, called RT53, can insert into the membranes of cancer cells through interaction with a yet-unknown AAC-11 protein partner. This binding probably allows RT53 to accumulate in cancer cell membranes where it forms pores due to its α -helix, membrane active structure [22]. Interestingly, RT53-treated B16F10 melanoma cells exhibited antitumor vaccination potential in a prophylactic model when mice were subsequently rechallenged with live B16F10 cells [22]. Here, we report that RT53 can induce all the hallmarks of ICD *in vitro* through a non-regulated, lytic mode of action. Interestingly, direct injection of RT53 into established MCA205 fibrosarcomas led to the complete regression of the tumors together with T-cell infiltration and an inflammatory response in an immunocompetent mouse model. These findings reveal the potential of RT53 as a novel antitumor and immunotherapeutic agent.

Material and methods

Peptides

All peptides were synthesized by Proteogenix (Strasbourg, France) and were > 95% pure as verified by HPLC and mass spectrographic analysis. Peptides sequences are the following:

RT53: RQIKIWFQNRRMKWKKAKLNAEKLDKDFKIRLQYFARGLQVYIRQLRLALQGKT

RT53M: RQIKIWFQNRRMKWKKAKLNAEKLDKDFKIRLQYFARGGQVYIRQGRLLALQGKT

The penetratin sequence is underlined.

Cell lines, chemicals and cytochemistry analysis

HU178 and Lu1205 cells were provided by Drs A. Marie-Cardine and N. Dumaz and genotyped to verify their authenticity. MRC-5 and U2OS cells were provided by Drs M. Dutreix and R. Fähræus, and were purchased from ATCC. HaCat cells were provided by Prof. N. Basset-Seguïn and their characteristics were described elsewhere [25]. Jurkat and HL-60 were purchased from The European Collection of Cell Cultures. Cells were cultivated either in DMEM or RPMI 1640 (Life Technologies), supplemented with 10% FBS and 1% penicillin/streptomycin. Cytochemistry analysis were performed as previously described [26, 27]. All chemicals were purchased from Sigma.

Lactate dehydrogenase release, ATP release and HMGB1 release

Release of lactate dehydrogenase (LDH) and ATP in the culture medium were assessed with the CytoTox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay and Enliten ATP Assay, respectively (Promega, Madison, WI, USA). HMGB1 release in the culture medium was assessed with the HMGB1 ELISA kit (IBL International, Hamburg, Germany).

Hemolysis assay

Mice blood was centrifuged at 2000 rpm for 10 min. Red blood cell pellets were washed five times with phosphate-buffered saline (PBS) and resuspended in normal saline. For each assay, 1×10^7 red blood cells were incubated with or without peptide (30 μ M) at 37°C for 1h. The samples were centrifuged at 4500 rpm for 5 min and the absorbance of the supernatant was measured at 540 nm. To determine the percentage of lysis, absorbance readings were normalized to lysis with 1% Triton X-100.

Electronic microscopy

Samples were fixed in 3% glutaraldehyde in phosphate buffer, pH 7.4 for 1 hour, washed, post-fixed with 1% osmium tetroxide in 0.1 M phosphate buffer and then gradually dehydrated in 70, 90 and 100% ethanol. After 10 min in a 1:2 mixture of epoxy propane and epoxy resin and 10 min in epon, samples were embedded in epoxy resin and polymerized at 60°C for 24 h. After polymerisation, ultrathin sections of 90 nm were cut with an ultra-microtome (Reichert ultracut S), stained with uranyl acetate and Reynold's lead and observed with a transmission electron microscope (JEOL 1011). Acquisition was performed with a Gatan Orius 1000 CCD camera.

Visualization of calreticulin-GFP aggregation

U2OS cells stably expressing a calreticulin-GFP fusion protein were described elsewhere [28]. Cells grown on coverslips were washed twice with PBS, fixed in PBS containing 4% paraformaldehyde and imaged using a Zeiss Axiovert 200 M microscope.

Western-blotting

Cells were lysed in 50 mM Tris/HCl pH 7.6, 150 mM NaCl containing 1% Triton-X100, 10 μ g/ml leupeptin, 10 μ g/ml aprotinin and 0.1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)

and clarified by centrifugation at 15,000 g for 15 min. Proteins were resolved by SDS PAGE and transferred onto a polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (Bio-Rad). For Western blot analysis, membranes were blocked in PBS, 0.1% Tween 20, 5% BSA for 1 h followed by incubation overnight at 4°C with one of the following rabbit polyclonal antibodies: anti-eIF2 α (cat #9722) or anti-phospho-eIF2 α (Ser51, cat #9721) (Cell Signaling). After being washed three times in PBS, 0.1% Tween 20, membranes were incubated for 1 h with goat anti-rabbit horseradish peroxidase-conjugated IgG (Sigma) in blocking solution. Membranes were then washed extensively in PBS, 0.1% Tween 20 and developed by using enhanced chemiluminescence detection reagents (Amersham Biosciences) in accordance with the manufacturer's protocol.

Ethics statement

This study has been carried out in accordance with the EC Directive 86/609/EEC for animal experiments and was approved by the Committee for Experimental Animal Studies of the University of Paris 7 Institute Board Ethics (Protocol Number: 2303.01). Animals were housed in vented animal cabinets under controlled temperature (22°C) and 12 h light-dark cycle under pathogen-free conditions and were allowed food and water *ad libitum*. Prior to the start of the experiments, mice were allowed to rest for 1 week following shipment. All efforts were made to minimize suffering. Animals were euthanized by cervical dislocation under anesthesia with 3% isoflurane. Female C57BL/6 mice were from ENVIGO (France).

Tumor vaccination assay

MCA205 cells were harvested using Versene (Invitrogen), washed in PBS and resuspended in 200 μ l of serum-free RPMI medium. The cells were then exposed to 30 μ M RT53 for 3h for cell death induction and the whole suspension of RT53-treated cells was injected subcutaneously (2×10^6 cells) into the left flanks of C57BL/6 mice ($n = 6$ per group). Eight days later, the mice were challenged subcutaneously on the right flank with 0.5×10^6 live MCA205 cells. Tumor growth on the challenge site was evaluated using a digital caliper and volume was calculated using the formula: Length x Width²/2. Animals were euthanized by cervical dislocation under anesthesia with 3% isoflurane when tumor size reached the ethical end point or were necrotic.

Intratumoral treatment

Mouse xenograft tumors were obtained by subcutaneous injection of 0.5×10^6 MCA205 cells into the right flanks of C57BL/6 mice ($n = 6$ per group). When tumors reached a size of 20–40 mm³, the mice received intratumoral injection of 300 μ g of RT53 or vehicle (normal saline) for three consecutive days. Tumor growth was evaluated using a digital caliper and volume was calculated using the formula: Length x Width²/2. Animals were euthanized by cervical dislocation under anesthesia with 3% isoflurane when tumor size reached the ethical end point or were necrotic. Following anesthesia, xenografts were removed for immunohistochemical staining and cytotoxicity analysis.

Histological analysis

Histological Tumors were fixed in 4% neutral buffered formalin and embedded in paraffin. Sections (4 μ m) were stained with hematoxylin-eosin (H&E) and subjected to microscopic analysis. To investigate T cells infiltration, sections were stained with an anti-CD3 antibody (Dako, ref: A0452) or rabbit IgG isotype control. Histological analysis was performed at the HistIM facility of Cochin Institute (Paris, France). Slides were imaged using a Lamina

multilabel slide scanner (Perkin Elmer). For quantitative analysis of T cells infiltration, six different and noncontiguous representative fields (40x magnification) were randomly selected for each experiment and their areas were quantified for immunoreactive CD3.

RNA extraction and real-time PCR

RNA was extracted from tumors using the Qiagen Rneasy Mini kit, according to the manufacturer's instructions, and was reverse transcribed using the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) using random hexamers. Quantitative PCR was performed with the StepOne real-time PCR system (Applied Biosystems) using Perfecta SYBR Green FastMix, ROX (Quanta Biosciences, Beverly, MA, USA) and the following primers: CCL2, F 5' - CTCAGCCAGATGCAGTTAACG-3', R 5' - GCTGCTGGTGATCCTCTTGT-3'; CXCL10, F 5' - CCTGCCACGTGTTGAGAT-3', R 5' - TGATGGTCTTAGATTCCGGATTC-3'; GAPDH, F 5' - CATGTTCCAGTATGACTCCACTC-3', R 5' - GGCCTCACCCATTTGATGT-3'. Melting curve analyses were performed to verify the amplification specificity. Relative quantification of gene expression was performed according to the comparative CT ($\Delta\Delta CT$) method using StepOne Software 2.0 (Applied Biosystems).

ELISA analysis of plasma

Blood from C5BL/6 mice with tumor size of 20–40 mm³ was harvested at the selected time points following single intratumoral injection of 300 µg of RT53 or vehicle (normal saline). *In vivo* secretion of IL-1β and IL-6 in the serum was assessed using the Mouse IL-1β/IL-1F2 Quantikine ELISA Kit and Mouse IL-6 Quantikine ELISA Kit, respectively, per the manufacturer's instruction (R&D System).

Statistical analysis

Student's *t* test was used to test for statistical significance of the differences between the different group parameters. *p* values of less than 0.05 was considered statistically significant.

Results

RT53 induces rapid cancer cells necrosis

We first investigated which cell death modality is induced by RT53. Kinetic experiments indicated that, when added to various human or mouse cancer cell lines, RT53 induced the rapid loss of plasma membrane integrity, as detected by the release of the intracellular enzyme lactate dehydrogenase (LDH) (Fig 1A). However, no cytotoxic effects were observed when RT53 was tested on the non-malignant cells HaCat and MRC-5 (Fig 1A). In line with our previous observations [22], a mutant peptide (RT53M) in which leucines 384 and 391 (AAC-11 numbering) were substituted by alanines did not affect the integrity of the plasma membrane (Fig 1B). Importantly, a hemolytic assay revealed that RT53 treatment did not cause erythrocyte lysis (Fig 1C), ruling out an unspecific detergent-like effect for RT53 as sometimes observed for amphiphilic peptides [29]. Altogether, these data indicate that the RT53-induced plasma membrane permeabilization is specific to cancer cells and appears to occur *via* a defined structural target(s). We next further evaluated the mode of action underlying RT53 cytotoxic activity by means of transmission electron microscopy analysis. Observation of U2OS osteosarcoma cells treated with RT53 revealed an obvious necrotic morphology, with a disrupted plasma membrane and subsequent release of intracellular materials (Fig 2A). Interestingly, nuclei from RT53-treated cells appeared largely intact, without evidence of chromatin condensation, indicating the RT53-mediated cell death does not involve a direct form of conventional apoptosis

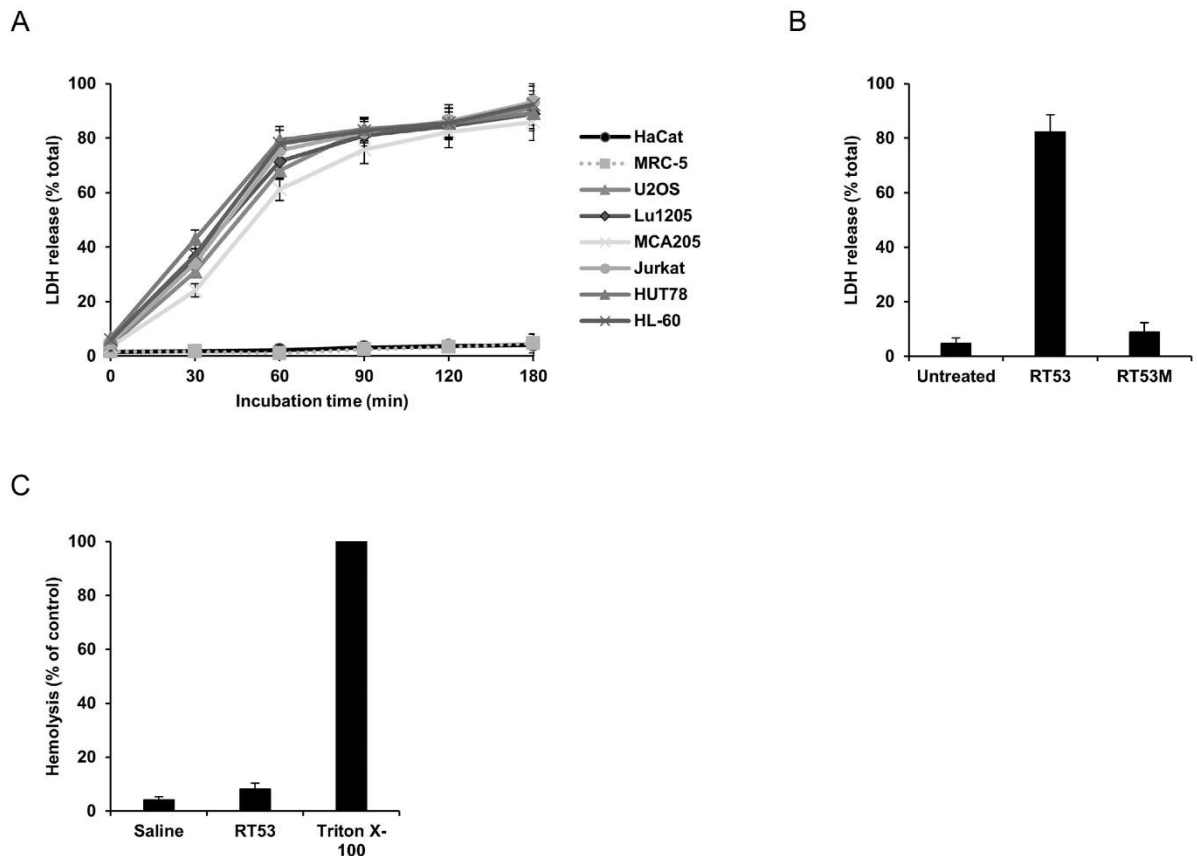


Fig 1. RT53 induces rapid cancer cells membranolytic. (A) Non-malignant (HaCat and MRC-5) and cancerous (U2OS, Lu1205, MCA205, Jurkat, HUT78 and HL-60) cells were treated with 20 μ M of RT53. Plasma membrane permeability was evaluated at the designed time points by measuring extracellular LDH into the culture medium. The obtained values were normalized to those of the maximum LDH released (completely lysed) control. Data are means \pm s.e.m. ($n = 3$) (B) U2OS cells were treated with 20 μ M of RT53 or the control peptide RT53M for 3 h. Plasma membrane permeability was evaluated as in (A). (C) Mice red blood cells were incubated with 20 μ M of RT53. Released hemoglobin was detected by densitometry at 540 nm. Hemoglobin release by cells treated with 1% Triton X-100 was used as 100% lysis control.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201220.g001>

but rather a membranolytic mode of action. In line with this hypothesis, the pan-caspase inhibitor Z-VAD-fmk failed to prevent membrane permeabilization by RT53, as assessed by the release of lactate dehydrogenase (LDH) into the culture medium (Fig 2B). Regulated necrosis includes multiple cell death routes such as necroptosis or mitochondrial permeability transition pore (MPTP)-mediated necrosis. However, inhibition of necroptosis by necrostatin-1 or blockade of the MPTP by cyclosporin A failed to interfere with RT53-mediated loss of membrane integrity (Fig 2B). Therefore, these results indicate that the cytotoxic effects of RT53 toward cancer cells occur mainly through a non-regulated form of necrosis.

RT53 elicits ICD *in vitro*

As recent evidence suggests that necrosis may be immunogenic [15–21], we investigated whether RT53 treatment would be able to induce the hallmarks of ICD, which include the surface exposure of the endoplasmic reticulum (ER) chaperone calreticulin (CRT) and the release of ATP and HMGB1 [30]. Surface exposure of CRT by tumor cells constitutes a major checkpoint of ICD, because CRT favors their engulfment by dendritic cells [5, 31]. CRT aggregation

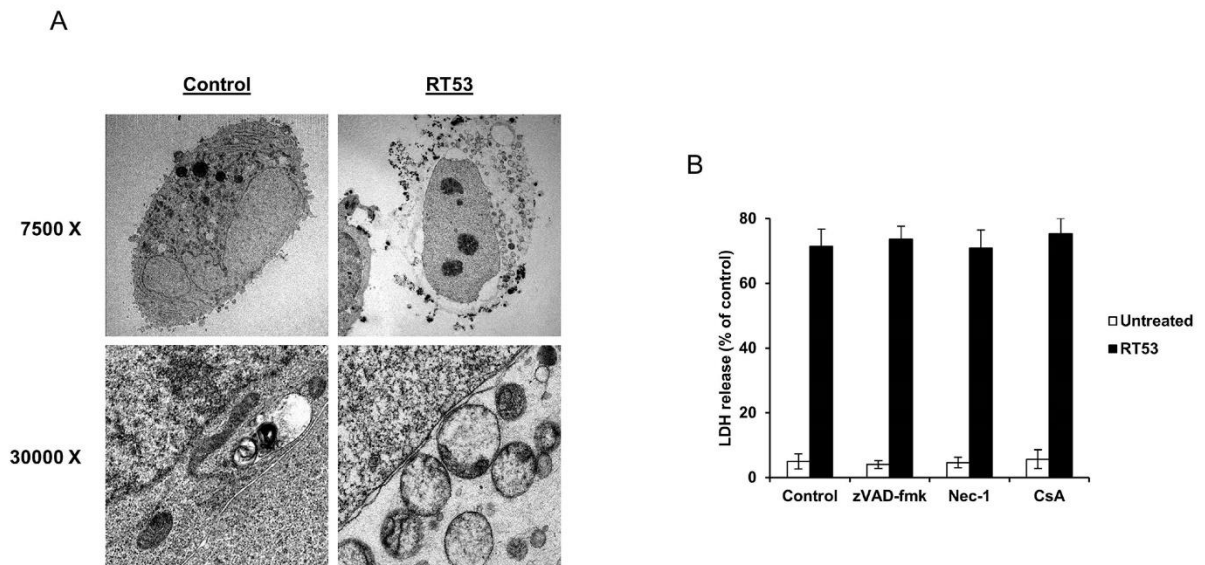


Fig 2. RT53 induces unregulated necrotic cell death. (A) Ultrastructural analysis of RT53-mediated cell death. U2OS cells were left untreated (Control) or exposed to 15 μ M of RT53 for 30 min. Cells were then analyzed by transmission electron microscopy following osmium tetroxide staining. (B) U2OS cells were exposed to 20 μ M of RT53 in the presence or absence of 50 μ M zVAD-fmk, 50 μ M Necrostatin-1 (Nec-1) or 100 mM cyclosporin A (CsA) for 1 h. Necrotic cell death was monitored by lactate dehydrogenase (LDH) release from cells into the culture medium. The obtained values were normalized to those of the maximum LDH released (completely lysed) control. Data are means \pm s.e.m. ($n = 3$).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201220.g002>

has been reported to precede its plasma membrane exposure [32]. Using a defined biosensor model [28, 33] of U2OS cell line stably expressing a CRT-green fluorescent protein (GFP), we observed the redistribution of the CRT-GFP fusion protein from a near-to-diffuse to a granular pattern in response to RT53 (Fig 3A). Of note, whereas CRT exposure induced by chemotherapeutic agents such as mitoxantrone requires caspase-8 activation [34], the pan-caspase inhibitor zVAD-fmk failed to affect calreticulin aggregation induced by RT53. As an internal control, zVAD-fmk efficiently prevented CRT-GFP aggregation induced by the ICD inducer mitoxantrone (Fig 3A). Moreover, whereas chemotherapy-driven CRT translocation relies on phosphorylation of the eukaryotic transcription factor eIF2 α [5], RT53 exposure did not induce phosphorylation of eIF2 α (Fig 3B). Therefore, our data indicate that in contrast to the “canonical” (chemotherapy-elicited) CRT pathway, RT53 can trigger CRT exposure in a caspase- and eIF2 α -independent pathway. We next tested whether RT53 would stimulate the release of the two DAMPs HMGB1 and ATP, two obligatory signals of immunogenicity. As shown in Fig 3C, RT53 treatment of U2OS cells triggered the release of HMGB1 into the culture medium, as detected by ELISA assay, in a dose-dependent manner. Moreover, ATP-bioluminescence assays revealed that RT53 treatment resulted in a dramatic increase of extracellular ATP (Fig 3D), demonstrating that RT53 can promote the secretion of both DAMPs by cancer cells. Taken together, these results indicate that RT53 can induce all surrogate markers of ICD *in vitro* in an apoptosis-independent manner.

RT53-treated cancer cells or intratumoral RT53 administration have antineoplastic effects *in vivo*

Since RT53 induces all major characteristics of ICD *in vitro*, we next assessed the antitumor effects of the peptide using well-characterized syngeneic tumor models. In a first experiment,

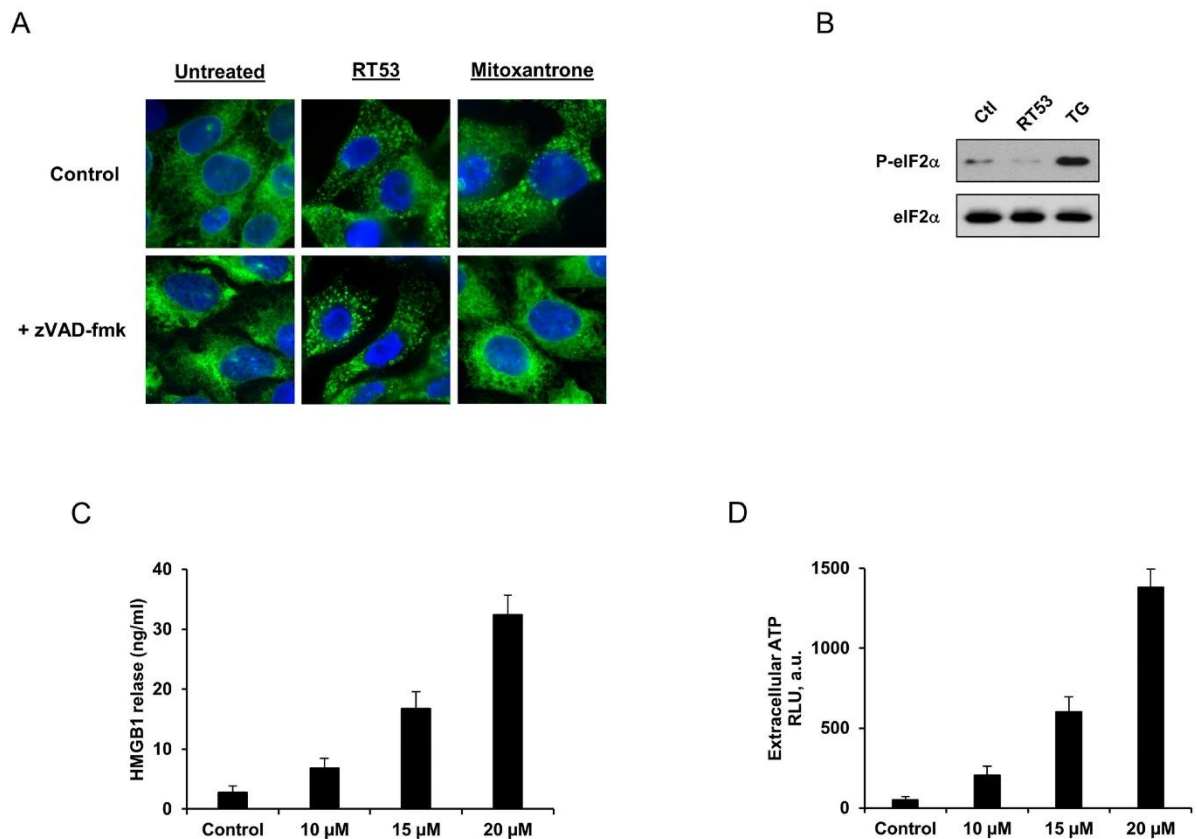


Fig 3. RT53 triggers calreticulin exposure as well as the release of HMGB1 and ATP. (A) U2OS cells stably expressing CRT-GFP were treated with 10 μM of RT53 or 1 μM mitoxantrone for 6 h, in the presence or absence of zVAD-fmk. Cells were then, fixed, stained for DNA, and examined by fluorescence microscopy. (B) U2OS cells were left untreated or treated with 10 μM of RT53 or 200 nM thapsigargin (TG) as a positive control for 6 h. Cell lysates were analyzed by Western blot for phosphorylated and total protein eIF2α. (C) U2OS cells were left untreated or exposed to increasing concentrations of RT53 for 3h. Extracellular HMGB1 was then measured in the culture supernatant. Data are means±s.e.m. ($n = 3$). (D) U2OS cells were left untreated or exposed to increasing concentrations of RT53 for 3h. Extracellular ATP was then measured in the culture supernatant. Data are means±s.e.m. ($n = 3$).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201220.g003>

we evaluated the ability of RT53-treated cells to induce anti-tumor immunity in a prophylactic tumor vaccination model. As shown in Fig 4A, immunization of C57BL/6 mice by subcutaneous injection of MCA205 fibrosarcoma cells treated *in vitro* by RT53 subsequently resulted in drastically reduced tumor growth at the challenge site compared to control mice. This result thus strongly suggests that RT53 treatment of cancer cells can induce an adaptive immune response *in vivo*. To further evaluate the ability of RT53 to elicit an antitumor response, we investigated the therapeutic effect of direct administration of the peptide to tumors. For that purpose, RT53 was injected once a day for three consecutive days into established MCA205 fibrosarcomas growing in C57BL/6 mice. As shown in Fig 4A, intratumoral administration of RT53 resulted in a nearly complete suppression of tumor growth. Notably, complete tumor regression was observed in 75% of the mice receiving the treatment (Fig 4B). Importantly, no weight loss or obvious clinical symptoms were observed in the treated animals (not shown). Therefore, these data indicate that RT53 can both act locally and as an immunogenic cytotoxic compound *in vivo*.

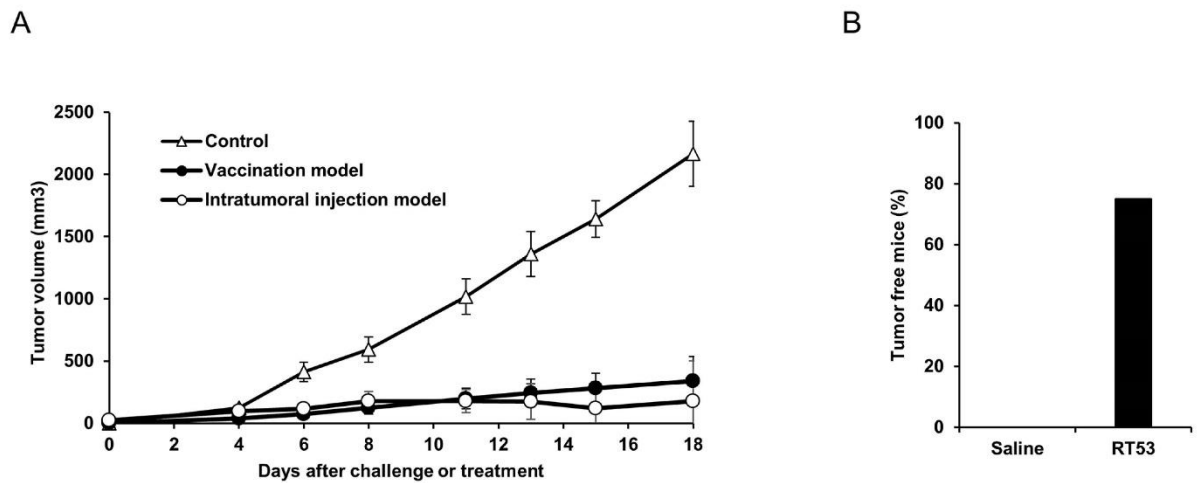


Fig 4. RT53 treatment prevents tumor growth. (A) Closed circle: RT53-treated cancerous cells induce anti-tumor immunogenicity in a prophylactic tumor vaccination assay. Syngeneic C57BL/6 mice were injected s.c. on the left flank with 2×10^6 MCA205 cells treated *in vitro* with RT53. Eight days later, the mice were challenged subcutaneously on the right flank with 0.5×10^6 live MCA205 cells and tumor growth was monitored. ($n = 6$ per group). Open circles: effect of intratumoral injection of RT53 on the growth of established tumors. Palpable MCA205 tumor on C57BL/6 mice were injected intratumorally with 300 μg RT53 once a day for 3 days. Open triangles represent the growth in saline-treated controls. Tumor growth was monitored on day 1 of injections (left panel). ($n = 6$ per group). (B) Percentage of tumor-free mice at day 21.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201220.g004>

Intratumoral administration of RT53 induces massive tumor necrosis, T cell infiltration and an inflammatory response

To investigate the underlying mechanisms behind the antitumor effects of RT53, we first tested whether intratumoral injection of RT53 could induce an inflammatory response. For that purpose, plasma from RT53-treated or control animals was analyzed for IL-1 β and IL-6 levels. As shown in Fig 5A, both IL-1 β and IL-6 levels sharply increased 4 h following intratumoral RT53 injection compared to controls. This increase in cytokine levels was not persistent, as no differences in IL-1 β and IL-6 levels were noted from 24 h up to 96 h following RT53 administration (Fig 5A). In order to assess histological changes resulting from local injection with RT53, sections of MCA205 tumors treated with a single intratumoral administration of normal saline or RT53 and harvested 24 h or 96 h following treatment were analyzed. Hematoxylin–eosin staining revealed dramatic hemorrhagic tumor necrosis in RT53-treated tumors, whereas tumors injected with normal saline exhibited minimal necrosis. (Fig 5B top and S1 Fig). As observed for the lytic peptide LTX-315 [17], tumor necrosis was clearly noticeable 24 h post injection. Interestingly, immunohistochemical analysis revealed massive infiltration by CD3⁺ T lymphocytes in the RT-53 treated tumors 96 h post injection, while control tumors contained a rather low number of T cells (Fig 5B middle, Fig 5C and S2 Fig). To evaluate changes in the tumor microenvironment induced by RT53 injection that could explain the increased number of T lymphocytes, we used real-time RT-PCR of tumor extracts to analyze the relative expression of the pro-inflammatory chemokine ligands CCL2 and CXCL10. As shown in Fig 5D, the levels of both CCL2 and CXCL10 transcripts were markedly increased upon RT53 intratumoral injection compared to saline-injected tumors. Altogether, these results indicate that, in addition to the local immune response, intratumoral RT53 injection triggers a transient systemic inflammatory response accompanied by the elevation of circulating cytokines.

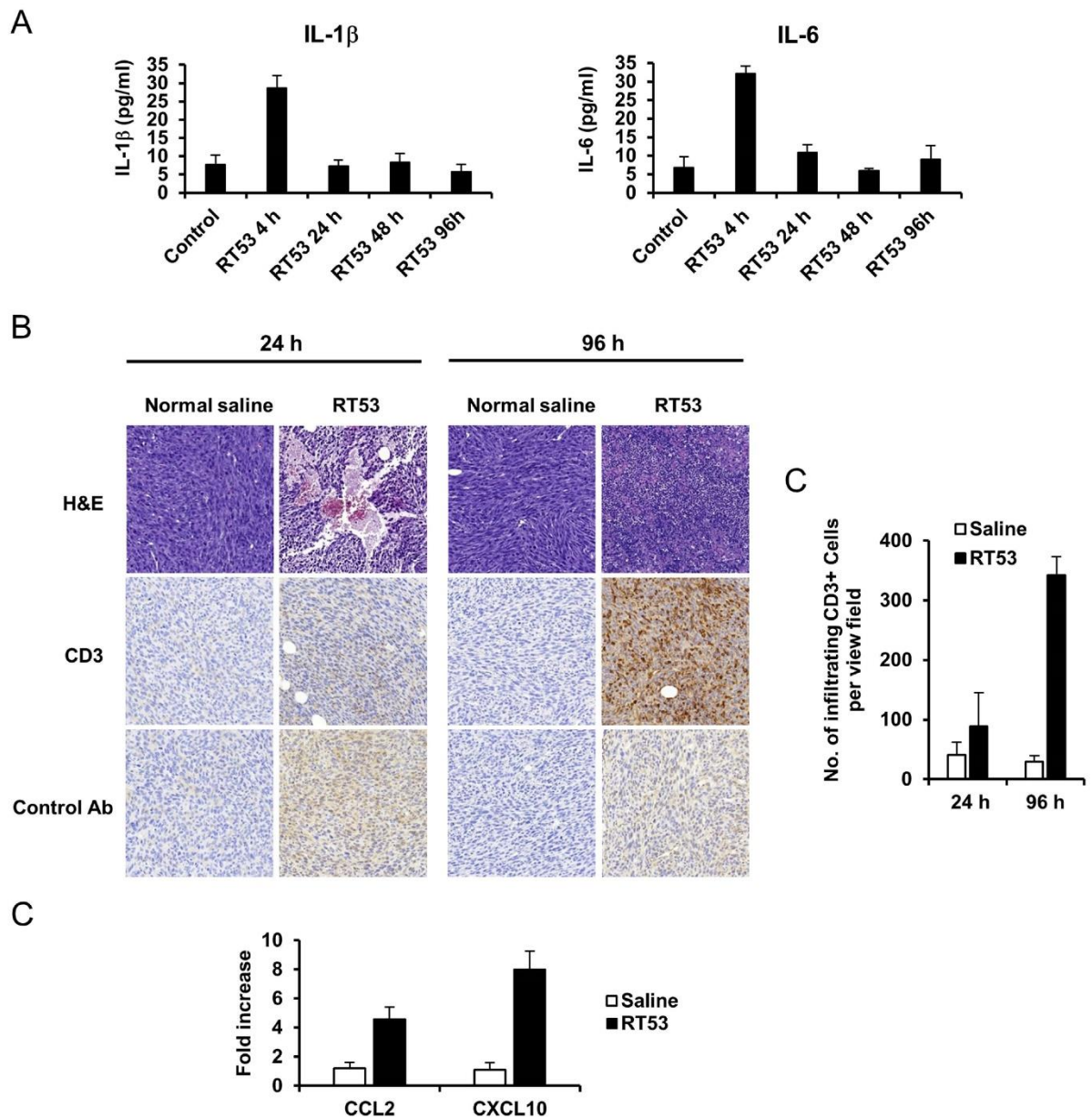


Fig 5. Intratumoral administration of RT53 induces tumor necrosis, immune cells infiltration and inflammation. (A) Plasma was harvested 4, 24, 48 or 96 h following single intratumoral injection of normal saline (control) or 300 μ g RT53 in normal saline and IL-1 β (left panel) as well as IL-6 (right panel) levels were estimated using ELISA. Data from 3 animals are presented for each time point as mean \pm SEM. (B) Established MCA205 fibrosarcomas were surgically excised 24 h or 96 h post intratumoral injection with normal saline (control) or 300 μ g RT53 in normal saline and sections subjected to H&E staining (top) or stained for CD3 or rabbit IgG isotype control (middle and bottom, respectively). (C) Number of infiltrating CD3-positive cells per view field following CD3 staining. Data from 3 animals are presented as mean \pm SEM. (D) Relative transcription of CCL2 and CXCL10 (normalized to GAPDH) as determined by real-time RT-PCR on samples of tumors 24 h after RT53 or normal saline injection. Values of CCL2 and CXCL10 are represented as fold change relative to untreated tumors, set to 1 (mean \pm SEM; n = 3).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201220.g005>

Conclusion

A number of mechanisms have been proposed to account for the failure of chemotherapies in cancer patients. Beside the development of drug resistance by malignant cells, tumors can also escape recognition and clearance by the immune system through the activation of multiple immunosuppressive mechanisms [35]. Recent observations have revealed that, among the cytotoxic chemotherapeutic agents used in clinic, some were able to induce an immunogenic form of apoptosis as the succumbing cancer cells could induce a potent antitumor immune response [36]. This so-called immunogenic cell death (ICD) is now known to increase the immunogenicity of dying cancer cells owing to the release of endogenous danger signals or damage-associated molecular patterns (DAMPs) [37] that alert the innate immune system, resulting in an effective antitumor immune response. As the immune system plays a fundamental role in long-term tumor control, great efforts are currently undertaken to elaborate chemotherapeutic approaches that can elicit immunogenic cancer cell death. We have previously reported that the penetrating peptide RT53, based on the fusion of the heptad leucine repeat region of the survival protein AAC-11 (residues 363–399) and the penetrating sequence, induces cancer cell death *in vitro* and inhibits melanoma tumor growth in a xenograft mouse model [22]. In the present study, we demonstrate that RT53 selectively induces necrosis of cancer cells and that this necrotic cell death is immunogenic. RT53-induced cancer cells death occurred through an apoptosis-independent, membranolytic mechanism, as evidenced by the release of the cytoplasmic enzyme lactate dehydrogenase (LDH) as well as transmission electron microscopy. Here, a necrotic phenotype with no morphological signs of apoptosis, including nuclear condensation, was clearly evident. Accordingly, blockage of apoptosis by means of caspases inhibition failed to prevent the RT53-induced killing of cancer cells. Further experiments revealed that RT53 did not induce a typical regulated necrosis, as neither necrostatin-1, which inhibits receptor-interacting protein kinase (RIPK) 1-mediated necroptosis, nor cyclosporine A, which inhibits mitochondrial permeability transition-mediated regulated necrosis, interfered with cell death induction by RT53. Therefore, our results indicate that RT53-induced necrosis occurs in a passive manner, upon plasma membrane destruction. Our previous results indicate that RT53 accumulates within the plasma membrane of cancer cells, but not to that of non-cancerous cells [22]. Moreover, we show here that RT53 failed to lyse erythrocytes or normal cells, indicating that RT53-mediated cancer cells necrosis does not merely result from an unspecific, detergent-like membrane permeabilization. Although we cannot exclude a role for the physicochemical characteristics of cancer cells membranes, we hypothesize that RT53 targets a yet unknown cancer cell-specific membrane-bound partner (s), as observed for several described cancer cell-specific, membranolytic peptides [38–40]. This binding likely increases the local concentration of RT53, resulting in membrane lysis, owing to its membrane active, alpha helix, structure [22]. This selective and rapid tumor membrane disruptive behavior is consistent with other investigations that have examined the mechanism of action of other pore forming anticancer peptides [41]. Interestingly, our study indicates that RT53-induced cell death is accompanied by all the hallmarks of ICD *in vitro*, namely the translocation of calreticulin to the cell surface and the extracellular release of HMGB1 and ATP. These three DAMPs act as potent immunostimulants and are known to possess a key role in the immunogenicity of nearly all ICD inducers [2]. Whereas HMGB1, which is a chemotactic for immune cells and elicits adaptive immunity, and ATP, which acts as a “find me” signal, can be passively released from damaged cells [42, 43], calreticulin exposure on dying cells usually is the result of a complex signaling process [44]. Surface-exposed calreticulin is a crucial DAMP in ICD, as it dictates tumor specific immunity, allowing the recognition and engulfment of tumor cells by dendritic cells [5, 31]. Noteworthy, unlike the

“canonical” (chemotherapy-induced) calreticulin exposure pathway, RT53-induced calreticulin exposure was found to be both caspase- and eIF2 α -independent, similar to what observed with photodynamic therapy and high hydrostatic pressure induction of ICD [45, 46]. Therefore, our results indicate that the passive cell death caused by RT53 is fully able to allow the activation of the key DAMPs *in vitro*.

Importantly, RT53 treatment appears to induce *bona fide* ICD as RT53-exposed cells could serve as potent immunizers in a vaccination assay. Indeed, inoculation of RT53-killed fibrosarcomas cells into syngenic, immunocompetent mice resulted in a drastic reduction of tumor growth at the challenge site, when using MCA205 living cells. These results are in line with those obtained using another experimental animal model [22] and suggest that RT53 does mediate anti-tumor immunity *in vivo*. To further assess the anticancer properties of RT53, we evaluated the effects of intratumoral administration of the peptide. Interestingly, the majority of treated animals displayed a complete suppression of tumor growth. Based on our findings that RT53 induces tumor cell necrosis *in vitro*, we hypothesized that the tumor growth inhibition we observed *in vivo* upon local RT53 injection also occurred by this mechanism. Indeed, histological examinations revealed that administration of RT53 caused massive hemorrhagic necrosis, indicating that direct injection of RT53 into tumors results in total cell killing and tumor growth blockade and regression. Moreover, local injection of RT53 was followed by an increased infiltration of T cells, suggesting that the direct oncolytic effect of RT53 leads to the generation of a more immunogenic environment that promotes the infiltration of lymphocytes. Immune cells infiltration into tumors is governed by chemotaxis, with the local chemokine network influencing the numbers and types of lymphocytes recruited [47]. In particular, the chemokines CCL2, CCL3, CCL4, CXCL9 and CXCL10 are known to be potent chemoattractants for tumor-infiltrating T cells [48] and increased expression of these chemokines has been shown to be associated with infiltration of tumor-specific T cells in cancer patients and various mice models of cancer [47–54]. Interestingly, our data demonstrate an upregulation of the genes encoding CCL2 and CXCL10 in tumors following RT53 injection. Therefore, our data suggest that enhanced production of these chemokines may explain the observed increased infiltration of T cells into the RT53-treated tumors. Several cell types within the tumor microenvironment can be involved in the secretion of specific chemokines, including the tumor cells themselves, macrophages, endothelial cells or the recruited T cells [48, 55]. It will be of interest to characterize the cell types producing the detected chemokines, as well as the tumor-infiltrating T cell populations upon RT53 injection. Intratumoral administration of RT53 led to a marked increase of the cytokines IL-1 β and IL-6 levels in the circulation 4 h post injection. The upregulation of these cytokines indicates that local injection of RT53 stimulates pro-inflammatory processes and the systemic activation of the immune system.

Our results are reminiscent to those obtained when studying the anti-cancer effects of another membranolytic peptide, LTX-315. Like RT53, LTX-315 induces an unregulated form of necrosis that can lead to the release of DAMPs *in vitro* and the induction of a potent immune response in different preclinical tumor models [16–19, 21, 56, 57]. As accidental necrosis of cancer cells provoked by freeze-thawing or boiling fails to induce a potent immune response *in vivo* [1, 11], our results, combined to those obtained with LTX-315, indicate that the induction of ICD obtained with these oncolytic peptides is not a consequence of the mere spillage of intracellular components into the extracellular milieu, and that ICD is not restricted to immunogenic apoptosis. However, more work is still needed to characterize the precise molecular mechanisms that underlie RT53-induced ICD. In particular, it will be interesting to explore the mechanisms through which intratumoral administration of RT53 shifts the tumor microenvironment towards local immunostimulation.

In recent years, the concept that curative cancer therapy requires the activation of an antitumor immune response by the dying cancer cells has emerged [2]. To date, only few chemotherapeutics can trigger ICD. Therefore, our results indicate that RT53 might constitute a promising immunotherapeutic agent.

Supporting information

S1 Fig. Intratumoral administration of RT53 induces tumor necrosis. Established MCA205 fibrosarcomas were surgically excised 24 h or 96 h post intratumoral injection with normal saline (control) or 300 μ g RT53 in normal saline and sections subjected to H&E staining.
(TIF)

S2 Fig. Intratumoral administration of RT53 induces immune cells infiltration. Established MCA205 fibrosarcomas were surgically excised 24 h or 96 h post intratumoral injection with normal saline or 300 μ g RT53 in normal saline and sections subjected to CD3 staining. For quantitative analysis of T cells infiltration, 6 different and noncontiguous representative fields (40x magnification) were randomly selected for each experiment and their areas quantified for immunoreactive CD3.
(TIF)

S1 File. NC3Rs ARRIVE guidelines checklist.
(PDF)

Acknowledgments

We thank Prof. Nicole Basset-Seguin and Drs. Anne Marie-Cardine, Marie Dutreix, Nicolas Dumaz and Robin Fähræus for providing cell lines and Dr Laurence Malbert-Colas for helpful technical assistance. We gratefully thank the coworkers of the Animal Experimental Facilities and the Imagery Department of the IUH as well as the Electron Microscopy Platform of the Institut Cochin (Paris, France).

Author Contributions

Conceptualization: Ewa Pasquereau-Kotula, Justine Habault, Guido Kroemer, Jean-Luc Poyet.

Data curation: Ewa Pasquereau-Kotula, Justine Habault.

Formal analysis: Ewa Pasquereau-Kotula.

Funding acquisition: Jean-Luc Poyet.

Investigation: Ewa Pasquereau-Kotula, Justine Habault, Jean-Luc Poyet.

Methodology: Ewa Pasquereau-Kotula, Justine Habault, Guido Kroemer, Jean-Luc Poyet.

Project administration: Jean-Luc Poyet.

Resources: Ewa Pasquereau-Kotula, Guido Kroemer.

Supervision: Jean-Luc Poyet.

Validation: Ewa Pasquereau-Kotula, Justine Habault, Jean-Luc Poyet.

Visualization: Ewa Pasquereau-Kotula, Justine Habault.

Writing – original draft: Jean-Luc Poyet.

Writing – review & editing: Ewa Pasquereau-Kotula, Justine Habault, Guido Kroemer.

References

- Casares N, Pequignot MO, Tesniere A, Ghiringhelli F, Roux S, Chaput N, et al. Caspase-dependent immunogenicity of doxorubicin-induced tumor cell death. *The Journal of experimental medicine*. 2005; 202(12):1691–701. <https://doi.org/10.1084/jem.20050915> PMID: 16365148.
- Kroemer G, Galluzzi L, Kepp O, Zitvogel L. Immunogenic cell death in cancer therapy. *Annu Rev Immunol*. 2013; 31:51–72. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032712-100008> PMID: 23157435.
- Vacchelli E, Aranda F, Eggermont A, Galon J, Sautes-Fridman C, Cremer I, et al. Trial Watch: Chemotherapy with immunogenic cell death inducers. *Oncoimmunology*. 2014; 3(1):e27878. <https://doi.org/10.4161/onci.27878> PMID: 24800173.
- Fuchs Y, Steller H. Live to die another way: modes of programmed cell death and the signals emanating from dying cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2015; 16(6):329–44. <https://doi.org/10.1038/nrm3999> PMID: 25991373.
- Obeid M, Tesniere A, Ghiringhelli F, Fimia GM, Apetoh L, Perfettini JL, et al. Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. *Nat Med*. 2007; 13(1):54–61. <https://doi.org/10.1038/nm1523> PMID: 17187072.
- Ghiringhelli F, Apetoh L, Tesniere A, Aymeric L, Ma Y, Ortiz C, et al. Activation of the NLRP3 inflammasome in dendritic cells induces IL-1beta-dependent adaptive immunity against tumors. *Nat Med*. 2009; 15(10):1170–8. <https://doi.org/10.1038/nm.2028> PMID: 19767732.
- Michaud M, Martins I, Sukkurwala AQ, Adjemian S, Ma Y, Pellegatti P, et al. Autophagy-dependent anti-cancer immune responses induced by chemotherapeutic agents in mice. *Science (New York, NY)*. 2011; 334(6062):1573–7. <https://doi.org/10.1126/science.1208347> PMID: 23811849.
- Apetoh L, Ghiringhelli F, Tesniere A, Obeid M, Ortiz C, Criollo A, et al. Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Nat Med*. 2007; 13(9):1050–9. <https://doi.org/10.1038/nm1622> PMID: 17704786.
- Yamazaki T, Hannani D, Poirier-Colame V, Ladoire S, Locher C, Sistigu A, et al. Defective immunogenic cell death of HMGB1-deficient tumors: compensatory therapy with TLR4 agonists. *Cell death and differentiation*. 2014; 21(1):69–78. <https://doi.org/10.1038/cdd.2013.72> PMID: 23811849.
- Galluzzi L, Buque A, Kepp O, Zitvogel L, Kroemer G. Immunogenic cell death in cancer and infectious disease. *Nat Rev Immunol*. 2017; 17(2):97–111. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.107> PMID: 27748397.
- Aaes TL, Kaczmarek A, Delvaeye T, De Craene B, De Koker S, Heyndrickx L, et al. Vaccination with Necroptotic Cancer Cells Induces Efficient Anti-tumor Immunity. *Cell Rep*. 2016; 15(2):274–87. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.03.037> PMID: 27050509.
- Yatim N, Jusforgues-Saklani H, Orozco S, Schulz O, Barreira da Silva R, Reis e Sousa C, et al. RIPK1 and NF-kappaB signaling in dying cells determines cross-priming of CD8(+) T cells. *Science (New York, NY)*. 2015; 350(6258):328–34. <https://doi.org/10.1126/science.aad0395> PMID: 26405229.
- Koks CA, Garg AD, Ehrhardt M, Riva M, Vandenberk L, Boon L, et al. Newcastle disease virotherapy induces long-term survival and tumor-specific immune memory in orthotopic glioma through the induction of immunogenic cell death. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2015; 136(5):E313–25. <https://doi.org/10.1002/ijc.29202> PMID: 25208916.
- Hatfield P, Merrick AE, West E, O'Donnell D, Selby P, Vile R, et al. Optimization of dendritic cell loading with tumor cell lysates for cancer immunotherapy. *J Immunother*. 2008; 31(7):620–32. <https://doi.org/10.1097/CJI.0b013e31818213df> PMID: 18600182.
- Zhou H, Forveille S, Sauvat A, Sica V, Izzo V, Durand S, et al. The oncolytic peptide LTX-315 kills cancer cells through Bax/Bak-regulated mitochondrial membrane permeabilization. *Oncotarget*. 2015; 6(29):26599–614. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.5613> PMID: 26378049.
- Forveille S, Zhou H, Sauvat A, Bezu L, Muller K, Liu P, et al. The oncolytic peptide LTX-315 triggers necrotic cell death. *Cell cycle (Georgetown, Tex)*. 2015; 14(21):3506–12. <https://doi.org/10.1080/15384101.2015.1093710> PMID: 26566869.
- Zhou H, Forveille S, Sauvat A, Yamazaki T, Senovilla L, Ma Y, et al. The oncolytic peptide LTX-315 triggers immunogenic cell death. *Cell Death Dis*. 2016; 7:e2134. <https://doi.org/10.1038/cddis.2016.47> PMID: 26962684.
- Eike LM, Yang N, Rekdal O, Sveinbjornsson B. The oncolytic peptide LTX-315 induces cell death and DAMP release by mitochondria distortion in human melanoma cells. *Oncotarget*. 2015; 6(33):34910–23. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.5308> PMID: 26472184.

19. Camilio KA, Berge G, Ravuri CS, Rekdal O, Sveinbjornsson B. Complete regression and systemic protective immune responses obtained in B16 melanomas after treatment with LTX-315. *Cancer Immunol Immunother.* 2014; 63(6):601–13. <https://doi.org/10.1007/s00262-014-1540-0> PMID: 24676901.
20. Camilio KA, Rekdal O, Sveinbjornsson B. LTX-315 (Oncopore): A short synthetic anticancer peptide and novel immunotherapeutic agent. *Oncoimmunology.* 2014; 3:e29181. <https://doi.org/10.4161/onci.29181> PMID: 25083333.
21. Yamazaki T, Pitt JM, Vetizou M, Marabelle A, Flores C, Rekdal O, et al. The oncolytic peptide LTX-315 overcomes resistance of cancers to immunotherapy with CTLA4 checkpoint blockade. *Cell death and differentiation.* 2016; 23(6):1004–15. <https://doi.org/10.1038/cdd.2016.35> PMID: 27082453.
22. Jagot-Lacoussiere L, Kotula E, Villoutreix BO, Bruzzoni-Giovanelli H, Poyet JL. A Cell-Penetrating Peptide Targeting AAC-11 Specifically Induces Cancer Cells Death. *Cancer research.* 2016; 76(18):5479–90. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-0302> PMID: 27406828.
23. Rigou P, Piddubnyak V, Faye A, Rain JC, Michel L, Calvo F, et al. The antiapoptotic protein AAC-11 interacts with and regulates Acinus-mediated DNA fragmentation. *The EMBO journal.* 2009; 28(11):1576–88. Epub 2009/04/24. <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.106> PMID: 19387494.
24. Faye A, Poyet JL. Targeting AAC-11 in cancer therapy. Expert opinion on therapeutic targets. 2010; 14(1):57–65. Epub 2009/12/17. <https://doi.org/10.1517/14728220903431077> PMID: 20001210.
25. Boukamp P, Petrussevska RT, Breitkreutz D, Hornung J, Markham A, Fusenig NE. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *The Journal of cell biology.* 1988; 106(3):761–71. PMID: 2450098.
26. Piddubnyak V, Rigou P, Michel L, Rain JC, Geneste O, Wolkenstein P, et al. Positive regulation of apoptosis by HCA66, a new Apaf-1 interacting protein, and its putative role in the physiopathology of NF1 microdeletion syndrome patients. *Cell death and differentiation.* 2007; 14(6):1222–33. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4402122> PMID: 17380155.
27. Jagot-Lacoussiere L, Faye A, Bruzzoni-Giovanelli H, Villoutreix BO, Rain JC, Poyet JL. DNA damage-induced nuclear translocation of Apaf-1 is mediated by nucleoporin Nup107. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* 2015; 14(8):1242–51. <https://doi.org/10.1080/15384101.2015.1014148> PMID: 25695197.
28. Sukkurwala AQ, Adjemian S, Senovilla L, Michaud M, Spaggiari S, Vacchelli E, et al. Screening of novel immunogenic cell death inducers within the NCI Mechanistic Diversity Set. *Oncoimmunology.* 2014; 3:e28473. <https://doi.org/10.4161/onci.28473> PMID: 25050214.
29. Sato H, Feix JB. Peptide-membrane interactions and mechanisms of membrane destruction by amphipathic alpha-helical antimicrobial peptides. *Biochimica et biophysica acta.* 2006; 1758(9):1245–56. <https://doi.org/10.1016/j.bbame.2006.02.021> PMID: 16697975.
30. Kepp O, Senovilla L, Vitale I, Vacchelli E, Adjemian S, Agostinis P, et al. Consensus guidelines for the detection of immunogenic cell death. *Oncoimmunology.* 2014; 3(9):e955691. <https://doi.org/10.4161/21624011.2014.955691> PMID: 25941621.
31. Gardai SJ, McPhillips KA, Frasch SC, Janssen WJ, Starefeldt A, Murphy-Ullrich JE, et al. Cell-surface calreticulin initiates clearance of viable or apoptotic cells through trans-activation of LRP on the phagocyte. *Cell.* 2005; 123(2):321–34. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.08.032> PMID: 16239148.
32. Martins I, Kepp O, Schlemmer F, Adjemian S, Tailler M, Shen S, et al. Restoration of the immunogenicity of cisplatin-induced cancer cell death by endoplasmic reticulum stress. *Oncogene.* 2011; 30(10):1147–58. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.500> PMID: 21151176.
33. Menger L, Vacchelli E, Adjemian S, Martins I, Ma Y, Shen S, et al. Cardiac glycosides exert anticancer effects by inducing immunogenic cell death. *Sci Transl Med.* 2012; 4(143):143ra99. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3003807> PMID: 22814852.
34. Panaretakis T, Kepp O, Brockmeier U, Tesniere A, Bjorklund AC, Chapman DC, et al. Mechanisms of pre-apoptotic calreticulin exposure in immunogenic cell death. *The EMBO journal.* 2009; 28(5):578–90. <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.1> PMID: 19165151.
35. Rabinovich GA, Gabrilovich D, Sotomayor EM. Immunosuppressive strategies that are mediated by tumor cells. *Annu Rev Immunol.* 2007; 25:267–96. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.25.022106.141609> PMID: 17134371.
36. Locher C, Conforti R, Aymeric L, Ma Y, Yamazaki T, Rusakiewicz S, et al. Desirable cell death during anticancer chemotherapy. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 2010; 1209:99–108. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2010.05763.x> PMID: 20958322.
37. Garg AD, Galluzzi L, Apetoh L, Baert T, Birge RB, Bravo-San Pedro JM, et al. Molecular and Translational Classifications of DAMPs in Immunogenic Cell Death. *Front Immunol.* 2015; 6:588. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00588> PMID: 26635802.

38. Do TN, Rosal RV, Drew L, Raffo AJ, Michl J, Pincus MR, et al. Preferential induction of necrosis in human breast cancer cells by a p53 peptide derived from the MDM2 binding site. *Oncogene*. 2003; 22(10):1431–44. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206258> PMID: 12629507.
39. Kanovsky M, Raffo A, Drew L, Rosal R, Do T, Friedman FK, et al. Peptides from the amino terminal mdm-2-binding domain of p53, designed from conformational analysis, are selectively cytotoxic to transformed cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001; 98(22):12438–43. <https://doi.org/10.1073/pnas.211280698> PMID: 11606716.
40. Sarafraz-Yazdi E, Bowne WB, Adler V, Sookraj KA, Wu V, Shteyler V, et al. Anticancer peptide PNC-27 adopts an HDM-2-binding conformation and kills cancer cells by binding to HDM-2 in their membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010; 107(5): 1918–23. <https://doi.org/10.1073/pnas.0909364107> PMID: 20080680.
41. Polyansky AA, Chugunov AO, Vassilevski AA, Grishin EV, Efremov RG. Recent advances in computational modeling of alpha-helical membrane-active peptides. *Current protein & peptide science*. 2012; 13(7):644–57. PMID: 23363529.
42. Scaffidi P, Misteli T, Bianchi ME. Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature*. 2002; 418(6894):191–5. <https://doi.org/10.1038/nature00858> PMID: 12110890.
43. Nandigama R, Padmasekar M, Wartenberg M, Sauer H. Feed forward cycle of hypotonic stress-induced ATP release, purinergic receptor activation, and growth stimulation of prostate cancer cells. *The Journal of biological chemistry*. 2006; 281(9):5686–93. <https://doi.org/10.1074/jbc.M510452200> PMID: 16321972.
44. Zivvogel L, Kepp O, Senovilla L, Menger L, Chaput N, Kroemer G. Immunogenic tumor cell death for optimal anticancer therapy: the calreticulin exposure pathway. *Clin Cancer Res*. 2010; 16(12):3100–4. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-2891> PMID: 20421432.
45. Garg AD, Krysko DV, Vandenabeele P, Agostinis P. Hypericin-based photodynamic therapy induces surface exposure of damage-associated molecular patterns like HSP70 and calreticulin. *Cancer Immunol Immunother*. 2012; 61(2):215–21. <https://doi.org/10.1007/s00262-011-1184-2> PMID: 22193987.
46. Fucikova J, Moserova I, Truxova I, Hermanova I, Vancurova I, Parllova S, et al. High hydrostatic pressure induces immunogenic cell death in human tumor cells. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2014; 135(5):1165–77. <https://doi.org/10.1002/ijc.28766> PMID: 24500981.
47. Balkwill F. Cancer and the chemokine network. *Nature reviews*. 2004; 4(7):540–50. <https://doi.org/10.1038/nrc1388> PMID: 15229479.
48. Harlin H, Meng Y, Peterson AC, Zha Y, Tretiakova M, Slingluff C, et al. Chemokine expression in melanoma metastases associated with CD8+ T-cell recruitment. *Cancer research*. 2009; 69(7):3077–85. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-2281> PMID: 19293190.
49. Peng W, Liu C, Xu C, Lou Y, Chen J, Yang Y, et al. PD-1 blockade enhances T-cell migration to tumors by elevating IFN-gamma inducible chemokines. *Cancer research*. 2012; 72(20):5209–18. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-1187> PMID: 22915761.
50. Gonzalez-Martin A, Gomez L, Lustgarten J, Mira E, Manes S. Maximal T cell-mediated antitumor responses rely upon CCR5 expression in both CD4(+) and CD8(+) T cells. *Cancer research*. 2011; 71(16):5455–66. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-1687> PMID: 21715565.
51. Iida N, Nakamoto Y, Baba T, Nakagawa H, Mizukoshi E, Naito M, et al. Antitumor effect after radiofrequency ablation of murine hepatoma is augmented by an active variant of CC Chemokine ligand 3/macrophage inflammatory protein-1alpha. *Cancer research*. 2010; 70(16):6556–65. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-0096> PMID: 20663902.
52. Gough M, Crittenden M, Thanarajasingam U, Sanchez-Perez L, Thompson J, Jevremovic D, et al. Gene therapy to manipulate effector T cell trafficking to tumors for immunotherapy. *Journal of immunology*. 2005; 174(9):5766–73. PMID: 15843579.
53. Lanca T, Costa MF, Goncalves-Sousa N, Rei M, Grosso AR, Penido C, et al. Protective role of the inflammatory CCR2/CCL2 chemokine pathway through recruitment of type 1 cytotoxic gamma delta T lymphocytes to tumor beds. *Journal of immunology*. 2013; 190(12):6673–80. <https://doi.org/10.1093/jimmunol.1300434> PMID: 23686489.
54. Hong M, Puaux AL, Huang C, Loumagne L, Tow C, Mackay C, et al. Chemotherapy induces intratumoral expression of chemokines in cutaneous melanoma, favoring T-cell infiltration and tumor control. *Cancer research*. 2011; 71(22):6997–7009. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-1466> PMID: 21948969.
55. Zlotnik A, Morales J, Hedrick JA. Recent advances in chemokines and chemokine receptors. *Crit Rev Immunol*. 1999; 19(1):1–47. PMID: 9987599.

56. Haug BE, Camilio KA, Eliassen LT, Stensen W, Svendsen JS, Berg K, et al. Discovery of a 9-mer Cationic Peptide (LTX-315) as a Potential First in Class Oncolytic Peptide. *J Med Chem*. 2016; 59(7): 2918–27. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b02025> PMID: 26982623.
57. Nestvold J, Wang MY, Camilio KA, Zinocker S, Tjelle TE, Lindberg A, et al. Oncolytic peptide LTX-315 induces an immune-mediated abscopal effect in a rat sarcoma model. *Oncoimmunology*. 2017; 6(8): e1338236. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2017.1338236> PMID: 28920000.

II. Mort cellulaire induite par RT53 dans le contexte des leucémies aigües myéloïdes

L'objectif de l'étude qui suit est de voir si les résultats obtenus dans les cancers solides peuvent être étendus aux cancers hématologiques, en particulier les LAMs, des pathologies très agressives pour lesquelles les options thérapeutiques sont limitées. Afin de pouvoir étudier les propriétés immunologiques de RT53, nous avons choisi d'utiliser un modèle murin pré-clinique immunocompétent bien caractérisé de LAP, en collaboration avec le Dr. M. Pla (UMRS 1131).

D'après les résultats obtenus, RT53 possède une forte activité anti-leucémique *in vitro* sur des lignées cellulaires de LAM et des blastes murins leucémiques. *In vivo*, il peut être utilisé en traitement direct (injection systémique) et permet d'améliorer de manière significative la survie des souris atteintes de LAP, même aux stades avancés de la maladie.

Comme dans les modèles solides, le peptide induit une membranolyse des cellules tumorales, et les blastes exposés à RT53 libèrent tous les signaux de danger associés à une MCI. Nous avons montré qu'une seule injection d'un vaccin constitué de ces cellules mourantes (traitées *in vitro* avec RT53) permettait de prévenir le développement de la LAP chez la souris, non seulement avant (vaccin prophylactique) mais aussi après (vaccin thérapeutique) induction de la maladie. Dans nos expériences, les souris vaccinées ne développent pas la maladie, et survivent plus d'un an après induction de la leucémie, alors que les souris contrôles meurent aux alentours de trois semaines. De plus, cette protection est long-terme, puisque les souris sont protégées contre de multiples rechallenges de cellules tumorales. Nos résultats indiquent que la réponse immunitaire observée est dépendante des cellules T. Pour finir, des souris receveuses, transplantées avec des splénocytes provenant de souris vaccinées, ne développent pas la maladie, suggérant l'élimination des cellules initiateuses de la leucémie.

Ces travaux prometteurs permettent d'envisager l'utilisation de cette approche immunothérapeutique chez l'humain dans le contexte des LAMs, et peut-être d'autres cancers hématologiques. Ils ont donné lieu au dépôt d'un brevet décrivant l'approche utilisée pour la conception du vaccin anti-leucémique, dont je suis co-inventrice (dépôt de brevet n°EP 19 435), et à la rédaction d'une publication scientifique dans le journal *Oncoimmunology* (**ARTICLE 2 « Prophylactic and therapeutic antileukemic effects induced by the AAC-11-derived peptide RT53 »**, [Habault et al.](#), *Oncoimmunology*, 2020).

Prophylactic and therapeutic antileukemic effects induced by the AAC-11-derived Peptide RT53

Justine Habault^{a,b}, Anna Kacj^{b,c}, Ewa Pasquereau-Kotula^a, Claire Fraser^a, Christine Chomienne^{b,d,e}, Hervé Dombret^{b,c,f}, Thorsten Braun^{b,c,g}, Marika Pla^{b,d*}, and Jean-Luc Poyet^{a,b,h*}

^aINSERM UMRS976, Institut De Recherche Saint-Louis, Hôpital Saint-Louis, Paris, France; ^bUniversité De Paris, Paris, France; ^cLaboratoire De Transfert Des Leucémies, EA3518, Institut De Recherche Saint-Louis, Hôpital-Saint Louis, Paris, France; ^dINSERM UMRS1131, Institut De Recherche Saint-Louis, Hôpital Saint-Louis, Paris, France; ^eService De Biologie Cellulaire, Assistance Publique-Hôpitaux De Paris, Hôpital Saint-Louis, Paris, France; ^fService d'Hématologie Adulte, Assistance Publique-Hôpitaux De Paris, Hôpital Saint-Louis, Paris, France; ^gService d'Hématologie, Assistance Publique-Hôpitaux De Paris, Hôpital Avicenne, Bobigny, France; ^hc-Dithem, Inserm Consortium for Discovery and Innovation in Therapy and Medicine

ABSTRACT

Despite considerable progress, the treatment of acute leukemia continues to be a challenge for a significant majority of patients. Using a well-characterized preclinical mouse model of acute promyelocytic leukemia (APL), we evaluated here the antileukemic efficacy of RT53, an anticancer peptide with potential immunological properties. Our results indicate that RT53 possesses a direct antileukemic effect, even at a late stage. We also demonstrate that a single injection of a vaccine consisting of leukemic blasts exposed to RT53, which induces the hallmarks of immunogenic cell death, was highly effective in preventing leukemia development in both prophylactic and therapeutic settings. The vaccine comprising RT53-treated APL cells generated long-term antileukemic protection and depletion experiments indicated that CD4 + T cells were of crucial importance for vaccine efficacy. Combined, our results provide the rationale for the exploration of RT53-based therapies for the treatment of acute leukemia.

ARTICLE HISTORY

Received 6 August 2019
Revised 13 November 2019
Accepted 4 December 2019

KEYWORDS

Anticancer peptide; acute leukemia; autologous tumor cell vaccine; tumor immunity

Introduction

A major strategy in anticancer efforts is to target oncogenic signaling networks that are required for tumor cell growth and survival. However, intrinsic or acquired resistance often limits the efficacy of these targeted therapies.^{1,2} In parallel to the development of molecular-targeted agents, cancer immunotherapies are changing the therapeutic landscape for cancer patients by providing a clinically beneficial alternative to conventional treatments.^{3,4} Despite the improved molecular characterization of malignancies and development of target therapies, acute leukemia is not curable and a minority of patients survive more than 10 years after diagnosis. Among leukemia subtypes, prognosis is particularly poor in adult acute myeloid leukemia (AML).⁵ Therefore, new agents and novel regimens are clearly needed to improve outcomes for AML patients. We previously reported that RT53, a cell-permeable peptide derived from the survival protein AAC-11, selectively killed cancer cells *in vitro* and prevented tumor growth in melanoma mouse models.^{6,7} RT53 mechanism of action includes the inhibition of AAC-11 anti-apoptotic properties, through disruption of protein-protein interactions between AAC-11 and protein partners such as Acinus, as well as a non-regulated membranolytic effect of the cancer cells plasma

membrane.^{6–8} Interestingly, RT53 treatment of melanoma cells induces all the hallmarks of immunogenic cell death and B16F10 mouse cells treated by RT53 were able to mediate protective effects in a tumor vaccination model.^{6,8} In this study, we evaluated the therapeutic potential of RT53 as a treatment for acute leukemia. We found that RT53 possesses a direct antileukemic effect, both *in vitro* and in a preclinical acute promyelocytic leukemia (APL) mouse model. A vaccine consisting of RT53-exposed leukemic blast cells was highly effective at preventing leukemia development both prophylactically and therapeutically through the induction of CD4 + T cell-dependent long-term response. These results make RT53-based antileukemic therapies attractive for clinical development.

Material and methods


Peptides

Peptides were synthesized by Proteogenix (Strasbourg, France) and were >95% pure as verified by HPLC and mass spectrographic analysis. The peptide sequence of RT53 is the following: RQIKIWFQNRRMKWKAKLNAEKLDKDFKIRLQYFARGLQVYIRQLRLALQGKT

The penetratin sequence is underlined.

CONTACT Jean-Luc Poyet ✉ jean-luc.poyet@inserm.fr INSERM UMRS976, Institut De Recherche Saint Louis, Hôpital Saint-Louis, Université De Paris, 1 Avenue Claude Vellefaux, Paris 75010, France

*These authors contributed equally to this work

 Supplemental data for this article can be accessed on the publisher's website.

© 2020 The Author(s). Published with license by Taylor & Francis Group, LLC.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>), which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Cell lines and chemicals

NB4 (purchased from ATCC), UF-1 (provided by Dr. Y. Ikeda, Tokyo, Japan), HUT-78 (provided by Dr. A. Marie-Cardine, INSERM U976, Paris, France) and B16F10 (provided by Dr. M. Dutreix, CNRS UMR3347, INSERM 1021, Paris, France) were used for the experiments. Cells were grown in RPMI 1640 medium supplemented with 10% fetal calf serum, L-glutamine (2 mM), 1 mM Hepes and 200 ug/ml penicillin/streptomycin antibiotics (Gibco). All cells were maintained at 37°C in humidified 5% CO₂ atmosphere. All chemicals were purchased from Sigma.

Lactate dehydrogenase, ATP and HMGB1 release assays

Release of lactate dehydrogenase (LDH) and ATP in the culture medium was assessed with the CytoTox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay and Enliten ATP Assay, respectively (Promega, Madison, WI, USA). HMGB1 release in the culture medium was assessed with the HMGB1 ELISA kit (IBL International, Hamburg, Germany).

Electron microscopy

Samples were fixed in 3% glutaraldehyde in phosphate buffer, pH 7.4 for 1 h, washed, post-fixed with 1% osmium tetroxide in 0.1 M phosphate buffer and then gradually dehydrated in 70%, 90% and 100% ethanol. After 10 min in a 1:2 mixture of epoxy propane and epoxy resin and 10 min in epon, samples were embedded in epoxy resin and polymerized at 60°C for 24 h. After polymerization, ultrathin sections of 90 nm were cut with an ultra-microtome (Reichert ultracut S), stained with uranyl acetate and Reynold's lead and observed with a transmission electron microscope (JEOL 1011). Acquisition was performed with a Gatan Orius 1000 CCD camera.

Apoptosis assays

Leukemic blasts apoptosis assessment was performed using fluorescein isothiocyanate (FITC) Annexin V Apoptosis Detection Kit I (BD Biosciences, Waltham, MA) and propidium iodide (PI) as per the manufacturer's instructions, followed by flow cytometry analysis with a CytoFLEX Flow Cytometer (Beckman and Coulter). Viable cells were defined as annexin V/PI.

Autophagy assessment

The formation of autophagic vesicles was assessed using the Cyto-ID Autophagy Detection Kit (EnzoLife Sciences, Antwerpen, Belgium) using a 488-nm excitable fluorescent probe that selectively stains autophagic compartments, according to manufacturer's protocol. Serum starvation (1 h) was used as a positive control for autophagic flux. Flow cytometry analysis was performed with a CytoFLEX Flow Cytometer (Beckman and Coulter).

Determination of surface-exposed CRT

CRT exposure was assessed by surface immunostaining and flow cytometry. In brief, APL blast cells (10⁶ cells per mL) in RPMI 1640 medium supplemented with 10% fetal calf serum, L-glutamine (2 mM), 1 mM Hepes and 200 ug/ml penicillin/streptomycin antibiotics plated in 24 well plates were treated for 6 h with 5 μM of RT53 peptide. Cells were washed with PBS (Phosphate-Buffered Saline), harvested and plated in 96-well round-bottomed microtiter plates and incubated in blocking solution for 45 min (Blocking Solution Image-iT[®] Fixation/Permeabilization Kit Cat. #R37602, Thermo Fischer Scientific). After 1X wash with PBS, cells were stained with anti-calreticulin primary antibody (Calreticulin (D3E6) XP[®] Rabbit mAb #12238, Cell Signaling). Goat anti-rabbit Alexa Fluor 488 was used as a secondary antibody after another PBS wash (Alexa Fluor[®] 488 goat anti-rabbit IgG secondary antibody Cat. #A11034, Thermo Fischer Scientific). Cells were then analyzed with a CytoFLEX Flow Cytometer (Beckman and Coulter) by gating on propidium iodide-negative cells for the exclusion of dead cells.

Ethics statement

This study has been carried out in accordance with the EC Directive 86/609/EEC for animal experiments and was approved by the Committee for Experimental Animal Studies of the University of Paris 7 Institute Board Ethics (Protocol Number: 2303.01). Animals were housed and bred at our animal facility (Institut de Recherche Saint-Louis, Saint Louis Hospital, Paris, France) in vented animal cabinets under controlled temperature (22°C) and 12 h light-dark cycle under pathogen-free conditions and were allowed food and water *ad libitum*.

Preclinical acute promyelocytic leukemia-transplantable mice model

APL blasts (provided by Drs. M. Bishop and S. Kogan, UCSF, USA) origin from the spleen of mice bearing the human *PML-RARA cDNA* construct driven by a myeloid lineage specific promoter (*hMRP8*) in the FVB/N inbred strain of mice. For amplification, cells (1 × 10⁵ or 1 × 10⁶) were suspended in PBS and transplanted by intravenous (i.v) tail injection (200 uL) into female syngeneic recipient mice (5–6 weeks old). The establishment of leukemia was assessed by a decrease in blood platelet counts approximately 3 weeks after graft. Spleen cells from a primary recipient were collected, washed, re-suspended in PBS and injected (10⁴ cells/mouse; 200 uL) into the tail veins of male FVB/N mice (7–8 weeks old) for experiments. For direct treatment experiments, mice were treated daily or every other day (i.p) with normal saline or RT53 at 2.4 mg/kg in normal saline starting from day 10 or day 20 for a total of 7 injections.

RT53-treated APL blast vaccination assay

Two millions live cells from primary recipients' spleens or the indicated cells were washed in PBS and resuspended in 200 μL

of serum-free RPMI medium. The cells were then exposed to 30 μ M RT53 for 3 h for cell death induction and the whole suspension of RT53-treated cells was injected subcutaneously (2×10^6 cells) into the left flanks of FVB/N syngeneic mice. For leukemia induction, the mice were injected i.v. with 1×10^4 blast cells from primary recipients' spleens at the indicated time.

T cell depletion

Mice were depleted of either CD4+, CD8+ or both T cell populations by bi-weekly i.p. injection of 0.2 mg of ascites fluids containing an anti-CD4 or -CD8 antibody starting 2 weeks before experiments. Injections were then performed 2 times per week during the study period. Blood was collected by submandibular bleeding. PBMC were labeled with a mix of anti-CD3E-APC (MACS), anti-CD4-PE (MACS) and anti-CD8-APC-cy7 (BD Biosciences) (2.5 μ l, 30 min, 4°C). Red blood cells were then lysed in ACK buffer for 7 min at RT. The efficacy of depletion was monitored using Canto II (BD Biosciences) cytometer and data analyzed with FlowJo software.

Results and discussion

RT53 possess direct antileukemic properties

To test the antileukemic properties of RT53, we first exposed human all-trans retinoic acid ATRA-sensitive (NB4) and ATRA-resistant (UF-1) acute promyelocytic leukemia (APL) cells as well as mouse APL spleen blast cells derived from *hMRP8-PML-RARA* transgenic mice⁹ to increasing concentrations of RT53. As shown in Figure 1(a), RT53 decreased viability of all the tested cells through the rapid loss of plasma membrane integrity, as detected by the release of the intracellular enzyme lactate dehydrogenase (LDH). Importantly, no cell death was detected in spleen cells from healthy mice even at the highest concentration tested, indicating that RT53 exhibits selective cytotoxicity toward leukemic cells, but not normal cells. The observed LDH release upon RT53 treatment indicates that leukemic cells death is associated with loss of outer cell membrane integrity and cytoplasmic leakage, which are characteristic features of necrosis. In line with this hypothesis, ultrastructural analysis of APL spleen cells exposed to RT53 revealed an obvious necrotic morphology of the leukemic blasts, with loss of plasma membrane integrity and cytoplasmic swelling without morphological signs of nuclear apoptosis (Figure 1(b)). No changes in cellular integrity or ruptured cells could be detected in the normal spleen cells, confirming that RT53 exhibits high specificity toward leukemic cells (Figure 1(b)). To further define the RT53 mechanism of action and response kinetics, we assessed cell death induced by the peptide using annexin V and propidium iodide (PI) staining over time of treatment. This double labeling allows to distinguish early apoptotic (annexin V positive and PI negative) and late apoptotic/necrotic (both annexin V and PI positive) cells. As shown in Figure 1(c), RT53 exposure of APL spleen cells induced concomitant annexin V and PI positivity, even at early points in the treatment. These data, together with the electron microscopy analysis, indicate that RT53 does not induce the characteristic

morphological and biochemical features of apoptosis, but rather mediates a necrotic form of cell death. In line with this hypothesis, inhibition of caspases activity with the pan-caspase inhibitor zVAD-fmk, while efficiently interfering with cell death induced by staurosporine, failed to prevent cell killing mediated by RT53 (Figure 1(d)), confirming that RT53 cytotoxic effects do not involve apoptosis. We next investigated whether RT53 could trigger necroptosis, an alternative, caspase-independent form of cell death that is regulated by receptor-interacting protein kinases (RIPK) 1 and 3.¹⁰ As shown in Figure 1(e), the RIPK1 inhibitor necrostatin-1 was unable to interfere with RT53-mediated APL cells death, although it had a marked cytoprotective effect on TNF- α -induced necroptosis (Figure 1(e)). However, IM-54, a potent and selective inhibitor of unregulated necrosis induced by oxidative stress,¹¹ efficiently prevented cell death induced by RT53 (Figure 1(f)), indicating that RT53 treatment triggers necrosis of the leukemic cells through the induction of oxidative stress. Of note, RT53 treatment did not promote autophagy, as peptide exposure failed to upregulate formation of autophagic compartments (Figure 1(g)), and, consistently, the autophagy inhibitor 3-Methyladenine had no effect on RT53 cytotoxicity toward APL cells (Figure 1(h)). Altogether, these results indicate that RT53 kills the APL blasts via a rapid, unregulated necrosis mechanism induced by oxidative stress, without relying on the major regulated cell death pathways.

To explore the *in vivo* therapeutic potential of RT53 as a treatment of acute leukemia, we used a well-characterized preclinical APL model bearing the human *PML-RARA* oncogene which mimics human APL, both in its characteristics and its response to conventional therapeutic drugs such as ATRA and arsenic trioxide.^{9,12} In this model, 100% of the syngeneic mice (FVB/N) transplanted with 10^4 primary recipients' spleen blasts developed an APL and succumbed within 30 days (Figure 1(i)). APL mice treated with RT53 (2.4 mg/kg) for 7 days starting on day 10 after leukemia engraftment had a significantly extended survival compared to control mice ($P < .0001$). The survival of APL mice treated with RT53 was significantly ($P < .0001$) superior to that of mice treated by ATRA (Figure 1(i)). Similar survival advantage was obtained when RT53 was administered every other day for a total of seven administrations (D10 Q2D schedule, Figure 1(j)). RT53 treatment starting on day 20 after leukemia engraftment, when leukemia is fully established¹³ as shown by standardized minimal residual disease (MRD) monitoring (high level of *PML-RARA* transcripts in PBL, bone marrow and spleen), also prolonged the survival of leukemic mice (D20 schedule, Figure 1(j)). To our knowledge, no therapeutic approach has demonstrated such a pronounced effect on the survival of mice with comparable advanced disease stage in this preclinical model. No organ toxicity (macroscopic or microscopic) was noted with either treatment schedule (data not shown). Therefore, these results indicate that RT53 possesses robust antileukemic activity both *in vitro* and *in vivo*.

A vaccine comprising RT53-treated APL cells induces long-term survival

Anticancer chemotherapies are particularly effective when they induce immunogenic cell death (ICD), thus eliciting an

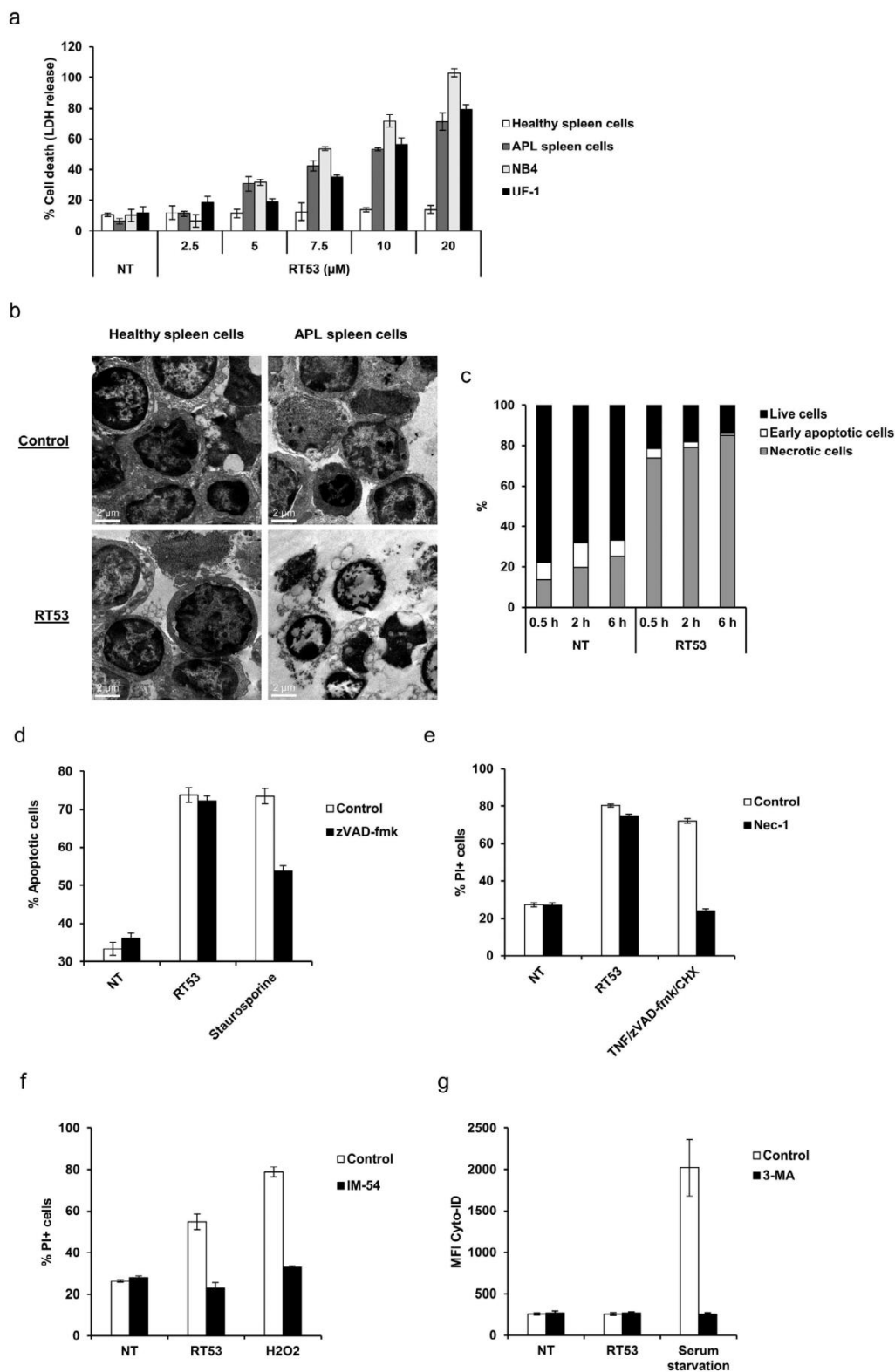
e1728871-4  J. HABAUT ET AL.

Figure 1. RT53 treatment increases APL mice survival. (a) The indicated cells were left untreated or exposed to increasing concentrations of RT53 for 20 h. Cell death induced by peptide treatment was measured by lactate dehydrogenase (LDH) release. Data are means \pm s.e.m. ($n = 3$). (b) Ultrastructural analysis of RT53-treated spleen cells. Spleen cells from healthy or APL mice were left either untreated or exposed to 10 μ M of RT53 for 1 h. Cells were then analyzed by transmission electron microscopy following osmium tetroxide staining. (c) APL spleen cells were exposed to 5 μ M RT53 for the indicated periods of time and phosphatidyserine exposure

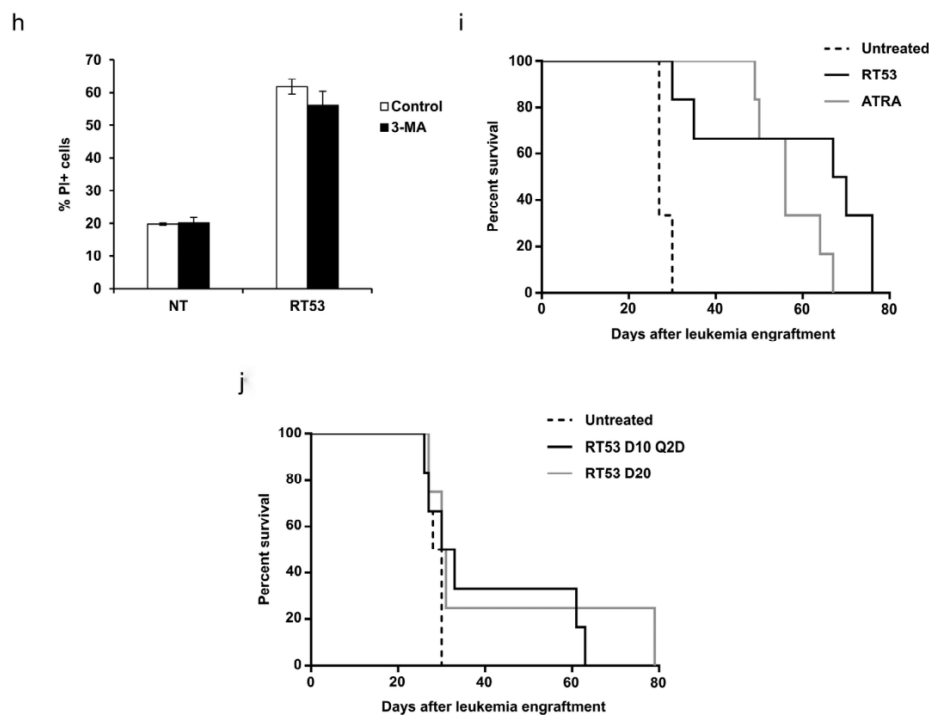


Figure 1. (continued)

antitumor immune response.¹⁴ We, therefore, investigated whether RT53 treatment of APL spleen cells would be able to induce the key known biomarkers of ICD, which include the endoplasmic reticulum (ER) chaperone calreticulin (CRT) surface exposure and the release of the chromatin protein high mobility group box1 protein (HMGB1) as well as ATP.¹⁵ As showed in Figure 2(a), RT53 treatment triggered the release of both HMGB1 and ATP in the culture medium, detected by ELISA and ATP-bioluminescence assays, respectively, as well as surface exposure of CRT, detectable by FACS analysis, indicating that RT53 can induce all tested characteristics of ICD. Similar data were obtained with the human APL cells NB4 (not shown). To further investigate the capacity of RT53 to induce an antileukemic response, we took advantage of the APL preclinical model, which is based on immunocompetent FVB/N mice, to develop a prophylactic tumor vaccination model (Figure 2(b)). Interestingly, 7 out of 8

mice vaccinated subcutaneously with RT53-exposed APL spleen blast cells did not develop the disease after APL engraftment (Figure 2(b)), indicating the prophylactic effect of RT53-exposed APL cells. Eight months after APL engraftment, surviving animals were found disease-free by MRD monitoring. These data indicate that a simple vaccine constituted by RT53-treated APL cells triggered a very effective prophylaxis, protecting against the development of leukemia.

The prophylactic effect generated by the RT53-treated APL cells vaccine is tumor type-specific and long-lasting

To demonstrate the specificity of RT53-exposed APL cells prophylactic effect, mice were vaccinated subcutaneously with various human (NB4, HUT78) or mouse (B16F10) cancerous cells treated with RT53. As shown in Figure 3(a), none of the tumor cells generated protection against leukemia

(annexin V labeling) and cell membrane permeabilization (propidium iodide (PI) labeling) were analyzed by flow cytometry. The percentages of viable cells (annexin V⁻/PI⁻), early apoptotic cells (annexin V⁺/PI⁻) and late apoptotic/necrotic cells (annexin V⁺/PI⁺) are represented (average of two independent experiments). (d) APL spleen cells were exposed to 5 μ M of RT53 in the presence or absence of 50 μ M zVAD-fmk for 3 h. Cell death was measured by flow cytometry as in (c). Staurosporine (5 μ M) was used as a control. Average of two independent experiments. (e) APL spleen cells were exposed to 5 μ M of RT53 in the presence or absence of 50 μ M Necrostatin-1 (Nec-1) for 3 h and cell membrane permeabilization (PI labeling) was analyzed by flow cytometry. [TNF- α (30 ng/ml) + zVAD-fmk (40 μ M) + 10 μ g/mL cycloheximide (CHX)] treatment was used as a control. (f) APL spleen cells were exposed to 5 μ M of RT53 in the presence or absence of 10 μ M of IM-54 for 3 h. Cell death was measured as in (e). H2O2 (100 μ M) treatment was used as a control. Average of two independent experiments. (g) APL spleen cells were exposed to 5 μ M RT53 for 1 h in the presence or absence of 10 μ M 3-Methyladenine (3-MA) and autophagic activity was determined by flow cytometry analysis using the Cyto-ID autophagy detection reagent. Serum starvation (1 h) was used as a control. Data are expressed as the mean fluorescence intensity of Cyto-ID (average of two independent experiments). (h) APL spleen cells were exposed to 5 μ M of RT53 for 1 h in the presence or absence of 10 μ M 3-Methyladenine (3-MA). Cell death was measured as in (e). Average of two independent experiments. (i) 10⁴ APL blasts were inoculated intravenously (i.v.) into FVB/N mice at day 0. Mice were then either left untreated ($n = 6$), treated with ATRA (5 mg, subcutaneous implantation of 21-day release pellets, $n = 6$) at day 6 or injected intraperitoneally (i.p.) with RT53 (2.4 mg/kg in normal saline) at day 10 every day for a total of seven doses ($n = 6$). Survival curves were analyzed with the Mantel-Cox test. (j) APL mice obtained as in (i) were either left untreated ($n = 6$), injected i.p. with RT53 (2.4 mg/kg in normal saline) at day 10 every other day for a total of seven doses (D10 Q2D schedule, $n = 6$) or at day 20 every day for a total of seven doses (D20 schedule, $n = 4$). Survival curves were analyzed with the Mantel-Cox test.

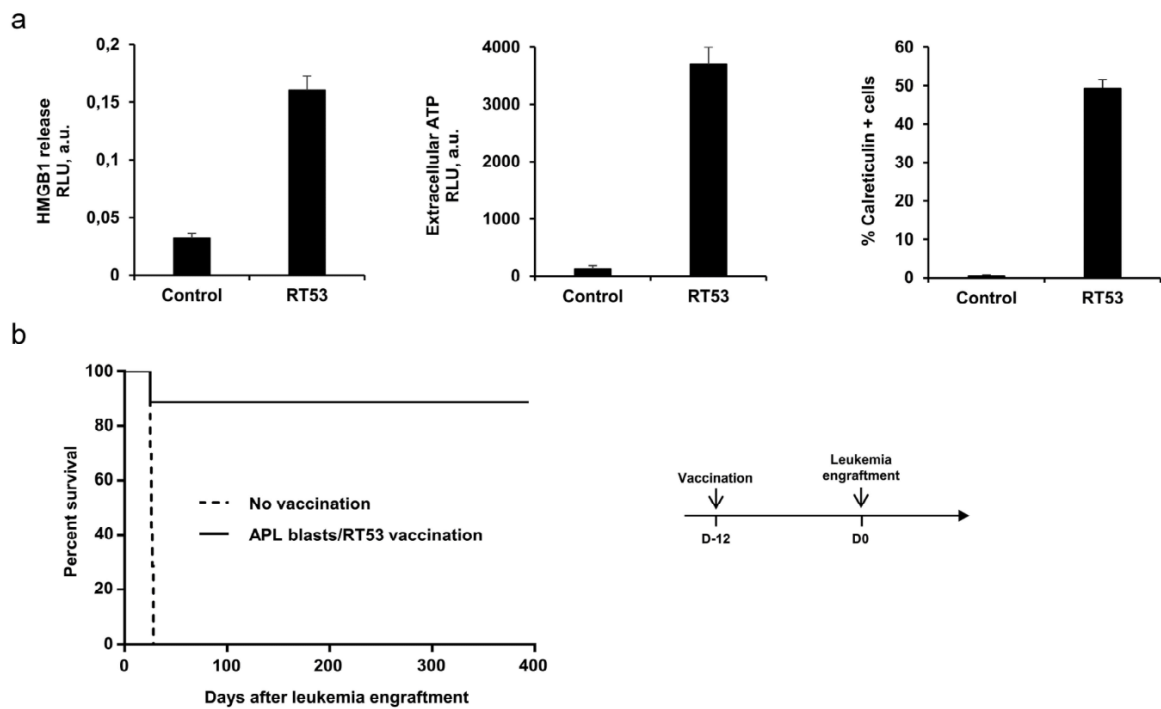


Figure 2. Inhibition of APL progression by prophylactic vaccination with RT53-treated APL blasts. (a) APL blasts in basal RPMI medium were left untreated or treated with either 5 μM of RT53 for 6 h (CRT exposure analysis) or 10 μM of RT53 for 1 h (HMGB1 and ATP release analysis). Extracellular HMGB1 (left) and ATP (middle) were then measured in the culture supernatant by ELISA and ATP-bioluminescence assays, respectively, and surface exposure of CRT (right) detected by FACS analysis. (b) APL blasts were exposed to 30 μM RT53 in basal RPMI medium for 3 h for cell death induction and the whole suspension was injected subcutaneously (2×10^6 cells) into the left flanks of FVB/N mice. Twelve days later, the vaccinated ($n = 8$) or control mice ($n = 7$) were injected i.v. with live 10^4 APL blasts. Survival curves were analyzed with the Mantel–Cox test. The schematic protocol used is illustrated (right).

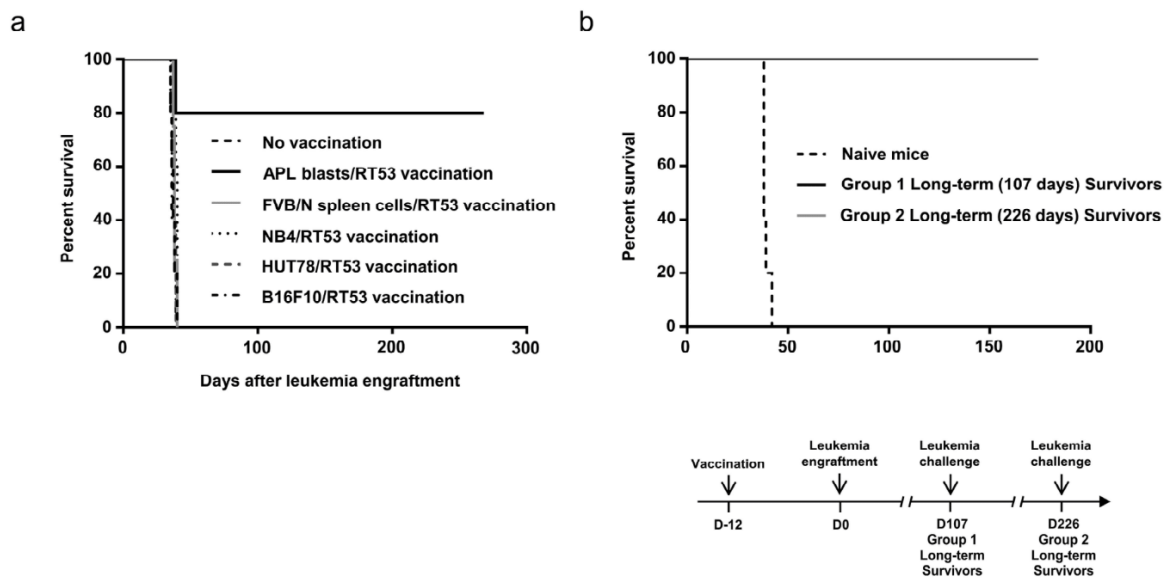


Figure 3. Tumor specificity and long-lasting effect of prophylactic vaccination with RT53-treated APL blasts. (a) FVB/N mice were vaccinated with RT53-treated APL blasts ($n = 10$), RT53-treated spleen cells from healthy mice ($n = 5$), or the indicated RT53-treated cells ($n = 5$ per group) using the same protocol as in Figure 2(b). Twelve days later, the vaccinated or control mice were injected i.v. with live 10^4 APL blasts. Survival curves were analyzed with the Mantel–Cox test. (b) Surviving mice from Figure 2(b) were challenged with 10^4 live APL spleen blasts 107 days (group 1, $n = 5$) or 226 days (group 2, $n = 4$) after initial APL engraftment. Survival curves were analyzed with the Mantel–Cox test. The schematic protocol used is illustrated (lower panel).

development, indicating that the protection induced by RT53-treated APL cells is tumor specific. Moreover, the absence of protection observed following vaccination with RT53-treated NB4 cells suggests that immune clearance of leukemic cells in RT53-exposed APL cells vaccinated animals does not rely on the recognition of the unique PML-RAR α fusion protein, which is also expressed in NB4 cells. Finally, vaccination with RT53-treated spleen cells from healthy FVB/N mice generated no protection (Figure 3(a)), indicating that the prophylactic effect against APL was exclusively triggered by the RT53-treated leukemic APL cells.

We next determined whether surviving mice developed long-lasting antileukemic protection. At 107 or 226 days after initial leukemia engraftment, survivors from Figure 2 (b) or control mice were challenged with 10^4 live APL spleen blast cells, in the absence of any further therapy. Strikingly, all vaccinated animals that received vaccination were protected from APL cells challenge, whereas all control mice succumbed to leukemia within 40 days (Figure 3 (b)). These results indicate that single vaccination with RT53-exposed APL cells induces eradication of a rapidly fatal tumor burden and evokes effective, long-lasting prophylaxis capable of preventing leukemia. Moreover, when we inoculated 10^7 spleen cells originating from long-term survivors vaccinated with RT53-treated APL blasts into secondary recipients, none of the injected mice developed APL (followed up >200 days; not shown), suggesting that this vaccine leads to eradication of APL-initiating cells. Injection of 10^4 spleen cells from unvaccinated APL mice was sufficient to establish APL and all recipients died (not shown).

CD4 + T cells are critical for the induction of prolonged survival induced by the RT53-treated APL cells vaccine

To determine the cells involved in the prophylactic effect of RT53-treated APL cells vaccination, mice were depleted of CD4 $^+$ T, CD8 $^+$ T or both T cell populations using cell type-specific antibodies. Depletion of CD4 $^+$ T cells notably reduced vaccine-induced protection, whereas depletion of CD8 $^+$ T cells had no effect on vaccine efficacy (Figure 4), demonstrating the essential role of CD4 $^+$ T cells in the induction of effective antileukemic immunity. As CD4 $^+$ T cells are crucial in the establishment of immune memory,¹⁶ our results might explain the protective effect observed in Figure 3(b). However, complete loss of protection was observed in mice that were depleted of both T-cell populations (Figure 4), indicating that the antileukemic response generated by RT53-treated APL cells vaccination required the presence of both CD4 $^+$ and CD8 $^+$ T cells. Although the precise mechanisms involved in vaccination-induced protection remain to be defined, the observation that leukemia development is effectively contained in mice depleted for CD8 $^+$ T cells is suggestive of the induction of innate immune cells, such as macrophages and natural killer cells, which can be activated by CD4 $^+$ T cells.¹⁷ A cytotoxic activity of CD4 $^+$ T cells toward the leukemic cells is also possible, as witnessed in different experimental tumor settings.^{18–20} Of note, depletion of either CD4 $^+$, CD8 $^+$ or both T cell populations in long-term survivors from Figure 2(b) did not result in APL (Supplementary Figure 1), indicating that CD4 $^+$ and/or CD8 $^+$ T cells were not necessary for the maintenance of the antileukemic effects of RT53-treated APL cells vaccination and suggesting strongly that this vaccination leads to a cure of the mice.

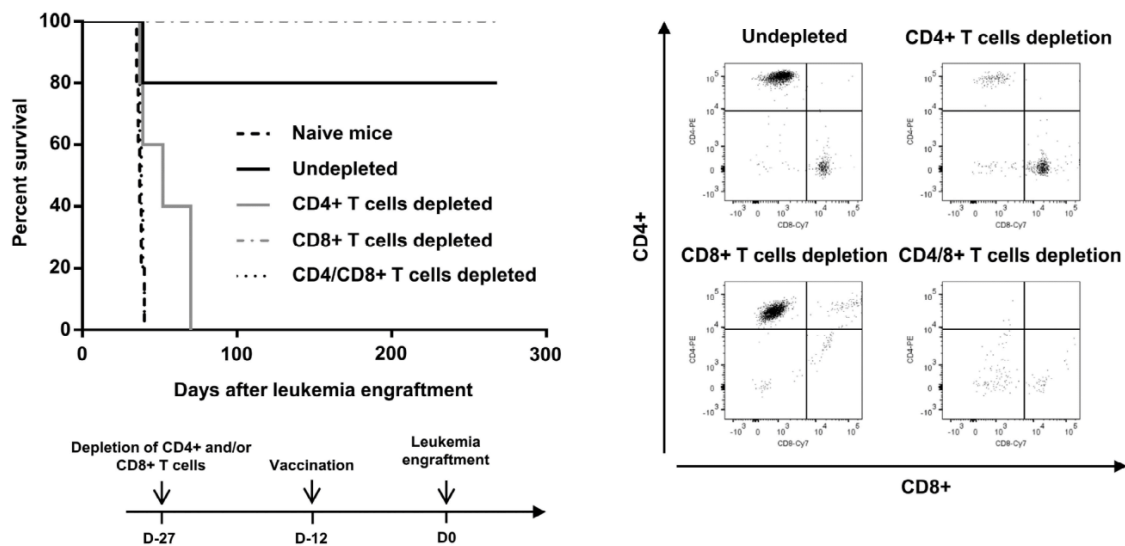


Figure 4. Requirement of CD4 $^+$ and CD8 $^+$ T cells for prolonged survival induced by vaccination with RT53-treated APL blasts. FVB/N mice were depleted of either CD4 $^+$, CD8 $^+$ or both T cell populations by bi-weekly i.p. injection of 0.2 mg of T cell type-specific monoclonal antibodies starting 2 weeks before experiments. Injections were then performed 2 times per week during the study period. The efficacy of depletion was monitored by flow cytometric analysis (right panel). Depleted ($n = 5$ per group) or naive mice ($n = 10$) were then vaccinated with RT53-treated APL blasts and injected i.v. with live 10^4 APL blasts (left, upper panel). Survival curves were analyzed with the Mantel–Cox test. The schematic protocol used is illustrated (left, lower panel).

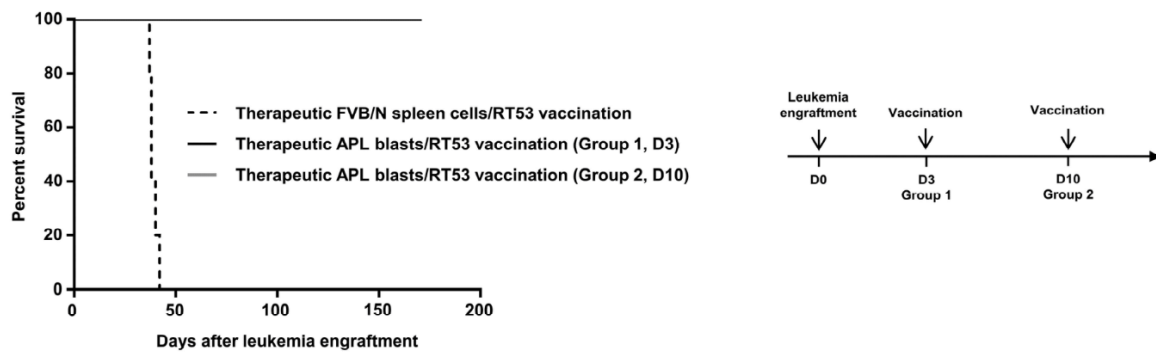


Figure 5. Therapeutic efficacy of RT53-treated APL blast vaccination in well-established leukemia. 10^4 APL blasts were inoculated i.v. into FVB/N mice at day 0. Mice were then vaccinated with RT53-treated APL blast 3 or 10 days after leukemia engraftment ($n = 5$ per group). Survival curves were analyzed with the Mantel–Cox test. The schematic protocol used is illustrated (right panel).

The RT53-treated APL cells vaccine is effective in mice with well-established leukemia

Having shown that RT53-treated APL cells vaccination can elicit an efficient prophylactic antileukemic effect, we next tested the therapeutic benefit of the vaccine in mice with well-established leukemia. For that purpose, mice received the RT53-treated APL cells 3 (rising disease) or 10 (well-established disease)¹³ days after APL cell engraftment and the onset of the disease was compared to that of non-vaccinated controls. Very interestingly, 100% of the vaccinated mice were protected from leukemia development and remained disease-free through 80 days of observation, irrespective of the immunization schedule (Figure 5, lower panel). These data indicate that the therapeutic administration of the RT53-treated APL cells vaccine resulted in the eradication of leukemic cells in all the tested mice, even when vaccination was delayed until 10 days after tumor inoculation, indicating the effectiveness of this approach.

Concluding remarks

Acute leukemia such as AML is known to generate an immunosuppressive environment that circumvent immunosurveillance mechanisms.^{21–27} Therefore, immunotherapy has great potential as a more effective and less toxic alternative to current treatments for leukemia patients. We report here a simple, highly efficient and practical strategy for immunotherapy of leukemia. By using a well-established, aggressive APL model, we showed that single vaccination with a vaccine comprising whole leukemic cells exposed to RT53, shown here to induce immunogenic cell death, protected against the development of leukemia *in vivo* both prophylactically and therapeutically. Cure of the tumor was observed and the vaccinated animals were protected against subsequent leukemia challenge in the absence of any further boosts, through the generation of long-lasting, protective tumor-specific responses involving CD4 + T cells. Such vaccine-based approach is practical, as it does not require the knowledge of specific tumor antigens, is not limited by the HLA phenotype and is safe because the antitumor effect is obtained without the use of potentially toxic immunostimulatory

adjuvants in the vaccine. Because leukemic blasts can be easily obtained from the blood or bone marrow of patients at diagnosis, yielding sufficient material for clinical use, RT53-treated leukemic cells vaccines may be a workable and effective strategy for immunotherapy of leukemia. Further, we demonstrated the single-agent efficacy of RT53 for the treatment of established leukemia, even at late stages, suggesting that RT53 might constitute a therapeutic option for patients who experienced multiple relapses because of resistance to approved therapies. Along with the absence of toxicity, these preclinical efficacy evidences support further development and clinical testing of RT53-based therapies in the context of acute leukemia and maybe other hematological malignancies.

Acknowledgments

We thank the coworkers of the Animal Experimental Facilities of the Institut de Recherche Saint-Louis as well as the staff of the Institut Cochin imaging platform. We are grateful to Michael Bishop and Scott Kogan (University of California San Francisco (UCSF)) for the APL cells. This study was supported in part by grants from Association Laurette Fugain to T.B., H.D. and J-L.P. and La Ligue Nationale contre le Cancer (Grant No SR17/75-38) and Cancéropole Ile de France to J-L.P.

Funding

This work was supported by Association Laurette Fugain, Cancéropole Ile de France and the Ligue Nationale contre le Cancer [SR17/75-38].

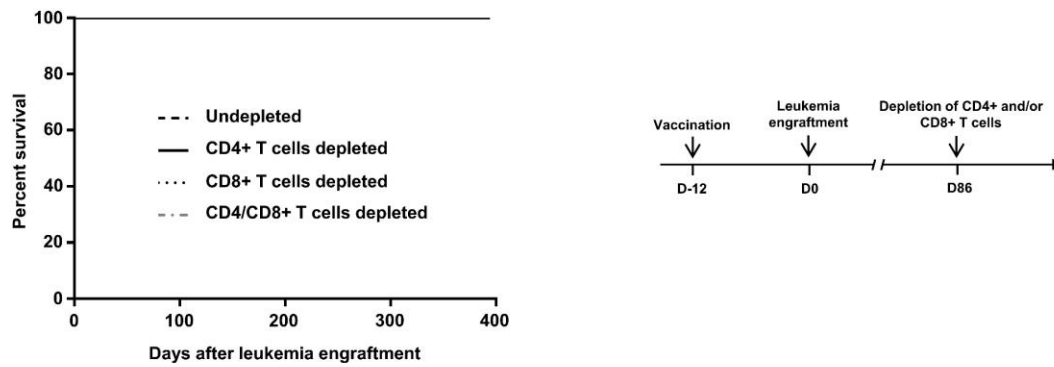
Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

References

1. Ellis LM, Hicklin DJ. Resistance to targeted therapies: refining anticancer therapy in the era of molecular oncology. *Clin Cancer Res.* 2009;15:7471–7478. doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-1070.
2. Neel DS, Bivona TG. Resistance is futile: overcoming resistance to targeted therapies in lung adenocarcinoma. *NPJ Precis Oncol.* 2017;1(3).

3. Martin SD, Coukos G, Holt RA, Nelson BH. Targeting the undruggable: immunotherapy meets personalized oncology in the genomic era. *Ann Oncol.* 2015;26:2367–2374. doi:10.1093/annonc/mdv382.
4. Thallinger C, Fureder T, Preusser M, Heller G, Mullauer L, Holler C, Prosch H, Frank N, Swierzewski R, Berger W, et al. Review of cancer treatment with immune checkpoint inhibitors: current concepts, expectations, limitations and pitfalls. *Wien Klin Wochenschr.* 2018;130:85–91. doi:10.1007/s00508-017-1285-9.
5. De Kouchkovsky I, Abdul-Hay M. Acute myeloid leukemia: a comprehensive review and 2016 update. *Blood Cancer J.* 2016;6:e441. doi:10.1038/bcj.2016.50.
6. Jagot-Lacoussiere L, Kotula E, Villoutreix BO, Bruzzoni-Giovanelli H, Poyet JL. A cell-penetrating peptide targeting AAC-11 specifically induces cancer cells death. *Cancer Res.* 2016;76:5479–5490. doi:10.1158/0008-5472.CAN-16-0302.
7. Rigou P, Piddubnyak V, Faye A, Rain JC, Michel L, Calvo F, Poyet JL. The antiapoptotic protein AAC-11 interacts with and regulates Acinus-mediated DNA fragmentation. *Embo J.* 2009;28:1576–1588. doi:10.1038/emboj.2009.106.
8. Pasquereau-Kotula E, Habault J, Kroemer G, Poyet JL. The anticancer peptide RT53 induces immunogenic cell death. *PLoS One.* 2018;13:e0201220. doi:10.1371/journal.pone.0201220.
9. Brown D, Kogan S, Lagasse E, Weissman I, Alcalay M, Pelicci PG, Atwater S, Bishop JM. A PMLRARalpha transgene initiates murine acute promyelocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94:2551–2556. doi:10.1073/pnas.94.6.2551.
10. Pasparakis M, Vandenabeele P. Necroptosis and its role in inflammation. *Nature.* 2015;517:311–320. doi:10.1038/nature14191.
11. Dodo K, Katoh M, Shimizu T, Takahashi M, Sodeoka M. Inhibition of hydrogen peroxide-induced necrotic cell death with 3-amino-2-indolylmaleimide derivatives. *Bioorg Med Chem Lett.* 2005;15:3114–3118. doi:10.1016/j.bmcl.2005.04.016.
12. Lallemand-Breitenbach V, Guillemin MC, Janin A, Daniel MT, Degos L, Kogan SC, Bishop JM, de Thé H. Retinoic acid and arsenic synergize to eradicate leukemic cells in a mouse model of acute promyelocytic leukemia. *J Exp Med.* 1999;189:1043–1052. doi:10.1084/jem.189.7.1043.
13. Pokorna K, Le Pogam C, Chopin M, Balitrand N, Reboul M, Cassinat B, Chomienne C, Padua RA, Pla M. Tracking the extramedullary PML-RARalpha-positive cell reservoirs in a preclinical model: biomarker of long-term drug efficacy. *Mol Cell Probes.* 2013;27:1–5. doi:10.1016/j.mcp.2012.08.001.
14. Casares N, Pequignot MO, Tesniere A, Ghiringhelli F, Roux S, Chaput N, Schmitt E, Hamai A, Hervas-Stubbs S, Obeid M, et al. Caspase-dependent immunogenicity of doxorubicin-induced tumor cell death. *J Exp Med.* 2005;202:1691–1701. doi:10.1084/jem.20050915.
15. Kepp O, Senovilla L, Vitale I, Vacchelli E, Adjemian S, Agostinis P, Apetoh L, Aranda F, Barnaba V, Bloy N, et al. Consensus guidelines for the detection of immunogenic cell death. *Oncoimmunol.* 2014;3:e955691.
16. Chen SA, Tsai MH, Wu FT, Hsiang A, Chen YL, Lei HY, Tzai TS, Leung HW, Jin YT, Hsieh CL, et al. Induction of antitumor immunity with combination of HER2/neu DNA vaccine and interleukin 2 gene-modified tumor vaccine. *Clin Cancer Res.* 2000;6:4381–4388.
17. Luckheeram RV, Zhou R, Verma AD, Xia B. CD4(+)T cells: differentiation and functions. *Clin Dev Immunol.* 2012;2012:925135. doi:10.1155/2012/925135.
18. Quezada SA, Simpson TR, Peggs KS, Merghoub T, Vider J, Fan X, Blasberg R, Yagita H, Muranski P, Antony PA, et al. Tumor-reactive CD4(+) T cells develop cytotoxic activity and eradicate large established melanoma after transfer into lymphopenic hosts. *J Exp Med.* 2010;207:637–650. doi:10.1084/jem.20091918.
19. Fu J, Zhang Z, Zhou L, Qi Z, Xing S, Lv J, Shi J, Fu B, Liu Z, Zhang JY, et al. Impairment of CD4+ cytotoxic T cells predicts poor survival and high recurrence rates in patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatology.* 2013;58:139–149. doi:10.1002/hep.26054.
20. Sharma RK, Yolcu ES, Srivastava AK, Shirwan H. CD4+ T cells play a critical role in the generation of primary and memory antitumor immune responses elicited by SA-4-1BBL and TAA-based vaccines in mouse tumor models. *PLoS One.* 2013;8:e73145. doi:10.1371/journal.pone.0073145.
21. Barrett AJ, Le Blanc K. Immunotherapy prospects for acute myeloid leukaemia. *Clin Exp Immunol.* 2010;161:223–232. doi:10.1111/j.1365-2249.2010.04197.x.
22. Gibbins JD, Ancelet LR, Weinkove R, Compton BJ, Painter GF, Petersen TR, Hermans IF. An autologous leukemia cell vaccine prevents murine acute leukemia relapse after cytarabine treatment. *Blood.* 2014;124:2953–2963. doi:10.1182/blood-2014-04-568956.
23. Ustun C, Miller JS, Munn DH, Weisdorf DJ, Blazar BR. Regulatory T cells in acute myelogenous leukemia: is it time for immunomodulation? *Blood.* 2011;118:5084–5095. doi:10.1182/blood-2011-07-365817.
24. Mohty M, Jarrossay D, Lafage-Pochitaloff M, Zandotti C, Briere F, de Lamballeri XN, Isnardon D, Sainty D, Olive D, Gaugler B. Circulating blood dendritic cells from myeloid leukemia patients display quantitative and cytogenetic abnormalities as well as functional impairment. *Blood.* 2001;98:3750–3756. doi:10.1182/blood.V98.13.3750.
25. Szczepanski MJ, Szajnik M, Czystowska M, Mandapathil M, Strauss L, Welsh A, Foon KA, Whiteside TL, Boyiadzis M. Increased frequency and suppression by regulatory T cells in patients with acute myelogenous leukemia. *Clin Cancer Res.* 2009;15:3325–3332. doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-3010.
26. Zhou Q, Bucher C, Munger ME, Highfill SL, Tolar J, Munn DH, Levine BL, Riddle M, June CH, Vallera DA, et al. Depletion of endogenous tumor-associated regulatory T cells improves the efficacy of adoptive cytotoxic T-cell immunotherapy in murine acute myeloid leukemia. *Blood.* 2009;114:3793–3802. doi:10.1182/blood-2009-03-208181.
27. Shenghui Z, Yixiang H, Jianbo W, Kang Y, Laixi B, Yan Z, Xi X. Elevated frequencies of CD4(+) CD25(+) CD127lo regulatory T cells is associated to poor prognosis in patients with acute myeloid leukemia. *Int J Cancer J Int Du Cancer.* 2011;129:1373–1381. doi:10.1002/ijc.25791.



Supplementary Figure 1: Depletion of either CD4+, CD8+ or both T cell populations in long-term survivors from Figure 2(b) does not result in APL upon leukemia challenge.

Surviving mice from Figure 2(b) were left untreated or were depleted of either CD4+, CD8+ or both T cell populations by bi-weekly i.p. injection of 0.2 mg of T cell-type specific monoclonal antibodies starting 86 days following leukemia engraftment. Injections were then performed 2 times per week during the study period. Survival curves were analyzed with the Mantel-Cox test. The schematic protocol used is illustrated (right)

CHAPITRE 2 : Effet anti-tumoral du peptide RT39 dans le contexte des leucémies aigües et du Syndrome de Sézary

Ce second chapitre est consacré à l'évaluation pré-clinique ainsi qu'à l'étude du mécanisme d'action d'un peptide dérivé du peptide « prototype » RT53, appelé RT39, plus court de 14 résidus. Si RT53 possède des propriétés anti-tumorales prometteuses, réduire la séquence active du peptide en déterminant la séquence minimale nécessaire à son activité, outre l'intérêt de caractérisation des LZDPs, peut s'avérer très intéressant pour un futur développement clinique, en raison du coût important de la synthèse des peptides thérapeutiques.

L'évaluation de du peptide RT39 sera effectuée dans les contextes du SS et des leucémies aigües, à la fois *in vitro*, mais aussi *ex vivo* sur des prélèvements de patients, et *in vivo* dans des modèles murins de ces pathologies. Concernant le SS, le succès de cette étude pré-clinique passe par le développement d'un nouveau modèle murin, plus représentatif de la maladie, basé sur l'injection de cellules de patients (modèle PDX). Un autre axe important de ce chapitre est l'étude du mécanisme d'action du peptide : fonctionne-t-il de la même façon que le peptide RT53 (membranolyse et induction d'une MCI) ? Est-il aussi spécifique, et si oui, comment cela s'explique-t-il (étude de l'hypothèse d'un ou plusieurs partenaire(s) membranaire(s)) ?

II. Effet anti-tumoral du peptide RT39 dans le Syndrome de Sézary

1) Évaluation *in vitro*, *ex vivo* et *in vivo* et étude du mécanisme d'action

Dans un premier temps, nous avons évalué et comparé le potentiel anti-tumoral des peptides RT53 et RT39 dans le contexte du SS, en collaboration avec le Dr. A. Marie-Cardine (UMRS 976), spécialiste de cette pathologie. Le SS est un sous-type de lymphome T cutané, caractérisé par la présence d'un clone T CD4+ tumoral qui s'accumule principalement dans le sang périphérique et la peau. A l'heure actuelle, il n'existe pas de traitement efficace pour traiter cette maladie terriblement agressive.

Les résultats obtenus ont montré que les peptides LZDPs exercent une activité cytotoxique spécifique vis-à-vis des cellules de Sézary (issues de prélèvements de patients) mais pas vis-à-vis des cellules T non-tumorales. Ils induisent une membranolyse des lymphocytes T tumoraux, menant à une mort cellulaire rapide par nécrose. Cette activité membranolytique semble passer par une étape d'accumulation des LZDPs dans la membrane plasmique, suggérant l'interaction avec un partenaire spécifique d'AAC-11, et par conséquent des peptides. Étant donné la spécificité de l'activité anti-tumorale, ce partenaire devrait être présent uniquement dans les membranes plasmiques des cellules transformées. Des expériences de peptide-pull-down couplées à une analyse par spectrométrie de masse ont permis d'identifier plusieurs candidats potentiels.

Parmi ces candidats, la protéine PAK1 (p21-activated kinase) semble particulièrement intéressante. Cette protéine, connue pour être impliquée dans le cancer, est surexprimée à la membrane des cellules de Sézary

comparé aux cellules saines. De plus, des expériences de dérégulation de PAK1 par shRNA ont montré que son expression à la membrane est indispensable à la sensibilité des cellules tumorales aux LZDPs.

D'après les résultats obtenus, l'efficacité du peptide RT39 est comparable à celle du peptide RT53, justifiant son utilisation préférentielle.

Chez la souris, les données suggèrent que nos peptides ne sont ni toxiques ni immunogéniques. Fait important, après injection intraveineuse (IV) ou intrapéritonéale (IP), la demi-vie des LZDPs est de l'ordre de 30 minutes, mais le temps d'élimination est très prolongé avec des aires sous la courbe (AUC) élevées, témoins de fortes expositions. Dans un modèle de xénogreffe sous-cutané de cellules HUT78 (lignée cellulaire de SS), le traitement quotidien (voie IP à 5mg/kg) par les peptides inhibe la croissance tumorale.

Ces résultats obtenus *in vitro*, *ex vivo* et *in vivo* ont fait l'objet d'un article scientifique, qui sera soumis prochainement (**ARTICLE 3 « PAK1-dependent anti-tumor effect of anti-apoptosis clone 11 protein-derived peptides on Sézary syndrome malignant CD4+ T lymphocytes »**, [Habault](#) et al.).

PAK1-dependent anti-tumor effect of anti-apoptosis clone 11 protein-derived peptides on Sézary syndrome malignant CD4⁺ T lymphocytes

Justine HABAULT^{1,2}, Nicolas THONNART^{1,2}, Ewa KOTULA^{1,2}, Martine BAGOT^{1,2,3}, Armand BENSUSSAN^{1,2}, Bruno O. Villoutreix⁴, Anne MARIE-CARDINE^{1,2} and Jean-Luc POYET^{1,2,5}

¹ INSERM UMRS976, Institut de Recherche Saint Louis, Hôpital Saint Louis, Paris, France

² Université de Paris, France

³ AP-HP, Hôpital Saint Louis, Département de Dermatologie, Paris, France

⁴ INSERM UMRS 1177, Lille, France

⁵c-Dithem, Inserm Consortium for Discovery and Innovation in Therapy and Medicine

Running title: Peptide-based depletion of Sézary cells

A.M-C. and J-L.P. contributed equally to this work.

Corresponding authors:

Dr Anne MARIE-CARDINE, INSERM UMRS976, Hôpital Saint Louis, Pavillon Bazin, 1 avenue Claude Vellefaux, 75010 Paris, France. Tel: (33) 1 53 72 20 78. Fax: (33) 1 53 72 20 51. E-mail: anne.marie-cardine@inserm.fr. Dr Jean-Luc POYET, INSERM UMRS976, Hôpital Saint Louis, Bâtiment Hayem, 1 avenue Claude Vellefaux, 75010 Paris, France. Tel: (33) 666775145. Fax: (33) 142385345. E-mail: jean-luc.poyet@inserm.fr.

Abstract

Sézary syndrome is an aggressive form of cutaneous T cell lymphoma, especially at late stages (5-year survival <25%), characterized by the presence of a malignant CD4⁺ T cell clone in both blood and skin. Its pathophysiology is still poorly understood and the development of targeted therapies hampered by the absence of specific target proteins. The antiapoptotic factor AAC-11 plays important roles in cancer cell progression and survival and thus has been considered as an anticancer therapeutic target. Here we evaluated the use of cell-penetrating peptides derived from AAC-11 as potential anticancer agents for the treatment of Sézary syndrome. We show that a peptide, called RT39 and corresponding to AAC-11 binding site to its protein partners coupled to the cell penetrating sequence penetratin, is able to induce the specific elimination of the malignant T cell clone both *in vivo* on Sézary patients' circulating cells and *in vivo* in a sub-cutaneous xenograft mouse model.

RT39-mediated clearance of malignant cells did not occur through classical apoptosis pathways but rather reflects the ability of the peptide to promote plasma membrane disruption through pores formation. We demonstrate that the peptide acts by direct binding to plasma membrane recruited p21-activated kinase 1 (PAK1) in Sézary cells, where PAK1 is highly expressed, resulting in their selective membranolysis. Along with the absence of toxicity, these preclinical efficacy evidences suggest that RT39 might represent a promising alternative therapeutic tool for Sézary syndrome as it spares the non-malignant immune cells and, unlike recent antibody-based immunotherapies, does not require the mobilization of the cellular immunity that shows heavy deficiencies at advanced stages of the disease.

Introduction

Sézary syndrome (SS) represents a sub-type of cutaneous T cell lymphoma characterized by the presence of a malignant CD4⁺ T-cell clone that accumulates mainly in the skin and peripheral blood (Ortonne, Huet et al. 2006, Jawed, Myskowski et al. 2014). This disease shows an aggressive evolution and a poor prognosis at advanced stages. Although durable remission was obtained by allogeneic stem cell transplant for a limited number of patients (Virmani, Zain et al. 2015), current standard therapies remain unable to either overcome the massive malignant cell proliferation and accumulation and the consequent asphyxiation of the immune system, or spare the integrity of the immune system leading to severe infectious diseases (Jawed, Myskowski et al. 2014, Virmani, Zain et al. 2015).

Because patients presenting a high circulating tumor burden experience compromised immune responses as a consequence of immune cell loss, the development of targeted therapies acting independently of the cellular immunity might represent an alternate approach for these patients.

The anti-apoptosis clone-11 protein (AAC-11), also known as apoptosis inhibitor 5 (Api5), has been described as an anti-apoptotic protein overexpressed in various cancer cells and whose depletion results in cancer cells death upon starvation (Tewari, Yu et al. 1997, Kim, Cho et al. 2000). The anti-apoptotic effect of AAC-11 appears to be clinically relevant as the overexpression of AAC-11 was linked to a bad prognosis for non-small cell lung or cervical cancer patients (Faye and Poyet 2010). Decreased expression of various tumor suppressor microRNAs

in several cancers correlates with AAC-11 upregulation, which might be linked to tumor progression (Wang, Lee et al. 2008, Pekow, Dougherty et al. 2012, Bertero, Bourget-Ponzio et al. 2013, Siu, Abou-Kheir et al. 2014, Pekow, Meckel et al. 2015). A critical role for AAC-11 in the sensitivity of malignant cells against anti-tumor agents or stress-induced apoptosis was also demonstrated, indicating that this protein acts as a cellular integrator upon stressful situations (Faye and Poyet 2010). Thus, targeting the AAC-11 survival pathway could constitute an attractive strategy for developing cancer therapeutics. Although the precise mechanisms by which AAC-11 inhibits apoptosis are still poorly defined, AAC-11 is known to function as a scaffold protein for apoptosis-related proteins among which the apoptotic and splicing factor Acinus (Rigou, Piddubnyak et al. 2009). AAC-11 interaction with Acinus leads to an inhibition of the apoptosis-related DNA fragmentation while conversely, the inhibition of AAC-11/Acinus complexes formation resulted in a higher sensitivity of cancer cell lines towards drugs-induced cytotoxicity (Rigou, Piddubnyak et al. 2009). These data suggest that the inability of AAC-11 to interact with its potential binding partners might abolish its anti-apoptotic function, providing a rationale for the development of agents able to block such interactions as tumor cell death inducers (Faye and Poyet 2010). In this regard an AAC-11-derived peptide, encompassing the heptad leucine repeat region of the molecule (RT53 peptide), which acts as a protein-protein interaction module, has shown potent anti-tumor activity on various cancer cell lines and in melanoma mouse xenograft models (Jagot-Lacoussiere, Kotula et al. 2016, Pasquereau-Kotula, Habault et al. 2018). As both resistance of the malignant T cell clone to apoptosis following activation and immune response impairment are well-known characteristics of Sézary syndrome at advanced stages (Thonnart, Caudron et al. 2014), we aimed to validate a possible anti-tumor effect of AAC-11-derived peptides in the context of this disease.

Material and Methods

Patients and cells

SS diagnosis was established on recognized international clinical, histological and biological criteria. Blood from SS patients with more than 90% of malignant CD4⁺ T cells (identified by their TCR-V β rearrangement) was collected for the present study, which was approved by the institutional ethics committee (Saint Louis Hospital, Paris). Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated from heparinized venous blood by density gradient centrifugation over lymphocytes separating medium (LSM; PAA Laboratories, Les Mureaux, France). CD4⁺ T cells were purified from freshly isolated PBMCs by MACS using the CD4⁺ T cell isolation

kit according to the manufacturer's protocol (Miltenyi Biotech). The Sézary cell line HUT78 was amplified as previously described and cultured in RPMI 1640 supplemented with 2 mM L-glutamine, 1% penicillin-streptomycin (Invitrogen) and 10% heat-inactivated fetal calf serum (Life Technologies).

Materials and antibodies

All chemicals were purchased from Sigma. Antibodies were from Cell Signaling Technology (rabbit anti-PAK1, rabbit anti-phospho-PAK1/S144), Sigma (mouse anti-HA), Thermofisher Scientific (AlexaFluor 488-coupled goat anti-mouse Ig, AlexaFluor 594-conjugated goat anti-rabbit Ig), BD Bioscience (mouse anti-human CD3), Beckman Coulter (mouse anti-TCR-V β , -CD3 and -CD4 antibodies) and Abcam (rabbit anti-AAC-11, mouse anti-Ki-67).

Peptides

All peptides were synthesized by Proteogenix (Strasbourg, France) and guaranteed more than 95% pure by HPLC and mass spectrometry analysis. Peptides sequences are the following: RK16: RQIKIWFQNRRMKWKK; RT53: RQIKIWFQNRRMKWKKAKLNAEKLKDFKIRLQYFARGLQVYIRQLRLALQGKT; RT39: RQIKIWFQNRRMKWKKLQYFARGLQVYIRQLRLALQGKT; RT39M: RQIKIWFQNRRMKWKKLQYFAAGLQVYIRQLRLALQGKT.

Cell treatment and cell death monitoring

Cells were left untreated or treated with 5, 7.5 or 10 μ M of RK16, RT39, RT39M or RT53 peptide for 4h at 37°C. When mentioned, a 1 h pre-incubation step was performed in the presence of the pan caspase inhibitor ZVAD-FMK (50 μ M) or the necroptosis inhibitor Necrostatin-1 (50 μ M). After incubation, cells were processed for flow cytometry to assess cell death. Immunolabelings were performed according to a standard procedure with a mix of anti-TCR-V β , -CD3 and -CD4 mAbs. Detection of apoptotic cells was performed using 7AAD (BD Biosciences), according to the supplier's protocol (Philpott, Turner et al. 1996). Cells were analyzed on a CytoFlex cytometer (Beckman Coulter) and data treated with FlowJo software. Necrotic plasma membrane permeabilization was assessed by measuring the release of the enzyme lactate dehydrogenase (LDH) in the culture medium with the CytoTox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay kit (Promega, Madison, WI).

Three-dimensional (3-D) structure prediction of RT39 and RT39M peptides

3-D structure prediction was performed with QUARK (Xu and Zhang, *Proteins*, 2012; 80:1715–1735 and PEP-FOLD (Shen et al., *J. Chem. Theory Comput.*, 2014, 10 (10), pp 4745–4758). The top scoring prediction models and the consensus models predicted by both methods were then investigated interactively and reported here.

Peptides cellular uptake assessment

Cellular internalization of rhodamine-labelled peptides was analyzed by flow cytometry. Cells were incubated in the presence of the peptide (5 μ M) in complete medium for 1 h. Cells were then washed three times in PBS and incubated with trypsin (1 mg/ml) for 10 min to remove the extracellular unbound peptides. Finally, cells were resuspended in PBS and kept on ice. Fluorescence intensity of internalized peptides in live cells was measured by flow cytometry using BD FACS CANTO II TM by acquiring 1×10^4 cells. Data were analyzed using FACSDIVA TM software (BD biosciences).

ATP release and HMGB1 release

Release of ATP and HMGB1 in the culture medium were assessed with the Enliten ATP Assay kit (Promega, Madison, WI, USA) or the HMGB1 ELISA kit (IBL International, Hamburg, Germany), respectively.

Immunofluorescence

Frozen OCT-embedded CD4⁺ T cell pellet or Sézary patient skin biopsies were cryo-sectioned and subjected to staining according to a standard protocol (Ghazi, Thonnart et al. 2015). Briefly, frozen sections were fixed in methanol, air-dried, washed and subjected to a saturation step. Labelings were then performed with rhodamine-coupled RK16, RT39 or RT39M peptide, anti-CD3 ϵ mAb (UCHT1; BD Bioscience), anti-PAK1 or anti-phospho-PAK1 antibody (Sigma-Aldrich) plus AlexaFluor 488-coupled goat anti-mouse Ig antibodies or AlexaFluor 594-conjugated goat anti-rabbit Ig antibodies (Life Technologies). After washes, slices were mounted in DAPI Fluoromount-G (Southern Biotech) and analyzed on a Leica DMRB microscope. Wild type or transduced HUT78 cells were pre-incubated with the indicated rhodamine-coupled peptide, subjected to cytopsin (600 rpm for 5 min) and then fixed in 3% PFA. Labeling were performed as described for frozen-OCT cryo-sections.

Double sandwich ELISA

Anti-PAK1 antibody was adsorbed overnight at 4°C on a high-binding 96-wells microplate. The next day, wells were washed 3 times with PBS, saturated with PBS/1% BSA for 1 h at 37°C. Recombinant PAK1 in PBS/0.1% Tween-20 was next added to the wells (21.35 ng/well) and left for 1 h à 37°C. After washes in PBS, biotinylated peptide RK16, RT39M or RT39

was added for 1 h at 37°C. After washes and incubation with Neutravidin-HRP (ThermoFisher; 1:2000 in PBS/0.1% Tween/1% BSA) for 1 h at 37°C, revelation was performed with 0.4 mg/ml OPD (o-Phenylenediamine) in 0.05 M Phospho Citrate Buffer and the colorimetric reaction was detected at 492 nm using a microplate reader.

Cell lysates, immunoprecipitation and Western blotting

Purified CD4⁺ T cells or HUT78 cells were lysed in lysis buffer (50 mM Tris/HCl pH 7.6, 150 mM NaCl, 1% Nonidet-P40, 10 μ g/ml leupeptin and aprotinin and 0.1 mM PMSF) and clarified by centrifugation at 15 000 g for 15 min at 4°C. For Western blotting, samples were separated by SDS-PAGE and transferred onto a nitrocellulose membrane. Analyses were realized using an anti-AAC-11 or β -actin antibody. After incubation with the appropriate horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (Jackson ImmunoResearch), the detection was performed with an ECL system (Thermo Fisher Scientific) and an ImageQuant LAS 400 system (GE Healthcare). Immunoprecipitation was performed on post-nuclear lysates by addition of 10 μ g of antibody (anti-PAK1 or anti-HA) and incubation for 2 h at 4°C. In some settings, HUT78 were treated with 5 μ M of peptides prior to cell lysis. Proteins/antibody complexes were then collected with Protein G Sepharose beads (Sigma) (1h30 at 4°C) and processed for SDS-PAGE and Western blotting.

Lentiviral transduction

Lentiviral particles were produced in HEK293 with the helper plasmids pLvVSVg and pLvPack (Sigma) plus a lentiviral plasmid. shRNAs against PAK1 originate from lentiviral plasmids MISSION pLKO.1-puro (Sigma, NM_002576 containing the sequence CCGGCCCTAAACCATGGTTCTAAACCTCGA GGTTTAGAACCATGGTTTAGGGTTTTTTG). shSCR (SHC016-1EA, Sigma) contains the sequence CCGGCAACAAGATGAAGAGCACCAACTCG AGTTGGTGCTCTTCATCTTGTTGTTTTTG. PAK1 cDNA (a generous gift from Dr Céline Dermardirossian, TSRI, La Jolla, CA) was cloned into the pLVXIRE5-ZsGreen lentiviral vector (Clontech) with a Ha-tag. Lentiviral infection of target cells was done as previously described (Jagot-Lacoussiere, Faye et al. 2015).

Xenograft mouse model

Animal experiments were approved by The University Board Ethics Committee for Experimental Animal Studies (#2303.01). Eight-week-old female NOD-SCID-gamma (NSG) mice were bred and housed under pathogen-free conditions at our animal facility (IUH, Saint Louis Hospital, Paris, France). HUT78 Sézary cell line

(10^6) was injected subcutaneously and tumor growth was followed. When the tumors reached approximately 100 mm^3 , mice were randomized in groups of 7 and peptide treatment started. It consisted in a daily intra-peritoneal (i.p) injection of normal saline (NT), RK16, RT39 or RT39M peptide (5 mg/kg). Tumor volume was measured each day and calculated as length x width²/2.

Histological analysis

Mice subcutaneous tumors or organs (lung, liver and spleen) were fixed in 4% neutral buffered formalin and embedded in paraffin. Sections (4 mm) were stained with hematoxylin eosin (H&E) and subjected to microscopic analysis and image recording. Necrosis and whole tumor areas were measured using ImageJ software. Histological analysis was performed at the HistIM facility of Cochin Institute (Paris, France). Slides were imaged using a Lamina multilabel slide scanner (Perkin Elmer).

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using a Mann Whitney or Student *t* test. P values of less than 0.05 were considered statistically significant. For immunoblots, protein bands intensity was quantified using Image Quant TL software (GE Healthcare) and the protein of interest/loading control ratio calculated for each sample. Data were then expressed as mean \pm SD.

Results

The AAC-11-derived peptide RT39 exhibits cytotoxic properties against HUT78 Sézary cell line

Previous studies have established that the inhibition of AAC-11 interaction with its binding partners resulted in an increased susceptibility of tumor cells to apoptosis (Rigou, Pidubnyak et al. 2009). In addition, a peptide spanning the complete heptad

leucine repeat region of AAC-11 (residues 363-399) linked to the cell-penetrating sequence (CPP) penetratin (RT53 peptide) was shown to induce cancer cell death *in vitro* and to inhibit melanoma tumor growth in a xenograft mouse model (Jagot-Lacoussiere, Kotula et al. 2016). To develop shorter AAC-11-derived peptides that are cytotoxic toward tumor cells, peptides representing subregions of the heptad leucine repeat portion of AAC-11 were synthesized and conjugated to penetratin. This strategy allowed us to identify a peptide encompassing amino-acids 377-399 of AAC-11 (RT39 peptide) that exhibited a potent cytotoxic effect as RT53 toward the Sézary cell line HUT78 (Figure 1A). Penetratin peptide alone (herein called RK16) did not induce cancer cell death, demonstrating that the direct killing ability of RT39 depends on the specific AAC-11 sequence. While investigating the residues requirement for the cytotoxic activity of RT39, we discovered that replacing arginine 22 (RT39 numbering, corresponding to arginine 382 of AAC-11) by an alanine (RT39M peptide) totally abrogated RT39 killing ability (Figure 1A). Of note, both peptides showed comparable cellular uptake (Figure 1B), indicating that RT39M lack of cytotoxicity was not a result of altered penetration properties. Moreover, *in silico* predictions suggest that RT39 and RT39M could adopt a relatively similar extended helical structure (Figure 1C), indicating that the substitution of arginine 22 by an alanine in RT39M did not affect the peptide structure but rather seemed to enhance its helicity. This is in line with previous observations indicating that alanine substitutions usually have a minimal effect on the overall secondary structure of the investigated protein or peptide (Morrison and Weiss 2001). Therefore, our results indicate that arginine 22 of RT39 is critically required for the cytotoxic activity of the peptide.

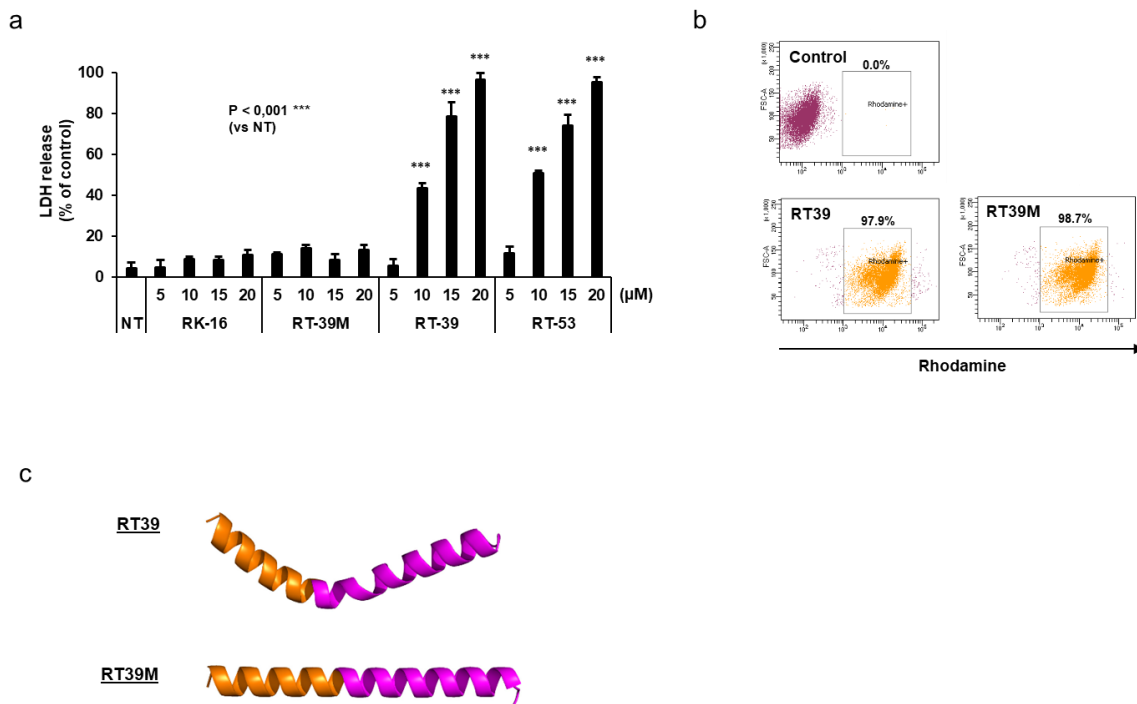


Figure 1: RT39 induces HUT78 Sézary cells death. (A) HUT78 cells were incubated with increasing concentrations of RK16, RT53, RT39 or RT39M peptide for 4 h at 37°C. Cell viability was estimated by lactate dehydrogenase (LDH) release from cells into the culture medium. The obtained values were normalized to those of the maximum LDH released (completely lysed) control. Data are means±s.e.m. ($n=3$). (B) Cellular uptake of RT39 and RT39M. HUT78 cells were incubated with 5 μM of Rhodamine-labelled RT39 or RT39M for 1 h in complete medium. Cells were then washed with PBS, incubated in trypsin-EDTA solution (0.01% trypsin) at 37°C for 10 min, resuspended in PBS and analyzed by flow cytometry. (C) Structural analysis of RT39 and RT39M. The regions corresponding to the penetratin moiety and the portion of the heptad leucine repeat of AAC-11 are in orange and magenta, respectively.

RT39 peptide promotes the specific depletion of Sézary patients' malignant T cell clone

We next examined the anti-tumor effect of RT39 on Sézary patients' peripheral blood mononuclear cells (PBMC; $n=4$). Penetratine alone (RK16) and the inactive point mutant RT39M peptides were used as negative controls. In our experimental cell death assay setting, 3 groups of cells were followed: i) the malignant T-cell clone, identified by its TCR-V β rearrangement ($\text{CD3}^+\text{CD4}^+\text{V}\beta^+$ cells), ii) the non-malignant CD4^+ T-cells ($\text{CD3}^+\text{CD4}^+\text{V}\beta^-$ cells), and iii) the non T-cells (CD3^- cells). As shown on Figure 2A, the exposure of Sézary patients' PBMC to increasing concentrations of RT39, but not of RK16 or RT39M, resulted in a dose-dependent and specific death of the malignant CD4^+ T-cells, as measured by 7AAD incorporation. In contrast to the malignant cell line HUT78 (see Figure 1A), significant death of freshly isolated Sézary cells is obtained with the

lowest concentration tested of RT39 (5 μM). Remarkably, no cell death was detected in the non-tumoral CD4^+ and non-T cells subsets even at the highest concentration tested, indicating that RT39 exhibits selective cytotoxicity toward tumor cells. As observed for HUT78 cells, depletion of the tumor clone was dependent on AAC-11 peptide sequence as no cell death was observed in the presence of RK16 control peptide (Figure 2A). Noteworthy, pre-incubation of the freshly-isolated Sézary cells with the pan-caspase inhibitor ZVAD-FMK or the necroptosis inhibitor Necrostatin-1 failed to prevent Sézary cells killing induced by RT39 (Figure 2B). Similar data were obtained using the HUT78 cell line (data not shown). Therefore, our results indicate that RT39 can selectively kill primary Sézary cells while sparing the non-malignant cells via a caspase-independent and necroptosis-unrelated cell death mechanism.

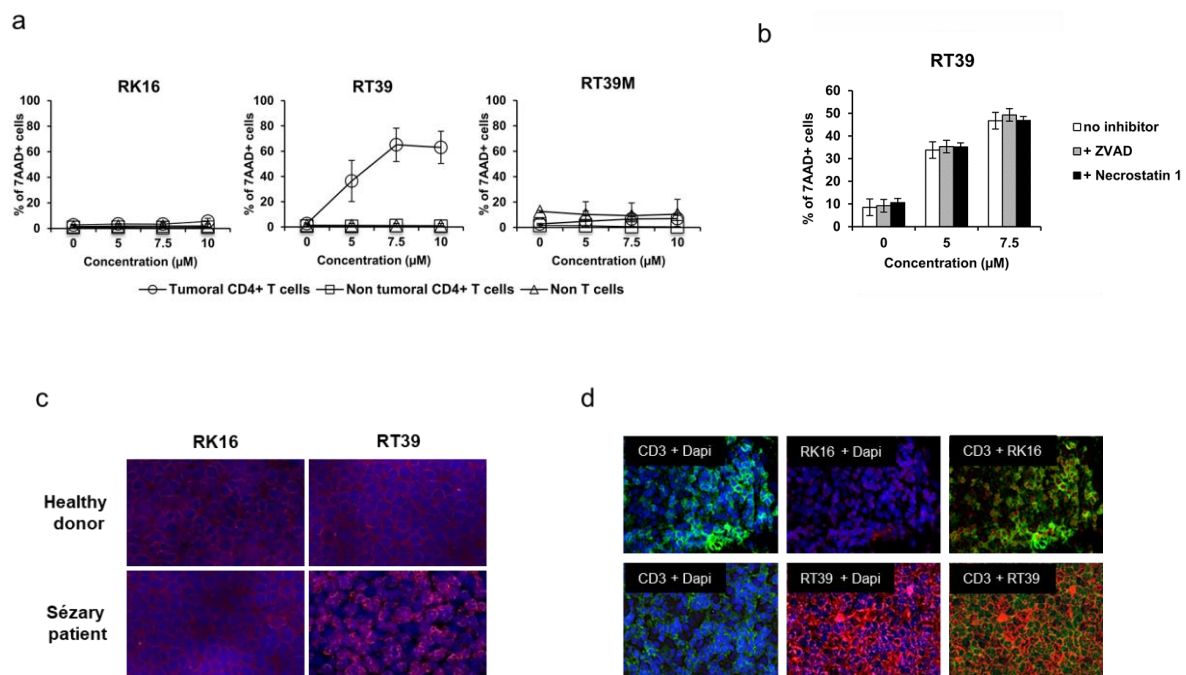


Figure 2: RT39 selectively induces primary Sézary cells death through a caspase-independent and necroptosis-independent mechanism. (A) Sézary patients' PBMC were incubated with increasing concentrations of RK16, RT39 or RT39M peptide for 4 h at 37°C. After immunolabeling with anti-TCRV β -FITC, -CD4-PE, -CD3-PE-Cy7 mAbs and 7-AAD, cells were analyzed by flow cytometry. Shown is the mean percentage \pm SD of 7-AAD $^+$ apoptotic cells within the non-T cells, the malignant and non-malignant CD4^+ T-cells from experiments performed on 4 patients. (B) Sézary patients' PBMC were either left untreated or pre-incubated for 1 h at 37°C with the pan-caspase inhibitor ZVAD-FMK or the necroptosis inhibitor Necrostatin-1. The cells were then incubated with increasing concentrations of RT39 for 4 h at 37°C. Cell death was analyzed as in (A). Given are the mean \pm SD of the % of dead malignant T cells of all patients tested ($n=4$). (C-D) RT39 peptide shows a plasma membrane-like distribution in Sézary malignant cells but not in normal CD4^+ T cells. (C) CD4^+ T cells were purified from healthy donors or Sézary patients' blood, pelleted and embedded in OCT. Stainings were performed using rhodamine-coupled RK16 or RT39 peptide, anti-CD3 mAb plus Alexa 488-conjugated goat anti-mouse Ig antibodies and DAPI. Original magnification x20. (D) Cryo-sections from Sézary patient skin biopsy were prepared and processed as in (C). Original magnification x20

RT39-mediated Sézary cells death results from a membranolytic mechanism

We next sought to investigate RT39 antitumor mechanisms of action. The rapid 7-AAD incorporation and LDH leakage upon RT39 exposure observed in Figures 1A and 2A suggests that Sézary cells death might be associated with loss of outer cell membrane integrity, which is a characteristic feature of necrosis. Consistent with hypothesis, transmission electron microscopy analysis revealed that RT39-treated HUT78 Sézary cells displayed an obvious necrotic phenotype, such as cytoplasmic swelling and plasma membrane disruption, without any morphological signs of nuclear apoptosis (Figure S1). Furthermore, in line with the absence of toxicity toward non-malignant CD4⁺ T cells observed in Figure 2A, RT39 treatment did not cause the hemolysis of mouse erythrocytes (Figure S2), ruling out nonspecific detergent-like effects on the plasma membrane of Sézary cells. To understand the lytic action of RT39, we sought to investigate whether the peptide could target Sézary cells plasma membrane. Previous data obtained with the RT53 peptide on melanoma cancer cell lines suggested that its anti-tumor effect was a consequence of its retention at the plasma membrane, leading, due to its membranolytic amphipathic α -helical structure, to the formation of pores and subsequent loss of integrity of the extracellular barrier (Jagot-Lacoussiere, Kotula et al. 2016). To determine whether a similar mechanism might apply to RT39 in freshly isolated Sézary cells, cryo-sections of OCT-embedded purified CD4⁺ T cell pellets from healthy donors or Sézary patients were stained with rhodamine-conjugated RK16 or RT39 peptides. As shown in Figure 2C, while RK16 exhibited a rather homogeneous distribution in both healthy donors and Sézary patients CD4⁺ T cells, RT39 mainly adopted a punctate and plasma membrane-associated pattern in Sézary malignant T cells. However, RT39 cellular distribution in healthy donors T cells was similar to that of RK16 (Figure 2C). The peculiar distribution of RT39 observed in Sézary T cells might be indicative of its binding to specific protein target(s) in tumor cells plasma membrane. Similar labeling is observed on skin biopsies obtained from Sézary syndrome patients. As shown in Figure 2D on a representative patient skin section, while RK16 appeared diffuse and evenly distributed in T lymphocytes constituting the tumor infiltrate, RT39 adopted a punctuate pattern delineating the T cells edges. Altogether these data demonstrate that RT39 adopts a similar cellular distribution pattern in both circulating and cutaneous tumor T cells, with a plasma membrane-like association, sustaining the idea of its interaction with membrane-bound target protein(s) which expression and/or cellular distribution is associated to a malignant T cell phenotype. As RT39 exhibits an amphipathic alpha helix structure that is similar to

that of known membrane-active peptides (Polyansky, Chugunov et al. 2012) (Figure 1C), our results suggest that the observed membrane binding of RT39 could explain its membranolytic properties on cancer cells.

RT39 and AAC-11 bind to PAK1

To define the molecular basis of RT39 Sézary cells membranolytic properties, we developed a peptide pull-down strategy to identify potential ligands for the peptide. HUT78 cell extracts were incubated with biotin-labeled RT39 or control (RK16) peptide and the lysates were precipitated using streptavidin beads. Mass spectrometry analysis revealed the presence of p21-activated kinase 1 (PAK1) among the proteins specifically associated to RT39 but not with the control peptide (data not shown). A colorimetric ELISA assay using recombinant PAK1 and biotinylated peptides confirmed that RT39, but not RK16 or the inactive point mutant RT39M, directly interacts with PAK1 (Figure 3A). Since the AAC-11-specific region of RT39 covers part of the heptad leucine repeat region of AAC-11, a motif known to be involved in the interactions between AAC-11 and its molecular partners, we hypothesized that PAK1 could interact with AAC-11. To evaluate the AAC-11/PAK1 interaction in Sézary cells, lysates of HUT78 cells were subjected to immunoprecipitation with an anti-PAK1 or isotype control antibody and the precipitates were examined for the presence of AAC-11 by immunoblotting. As shown in Figure 3B, AAC-11 and PAK1 were found to interact at the endogenous level. Importantly, a mutated AAC-11 protein in which arginine 382 has been substituted by an alanine, hence mimicking the mutation introduced in the RT39M inactive peptide, was unable to interact with endogenous PAK1 (Figure 3C), confirming that AAC-11 interacts with PAK1 by means of its heptad leucine repeat region and that arginine 382 of AAC-11 is critically involved in this interaction. Our observation that RT39 directly binds to PAK1 finally prompted use to investigate whether RT39 could interfere with AAC-11 binding to PAK1. For that purpose, HUT78 cells were exposed to a sub-toxic (5 μ M) dose of RT39 or RT39M for 1 h and the levels of AAC-11 associated with PAK1 were determined by immunoprecipitation. Interestingly, RT39, but not the inactive point mutant RT39M, was able to substantially diminish the binding of AAC-11 with PAK1 (Figure 3D), confirming the ability of RT39 to penetrate Sézary cells and disrupt the association of AAC-11 with its molecular partners.

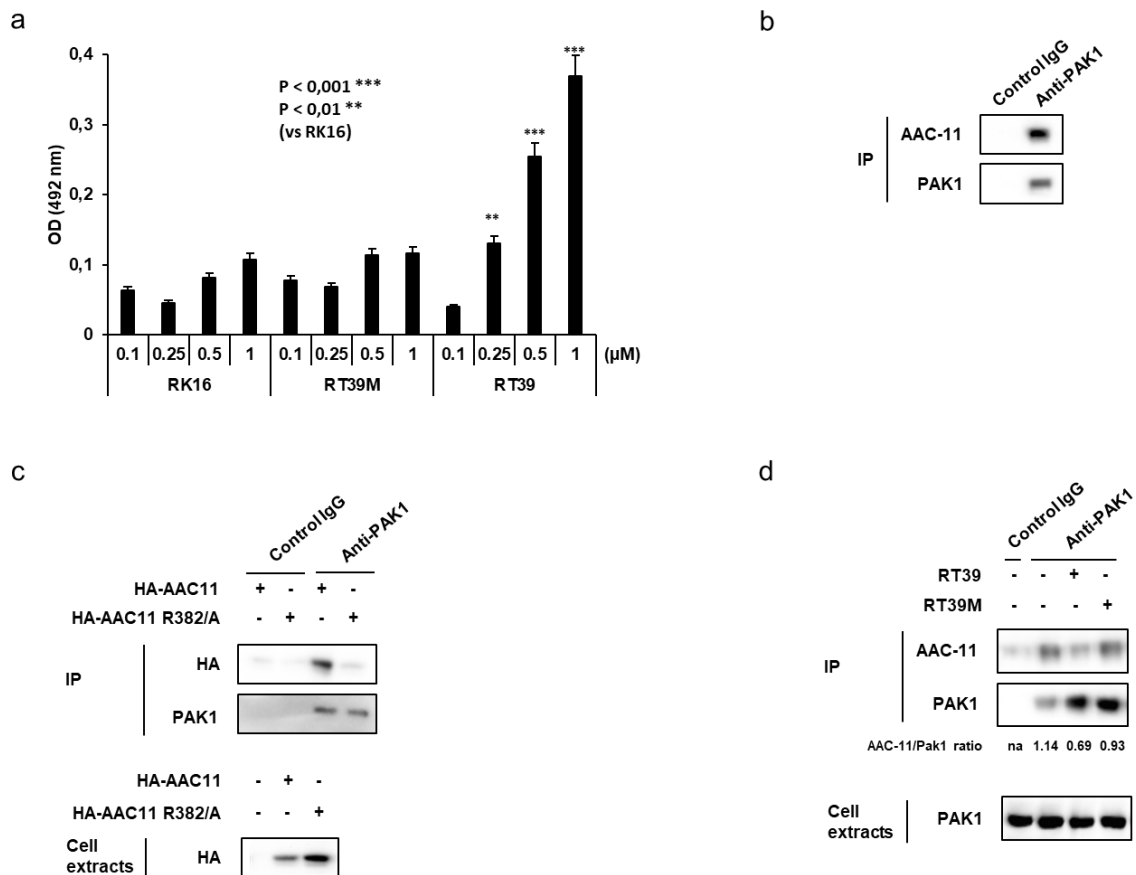


Figure 3: RT39 and AAC-11 interact with PAK1. (A) Direct binding between RT39 and PAK1. Recombinant PAK1 was added to wells coated with anti-PAK1 antibody. After washing, the indicated biotinylated peptides were incubated for 1 h at 37°C. Binding of the peptides was quantified with Neutravidin-HRP. (B) Endogenous interaction between AAC-11 and PAK1. HUT78 cells extracts were subjected to immunoprecipitation with a control antibody or anti-PAK1 antibody followed by immunoblotting with anti-AAC-11 or anti-PAK1 antibodies. (C) Substitution of arginine 382 of AAC-11 by an alanine abrogates AAC-11/PAK1 interaction. Extracts from HUT78 cells expressing the indicated HA-tagged constructs were either left untreated (lower panel) or subjected to immunoprecipitation with a control antibody or anti-PAK1 antibody (upper panel) followed by immunoblotting with anti-HA or anti-PAK1 antibodies. (D) RT39 but not RT39M disrupts endogenous AAC-11/PAK1 interaction. Cell extracts from HUT78 cells exposed or not to the indicated peptides (5 μM, 1 h) were either left untreated (lower panel) or subjected to immunoprecipitation with a control antibody or anti-PAK1 antibody followed by immunoblotting with anti-AAC-11 or anti-PAK1 antibodies. Protein bands intensity of the blot was quantified by densitometric analysis to calculate the mean ± SD of the AAC-11/PAK1 ratio for each IP.

PAK1 is constitutively activated and accumulates at the membrane level of Sézary cells

PAK1 is involved in multiple cellular pathways, including cytoskeleton remodeling and cell motility, and is known to play a role in survival, proliferation and invasiveness of cancer cells (Kumar, Sanawar et al. 2017). Consequently, changes in the levels and activity of PAK1 are frequently described in human malignancies (Kumar and Li 2016). To gain insight into PAK1 expression in Sézary cells, we first examined its expression level in whole cell extracts from purified circulating CD4⁺ T cells isolated from Sézary patients presenting a high blood tumor burden (over 90% of malignant cells within their CD4⁺ T cell population; n=7). As shown in Figure 4A, western blot analysis showed higher expression levels of PAK1 in Sézary cells as compared with CD4⁺ T lymphocytes isolated from the blood of healthy donors. Indeed, although PAK1 expression in malignant T cells varied among patients, a

significant increase in PAK1 expression in the Sézary patient's group was observed over the control group, demonstrating an up-regulation of PAK1 expression in Sézary patients' malignant CD4⁺ T cells. PAK1 exists in the cytoplasm in homodimeric trans-inhibited conformation but can be activated by recruitment to the membrane (Lei, Lu et al. 2000, Bokoch 2003). PAK1 activation is accompanied by phosphorylation events catalyzed by signaling molecules such as PDK1, Akt or PAK1 itself (Bokoch 2003, Molli, Li et al. 2009). Immunofluorescence labeling of OCT-embedded purified peripheral blood CD4⁺ T cell pellets from healthy donors or Sézary patients were performed and revealed a substantial increase of PAK1 and phospho-PAK1 location at the plasma membrane level in patient cells as compared to healthy donors CD4⁺ T cells (Figure 4C). Thus, PAK1 expression appeared up-regulated in Sézary T cells, this increased expression being correlated with an accumulation of activated PAK1 at the cell membrane level.

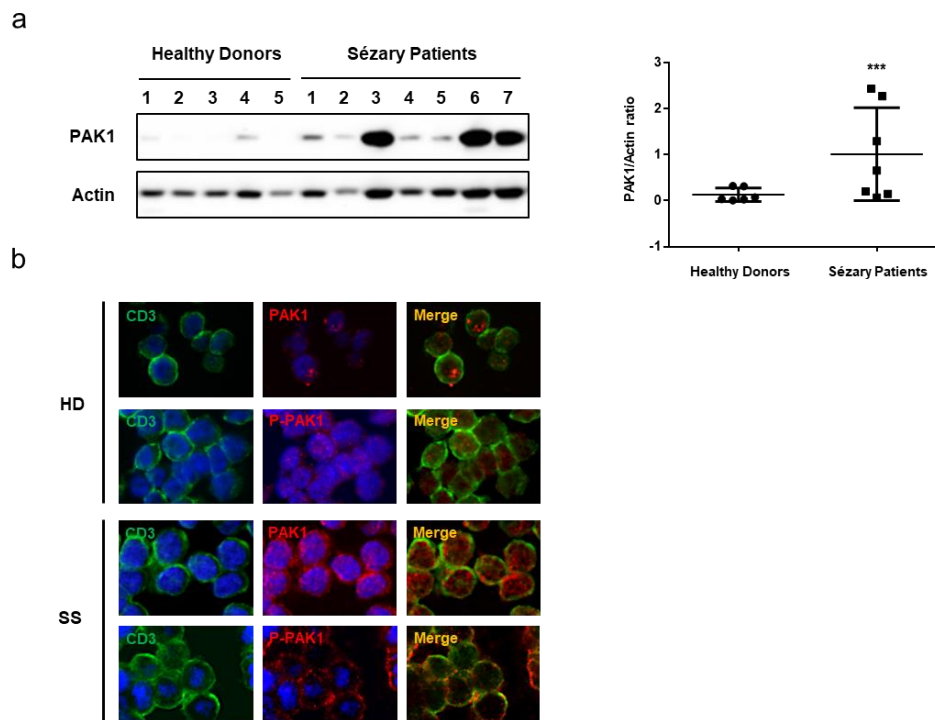


Figure 4: Active phospho-PAK1 is expressed at the membrane level of Sézary cells. (A) Total cell lysates prepared from sorted circulating CD4⁺ T cells from Sézary patients (n=7) or healthy donors (n=5) were separated by SDS-PAGE and immunoblotted using anti-PAK1 and anti-actin antibodies (left panel). Protein bands intensity was quantified by densitometric analysis to calculate the mean \pm SD of the PAK1/actin ratio for each group (right panel; *** $p=0.0002$) (B) Membrane fractions prepared from sorted circulating CD4⁺ T cells from Sézary patients (n=6) or healthy donors (n=5) were separated by SDS-PAGE and immunoblotted using anti-phospho-PAK1 (S199/204), -PAK1 and -CD3 antibodies (upper panel). Protein bands intensity was quantified by densitometric analysis to calculate the mean \pm SD of the phospho-PAK1/PAK1 ratio for each group (lower panel; *** $p=0.001$). (C) CD4⁺ T cells were purified from healthy donors or Sézary patients' blood, pelleted and embedded in OCT. Immunolabelings were performed using anti-PAK1, -phospho-PAK1 and -CD3 antibodies. Nuclei were stained with DAPI. Original magnification x20.

PAK1 mediates RT39 binding to Sézary cells membrane and is critical for its membranolytic action

Our observation indicating that RT39 can interact with PAK1 (Figures 3A and 3D), together with the increased membrane-associated PAK1 in Sézary cells (Figure 4B and C), strongly suggests that the interaction of RT39 with PAK1 might drive the retention of RT39 at the plasma membrane of Sézary cells, allowing its subsequent membranolytic effect. To test this hypothesis, we first evaluated whether RT39 could colocalize with PAK1 in Sézary cells. Staining with rhodamine-coupled RT39 peptide and anti-PAK1 or anti-phospho-PAK1 antibody were performed on purified CD4⁺ T cell pellets from healthy donors or from Sézary patients using rhodamine-coupled RT39 peptide and anti-PAK1 or anti-phospho-PAK1 antibody. As shown in Figure 5A, low fluorescence intensity levels of PAK1, phospho-PAK1 and RT39 were found to co-localize in healthy donors' cells, whereas similar but much brighter overlapping signals were detected in Sézary cells, suggesting PAK1 up-regulated expression and activation, and consequent higher RT39 binding and accumulation, in the tumor cells. Note that no RT39M accumulation was detected in both healthy

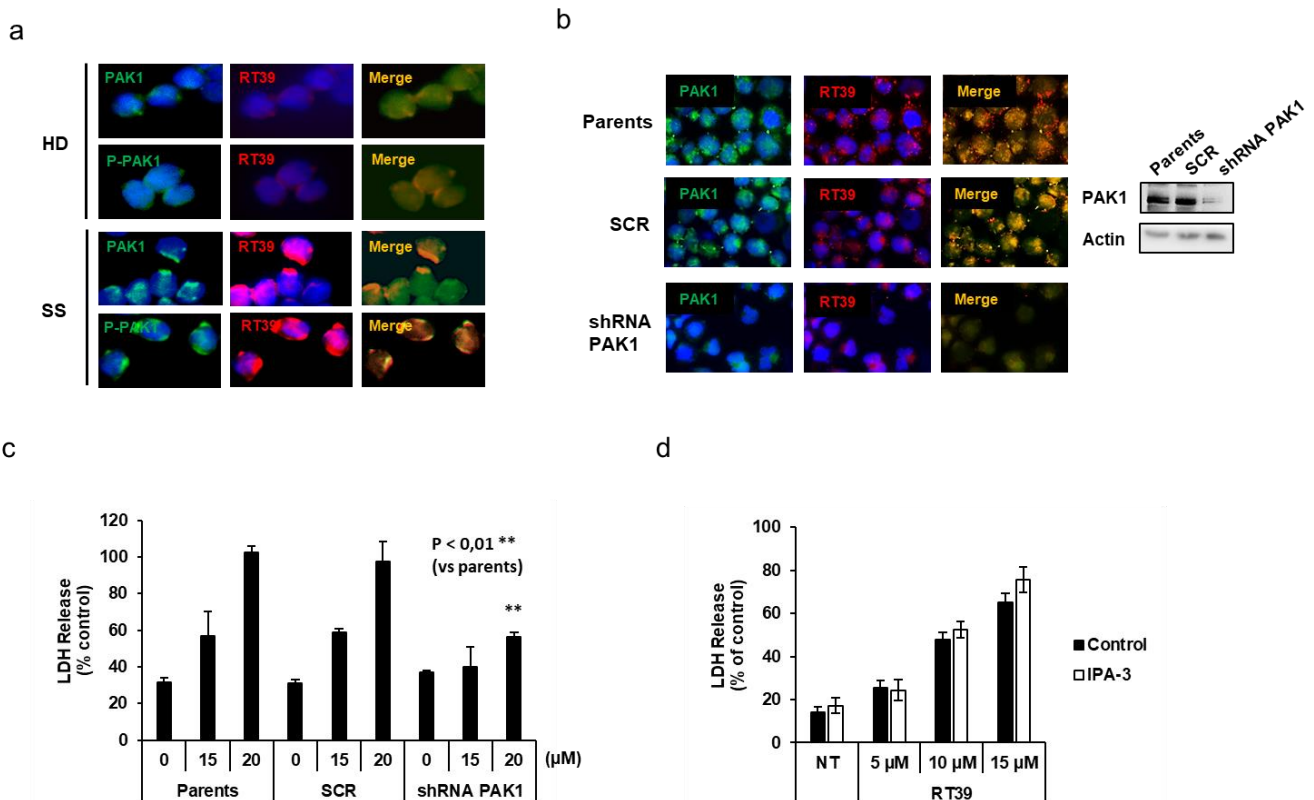
donors' or Sézary patients' cells, as expected from its inability to bind to PAK1 (data not shown).

We next examined the requirement for PAK1 in RT39-induced membranolysis by studying the effect of inhibition of PAK1 by either shRNA knock-down or by using the selective allosteric inhibitor IPA-3 in the Sézary cell line HUT78. PAK1 knockdown in shRNA-transduced cells was confirmed by western blot analysis (Figure 5B, right). Furthermore, immunofluorescence microscopy analysis revealed that plasma membrane-bound PAK1 was essentially eliminated in PAK1 shRNA-transduced cells, as well as RT39 cellular accumulation (Figure 5B, left). Interestingly, PAK1 knockdown afforded substantial protection towards RT39-mediated cytotoxicity as compared with control shRNA-transduced cells (Figure 5C).

We then explored the impact of an acute inhibition of PAK1 kinase activity on RT39-induced Sézary cells death using the PAK1 enzymatic activity inhibitor, IPA-3. Of note, since IPA-3 does not inhibit already activated PAK1, cells were pre-incubated with IPA-3 for 1 h before addition of RT39. This preincubation time was sufficient to deplete pre-activated PAK1 from HUT78 cells (Figure S3). In contrast with the observed requirement for PAK1 expression in RT39-mediated

cytotoxicity, inhibition of PAK1 activation with IPA-3 did not affect RT39 membranolytic effect (Figure 5D). Taken together, these data strongly suggest that the presence of PAK1 at the plasma membrane, but not its enzymatic activity, is essential for the selective membranolytic effect of RT39 on Sézary cells induced by RT39. If PAK1 serves as proteinaceous membrane receptor for RT39, then overexpression of a plasma membrane-localized PAK1 should increase the ability of RT39 to induce cytotoxic injury. To test this hypothesis, we transduced HUT78 cells with a lentivector encoding either HA-tagged wild-type or kinase-dead (K299A) PAK1 fused to a membrane-targeting KCVIM sequence, which corresponds to the C-terminal pentapeptide of the membrane localization sequence of K-Ras(B) (Huang, Marshall et al. 1993, Hicks, Hartman et al. 2005). Empty constructs or a lentivector encoding HA-tagged PAK1 without the KCVIM sequence were used as controls. Western-blotting analysis of the transduced cells membrane fractions confirmed expression and location of PAK1 proteins with the membrane-targeting sequence, but not PAK1 control, at the cell membrane (Figure 5E, left).

No toxicity was associated with expression of either constructs (data not shown). We then incubated the transduced cells with increasing amounts of RT39 to determine its cytotoxic effect in the various cellular settings. As shown in Figure 5E (right), a substantial increase in LDH release was observed in PAK1-KCVIM expressing cells compared to that of empty vector transduced cells. Similar increase in LDH release was observed in catalytically inactive PAK1 (K299A)-KCVIM expressing cells, whereas expression of PAK1 lacking the membrane-localization sequence did not result in a noticeable sensitization to RT39 compared to control cells (Figure 5E, right). Finally, incubation of the transduced Sézary cells with rhodamine-labeled RT39 revealed an extensive colocalization of the peptide with both PAK1-KCVIM and PAK1 (K299A)-KCVIM at the cell membrane upon immunostaining with anti-HA antibody (Figure 5F). Taken together, these data strongly point out PAK1 as a likely proteinaceous receptor for RT39 in the context of Sézary cells membrane, establishing an association that correlates with both the direct interaction between the two partners observed in Figure 3A and the selective cytotoxicity of RT39 toward Sézary cells.



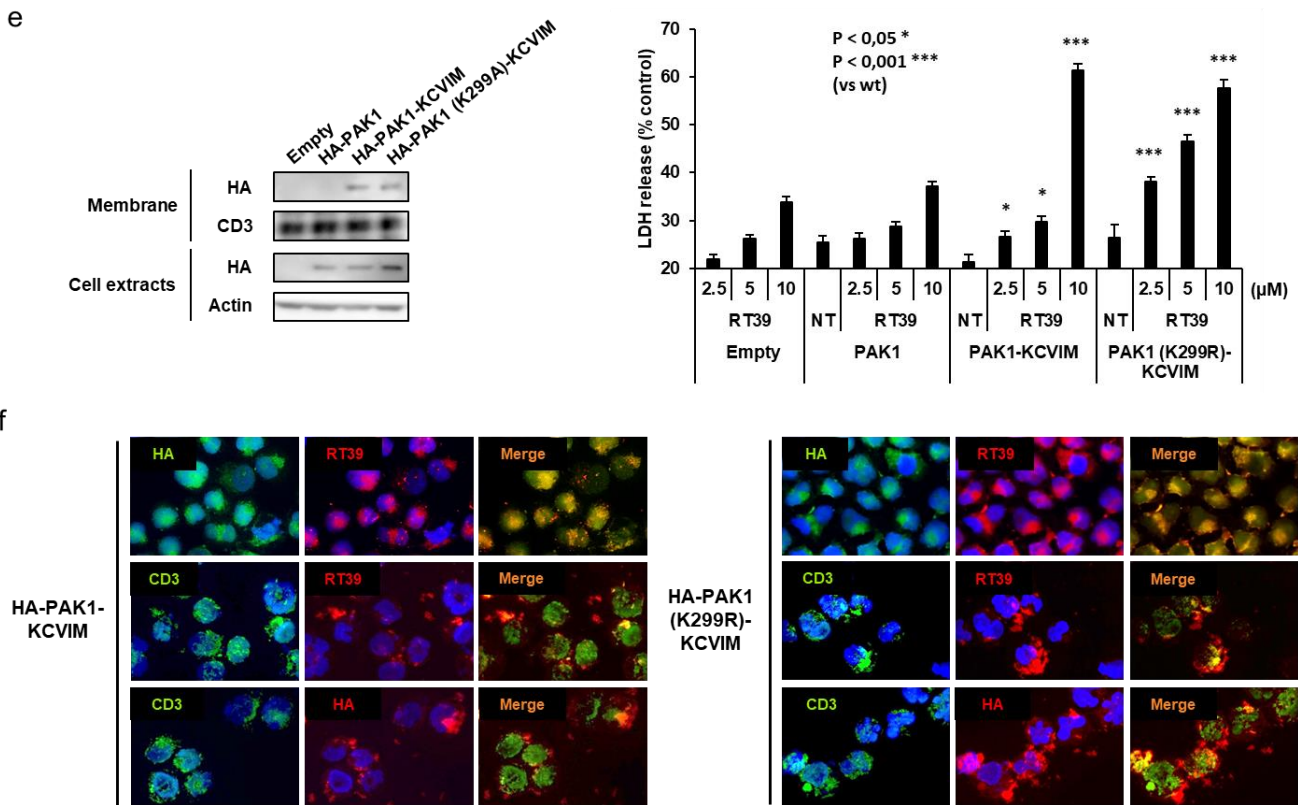


Figure 5: Involvement of PAK1 in RT39-mediated cytotoxicity. (A) CD4⁺ T cells were purified from healthy donors or Sézary patients' blood, pelleted and embedded in OCT. Stainings were performed using rhodamine-coupled RK16, RT39 or RT39M peptide and either anti-PAK1 or -phospho-PAK1 (S199/204) Ab plus Alexa 488-conjugated goat anti-rabbit Ig antibodies and DAPI. Original magnification x20. (B) HUT78 cells were either left untreated (parents) or infected with lentivirus- PAK1-shRNA or scramble-shRNA (SCR). PAK1 expression level in each cell line was assessed by immunoblotting (right panel). Cells were then exposed to 2.5 μ M of rhodamine-coupled RT39 for 1 h at 37°C, fixed in Triton X-100 and immunolabeled with anti-PAK1 antibody plus Alexa 488-conjugated goat anti-rabbit Ig antibodies and DAPI. Original magnification x20. (C) Untreated HUT78 or cells infected with lentivirus PAK1-shRNA or SCR-shRNA were incubated with increasing concentrations of RT39 for 1 h at 37°C. Cell viability was estimated by lactate dehydrogenase (LDH) release in the culture medium. The obtained values were normalized to those of the maximum LDH released (completely lysed) control. Data are means \pm s.e.m. of 3 experiments. (D) HUT78 cells were exposed to increasing concentrations of RT39 for 1 h at 37°C in the presence or absence of the PAK1 inhibitor IPA-3 (50 μ M). Cell viability was estimated as in (C). Data are means \pm s.e.m. of 3 experiments. (E) Total or membrane fractions of HUT78 cells transduced with the indicated constructs were analyzed by western blotting using the indicated antibodies (left panel). Cells transduced with the indicated constructs were either left untreated (NT) or exposed to increasing concentrations of RT39 for 1 h at 37°C. Cell viability was estimated as in (D). Data are means \pm s.e.m. of 3 independent experiments. (F) HUT78 cells transduced with the indicated constructs were exposed to 2.5 μ M of rhodamine-coupled RT39 for 1 h at 37°C, fixed in Triton X-100 and immunolabeled with anti-HA mAb or anti-CD3 mAb plus Alexa 488-conjugated goat anti-mouse Ig antibodies and DAPI. Original magnification x20.

RT39 peptide reduces tumor growth in a xenograft murine model of Sézary syndrome

We next assessed the *in vivo* antitumor activity of RT39. Preliminary analysis of RT39 toxicity demonstrated: i) no detectable *in vitro* hemolytic activity at concentrations up to 30 μ M (Figure S2), ii) no major weight loss (Figure S4) or behavior modification of mice upon repeated or single i.p. injection at doses up to 30 mg/kg and 60 mg/kg, respectively, iii) no outward signs of toxicity on all major organs, including kidney, liver, heart, lung and spleen with either treatment schedule (data not shown) and iv) no formation of anti-peptide antibodies despite sustained administration (Figure S4). Finally, the determination of RT39 peptide pharmacokinetic properties in mice showed that maximal plasmatic concentration was reached 10

minutes after i.p. injection and remained detectable for at least 2 hours, indicating a good plasma exposure (Figure S5). Combined, these observations indicate that RT39 possess a favorable safety profile and excellent stability *in vivo*.

We then examined the antitumor activity of RT39 in a Sézary syndrome xenograft model established by subcutaneous injection of HUT78 cells into NOD/SCID gamma mice. After tumor engraftment and growth, mice were injected daily with normal saline (NT) or 5 mg/kg body weight of RT39 or RT39M peptides. As shown in Figure 6A, treatment with RT39 induced significant tumor growth inhibition as compared to control mice, with approximate tumor growth reduction of 70% ($p < 0.002$). In contrast, RT39M treatment did not affect tumor growth, in agreement with our *in vitro* results. Note that, in this xenograft model, we did not detect any invasion of vital organs by HUT78 cells which

remained confined to the subcutaneous tumor (Figure 6B). Immunohistochemical analyses on paraffin-embedded tumor sections revealed significantly larger areas of necrotic cells in RT39-treated tumors as compared to control or RT39M-treated tumors (Figure 6C). However, the expression of Ki-67 as well as the percentage of TUNEL-positive cells were comparable in the different groups (not shown). Combined, these results suggest

that RT39 inhibits tumor growth by inducing tumor cells necrosis *in vivo*. Interestingly, in another xenograft model, in which HUT78 cells are injected intravenously, treatment with RT39 allows the elimination of the tumoral clone in the bloodstream (Figure S6).

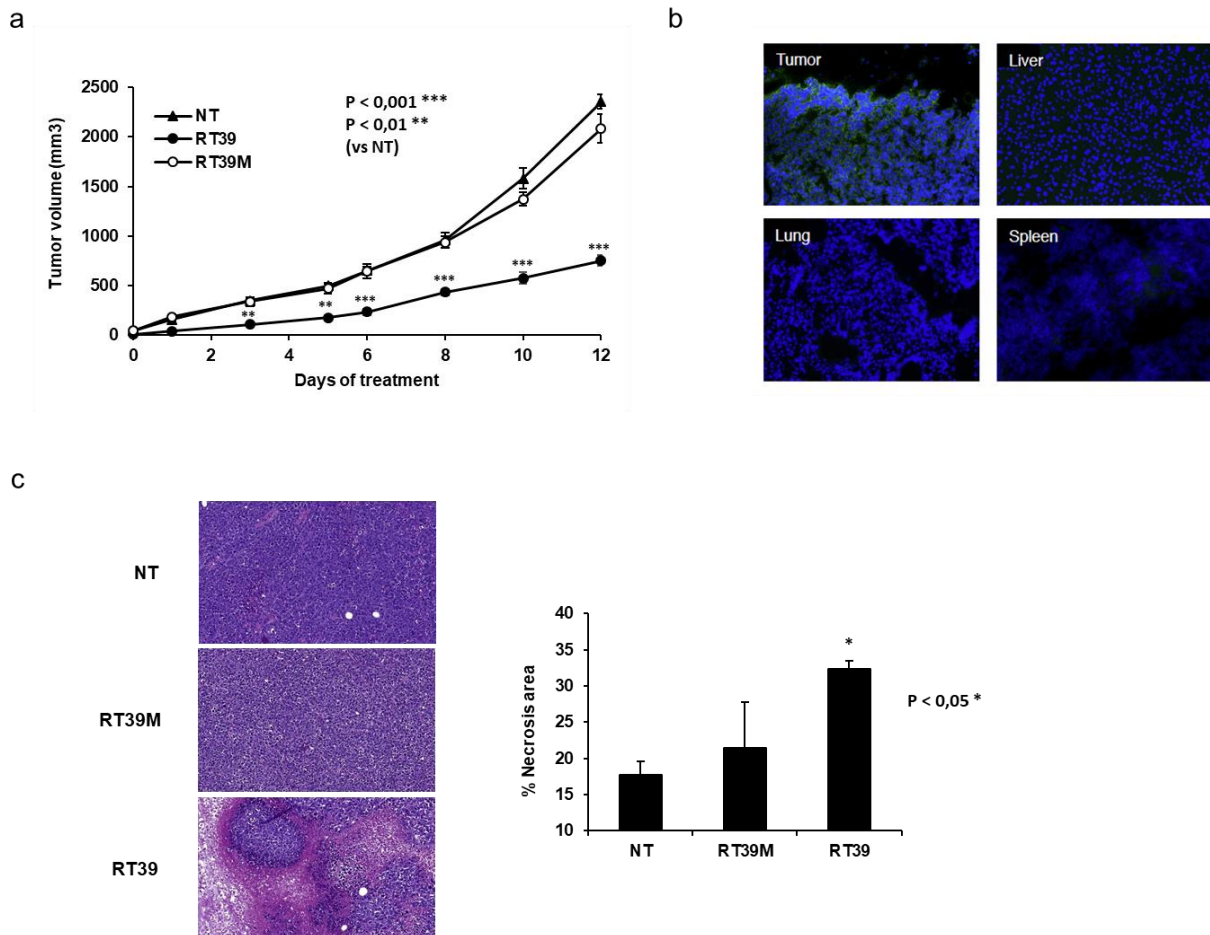


Figure 6: *In vivo* anti-tumor effect of RT39 in a subcutaneous xenograft model of Sézary syndrome (A) NSG mice were engrafted subcutaneously with HUT78 Sézary cells. Treatment started after randomization when tumors were visible and consisted in daily intraperitoneal injection of RT39 or RT39M (5 mg/kg; n=7 per group). Tumor volume was measured at the indicated days. Data represent tumor volumes for each group as means \pm SD. (B) Cryo-sections of OCT-embedded subcutaneous tumor, lung, liver, and spleen from control mice were stained with an anti-CD3 ϵ mAb plus Alexa 488-conjugated secondary antibodies. Original magnification x20. (C) Representative images of hematoxylin and eosin stained sections of tumors from mice treated with RT39, RT39M or normal saline (left panel). Quantification of necrotic area from hematoxylin and eosin sections. Data are means \pm s.e.m. of 6 tumors (right panel).

Discussion

Here we performed pre-clinical experiments to validate AAC-11-derived peptides as innovative therapeutic drugs for patients with Sézary syndrome, an aggressive and leukemic form of cutaneous T cell lymphoma. AAC-11 interacts with several apoptosis-related proteins and this complex-forming ability, probably favored by its elongated 3D structure (Han, Kim et al. 2012), appears to be essential for AAC-11 to fulfill its anti-apoptotic or pro-metastatic functions

(Van den Berghe, Laurell et al. 2000, Ahel, Horejsi et al. 2009, Rigou, Piddubnyak et al. 2009, Song, Kim et al. 2015). We have previously shown that inhibiting interactions between AAC-11 and its partners drastically increased the susceptibility of cancer cells to drug-induced apoptosis (Rigou, Piddubnyak et al. 2009). Moreover, a cell penetrating peptide (peptide RT53) comprising the whole heptad leucine repeat region of AAC-11 (residues 363-399), which functions as a protein-protein interaction module, fused at its N-terminus to the penetrative sequence was shown to induce cancer

cell death *in vitro* and to prevent tumor growth in melanoma mouse models (Jagot-Lacoussiere, Kotula et al. 2016). The heptad leucine repeat region of AAC-11 is encoded by two exons (exons 9 and 10). As exons often to structure or function units in proteins (Go 1981, Traut 1988), we hypothesized that RT53 peptide anti-cancer activity might be carried by either exon 9 or exon 10 of *AAC-11*, allowing to shorten the AAC-11 specific domain of RT53. Previous data from our group and others indicated that mutation of two exon 10-encoded leucine residues within the heptad leucine repeat region of AAC-11 (positions 384 and 391) or of the corresponding leucines in RT53, abrogated AAC-11 anti-apoptotic functions or RT53 anti-tumor activity (Tewari, Yu et al. 1997, Rigou, Piddubnyak et al. 2009, Jagot-Lacoussiere, Kotula et al. 2016), respectively. We therefore design a peptide, RT39, consisting of AAC-11 residues 377-399, encoded by exon 10, fused to the penetratin sequence and evaluated its anticancer properties in the context of Sézary syndrome.

Our *in vivo* and *in vivo* data established that RT39 exerts an efficient and specific anti-tumor activity towards circulating Sézary syndrome patients' malignant T cell clone, with no damage to the other immune cell populations. Interestingly, RT39-mediated tumor depletion did not occur through a regulated apoptotic or necroptotic pathway, but rather *via* a direct pronecrotic pathway that appears to be dependent on RT39 binding to PAK1 at the level of Sézary cell plasma membrane.

PAK1 is a major downstream effector of the Rho-GTPases Cdc42 and Rac that has been shown to play major roles in cytoskeletal remodeling, cell motility and cell proliferation and to be frequently overexpressed and hyperactivated in a number of human cancers (Kumar, Gururaj et al. 2006). Active PAK1 is known to negatively regulate tumor cells apoptosis, including chemotherapeutic agents-mediated cell death and to promote cancer cell invasion and metastasis (Deacon, Mistry et al. 2003, Dummler, Ohshiro et al. 2009). Functional study have also implicated PAK1 in cell transformation (Vadlamudi, Adam et al. 2000, Wang, Zhang et al. 2006), suggesting that PAK1 might contribute to tumorigenesis. We provide here the first evidence that PAK1 is over-expressed and constitutively activated in primary Sézary malignant cells where it consequently presented a plasma membrane-associated location. Our results are in line with that of Wang et al. who observed high PAK1 expression levels in PBMC and skin biopsies from mycosis fungoides (MF) patients, the most common cutaneous T cell lymphoma (CTCL) subtype (Wang, Gu et al. 2018). In this study, PAK1 silencing in HUT78 Sézary cell line was found to both induce spontaneous apoptosis as well as cell cycle inhibition through a PUMA/p21 axis, whereas PAK1 overexpression had the opposite effects (Wang, Gu

et al. 2018). PAK1 overexpression has also been associated with lymph nodes invasion in the context of breast cancer (Ong, Jubb et al. 2011). As Sézary malignant cells can accumulate in lymph nodes and PAK1 is known to promote CD4⁺ T cell trafficking through the expression of the lymph nodes homing molecules CCR7 and L-selectin (Dios-Esponera, Melis et al. 2019), PAK1 overexpression in Sézary cells might therefore play an important role in the disease onset and progression. However, the functional significance and the mechanism of aberrant PAK1 expression, activation and location in Sézary cells, as well as the biological function of the herein identified PAK1/AAC-11 interaction in the context of the Sézary syndrome, remain to be determined.

The activity of cytolytic peptides is dependent on several of their biophysical properties, such as their secondary structure, amphiphaticity, hydrophobicity and overall net charge. *In silico* predictions indicate that RT39 adopts an extended helical structure with the possible formation of an aromatic/hydrophobic face compatible with membrane interaction, similar to that of other known membranolytic peptides (Papo and Shai 2005). It is therefore likely that binding of RT39 to PAK1 in Sézary cells membrane increases its local concentration, resulting in pore formation and subsequent necrosis. Such mode-of-action, highlighting a crucial role for membrane-bound PAK1 in RT39 membranolytic action, is supported by our data demonstrating that: i) RT39 directly interacts with PAK1 *in vitro*, ii) RT39 and active phosphorylated PAK1 co-localized at the level of Sézary cell membranes, iii) downregulation of PAK1 expression abrogates RT39 membranolytic action and iv) cells expressing a form of PAK1 forced to associate with the plasma membrane become more susceptible to RT39 cytotoxicity, whereas expression of a form of PAK1 that does not contain a membrane-targeting sequence has little to no effect on RT39-induced membranolysis. These results strongly support a critical role for PAK1 in RT39-mediated cytotoxicity and provide important insights into how the peptide engages Sézary cells. Importantly, PAK1 is strongly expressed at the cell membrane level of peripheral blood Sézary CD4⁺ T cells as compared to circulating nonmalignant CD4⁺ T cells. Therefore, our data shed light on the mechanism whereby RT39 exhibits cancer cells-specificity.

The activity of cytolytic peptides is dependent on several of their biophysical properties, such as their secondary structure, amphiphaticity, hydrophobicity and overall net charge. *In silico* predictions indicate that RT39 adopts an extended helical structure with the possible formation of an aromatic/hydrophobic face compatible with membrane interaction, similar to that of other known membranolytic peptides (Papo and Shai 2005). It is therefore likely that binding of

RT39 to PAK1 in Sézary cells membrane increases its local concentration, resulting in pore formation and subsequent necrosis. Of note, the catalytic action of PAK1 does not seem to be required for RT39-mediated cytotoxicity as membrane expression of a catalytically inactive PAK1 produced a similar sensitization to the peptide cytotoxicity to that of wild-type PAK1 and a PAK1 synthetic inhibitor failed to prevent RT39-induced Sézary cells membranolysis. This observation is in line with a peptide only-mediated permeabilization of the Sézary cells membrane that is mostly driven by its interaction with PAK1. However, the three-dimensional structure of PAK1-bound RT39 in the context of the plasma membrane will be required to assess if the peptide retains its membrane active structure in such setting, thus validating this hypothesis.

Having demonstrated the *in vivo* efficacy of RT39 in depleting specifically Sézary syndrome malignant cells while sparing non-tumor cells, we further evaluated its activity as a single anti-tumor agent in a Sézary xenograft mouse model. Importantly, RT39 demonstrated favorable drug-like properties, including absence of immunogenicity, negligible toxicity and excellent stability *in vivo*. Moreover, treatment of NSG mice implanted with HUT78 cells with RT39 resulted in a strong inhibition of tumor growth. Analyses of tumors from treated animals demonstrated increased necrosis in RT39-exposed mice compared to control animals. These data are reminiscent to that obtained with the parental RT53 peptide when using melanoma mouse models, and strongly suggest that the observed *in vivo* antitumor effect of RT39 could be mediated through membranolysis of the tumor cells.

Supplemental data.

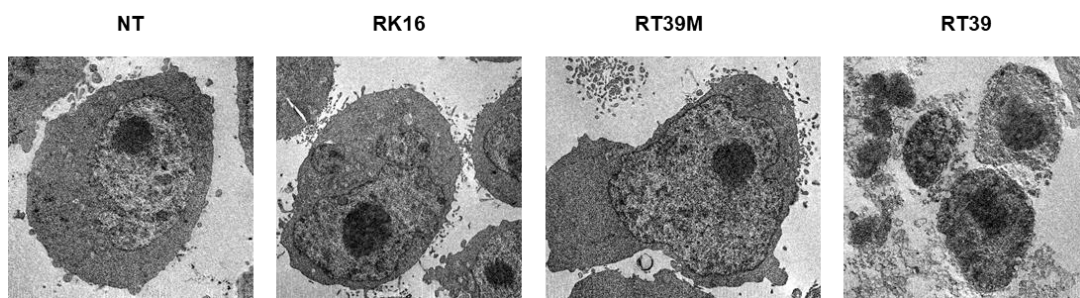


Figure S1: Ultrastructural analysis of RT39-treated HUT78 cells. HUT78 were either left untreated or exposed to 10 μ M of RT39 for 1 h. Cells were then analyzed by transmission electron microscopy following osmium tetroxide staining

In summary, we report here the identification and characterization of a novel AAC-11-derived peptide, RT39, which potently induces specific Sézary cell depletion *in vivo* in Sézary patients' circulating cells, and *in vivo* in a sub-cutaneous xenograft mouse model, through an apparently unique mechanism. From a therapeutic viewpoint, RT39 possesses highly desirable properties as it distinguishes malignant Sézary cells from normal immune cells and, unlike antibody-based immunotherapies, its mode-of-action is fully independent of the cellular immunity that is heavily deficient at advanced stages of the disease. Along with RT39 safety profile *in vivo*, these experimental results lead us to consider RT39 as a potential therapeutic agent for Sézary syndrome disease.

Acknowledgments

This work was supported by grants from INSERM and Paris Diderot University and Cancéropole Ile de France.

Authorship contributions

E.K, N.T, J.H, and A.M-C performed the experiments; A.M-C and J-L.P designed the research and analyzed the data; B.O.V performed the *in silico* studies; M.B was attending doctor for the patients; A.M-C, J.H, J-L.P, M.B and A.B wrote the paper. A.M-C and J-L.P are co-senior authors on this work.

Conflict of interest disclosure

The authors declare no competing financial interests.

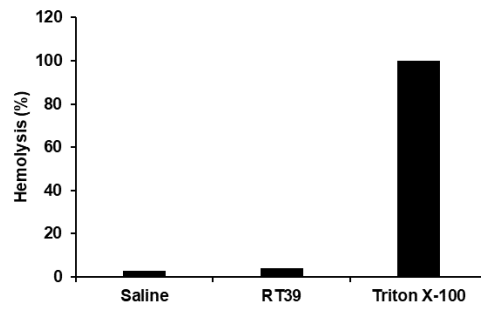


Figure S2: RT39 peptide does not induce hemolysis *in vitro*. Mice red blood cells were incubated with 30 μ M of RT39 peptide. Released hemoglobin was detected by densitometry at 540 nm. Hemoglobin release by cells treated with 1% Triton X-100 was used as 100% lysis control.

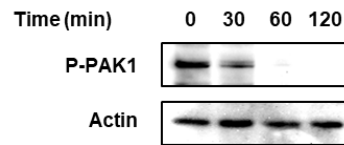


Figure S3: Effect of IPA-3 on PAK1 Ser199/Ser204 phosphorylation. HUT78 cells were incubated with the PAK1 inhibitor IPA-3 (50 μ M) for the indicated times. Total lysates were analyzed by western blotting using the indicated antibodies.

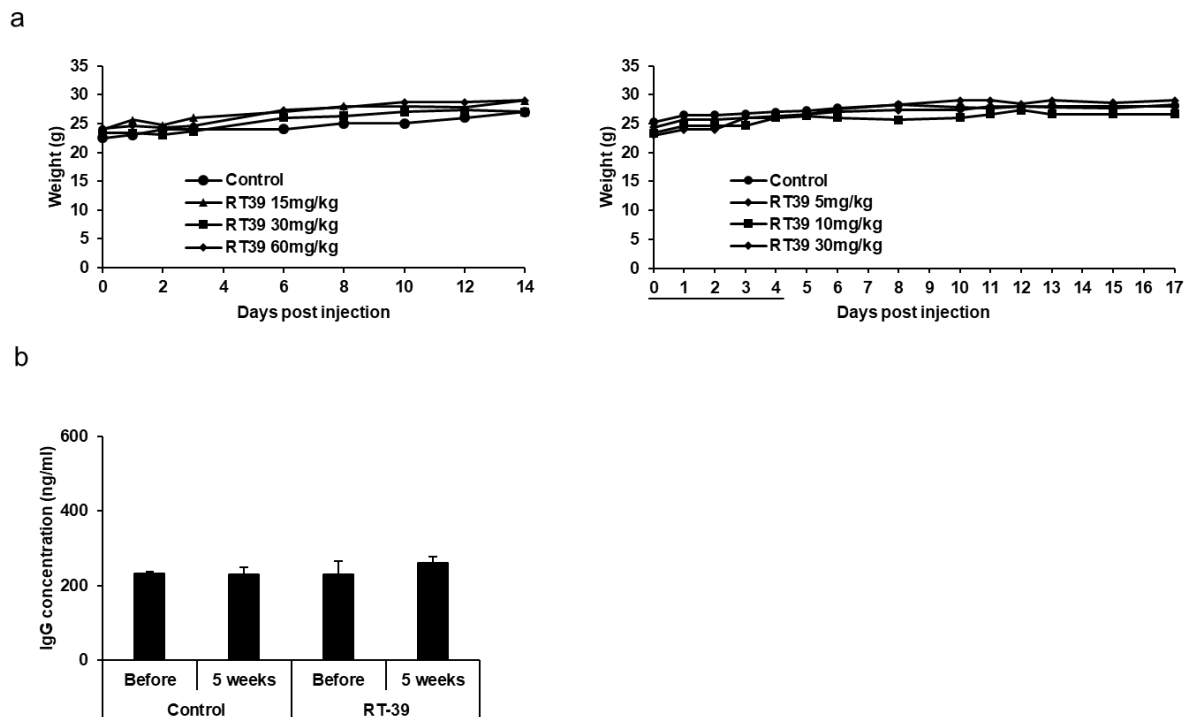


Figure S4: RT39 exhibits no toxicity or immunogenicity in mouse. (A) Female nude mice were exposed to either single i.p. administration of increasing doses of RT39 ranging from 15 to 60 mg/kg (left panel) or daily i.p. administration of increasing doses of RT39 ranging from 5 to 30 mg/kg for 5 consecutive days (underlined; right panel). Mice weight was followed daily and animals finally sacrificed 14 days after the last injection. (B) Male FVB/N mice were i.p. injected with 125 μ g of RT39 daily for 5 weeks. Immunoglobulin levels in blood samples were quantified before treatment and at the end of the procedure by ELISA.

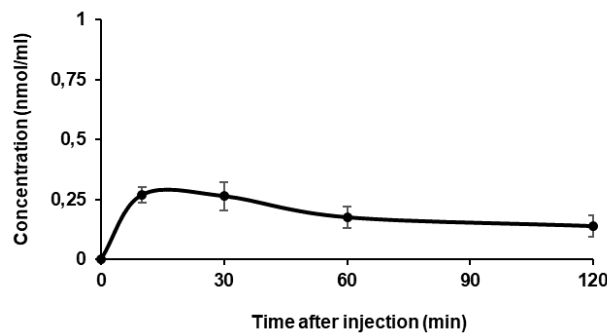


Figure S5: Quantification of RT39 plasmatic concentration after i.p. injection into mice. Groups of 3 mice were i.p. injected with 1 mg/kg of RT39 in normal saline. At the indicated time, mice were sacrificed and the plasmatic concentration of RT39 was estimated by LC-MS/MS as described in “Supplemental methods”.

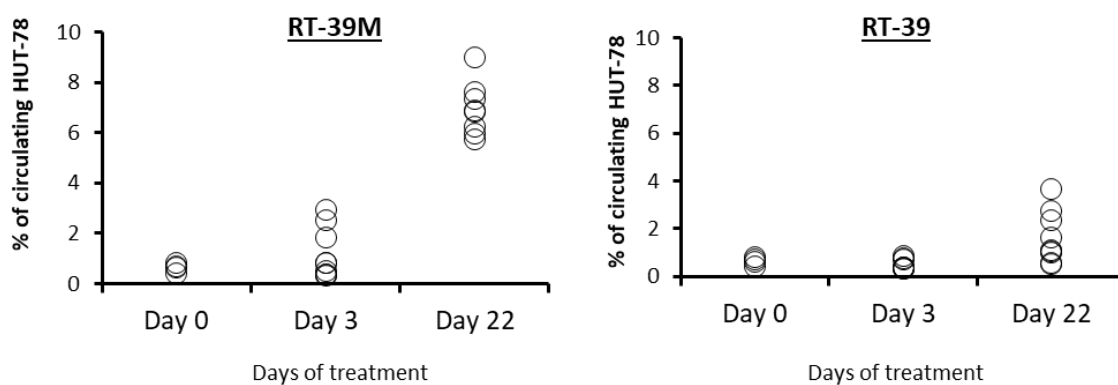


Figure S6. In vivo anti-tumor effect of RT39 in a subcutaneous xenograft model of Sézary syndrome. NSG mice were engrafted intravenously with HUT78 Sézary cells. Treatment started the day after the graft and consisted in daily intraperitoneal injection of RT39 or RT39M for 21 days (5 mg/kg; n=7 per group). Collection of blood samples was performed by submandibular bleeding at days 0, 3 and 22 after engraftment (100µl/mouse). After red cells lysis and labelling with an anti-CD3-FITC, samples were analyzed by flow cytometry. Data are represented as % of circulating HUT78 cells.

Supplemental methods

Electronic microscopy

Samples were fixed in 3% glutaraldehyde in PBS for 1 h, washed, post-fixed with 1% osmium tetroxide in PBS and then gradually dehydrated in 70, 90 and 100% ethanol. After 10 min in a 1:2 mixture of epoxy propane and epoxy resin and 10 min in epon, samples were embedded in epoxy resin and polymerized at 60°C for 24 h. After polymerisation, ultrathin sections of 90 nm were cut with an ultramicrotome (Reichert ultracut S), stained with uranyl acetate and Reynold's lead and observed with a transmission electron microscope (JEOL 1011). Acquisition was performed with a Gatan Orius 1000 CCD camera.

Hemolysis assay

Mice blood was centrifuged at 2000 rpm for 10 min. Red blood cell pellets were washed five times with

PBS and resuspended in normal saline. For each assay, 1×10^7 red blood cells were incubated with or without peptide (30 µM) at 37°C for 1h. The samples

were centrifuged at 4500 rpm for 5 min and the absorbance of the supernatant was measured at 540 nm. To determine the percentage of lysis, absorbance readings were normalized to lysis with 1% Triton X-100.

Assessment of acute and sub-acute toxicity in mice.

Two groups of 3 nude mice were exposed to single i.p. administration of increasing doses of RT39 ranging from 15 to 60 mg/kg in normal saline (acute toxicity), daily i.p. administration of increasing doses of RT39 ranging from 5 to 30 mg/kg in normal saline for 5 consecutive days (subacute toxicity), or normal saline alone. For each treatment schedule, the following parameters were monitored up to 14 days after the last administration: mortality, gross necropsy, weight change and signs of toxicity. At the end of the treatment, blood was collected and analyzed for cell count using an automated hematology analyzer (MedoniCA620, Stockholm, Sweden).

Immunogenicity assay

Male FVB/N mice were immunized with 125 µg of RT39 daily for 5 weeks. Blood samples were collected before and 5 weeks after the first immunization, and whole IgG levels assessed using a mouse IgG ELISA Kit (Abcam).

Determination of RT39 blood concentration by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) after i.p. injection into mice.

Groups of 3 mice were i.p. injected with either normal saline or 1mg/kg of RT39 peptide. At the indicated times, mice were sacrificed and blood was collected for K3 EDTA-plasma preparation. Samples were extracted by acetonitrile protein precipitation and injected into a LCMS-8030 Triple Quadrupole Liquid Chromatograph Mass Spectrometer (Shimadzu). The peptide exhibited a molecular ion at m/z 715.9. Peptide levels were determined relative to a calibration curve.

Intravenous Sézary xenograft model.

5.10⁵ HUT78 cells were injected intravenously (i.v) to 7-8 weeks old NSG mice (n=7/group). Treatments (RT39M or RT39 at 5mg/kg i.p for 21 days) were initiated 6h after engraftment. Mice general health condition was assessed (weight, hair, blood analysis, behavior) daily. The experiment ended when mice were found dead or sacrificed for ethics reasons. Blood was taken at days 0, 3 and 22 after engraftment submandibularly. After labeling with a human anti-CD3 coupled to FITC (1µg/ml) [Beckman Coulter], red blood cells lysis (Optilyse C) [Beckman Coulter] and washings, samples were analyzed by flow cytometry [CytoFLEX system, Beckman Coulter].

References

- Ahel, D., Z. Horejsi, N. Wiechens, S. E. Polo, E. Garcia-Wilson, I. Ahel, H. Flynn, M. Skehel, S. C. West, S. P. Jackson, T. Owen-Hughes and S. J. Boulton (2009). "Poly(ADP-ribose)-dependent regulation of DNA repair by the chromatin remodeling enzyme ALC1." *Science* **325**(5945): 1240-1243.
- Bertero, T., I. Bourget-Ponzio, A. Puissant, A. Loubat, B. Mari, G. Meneguzzi, P. Auberger, P. Barbry, G. Ponzio and R. Rezzonico (2013). "Tumor suppressor function of miR-483-3p on squamous cell carcinomas due to its pro-apoptotic properties." *Cell Cycle* **12**(14): 2183-2193.
- Bokoch, G. M. (2003). "Biology of the p21-activated kinases." *Annu Rev Biochem* **72**: 743-781.
- Deacon, K., P. Mistry, J. Chernoff, J. L. Blank and R. Patel (2003). "p38 Mitogen-activated protein kinase mediates cell death and p21-activated kinase mediates cell survival during chemotherapeutic drug-induced mitotic arrest." *Mol Biol Cell* **14**(5): 2071-2087.
- Dios-Esponera, A., N. Melis, B. C. Subramanian, R. Weigert and L. E. Samelson (2019). "Pak1 Kinase Promotes Activated T Cell Trafficking by Regulating the Expression of L-Selectin and CCR7." *Front Immunol* **10**: 370.
- Dummler, B., K. Ohshiro, R. Kumar and J. Field (2009). "Pak protein kinases and their role in cancer." *Cancer Metastasis Rev* **28**(1-2): 51-63.
- Faye, A. and J. L. Poyet (2010). "Targeting AAC-11 in cancer therapy." *Expert Opin Ther Targets* **14**(1): 57-65.
- Ghazi, B., N. Thonnart, M. Bagot, A. Bensussan and A. Marie-Cardine (2015). "KIR3DL2/CpG ODN interaction mediates Sezary syndrome malignant T cell apoptosis." *J Invest Dermatol* **135**(1): 229-237.
- Go, M. (1981). "Correlation of DNA exonic regions with protein structural units in haemoglobin." *Nature* **291**(5810): 90-92.
- Han, B. G., K. H. Kim, S. J. Lee, K. C. Jeong, J. W. Cho, K. H. Noh, T. W. Kim, S. J. Kim, H. J. Yoon, S. W. Suh, S. Lee and B. I. Lee (2012). "Helical repeat structure of apoptosis inhibitor 5 reveals protein-protein interaction modules." *J Biol Chem* **287**(14): 10727-10737.
- Hicks, K. A., H. L. Hartman and C. A. Fierke (2005). "Upstream polybasic region in peptides enhances dual specificity for prenylation by both farnesyltransferase and geranylgeranyltransferase type I." *Biochemistry* **44**(46): 15325-15333.
- Huang, D. C., C. J. Marshall and J. F. Hancock (1993). "Plasma membrane-targeted ras GTPase-activating protein is a potent suppressor of p21ras function." *Mol Cell Biol* **13**(4): 2420-2431.
- Jagot-Lacoussiere, L., A. Faye, H. Bruzzoni-Giovanelli, B. O. Villoutreix, J. C. Rain and J. L. Poyet (2015). "DNA damage-induced nuclear translocation of Apaf-1 is mediated by nucleoporin Nup107." *Cell Cycle* **14**(8): 1242-1251.
- Jagot-Lacoussiere, L., E. Kotula, B. O. Villoutreix, H. Bruzzoni-Giovanelli and J. L. Poyet (2016). "A Cell-Penetrating Peptide Targeting AAC-11 Specifically Induces Cancer Cells Death." *Cancer Res* **76**(18): 5479-5490.
- Jawed, S. I., P. L. Myskowski, S. Horwitz, A. Moskowitz and C. Querfeld (2014). "Primary cutaneous T-cell lymphoma (mycosis fungoides and Sezary syndrome): part I. Diagnosis: clinical and histopathologic features and new molecular and biologic markers." *J Am Acad Dermatol* **70**(2): 205 e201-216; quiz 221-202.
- Jawed, S. I., P. L. Myskowski, S. Horwitz, A. Moskowitz and C. Querfeld (2014). "Primary cutaneous T-cell lymphoma (mycosis fungoides and Sezary syndrome): part II. Prognosis, management, and future directions." *J Am Acad Dermatol* **70**(2): 223 e221-217; quiz 240-222.
- Kim, J. W., H. S. Cho, J. H. Kim, S. Y. Hur, T. E. Kim, J. M. Lee, I. K. Kim and S. E. Namkoong

- (2000). "AAC-11 overexpression induces invasion and protects cervical cancer cells from apoptosis." *Lab Invest* **80**(4): 587-594.
- Kumar, R., A. E. Gururaj and C. J. Barnes (2006). "p21-activated kinases in cancer." *Nat Rev Cancer* **6**(6): 459-471.
- Kumar, R. and D. Q. Li (2016). "PAKs in Human Cancer Progression: From Inception to Cancer Therapeutic to Future Oncobiology." *Adv Cancer Res* **130**: 137-209.
- Kumar, R., R. Sanawar, X. Li and F. Li (2017). "Structure, biochemistry, and biology of PAK kinases." *Gene* **605**: 20-31.
- Lei, M., W. Lu, W. Meng, M. C. Parrini, M. J. Eck, B. J. Mayer and S. C. Harrison (2000). "Structure of PAK1 in an autoinhibited conformation reveals a multistage activation switch." *Cell* **102**(3): 387-397.
- Molli, P. R., D. Q. Li, B. W. Murray, S. K. Rayala and R. Kumar (2009). "PAK signaling in oncogenesis." *Oncogene* **28**(28): 2545-2555.
- Morrison, K. L. and G. A. Weiss (2001). "Combinatorial alanine-scanning." *Curr Opin Chem Biol* **5**(3): 302-307.
- Ong, C. C., A. M. Jubb, P. M. Haverty, W. Zhou, V. Tran, T. Truong, H. Turley, T. O'Brien, D. Vucic, A. L. Harris, M. Belvin, L. S. Friedman, E. M. Blackwood, H. Koeppen and K. P. Hoefflich (2011). "Targeting p21-activated kinase 1 (PAK1) to induce apoptosis of tumor cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**(17): 7177-7182.
- Ortonne, N., D. Huet, C. Gaudez, A. Marie-Cardine, V. Schiavon, M. Bagot, P. Musette and A. Bensussan (2006). "Significance of circulating T-cell clones in Sezary syndrome." *Blood* **107**(10): 4030-4038.
- Papo, N. and Y. Shai (2005). "Host defense peptides as new weapons in cancer treatment." *Cell Mol Life Sci* **62**(7-8): 784-790.
- Pasquereau-Kotula, E., J. Habault, G. Kroemer and J. L. Poyet (2018). "The anticancer peptide RT53 induces immunogenic cell death." *PLoS One* **13**(8): e0201220.
- Pekow, J., K. Meckel, U. Dougherty, F. Butun, R. Mustafi, J. Lim, C. Crofton, X. Chen, L. Joseph and M. Bissonnette (2015). "Tumor suppressors miR-143 and miR-145 and predicted target proteins API5, ERK5, K-RAS, and IRS-1 are differentially expressed in proximal and distal colon." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **308**(3): G179-187.
- Pekow, J. R., U. Dougherty, R. Mustafi, H. Zhu, M. Kocherginsky, D. T. Rubin, S. B. Hanauer, J. Hart, E. B. Chang, A. Fichera, L. J. Joseph and M. Bissonnette (2012). "miR-143 and miR-145 are downregulated in ulcerative colitis: putative regulators of inflammation and protooncogenes." *Inflamm Bowel Dis* **18**(1): 94-100.
- Philpott, N. J., A. J. Turner, J. Scopes, M. Westby, J. C. Marsh, E. C. Gordon-Smith, A. G. Dalgleish and F. M. Gibson (1996). "The use of 7-amino actinomycin D in identifying apoptosis: simplicity of use and broad spectrum of application compared with other techniques." *Blood* **87**(6): 2244-2251.
- Polyansky, A. A., A. O. Chugunov, A. A. Vassilevski, E. V. Grishin and R. G. Efremov (2012). "Recent advances in computational modeling of alpha-helical membrane-active peptides." *Curr Protein Pept Sci* **13**(7): 644-657.
- Rigou, P., V. Piddubnyak, A. Faye, J. C. Rain, L. Michel, F. Calvo and J. L. Poyet (2009). "The antiapoptotic protein AAC-11 interacts with and regulates Acinus-mediated DNA fragmentation." *Embo J* **28**(11): 1576-1588.
- Siu, M. K., W. Abou-Kheir, J. J. Yin, Y. S. Chang, B. Barrett, F. Suau, O. Casey, W. Y. Chen, L. Fang, P. Hynes, Y. Y. Hsieh, Y. N. Liu, J. Huang and K. Kelly (2014). "Loss of EGFR signaling regulated miR-203 promotes prostate cancer bone metastasis and tyrosine kinase inhibitors resistance." *Oncotarget* **5**(11): 3770-3784.
- Song, K. H., S. H. Kim, K. H. Noh, H. C. Bae, J. H. Kim, H. J. Lee, J. Song, T. H. Kang, D. W. Kim, S. J. Oh, J. H. Jeon and T. W. Kim (2015). "Apoptosis Inhibitor 5 Increases Metastasis via Erk-mediated MMP expression." *BMB Rep* **48**(6): 330-335.
- Tewari, M., M. Yu, B. Ross, C. Dean, A. Giordano and R. Rubin (1997). "AAC-11, a novel cDNA that inhibits apoptosis after growth factor withdrawal." *Cancer Res* **57**(18): 4063-4069.
- Thonnart, N., A. Caudron, I. Legaz, M. Bagot, A. Bensussan and A. Marie-Cardine (2014). "KIR3DL2 is a coinhibitory receptor on Sezary syndrome malignant T cells that promotes resistance to activation-induced cell death." *Blood* **124**(22): 3330-3332.
- Traut, T. W. (1988). "Do exons code for structural or functional units in proteins?" *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**(9): 2944-2948.
- Vadlamudi, R. K., L. Adam, R. A. Wang, M. Mandal, D. Nguyen, A. Sahin, J. Chernoff, M. C. Hung and R. Kumar (2000). "Regulatable expression of p21-activated kinase-1 promotes anchorage-independent growth and abnormal organization of mitotic spindles in human epithelial breast cancer cells." *J Biol Chem* **275**(46): 36238-36244.
- Van den Berghe, L., H. Laurell, I. Huez, C. Zanibellato, H. Prats and B. Bugler (2000). "FIF [fibroblast growth factor-2 (FGF-2)-interacting-factor], a nuclear putatively antiapoptotic factor, interacts specifically with FGF-2." *Mol Endocrinol* **14**(11): 1709-1724.
- Virmani, P., J. Zain, S. T. Rosen, P. L. Myskowski and C. Querfeld (2015). "Hematopoietic Stem Cell Transplant for Mycosis Fungoides and Sezary Syndrome." *Dermatol Clin* **33**(4): 807-818.
- Wang, R. A., H. Zhang, S. Balasenthil, D. Medina and R. Kumar (2006). "PAK1 hyperactivation is sufficient for mammary gland tumor formation." *Oncogene* **25**(20): 2931-2936.
- Wang, Y., X. Gu, W. Li, Q. Zhang and C. Zhang (2018). "PAK1 overexpression promotes cell

proliferation in cutaneous T cell lymphoma via suppression of PUMA and p21." J Dermatol Sci **90**(1): 60-67.

Wang, Y., A. T. Lee, J. Z. Ma, J. Wang, J. Ren, Y. Yang, E. Tantoso, K. B. Li, L. L. Ooi, P. Tan and C. G. Lee (2008). "Profiling microRNA expression in hepatocellular carcinoma reveals microRNA-224 up-regulation and apoptosis inhibitor-5 as a microRNA-224-specific target." J Biol Chem **283**(19): 13205-13215.

2) *Mise au point d'un modèle PDX du Syndrome de Sézary et validation de l'effet anti-tumoral de RT39*

Afin de mieux prédire un éventuel effet thérapeutique du peptide RT39 chez l'humain, nous avons également développé un nouveau modèle murin de SS, reproduisant plus fidèlement les caractéristiques de la maladie. Ce modèle est basé sur l'injection de cellules mononuclées de sang périphérique de patients présentant une forte charge tumorale, en présence des cytokines nécessaires à leur prolifération (IL-2 et IL-7). Les cellules T tumorales envahissent le sang et la peau et provoquent des symptômes cutanés comparables à ceux observés chez l'humain, avec prolifération des kératinocytes dans l'épiderme. Il s'agit du premier modèle présentant une composante cutanée en l'absence de métastases dans les organes vitaux. Ce modèle pré-clinique représente un outil de grande valeur pour l'évaluation de composés thérapeutiques, ainsi que pour la compréhension de la physiopathologie du SS, notamment concernant la migration des cellules tumorales entre la peau et le sang, et a fait l'objet d'un dépôt de brevet dont je suis co-inventrice (dépôt de brevet N° EP 19 18 441).

Nous avons ensuite testé le potentiel thérapeutique du peptide RT39 sur ce nouveau modèle, plus proche de la véritable pathologie. D'après les résultats obtenus, les souris traitées par RT39 retrouvent un aspect cutané normal (désépaississement de l'épiderme). Cela suggère que le peptide, injecté par voie intrapéritonéale, est capable d'infiltrer le derme des souris pour y éliminer les lymphocytes T malins, permettant la guérison progressive des souris.

Ces travaux ont fait l'objet d'un second article (communication courte), actuellement en préparation (**ARTICLE 4 « Generation of a Sézary patient-derived xenograft mouse model with cutaneous involvement and its use in pre-clinical therapeutic studies »**, Habault et al.).

GENERATION OF A SÉZARY PATIENT-DERIVED XENOGRAFT MOUSE MODEL WITH CUTANEOUS INVOLVEMENT AND ITS USE IN PRE-CLINICAL THERAPEUTIC STUDIES

Justine HABAULT^{1,2}, Nicolas THONNART^{1,2}, Martine BAGOT^{1,2,3}, Armand BENSUSSAN^{1,2}, Jean-Luc POYET^{1,2,*} and Anne MARIE-CARDINE^{1,2,*}

¹ INSERM U976 Team 1, Onco-Dermatology and Therapies, Paris, France.

² Université de Paris, Saint Louis Research Institute, Paris, France

³ Department of Dermatology, Saint Louis Hospital, Paris, France

* The authors contributed equally and share senior authorship.

Running Title: Generation of a CTCL PDX mouse model

Corresponding author: Dr Anne MARIE-CARDINE, INSERM U976 Team 1, Hôpital Saint Louis, Pavillon Bazin, 1 avenue Claude Vellefaux, 75010 Paris, France. Tel: (33) 1 53 72 20 78. Fax: (33) 1 53 72 20 51. E- mail: anne.marie-cardine@inserm.fr.

Cutaneous T cell lymphoma (CTCL) are a heterogeneous class of non-Hodgkin's lymphomas characterized by the clonal proliferation of neoplastic T cells. The two main forms are mycosis fungoides (MF), where the tumor T cells remain confined to the skin, and Sézary syndrome (SS), where tumor cells show cutaneous but also blood location, this leukemic presentation leading to severe immunosuppression at advanced stages and to consequently poor prognosis. Although currently available treatments allow control of early stages MF, there is still no cure for advanced stages MF and SS¹. Over the last decades, efforts have been made to better understand the pathophysiology of CTCL but also to develop new therapeutic agents. However, progresses in both axes have been hampered by the lack of suitable animal models. Indeed, the various models described so far essentially used non-CTCL or CTCL cell lines rather than patients' derived cells, often led to the development of tumor at the point of injection (e.g. sub-cutaneous or intra-hepatic) with no dissemination of the tumor cells in the skin and/or occurrence of metastases, or alternatively require complex genetically engineered models, features that do not correspond to the spectra of patients' disease progression or genetic background²⁻¹³. In an attempt to obtain a CTCL mouse model that encompasses cutaneous and/or blood involvement, we thought to use Sézary patients' peripheral blood mononuclear cells (PBMC) as source of tumor cells, and NOD-SCID-gamma (NSG) mice as recipients, based on the model of PBMC-humanized mice¹⁴. To limit the possible occurrence of graft versus host disease (GVHD) reaction, only PBMC from patients presenting a high circulating tumor burden were used for engraftment (PBMC T cell content given in Supplemental Table 1). A mixture of IL2 and IL7 (400 IU and 60 ng per mouse, respectively) was also added at the time of cells injection and then once a week during the entire course of the experiment as i) abnormal expression of CD25 and/or IL7-receptor was often found associated to CTCL^{15,16} and ii) these cytokines previously allowed us to select and generate T cell lines from SS patients' circulating malignant T cell clone^{17,18}. Cells and cytokines were injected intravenously (i.v.). Mice were monitored daily for potential weight loss, occurrence of abnormal posture or behavior, and cutaneous changes/deterioration. Three sets of experiments were first conducted using PBMC from distinct SS patients (Exp. 1-3; n=3/experiment). Out of 9 engrafted mice, 8 showed skin disorders 34 to 50 days post-engraftment that mimic CTCL presentation (patch/plaque, transformed-like or erythrodermic appearance; supplemental Figure 1A). One animal developed GVHD symptoms before presenting cutaneous disorders (see experiments summary in supplemental Table 2). Analysis of skin sections by hematoxylin and eosin (H&E) staining clearly revealed a tremendous modification of the skin architecture of the engrafted mice compared to untreated animals, with the detection of multilayers of keratinocytes characteristic of epidermis thickening, and of dermal cellular infiltrates, two main features encountered in CTCL (Figure 1A, supplemental Figure 2). Further analyses performed by immuno-staining for detection of human CD3 and KIR3DL2 receptor (previously identified as a reliable malignant T cell marker^{19,20}) confirmed the presence of double positive cells in the dermis, underneath the epidermis (Figure 1B). Flow cytometry analysis of the lymphocytes extracted from engrafted mice skin sections established unambiguously that the vast majority of the cutaneous KIR3DL2⁺ CD4⁺ T cells shared the same TCR-Vb rearrangement that the patient original circulating malignant T cell clone (Figure 1C). Human CD4⁺ T cells were also detected in the mice blood stream during the course of the experiment (e.g. in Figure 1C). However, variations in the % of circulating CD4⁺ T cells, as well as in the % of circulating tumor cells, were observed from one animal to another in the same experimental group, but also from one experiment to another (see supplemental Table 2). Importantly, no sign of metastases within non-lymphoid organs, such as liver or kidney, was detected (supplemental Figure 1B) while spleen enlargement was observed (n=7/8; supplemental Figure 1C) that correlates with the presence of T cell infiltrates containing scarce malignant T cells (supplemental Figure 1D). Altogether these

data demonstrated that our experimental design led to the generation of mice presenting blood and cutaneous involvement, with the occurrence of a low rate of adverse effects requiring early mice sacrifice.

We next aimed to validate our model as a useful tool for *in vivo* validation of potential therapeutic agents. We tested the ability of a peptide (herein called RT39), identified as the minimal stretch of amino-acids of the pro-oncogenic anti-apoptosis clone 11 protein required for interaction with its binding partners, to promote malignant Sézary cell depletion. Indeed, we previously demonstrated that this peptide was able to specifically target and eliminate Sézary patients' circulating malignant T cell clone *in vivo* while sparing other immune cells²¹. After engraftment and development of cutaneous disorders (Day 55), mice were randomized in groups of 6 and either left untreated or treated every two days with RT39 peptide or with its inactive mutated version devoid of cytotoxic activity RT39M²¹ (5 mg/kg; Exp. 4). After 65 days of treatment (Day 120), RT39 anti-tumor efficiency was readily detectable through visual examination of the skin (Figure 2A, supplemental Figure 3), and further confirmed by IHC (Figure 2B) and immuno-staining (Figure 2C). Thus, untreated and RT39M-treated mice experienced a worsening of their epidermis thickness (quantification in Figure 2D), with no obvious clearance of the dermal infiltrating malignant T cells. In contrast, the RT39-treated group showed an epidermis structure that tends toward normal, associated to a strong reduction of the CD3⁺ CD4⁺ KIR3DL2⁺ tumor cell infiltrates in the dermis. Unfortunately, less than 2% of circulating T cells were detected in all groups at the experiment end point preventing evaluation of the peptide efficacy on the blood tumor burden. Nevertheless, we demonstrated that our mouse model allowed conducting long-term assays of therapeutic compounds with no occurrence of severe adverse effects requiring premature mice sacrifice.

In summary, we successfully generate a Sézary patient derived xenograft mouse model that showed cutaneous involvement, an observation that has never been achieved in previously described CTCL models. Our model essentially relies on 3 essential features, namely i) the use of patients' PBMC with high tumor burden, ii) a weekly supply of IL2 and IL7 cytokines, and iii) i.v. engraftment. While skin disorders were observed in all sets of experiment, detection of circulating malignant cells showed higher inter- and intra-experiment variation. However, one has to mention that the engrafted mice had to be sacrificed 3 to 4 months post-engraftment because of heavy skin deterioration leading to high level of animal discomfort, possibly hampering evaluation of malignant cells migration from skin to blood, an event symptomatic of late stage disease. Nevertheless, in our model, i.v. injected malignant cells present the ability to migrate and infiltrate the dermis without leading to the development of metastases in vital organs. Consequently, the engrafted mice present a lifetime allowing long-term anti-tumor assays, as exemplified here with RT39 peptide. Such model might therefore represent a valuable tool to be included in pre-clinical proof-of-concept assays, but also bring the opportunity to better understand the pathophysiology of CTCL, especially with regard to malignant cells trafficking between blood and skin.

Acknowledgments

This work was supported by grants from INSERM, Paris Diderot University and Canceropôle Ile de France. We thank H. Sicard (Innate Pharma, Marseille, France) for the kind gift of the anti-KIR3DL2 antibody.

Authorship contributions

J.H and N.T performed the experiments; A.M-C and J-L.P designed the research; A.M-C, J-L.P, M.B and J.H analyzed the data; M.B was attending doctor for the patients; A.M-C, M.B, J.H, J-L.P and A.B wrote the paper.

Conflict of interest disclosure

The authors declare no competing financial interests.

References

- 1) Fujii K. New Therapies and Immunological Findings in Cutaneous T-Cell Lymphoma. *Front Oncol.* 2018; 8:198.
- 2) Adachi T, Kobayashi T, Sugihara E, et al. Hair follicle-derived IL-7 and IL-15 mediate skin-resident memory T cell homeostasis and lymphoma. *Nat Med.* 2015; 21:1272-9.
- 3) Andrique L, Poglio S, Prochazkova-Carlotti M, et al. Intrahepatic Xenograft of Cutaneous T-Cell Lymphoma Cell Lines: A Useful Model for Rapid Biological and Therapeutic Evaluation. *Am J Pathol.* 2016; 186:1775-1785.
- 4) Cornejo MG, Kharas MG, Werneck MB, et al. Constitutive JAK3 activation induces lymphoproliferative syndromes in murine bone marrow transplantation models. *Blood.* 2009; 113:2746-54.

- 5) Huang Y, Su MW, Jiang X, et al. Evidence of an oncogenic role of aberrant TOX activation in cutaneous T-cell lymphoma. *Blood*. 2015; 125:1435-43.
- 6) Ito A, Ishida T, Yano H, et al. Defucosylated anti-CCR4 monoclonal antibody exercises potent ADCC-mediated antitumor effect in the novel tumor-bearing humanized NOD/Shi-scid, IL-2Rgamma(null) mouse model. *Cancer Immunol Immunother*. 2009; 58:1195-206.
- 7) Jain S, Stroopinsky D, Yin L, et al. Mucin 1 is a potential therapeutic target in cutaneous T-cell lymphoma. *Blood*. 2015; 126:354-62.
- 8) Krejsgaard T, Kopp K, Ralfkiaer E, et al. A novel xenograft model of cutaneous T-cell lymphoma. *Exp Dermatol*. 2010; 19:1096-102.
- 9) Mishra A, La Perle K, Kwiatkowski S, et al. Mechanism, Consequences, and Therapeutic Targeting of Abnormal IL15 Signaling in Cutaneous T-cell Lymphoma. *Cancer Discov*. 2016; 6:986-1005.
- 10) Rosenblatt-Velin N, Arrighi JF, Dietrich PY, et al. Transformed and nontransformed human T lymphocytes migrate to skin in a chimeric human skin/SCID mouse model. *J Invest Dermatol*. 1997; 109:744-50.
- 11) Thaler S, Burger AM, Schulz T, et al. Establishment of a mouse xenograft model for mycosis fungoides. *Exp Dermatol*. 2004; 13:406-12.
- 12) van der Fits L, Rebel HG, Out-Luiting JJ, et al. A novel mouse model for Sezary syndrome using xenotransplantation of Sezary cells into immunodeficient RAG2(-/-) gammac(-/-) mice. *Exp Dermatol*. 2012; 21:706-9.
- 13) Wu X, Sells REHwang ST. Upregulation of inflammatory cytokines and oncogenic signal pathways preceding tumor formation in a murine model of T-cell lymphoma in skin. *J Invest Dermatol*. 2011; 131:1727-34.
- 14) Ito M, Hiramatsu H, Kobayashi K, et al. NOD/SCID/gamma(c)(null) mouse: an excellent recipient mouse model for engraftment of human cells. *Blood*. 2002; 100:3175-82.
- 15) Bagot M, Charue D, Boulland ML, et al. Interleukin-7 receptor expression in cutaneous T-cell lymphomas. *Br J Dermatol*. 1996; 135:572-5.
- 16) Talpur R, Jones DM, Alencar AJ, et al. CD25 expression is correlated with histological grade and response to denileukin diftitox in cutaneous T-cell lymphoma. *J Invest Dermatol*. 2006; 126:575-83.
- 17) Marie-Cardine A, Huet D, Ortonne N, et al. Killer cell Ig-like receptors CD158a and CD158b display a coactivatory function, involving the c-Jun NH2-terminal protein kinase signaling pathway, when expressed on malignant CD4+ T cells from a patient with Sezary syndrome. *Blood*. 2007; 109:5064-5.
- 18) Poszepczynska E, Bagot M, Echchakir H, et al. Functional characterization of an IL-7-dependent CD4(+)CD8alphaalpha(+) Th3-type malignant cell line derived from a patient with a cutaneous T-cell lymphoma. *Blood*. 2000; 96:1056-63.
- 19) Hurabielle C, Thonnart N, Ram-Wolff C, et al. Usefulness of KIR3DL2 to Diagnose, Follow-Up, and Manage the Treatment of Patients with Sezary Syndrome. *Clin Cancer Res*. 2017; 23:3619-3627.
- 20) Marie-Cardine A, Viaud N, Thonnart N, et al. IPH4102, a humanized KIR3DL2 antibody with potent activity against cutaneous T-cell lymphoma. *Cancer Res*. 2014; 74:6060-21
- 21) Habault J, Thonnart N, Kotula E, et al. Anti-tumor effect of anti-apoptosis clone 11 protein-derived peptides on Sézary syndrome malignant CD4+ T lymphocytes. xxx. 20xx; xx:xx-xx.

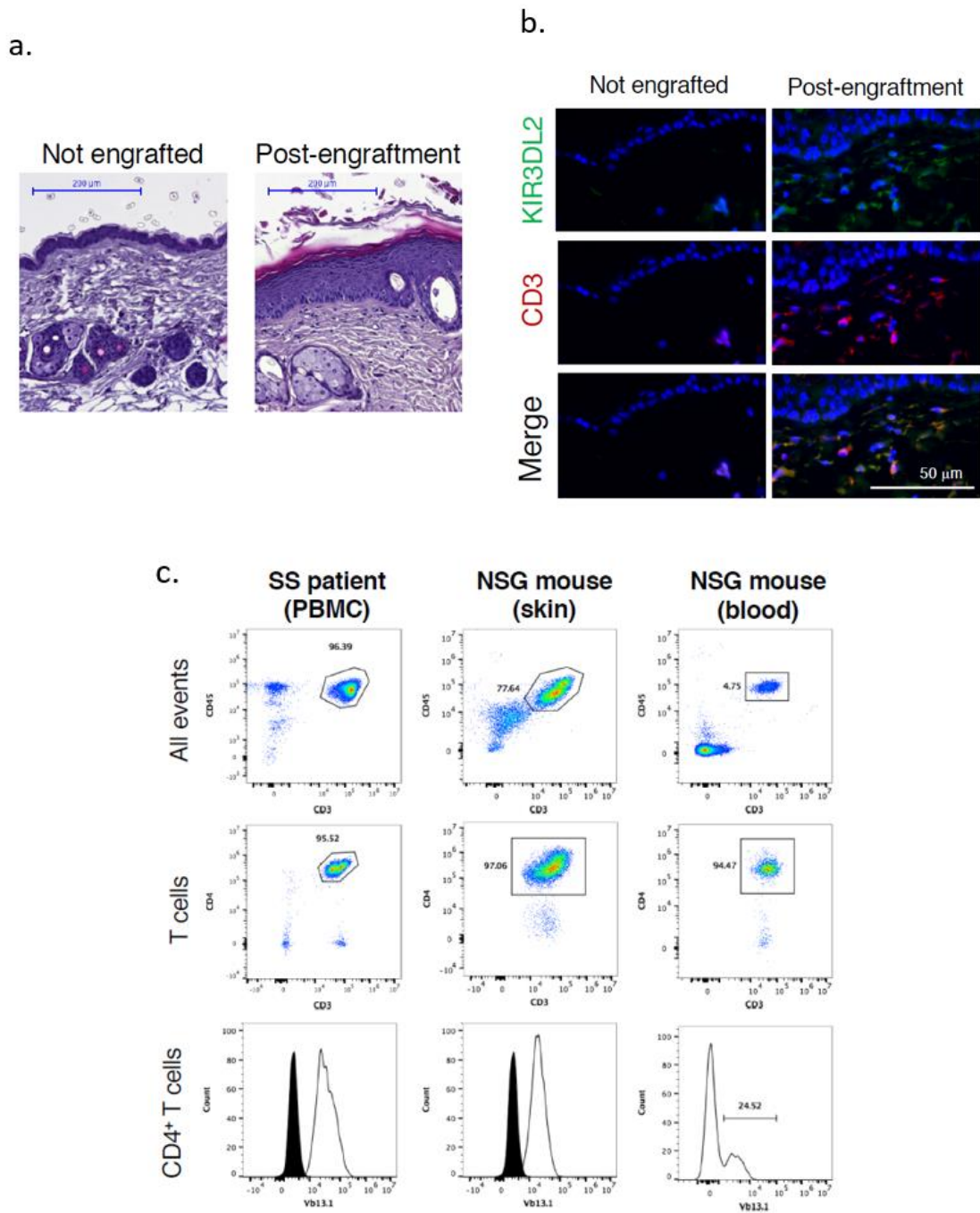


Figure 1: Main skin features of the CTCL PDX mouse model. The study was approved by the institutional ethics committee (Saint Louis Hospital, Paris) and performed using PBMC isolated from blood collected after obtaining patients' written informed consent. (A) Hematoxylin-eosin staining was performed on skin sections from control (not engrafted) mouse (left) and 80 days after engraftment with Sézary patient PBMC (right). Scale bar = 200µm. (B) Skin sections from control (upper panel) and engrafted (lower panel) mice were subjected to immunofluorescence labeling using anti-KIR3DL2 (clone 12B11) and anti-human CD3 (UCHT1) antibodies plus AlexaFluor488 (green) and AlexaFluor594 (red) coupled secondary reagent. Slices were mounted using a Dapi-containing mounting medium (blue). Scale bar = 50 µm. (C) Flow cytometric analysis of the tumor T cell clone following mice engraftment. Sézary patient PBMC (left panels) and lymphocytes recovered either in the blood (middle panels) or after collagenase extraction of a skin fragment (right panels) of a representative engrafted mouse were labeled with a mix of anti-human CD45, CD3, CD4 and TCR-Vb antibodies. Following successive gating of total lymphocytes (CD3⁺CD45⁺ cells) and CD4⁺ T cells, the patient original malignant T cell clone was identified through its TCR-Vb13.1 rearrangement.

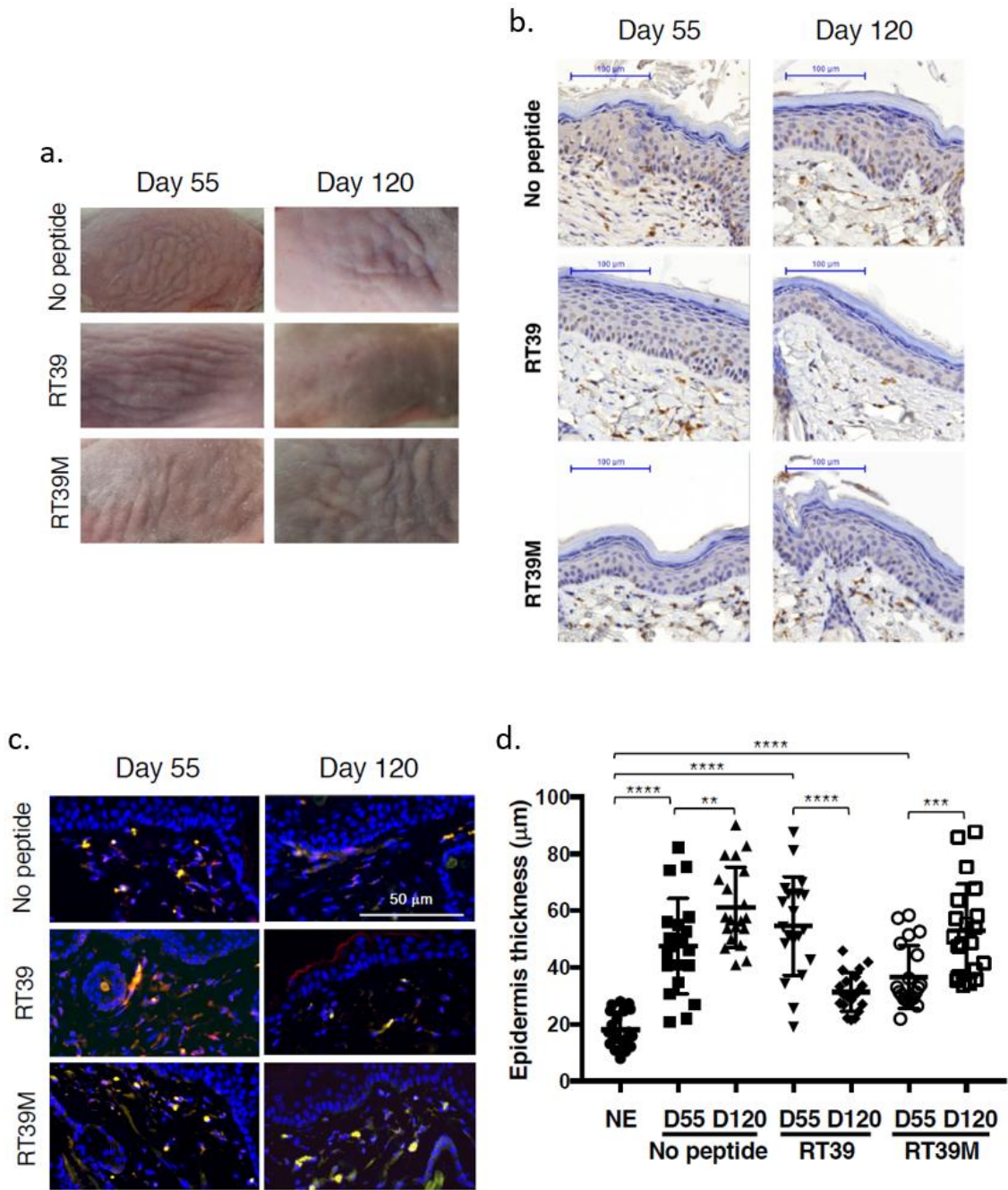


Figure 2: Use of the CTCL PDX mouse model as a tool for pre-clinical assays. After engraftment and appearance of cutaneous manifestations (55 days post-injection), mice were randomly separated in 3 groups (n=6 each) and either left untreated (no peptide) or treated with RT39 or RT39M peptide. Skin biopsies were collected before (Day 55) and at the end of treatment (Day 120). (A) Visual evaluation of cutaneous disorders before and after peptide treatment. Shown are data from one representative mouse from each group. (B) Immuno-histochemical analysis of skin sections. Labelings were performed using an anti-human CD3 mAb, allowing observation of the epidermis thickness and of dermal T cell infiltrates. Shown are representative data obtained on one mouse from each group. (C) Analysis of the presence of the malignant T cell clone by immunofluorescence using human CD3 and KIR3DL2 as tumor T cell markers. Shown are representative data obtained on one mouse from each group. After H&E staining of skin sections, the epidermis thickness was measured (7 points of measurement on 3 mice from each group). Similar analysis was realized on control/not engrafted mice (NE; n=3). Statistical analysis was performed using a Mann-Whitney *t* test. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$.

Table S1 : Lymphocyte content of Sézary patients' PBMC used for engraftment*

Experiment n°	% of cell subset in PBMC			% of tumor cells in CD4 ⁺ T cells
	CD4 ⁺ T cells	CD8 ⁺ T cells	NK cells	
1	74.1	1.7	< 1%	93.7
2	66.5	5.2	< 1%	86.3
3	92.3	1.9	1.4	92.1
4	97.1	< 1%	n.d	99.7

* determined by flow cytometry using a combination anti-CD45, -CD3, -TCR-V β , -CD4, -CD8 and -CD56 antibodies ; n.d : not detected.

Table S2: Main cutaneous and blood features of the engrafted mice

Experiment n°	n	End Point (Day post-engraftment)	Adverse effects leading to sacrifice n (Cause; Day post-engraftment)	Cutaneous manifestations		Blood involvement at end point*	
				n	Appearance (Day post-engraftment) Range:	Type	n
1	3	63	1/3 (GVHD; Day 38)	2/3 Range: 45-50	Erythrodermia	1/2 98.3	25.1
2	3	60	none	3/3 Range: 34-49	Patch/Plaque evolving in transformed-like	3/3 Mean \pm SD: 91.7 \pm 6.8 Range: 84.0-96.6	Mean \pm SD: 11.9 \pm 14.5 Range: 3.1-28.7
3	3	70	1/3 (infection due to scratching; Day 53)	2/3 Range: 35-40	Transformed-like	3/3 Mean \pm SD: 67.1 \pm 30.4 Range: 34.6-94.7	Mean \pm SD: 36.8 \pm 53.1 Range: 3.2-98.8
4	18	NT/RT39M: 84 RT39:120	none	18/18 Range: 32-38	Transformed-like	less than 2% of circulating T cells at experiment end point for all groups	

* the % of CD4⁺ T cells among circulating T cells (identified as CD45⁺ CD3⁺ cells), and of malignant TCR-V β ⁺ cells within CD4⁺ T cells, were determined by flow cytometry on mice blood using anti-human-CD45, -CD3, -CD4 and -TCR-V β mAbs.

Supplemental data.

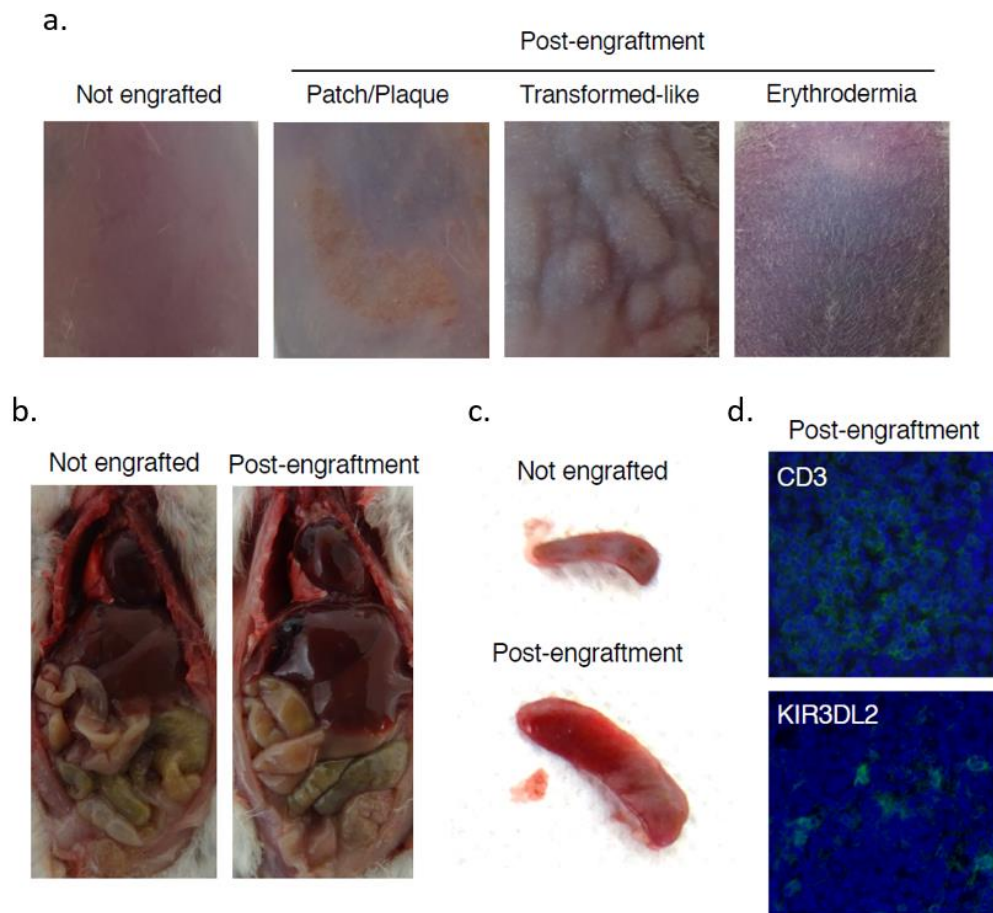


Figure S1. Main organs characteristics encountered in Sézary PDX mice. (A) Visual evaluation of the different types of cutaneous disorders observed post-engraftment? (B) Absence of metastases development in non-lymphoid organs. (C) Spleen enlargement (n=7/8). (D) Immunofluorescence analysis of a representative enlarged spleen showing the presence of numerous CD3+ T cells but only few malignant KIR3DL2+ cells.

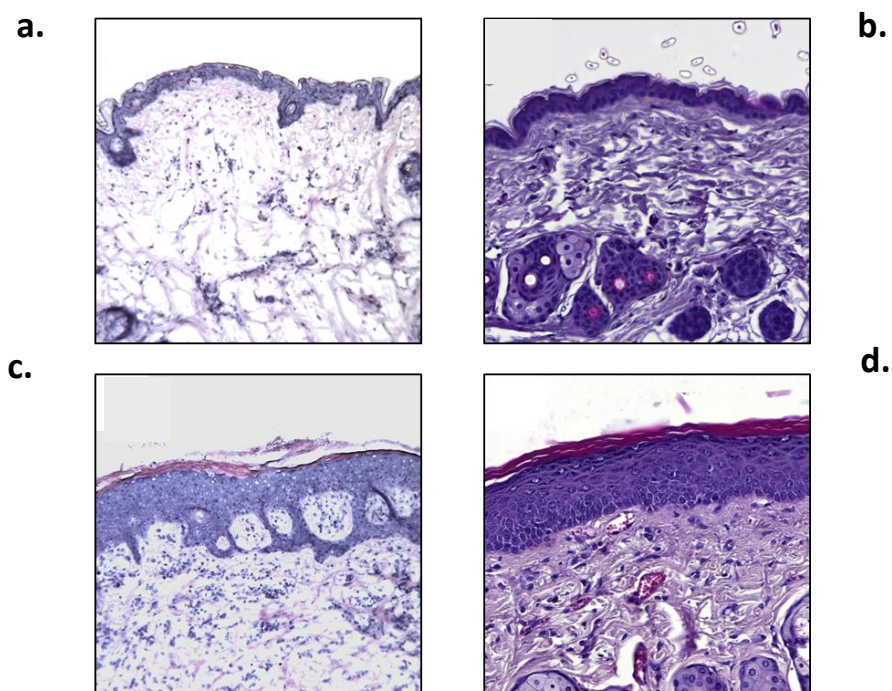


Figure S2. H&E coloration of skin biopsies from human and mouse. Cryosections were prepared from skin fragments of a healthy donor (A), Sézary patient (B), untreated NSG mouse (C) or NSG mouse engrafted with Sézary patient PBMC (D) and subjected to H&E coloration.

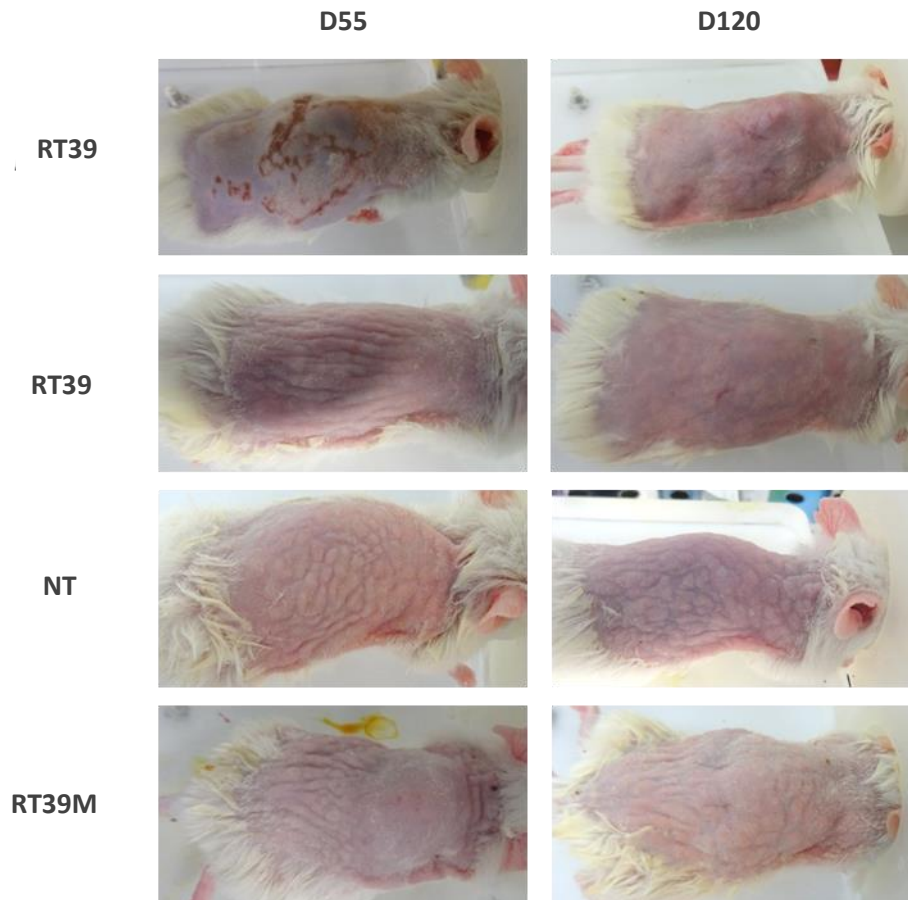


Figure S3. Visual evaluation of cutaneous disorders before and after peptide treatment. After engraftment and appearance of cutaneous manifestations (55 days post-injection), mice were randomly separated in 3 groups (n=6 each) and either left untreated (no peptide) or treated with RT39 or RT39M peptide. Skin biopsies were collected before (Day 55) and at the end of treatment (Day 120). Here are shown whole body of mice from Figure 2a.

II. Effet anti-tumoral du peptide RT39 dans les leucémies aigües

En parallèle de ces expériences réalisées dans le contexte du SS, nous avons voulu évaluer le potentiel anti-tumoral du peptide RT39 dans le contexte des leucémies aigües, majoritairement les LAMs, mais aussi les LAL (Leucémies Aigües Lymphoblastiques), en collaboration avec l'équipe du Pr. H. Dombret (EA3518), spécialiste du domaine. D'après les résultats préliminaires, RT39 semble capable d'éliminer spécifiquement les cellules leucémiques *in vitro* et *in vivo* (profils mutationnels variés). De plus, il semble que RT39 soit capable d'éliminer les cellules souches cancéreuses, mais pas les cellules souches non-cancéreuses, un résultat, s'il se confirme, particulièrement intéressant puisque que se sont ces cellules qui sont responsables des rechutes chez la plupart des patients. Enfin, nos données indiquent qu'il existe une corrélation importante entre expression membranaire de la protéine PAK1 et sensibilité des cellules aux peptides. *In vivo*, RT39 possède une forte activité anti-leucémique, à la fois dans des modèles de xéno greffe (NB4, OCI-AML3) et dans le modèle syngénique de LAP. Ces résultats sont présentés ci-dessous (**ARTICLE 5** en préparation, dont je serai co-première-autrice).

1) Activité cytotoxique de RT39 *in vitro* et *ex vivo*

Dans un premier temps, nous avons voulu évaluer l'effet anti-leucémique du peptide RT39 *in vitro*, sur un large panel de lignées cellulaires leucémiques. Pour cela, nous avons utilisé différentes lignées, présentant des profils mutationnels variés : des lignées cellulaires de LAM (OCI-AML3, KG1, NB4, NOMO-1, HL-60, K562, KASUMI) et de LAL (JURKAT, TOM-1, RS4-11). D'après les résultats obtenus, RT39 (mais pas RT39M) possède une forte activité cytotoxique vis-à-vis de toutes ces lignées cellulaires, avec une sensibilité légèrement plus faible pour les lignées de LAL. Les valeurs d'IC50 (concentration inhibitrice médiane) varient de 3.39 μ M pour les cellules OCI-AML3 à 24.91 μ M pour les cellules RS4-11 (Figure 1).

Cell lines	IC50 (μ M)
OCI AML3	3.39
NB4	3.86
KG1	4.16
NOMO-1	4.18
K562	6.55
HL-60	7.68
KASUMI1	8.16
JURKAT	6.94
TOM-1	7.50
RS411	24.91

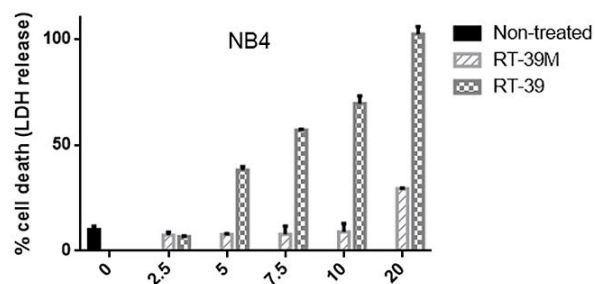


Figure 1. *In vitro* RT39 cytotoxic activity. Cells were incubated with increasing concentrations of RT39 for 4 h at 37°C. Cell viability was estimated by lactate dehydrogenase (LDH) release from cells into the culture medium. The obtained values were normalized to those of the maximum LDH released (completely lysed) control. Data are means \pm s.e.m. (n=3). (Left) RT39 IC50 for all tested cell lines. (Right) One representative exemple.

Nous avons ensuite examiné l'effet anti-tumoral de RT39 sur des cellules primaires issues de patients atteints de LAM ou de LAL, ainsi que de donneurs sains. Un traitement court (90min) suffit à induire la mort des cellules tumorales traitées par RT39 à 10 μ M, tandis que RT39M a un effet négligeable sur leur viabilité. Chez les donneurs sains, les peptides présentent une toxicité négligeable (Figure 2).

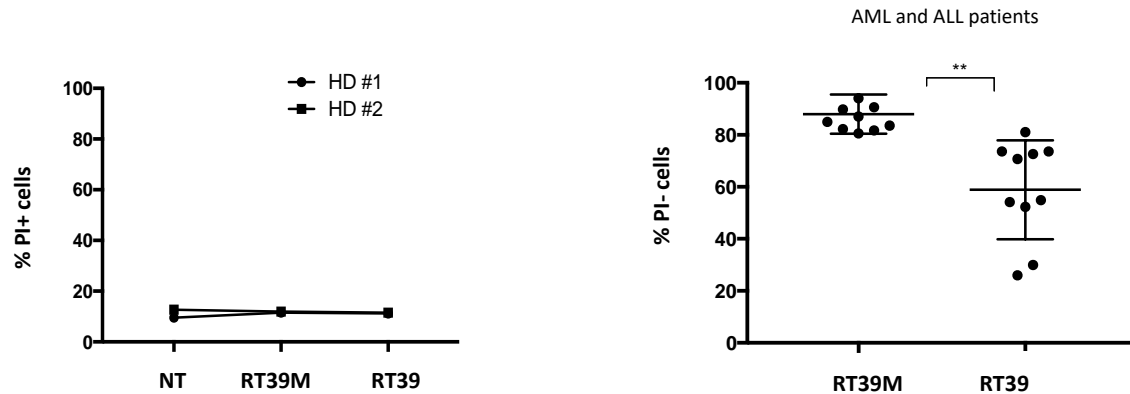


Figure 2. Ex vivo RT39 cytotoxic activity. (Left) CD34+ cells from healthy donors were exposed to RT39 and RT39M overnight at 15 μ M and cell death (PI+) was detected by flow cytometry. (Right) Primary AML and ALL samples were exposed 1h30 to RT39 RT39M 1h30 at 10 μ M and cell viability (PI-) was detected by flow cytometry. **p<0.005.

Enfin, nous avons voulu savoir si le peptide RT39 était capable d'éliminer efficacement les cellules initiateuses de la leucémie. Pour se faire, nous avons traité des blastes dérivés de la moëlle osseuse de patients, et nous avons évalué leur capacité à former des colonies. Afin de tester la spécificité de RT39 vis-à-vis des cellules souches cancéreuses, nous avons également isolé des progéniteurs hématopoïétiques (CD34+) de donneurs sains, et évalué leur capacité à former des colonies après traitement. D'après les résultats, RT39 inhibe de manière significative la croissance des colonies issues des blastes leucémiques, tandis qu'il n'a pas d'effet sur les cellules normales (Figure 3).

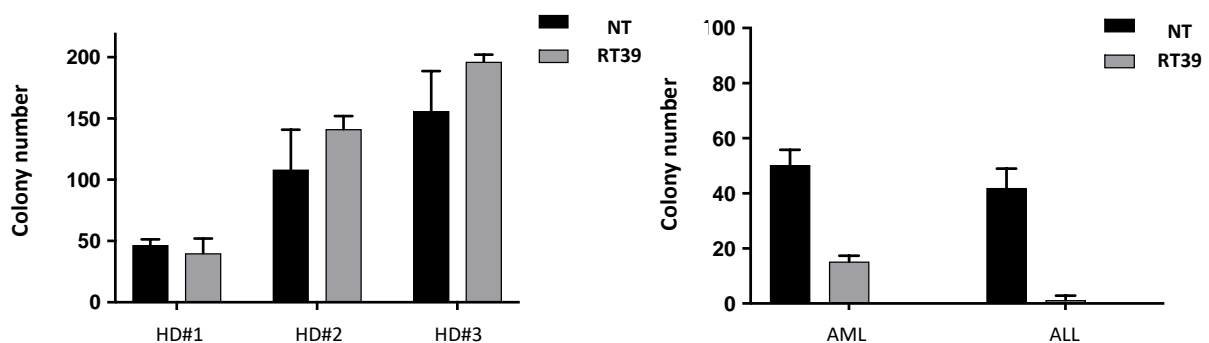


Figure 3. Colony forming cell assay after RT39 treatment. CD34+ cells from LAL patients or healthy donors were exposed to RT39 or left untreated (UT) overnight and seeded in methylcellulose and cytokines for 14 days (n=2). Colony formation was numbered in triplicate.

2) Étude du mécanisme d'action du peptide RT39

Nous avons ensuite étudié le mécanisme d'action de RT39 vis-à-vis des cellules leucémiques, sur la base des résultats obtenus dans le contexte du SS. En particulier, nous avons voulu vérifier si RT39 induisait une membranolyse des cellules leucémiques, dépendante de l'expression de la protéine PAK1 au niveau membranaire. Dans un premier temps, nous avons étudié la mort cellulaire induite par le peptide. Comme dans le SS, il s'agit d'une mort cellulaire rapide, associée à un relargage de protéines intracellulaires comme la LDH, témoin de la perte d'intégrité de la membrane plasmique caractéristique d'une nécrose. En microscopie électronique à transmission, les cellules leucémiques traitées par le peptide présentent un phénotype clairement nécrotique, avec gonflement du cytoplasme et rupture de la membrane plasmique, et ce, en l'absence de signes morphologique d'apoptose nucléaire (Figure 4). De plus, des expériences en cours d'analyse semblent indiquer que l'addition d'inhibiteurs de nécroptose (nécrostatine-1) ou de caspases (zVAD-fmk) n'affecte pas la mort cellulaire induite par RT39 dans les tests de cytotoxicité cellulaire, ce qui va dans le sens d'une mort cellulaire non-régulée.

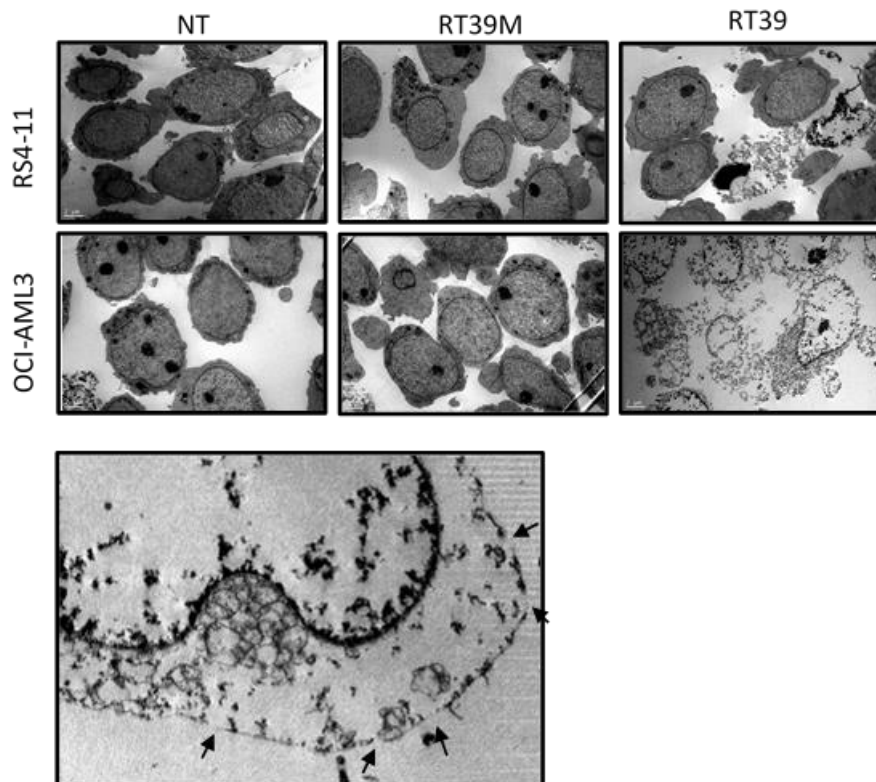
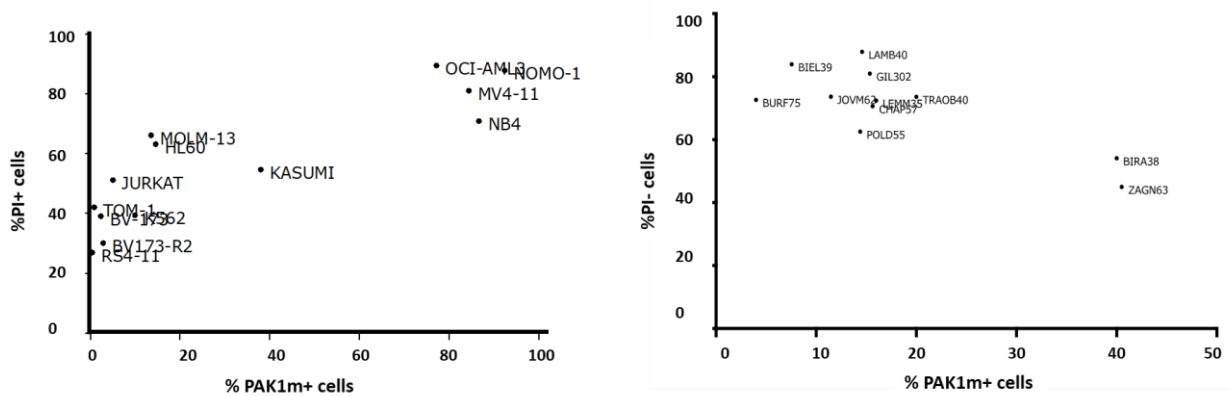


Figure 4. Morphology of leukemic cells after RT39 treatment. Observation by electron microscopy of RS4-11 and OCI-AML3 treated 1h with RT39 (7.5 μ M) or left untreated (NT) (x1500). In the lower panel (x10 000), arrows indicate pores formed across the plasma membrane.

Dans le SS, nous avons démontré que le peptide agissait, au moins en partie, par liaison directe à la protéine PAK1 surexprimée au niveau de la membrane plasmique des cellules tumorales, provoquant une membranolyse spécifique de ces cellules. Dans le contexte des leucémies aigües, la protéine PAK1 a déjà été identifiée comme étant une cible potentielle. Son expression dans la LAM est en effet associée à un mauvais pronostic (Pandolfi et al., 2015). D'autre part, PAK1 a récemment été identifiée comme étant une molécule effectrice agissant en aval

de la protéine HLX (H2.0-like homeobox), surexprimée dans les progéniteurs leucémiques (Kawahara et al., 2012). Enfin, l'inhibition de PAK1 par ARN interférence ou par des petites molécules inhibitrices induit une différenciation et une apoptose des cellules LAM (Pandolfi et al., 2015). Tous ces éléments nous permettent de penser que RT39 agit là encore via une interaction avec PAK1 au niveau de la membrane des cellules tumorales. Des expériences sont actuellement en cours afin de valider cette hypothèse. Nous avons d'ores et déjà obtenu plusieurs résultats encourageants.

Ainsi, nos expériences indiquent que le niveau d'expression de la protéine PAK1 à la membrane des cellules leucémiques est corrélé à leur sensibilité au peptide (lignées cellulaires et cellules de patients) (Figure 5).



En microscopie à fluorescence, il semble que RT39 s'accumule à la membrane des cellules LAM, et colocalise avec la forme membranaire active de PAK1 (Figure 7).

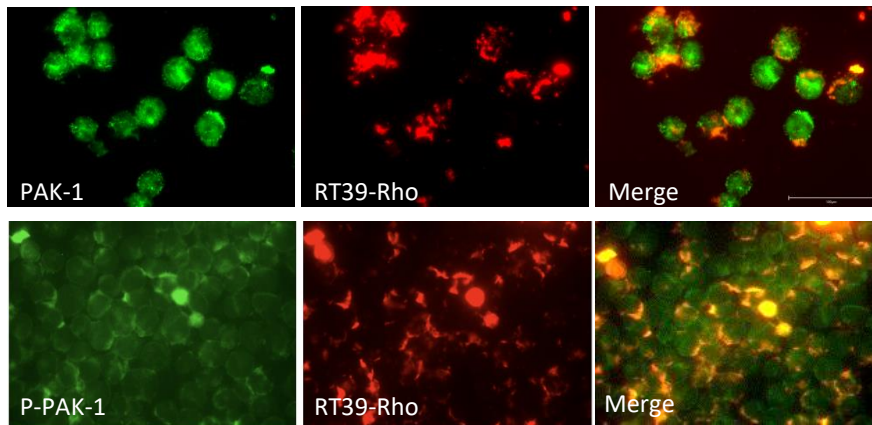


Figure 7. Co-localisation of PAK-1 and Phospho-PAK1 with RT39-Rho at the membrane of AML cells. OCI-AML3 were pre-treated for 1h with a sublethal dose of RT39-Rhodamine (1 μ M) then subjected to cytospin. Immunolabelings were performed using anti-PAK1 and -phospho-PAK1 antibodies. Nuclei were stained with DAPI. Original magnification x20.

Pour finir, la surexpression de PAK1 à la membrane de cellules résistantes à la cytotoxicité induite par RT39 (RS4-11) sensibilise ces cellules au traitement, tandis que la dérégulation de PAK1 dans des cellules très sensibles (OCI-AML3) par shRNA, les rend beaucoup plus résistantes (Figure 8).

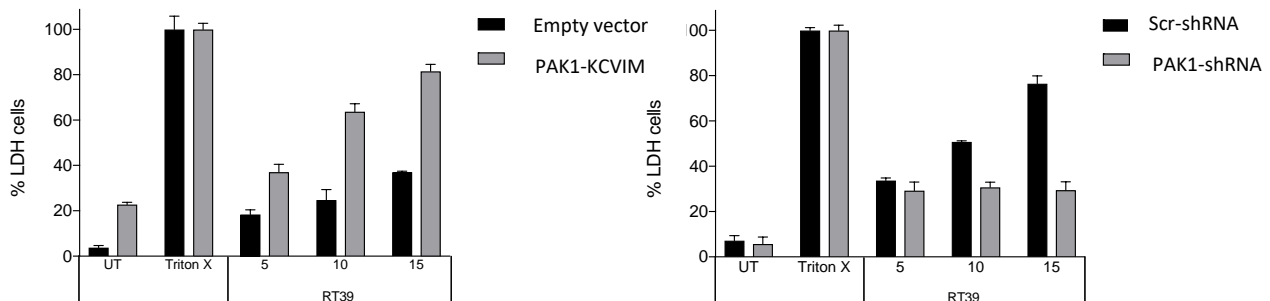


Figure 8. Effet of PAK1 expression level on RT39-induced cell death. (Left) RS4-11 cells infected with lentivirus control or PAK1-KCVIM. Transduced cells were then left untreated (UT) or incubated with increasing concentrations of RT39 for 1 h at 37°C. Cell viability was estimated by lactate dehydrogenase (LDH) release in the culture medium. The obtained values were normalized to those of the maximum LDH released (completely lysed) control. (Right) OCI-AML3 cells were infected with lentivirus PAK1-shRNA or SCR-shRNA. Transduced cells were then left untreated (UT) or incubated with increasing concentrations of RT39 for 1 h at 37°C. Cell viability was estimated by lactate dehydrogenase (LDH) release in the culture medium.

Tous ces résultats préliminaires vont dans le sens de ce qui avait été observé dans le contexte du SS. D'autres expériences restent encore à réaliser afin de valider le mécanisme d'action dans les leucémies aigües, mais il semblerait que PAK1 joue là encore un rôle important pour l'effet membranolytique de RT39 vis-à-vis des cellules tumorales.

3) Activité anti-tumorale de RT39 dans différents modèles murins de leucémie aigüe myéloïde

Nous avons ensuite évalué l'activité anti-tumorale de RT39 *in vivo*, dans trois modèles différents. Le premier modèle consiste en l'injection sous-cutanée de cellules NB4-LR1 (lignée cellulaire de LAP) dans des souris NSG. Ces cellules, dérivées de la lignée promyélocytaire NB4, se caractérisent par leur résistance à la différenciation induite par les rétinoïdes, ce qui fait de ce modèle murin un modèle pré-clinique pertinent compte tenu de l'importance de l'ATRA dans le traitement des LAP. Après apparition de la tumeur, les souris ont été traitées quotidiennement par voie intrapéritonéale avec une solution saline (NT) ou 5mg/kg de peptide RT39. D'après les résultats obtenus, le traitement par RT39 induit une réduction significative de la croissance tumorale, comparé aux souris contrôles, avec une réduction de la croissance tumorale d'environ 55% ($p < 0.005$) (Figure 9).

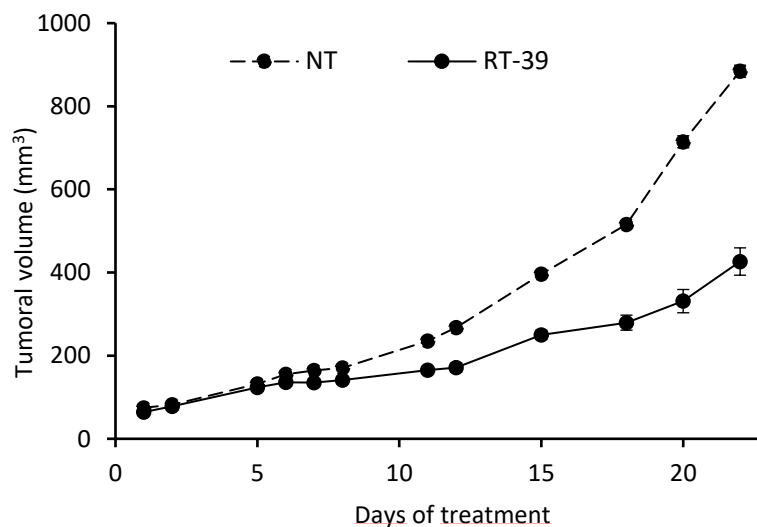


Figure 9. *In vivo* anti-tumor effect of RT39 in a subcutaneous xenograft model of LAP. NSG mice were engrafted subcutaneously with 1 million NB4-LR1 cells. Treatment started after randomization when tumors were visible and consisted of daily intraperitoneal injection of saline solution or RT39 (5 mg/kg; n=7 per group). Tumor volume was measured at the indicated days. Data represent tumor volumes for each group as means \pm SD.

Le second modèle consiste en l'injection par voie intraveineuse de cellules OCI-AML3, une lignée cellulaire de LAM mutée dans le gène NPM1, dans des souris NSG. Ce modèle, bien qu'immunodéficient, possède des caractéristiques proches de la pathologie clinique, avec présence de blastes leucémiques CD45+ dans le sang et la moëlle osseuse (Figure 10b). A partir du jour suivant la greffe, les souris sont traitées quotidiennement pendant 3 semaines par voie intrapéritonéale avec une solution saline (NT) ou 5mg/kg de peptides RT39 ou RT39M. D'après les résultats obtenus, le traitement par RT39 induit une augmentation significative de la survie des souris, puisque la moitié des souris survivent au moins deux fois plus longtemps que les souris contrôles ($***p < 0.001$) (Figure 10a).

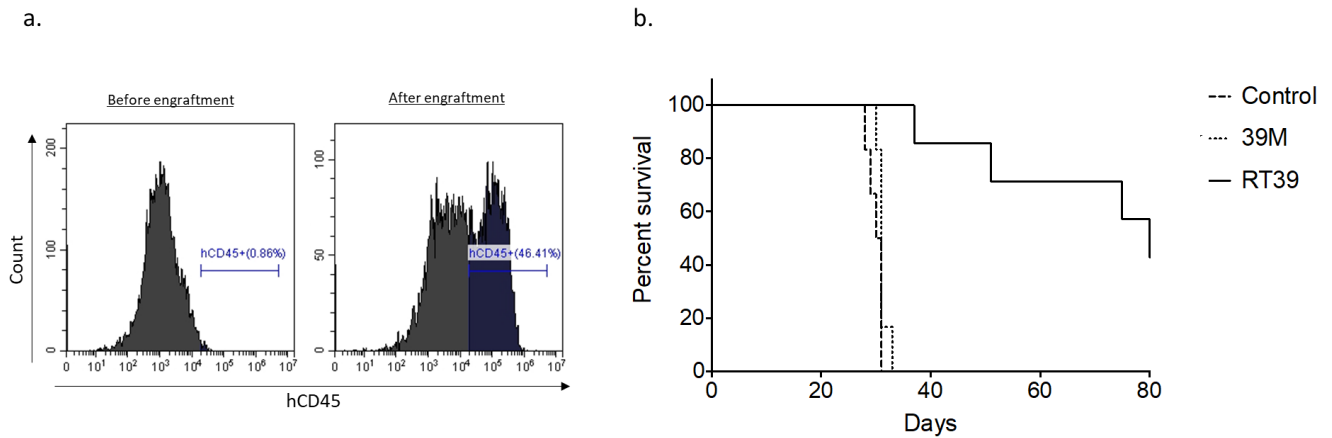


Figure 10. *In vivo* anti-tumor effect of RT39 in an intravenous xenograft model of LAM. (a) Flow cytometry analysis for the research of hCD45+ cells in the blood after engraftment, to confirm the engraftment success. (b) 1×10^5 OCI/AML3 cells were injected intravenously in NSG recipient mice. One day later, the mice were injected intraperitoneally every day for 3 weeks either with saline solution or the peptides RT39 or RT39M at 5mg/kg (n=6). The mice were sacrificed in accordance with the experimental protocol or when they became moribund or unable to obtain food or water or if they lost >20% of their body weight.

Enfin, le troisième modèle correspond au modèle pré-clinique LAP décrit dans le 1^{er} chapitre de ma partie résultats, à savoir un modèle de transplantation de blasts murins (PML-RAR α) dans des souris FVB/N et mimant les symptômes et les réponses aux traitements observés chez les patients LAP. Pour rappel, dans ce modèle, 100% des souris transplantées (10^4 blasts) succombent à la maladie, entre 28 et 35 jours après la greffe. D'après nos résultats, le traitement par RT39 (3 semaines consécutives de traitement quotidien à une dose de 5mg/kg) permet d'améliorer significativement la survie des souris (Figure 11).

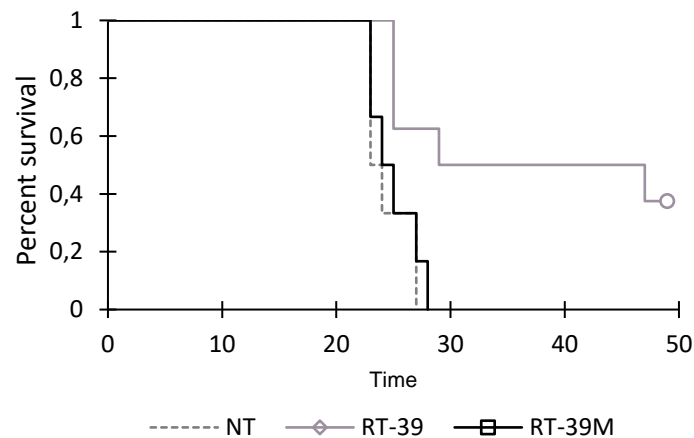


Figure 11. *In vivo* anti-tumor effect of RT39 in a syngeneic mouse model of LAP. 10^4 APL blasts were inoculated intravenously (i.v.) into FVB/N mice at day zero. Mice were either left untreated (n=6) or injected i.p. with RT39M or RT39 (5 mg/kg in normal saline) at day 10 daily for 3 weeks (n=6). Survival curves were analyzed with the Mantel-Cox test.

CHAPITRE 3 : Optimisation des peptides LZDPs dérivés d'AAC-11

Pour finir, nous avons découvert et caractérisé une nouvelle séquence de pénétration cellulaire correspondant à une portion de la protéine Acinus, un partenaire bien connu d'AAC-11. Cette séquence, appelée hAP10, ainsi qu'une séquence dérivée nommée hAP10DR sont plus courtes que la plupart des séquences de pénétration connues. Par ailleurs, elles sont au moins aussi efficaces en termes de capacité de translocation, et ce, en l'absence de toxicité et d'immunogénicité. D'après les études biochimiques réalisées, la voie d'internalisation majeure des CPPs hAP10 et hAP10DR semble être la micropinocytose. Ils sont tous deux capables de transporter des molécules de haut poids moléculaire, comme en attestent les résultats obtenus après couplage avec la GFP. La séquence de ces nouveaux CPPs a fait l'objet d'un dépôt de brevet dont je suis co-inventrice (dépôt de brevet n°19 315 060.4).

Dans la seconde partie de cette étude, nous avons conçu des peptides « seconde génération » associant les séquences hAP10 et hAP10DR aux résidus 377-399 du domaine LZ d'AAC-11 (séquence correspondant à la portion active de RT39), et nommés respectivement RT33 et RT33DR. Ces nouveaux peptides conservent les propriétés anti-tumorales des LZDPs de référence (avec une toxicité vis-à-vis des cellules saines *in vitro* et *in vivo* négligeable). RT33 et RT33DR comportant 6 résidus de moins que RT39, leur coût de synthèse est fortement réduit. Il s'agit évidemment d'un critère primordial dans le cadre d'un développement clinique.

Ces résultats ont fait l'objet de la rédaction d'un article scientifique, qui sera soumis très prochainement à une revue pour publication (**ARTICLE 6 « Efficient therapeutic delivery by a novel cell-penetrating peptide derived from Acinus »**, [Habault](#) et al.).

EFFICIENT THERAPEUTIC DELIVERY BY A NOVEL CELL-PENETRATING PEPTIDE DERIVED FROM ACINUS

Justine Habault^{1,2}, Claire Fraser^{1,2}, Ewa Pasquereau-Kotula^{1,2}, Anne Marie-Cardine^{1,2} and Jean-Luc Poyet^{1,2,3}

¹INSERM UMRS976, Institut de Recherche Saint Louis, Hôpital Saint Louis, Paris, France

²Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Paris, France

³c-Dithem, Inserm Consortium for Discovery and Innovation in Therapy and Medicine

Running Title: Characterization of novel cell-penetrating peptides

Keywords: Cell-penetrating peptides, AAC-11, therapeutic target, anticancer peptide, Sézary Syndrome

Grant Support: This work was supported by grants from INSERM, Ligue Nationale Contre le Cancer, ARC and Cancéropôle Ile-de-France

Corresponding Author: Jean-Luc Poyet, INSERM UMRS976, Institut de Recherche Saint Louis, Hôpital Saint-Louis, 1 rue Claude Vellefaux, 75010 Paris, France. Tel: +33 6 66 77 51 45; E-mail: jean-luc.poyet@inserm.fr

Abstract

In this study, we have identified a novel cell-penetrating sequence, termed hAP10, from the C-terminus of the human protein Acinus. hAP10 was able to efficiently enter various normal and cancerous cells, likely through an endocytosis pathway, and to deliver an EGFP cargo to the cell interior. Cell penetration of a peptide, hAP10DR, derived from hAP10 by mutation of an aspartic acid residue to an arginine was dramatically increased. Interestingly, a peptide containing a portion of the heptad leucine repeat region of the survival protein AAC-11 (residues 377-399) fused to either hAP10 or hAP10DR was able to induce tumor cells, but not normal cells, death *in vitro* and to inhibit tumor growth *in vivo* in a sub-cutaneous xenograft mouse model for the Sézary syndrome. Combined, our results indicate that hAP10 and hAP10DR may represent promising vehicles for *in vitro* or *in vivo* delivery of bioactive cargos, with potential use in clinical settings.

Introduction

Cell-penetrating peptides (CPPs) are a class of short (less than 30 residues), cationic and/or amphipathic peptides which has been extensively shown to be capable of translocating through various biological membranes via direct penetration and/or endocytosis [1-4]. Over the past few years, CPPs have received significant attention as delivery agents for a wide range of cargos such as proteins, peptides, DNAs, siRNAs, nanoparticles and small chemical compounds both *in vitro* and *in vivo* [5-9]. Applications include both fundamental biology, such as transport of fluorescent or radioactive agents for imaging purposes, stem cell manipulation and reprogramming and gene editing [10-14], as well as preclinical and clinical trials to investigate medical applications of CPP-derived therapeutics against various diseases, including heart disease, stroke, cancer, and pain (see [5] for review). Most of the CPPs in use today are pathogen-derived or synthetic entities and therefore feature potential risk of immunogenicity and cytotoxicity, especially when conjugated to a protein or nanoparticle, restricting their use for biomedical applications [15, 16]. Moreover, many described CPPs exhibit low delivery efficiency. Consequently, the development

of novel human-originated CPPs with a high transduction efficiency is of great interest. In this study, we have identified and characterized a novel cell-penetrating sequence, termed hAP10, from the C-terminus of the human protein Acinus and evaluated its potential as cargo protein carrier. A peptide derived from hAP10 by mutation of an aspartic acid residue to an arginine, called hAP10DR, was also developed and its penetrating properties explored. Finally, the antitumor effect of hAP10 or hAP10DR conjugation with the protein-protein interaction domain of the survival protein AAC-11 was investigated *in vitro* and *in vivo* in a sub-cutaneous xenograft mouse model for the Sézary syndrome.

Results

Acinus contains a CPP-like sequence

In exploring the sequence of Acinus (Apoptotic chromatin condensation inducer in the nucleus), a nuclear protein involved in RNA processing and apoptotic DNA fragmentation [17-22], we noticed an arginine rich region located in the C-terminus that presents significant similarities with the sequence of the TAT CPP (residues 1177-1186 of Acinus-L, Figure 1A). Analysis of this 10 residues sequence, hereafter called hAP10, using the CellPPD *in silico* tool [23] confirmed that hAP10 could indeed possess

CPP properties (Figure 1A). Cationic CPPs have a net positive charge at physiological pH, mostly derived from arginine and lysine residues in their sequence, which drives their cell-penetrating properties [5]. hAP10 is highly cationic with six arginine and one lysine residues. As it contains one aspartic acid at its center, and because replacing negative charged residues with positively charged residues can increase penetrating activity of cationic CPPs [24], we hypothesized that substitution of hAP10 aspartic acid to an arginine (hAP10DR) could potentially increase its penetrating properties. Indeed, as shown in Figure 1A, CellPPD analysis resulted in a higher SVM score for hAP10DR compared to hAP10. Secondary structure of CPPs are important for their membrane interaction and it has been shown that peptides with an α -helical

region can internalize more efficiently than their random-coiled counterparts [25]. Secondary and three-dimensional structure predictions carried out with the well-established PSIPRED and I-TASSER servers [26, 27] suggested an essentially helical structure for both hAP10 and hAP10DR, with an helical content of 70% and 80%, respectively (Figure 1B). Energy maps revealed slightly different favorable hydrogen donor and acceptor regions and steric fields around the peptides (Figure 1B). As these observations suggest that hAP10 and hAP10DR could represent novel CPPs, both peptides were selected for experimental validation and further analysis of their *in vitro* and *in vivo* cargo delivery properties.

a

Peptide designation	Sequence	SVM Score
hAP10	RSRSRDRRRK	1.09
hAP10DR	RSRSRRRRRK	1.56

b

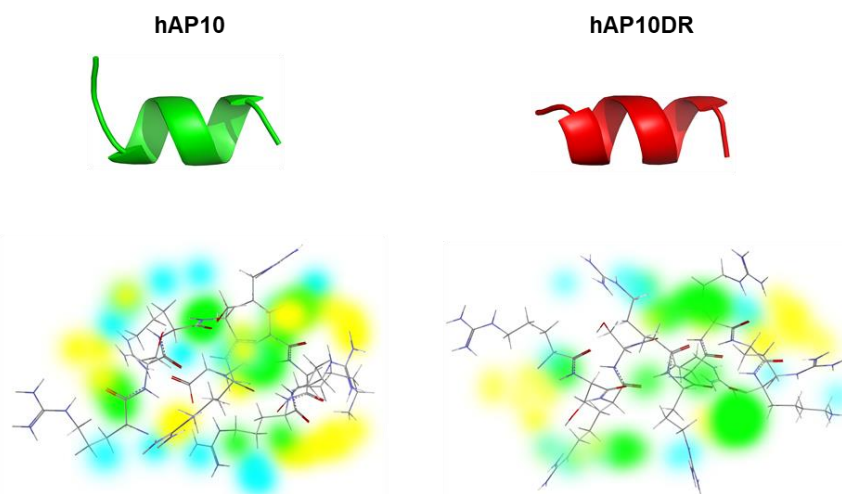


Figure 1 Sequence and structural prediction of the investigated peptides. (A) Name, amino-acid sequences and support vector machine (SVM) score of the potential CPPs. The SVM-based method, which uses binary profile of the peptide, was used for the SVM score prediction. (B) Top: Structural prediction of hAP10 and hAP10DR. Bottom: Energy maps of hAP10 and hAP10DR. Coloring is the following: hydrogen donor favorable (yellow), hydrogen acceptor favorable (blue) and steric favorable (green).

Cellular uptake of hAP10 and hAP10DR. The translocation efficacy of FITC-labeled hAP10 and hAP10DR was first assessed by flow cytometry analysis and compared to that of the widely used CPPs penetratin and TAT. Cellular uptake was analyzed after 60 min incubation of HUT78 Sézary cells and stringent washing followed by incubation with trypsin to remove the extracellular membrane-associated peptides [3]. Both hAP10 and hAP10DR

were efficiently internalized into HUT78 cells. hAP10 displayed similar uptake efficiency to that of penetratin (Figure 2A). hAP10DR however, showed a higher uptake and was internalized approximately twice as more efficiently than its wild type counterpart and about 50% more than TAT (Figure 2A), indicating that replacement of the negatively charged aspartic acid with the positively charged arginine drastically favored the CPP capacities of the peptide. Similar data were obtained using U2OS and C8161 cancer cells (not shown). Interestingly, hAP10 and hAP10DR were able to permeate into

non-cancerous cells, such as human B lymphocytes (Figure 2B). We next examined the cellular distribution of hAP10 and hAP10DR using fluorescent microscopy imaging. U2OS cells were treated with FITC-labelled hAP10 and hAP10DR or the control peptides penetratin and TAT and the cells were imaged using live microscopy imaging. We chose to perform these experiments on live cells to avoid fixation artefacts that can arise when studying transduction of arginine-rich peptides [3]. As shown in Figure 2C, both hAP10 and hAP10DR as well as

the control peptides adopted both a diffuse and punctuate fluorescence distribution throughout the cells, confirming that the peptides were indeed internalised and not merely adsorbed at the cell surface. In agreement with the cytometry profiles, the intracellular fluorescence intensity of the hAP10DR peptide was much higher to that of hAP10 and control peptides penetratin and TAT, confirming the superior transduction efficacy of the mutated version of the peptide.

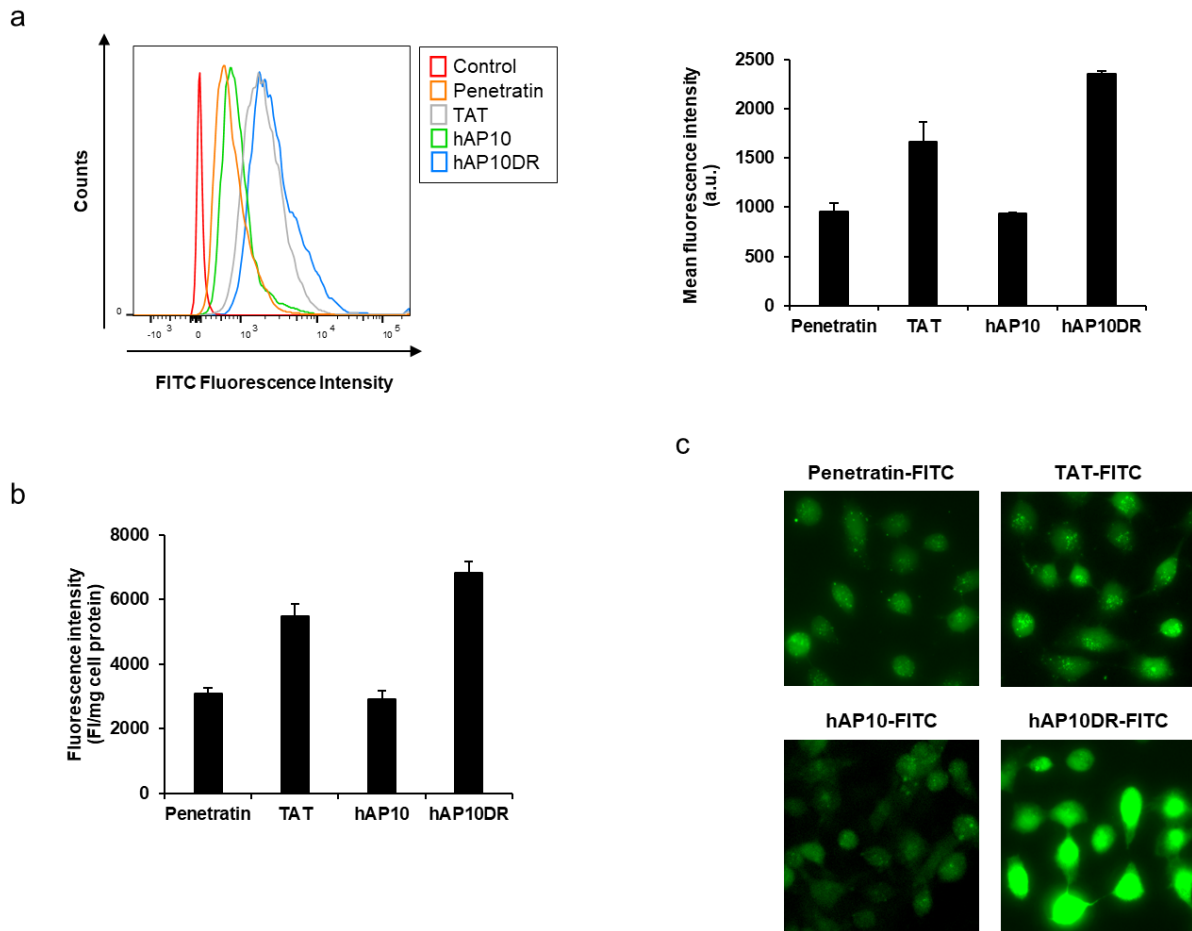


Figure 2 Cellular uptake of hAP10 and hAP10DR. (A) HUT78 cells were incubated with 5 μ M of FITC-labelled hAP10 and hAP10DR or penetratin and TAT as controls for 1 h in complete medium. Cells were then washed with PBS, incubated in trypsin-EDTA solution (0.01% trypsin) at 37°C for 10 min, resuspended in PBS and subjected to flow cytometry (right). Left: Bar diagram representing the uptake of the FITC-labelled peptides as mean cellular fluorescence from the flow cytometry analysis of live cells positive for FITC. Data are means \pm s.e.m. ($n=3$). (B) Fluorescence quantification of FITC-labelled hAP10 and hAP10DR uptaken in human B lymphocytes. Cells were incubated with 5 μ M of FITC-labelled hAP10 and hAP10DR or penetratin and TAT as controls for 1 h in complete medium, washed with PBS and the fluorescence of the cell lysis measured as described in Material and Methods. Data are means \pm s.e.m. ($n=3$). (C) Intracellular distribution of FITC-labelled hAP10 and hAP10DR in U2OS cells. U2OS cells grown on coverslips were incubated with 5 μ M of FITC-labelled hAP10 and hAP10DR or penetratin and TAT as controls for 1 h in complete medium, washed three times with PBS and live cells were imaged using fluorescence microscopy. All images were acquired using the same light intensity and microscope settings to permit direct comparison between the peptides.

Cellular uptake mechanism of hAP10 and hAP10DR. Although the precise mechanisms by which CPPs enter the cells are still under debate, they fall into two broad categories: direct translocation and endocytosis [5]. To gain insight

into the transduction process of hAP10 and hAP10DR, we investigated the effect of heparin, temperature and well-established endocytosis inhibitors on the cellular uptake of hAP10 and hAP10DR. As shown in Figure 3, cellular uptake of both hAP10 and hAP10DR into C8161 cells was greatly decreased in the presence of heparin sulfate, indicating that the peptides penetrate the membrane

via heparin sulfate proteoglycan (HSPG)-mediated pathway(s). Similar data were obtained using U2OS cells (not shown). We next tested whether the cellular internalization of hAP10 and hAP10DR was mediated by an energy-dependent process. As endocytosis is form of active transport, requiring energy, lowering the temperature is expected to inhibit endocytic processes but not energy-independent processes such as direct penetration. As shown in Figure 3, cellular uptake of hAP10 and hAP10DR was substantially decrease when exposed cells were incubated at 4°C as compared to 37°C. Similar results were observed following energy depletion by sodium azide (Figure 3). Combined, these data indicate that hAP10 and hAP10DR are internalized into cells through an energy-dependent endocytosis mechanism. We next evaluated the

precise cell entry pathway of hAP10 and hAP10DR by using various inhibitors of known endocytic pathways. Pre-treatment of cells with chlorpromazine (CPZ), a known inhibitor of clathrin-mediated endocytosis, or methyl- β -cyclodextrine (MBCD), an inhibitor of lipid raft-mediated endocytosis, did not significantly reduced the uptake of hAP10 and hAP10DR (Figure 3). However, a drastic decrease was observed upon pre-treatment of the cells with 5-(N-ethyl-isopropyl) amiloride (EIPA), an inhibitor of micropinocytosis (Figure 3). Together, these results identify macropinocytosis as the main pathway for hAP10 and hAP10DR cellular uptake.

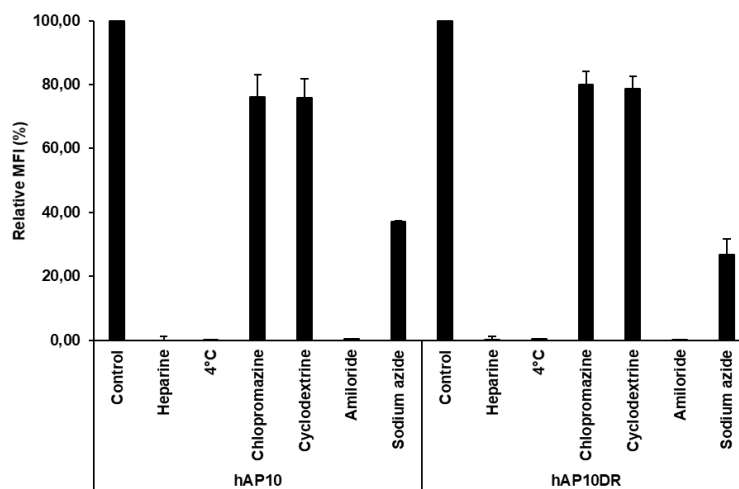


Figure 3 Internalization mechanisms of hAP10 and hAP10DR. C8161 cells pre-incubated at 4°C or with heparin sulfate (20 μ g/ml), sodium azide (0.1%), CPZ (50 μ M), MBCD (1 mM) or EIPA (50 μ M) for 30 min or left untreated were incubated with 5 μ M of FITC-labelled hAP10 and hAP10DR for 1 h in complete medium. Cells were then washed with PBS, detached with trypsin, washed and suspended in PBS, then subjected to flow cytometry (left). Right: Bar diagram representing the uptake of the FITC-labelled peptides as mean cellular fluorescence from the flow cytometry analysis of live cells positive for FITC. Data are means \pm s.e.m. ($n=3$).

Analysis of cellular toxicity, hemolytic activity and immunogenicity of hAP10 and hAP10DR.

We then assayed the cytotoxicity effect of hAP10 and hAP10DR on various cell lines. Dose-response analyses indicate that neither peptide significantly altered cellular viability at doses up to 30 μ M (Figure 4A). Moreover, absence of lactate dehydrogenase (LDH) activity release in the culture medium indicated that hAP10 and hAP10DR did not induce membrane disturbance (Figure 4B). In line with this observation, neither hAP10 nor hAP10DR exhibited hemolytic activity (Figure 4C). We next evaluated

the potential immunogenicity of hAP10 and hAP10DR by measuring the secreted levels of IL-6 upon treatment of RAW 264.7 mouse macrophage cells with the peptides for 24 h. Whereas the control bacteria-derived lipopolysaccharide (LPS) elicited a potent cytokine response, no significant IL-6 release was detected in the media of RAW 264.7 cells cultured in the presence of hAP10 or hAP10DR (Figure 4D). Combined, our data indicate that hAP10 or hAP10DR are essentially not cytotoxic and non-immunogenic and therefore demonstrate potential for *in vivo* applications.

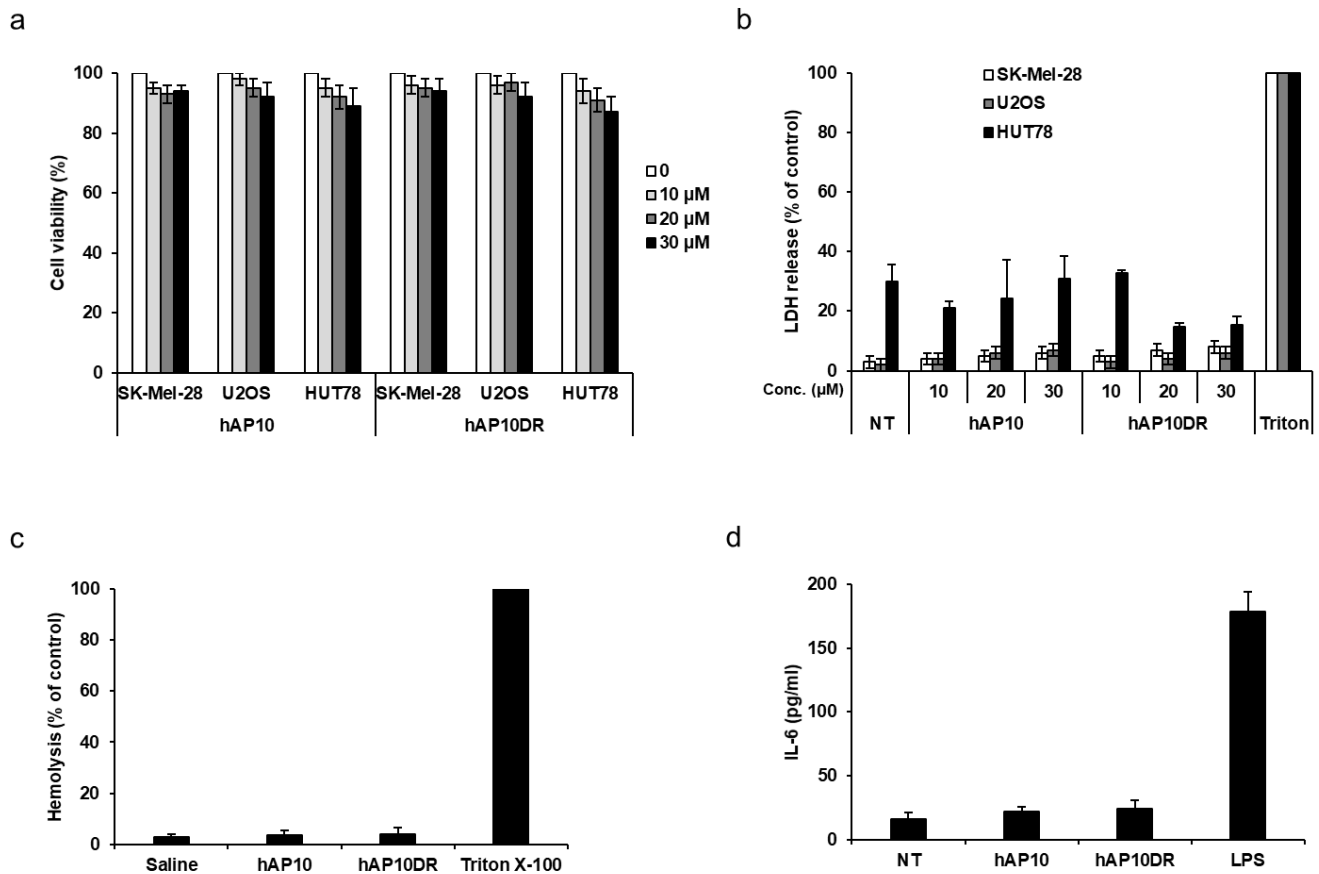


Figure 4 Lack of toxicity and immunogenicity of hAP10 and hAP10DR. (A) The indicated cells were exposed to increasing concentrations of hAP10 or hAP10DR for 20 h. Viability was then assessed by an MTT assay. Data are means \pm s.e.m. ($n=3$). (B) Necrotic cell death was monitored by lactate dehydrogenase (LDH) release from cells into the culture medium. The obtained values were normalized to those of the maximum LDH released (completely lysed) control. Data are means \pm s.e.m. ($n=3$). (C) hAP10 and hAP10DR do not induce hemolysis *in vitro*. Mice red blood cells were incubated with 30 μ M of hAP10 or hAP10DR. Released hemoglobin was detected by densitometry at 540 nm. Hemoglobin release by cells treated with 1% Triton X-100 was used as 100% lysis control. (D) Levels of IL-6 secretion from RAW 264.7 cells exposed to 10 μ M of hAP10 or hAP10DR or LPS (1 μ g/ml) for 24 h. Data are means \pm s.e.m. ($n=3$).

Intracellular delivery of hAP10- and hAP10DR-EGFP fusion protein. We next evaluated the potential of hAP10 and hAP10DR to carry a functional macromolecule into cells. For that purpose, we generated recombinant fusion proteins comprising EGFP fused at the N-terminus to hAP10 or hAP10DR or the control CPPs TAT and penetratin (Figure 5A). The resulting proteins were then administered to the culture media of U2OS cells and the cells were imaged using live microscopy imaging. As shown in Figure 5B, a punctate fluorescence pattern was observed for the fusion

proteins but not for EGFP alone. Interestingly, in line with the FITC-labeled peptide uptake, hAP10-EGFP fluorescence was at least comparable to that of TAT-EGFP or penetratin-EGFP whereas hAP10DR-EGFP fluorescence was significantly higher. Taken together, our data indicate that the hAP10 and mutated sequences possess strong cell penetrating activities and are at least as effective as the commonly used TAT and penetratin CPPs at delivering an EGFP cargo to the cell interior.

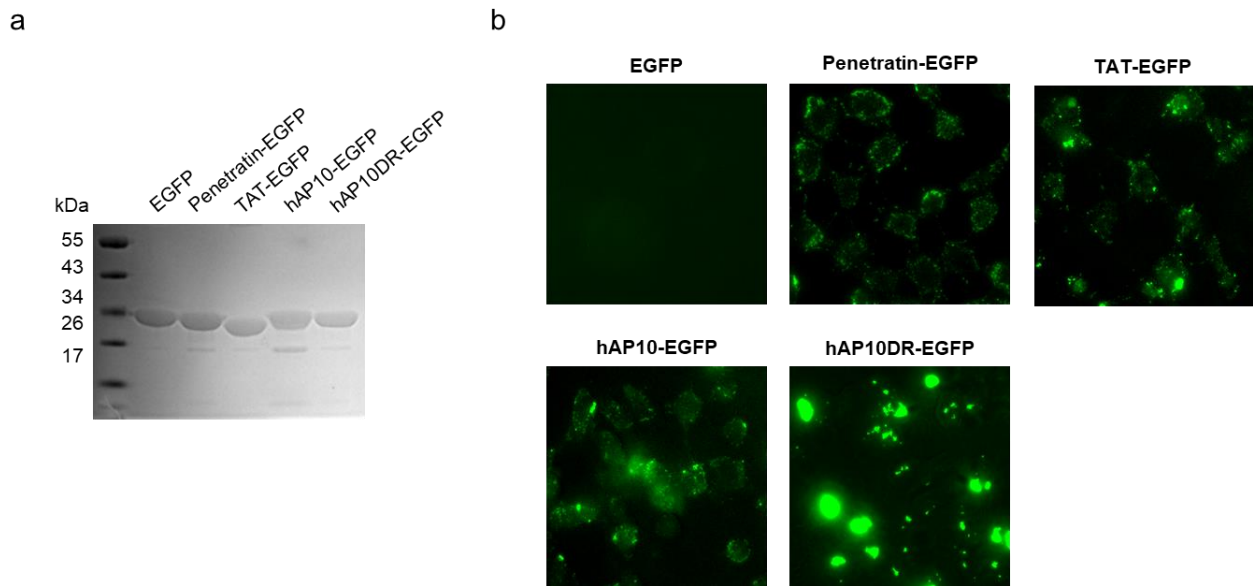


Figure 5 hAP10 and hAP10DR-mediated delivery of a GFP cargo into cells. **(A)** Electrophoretic analysis of the recombinant GFP derivatives. Samples (10 μ g) of the indicated purified recombinant proteins were resolved by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis followed by Coomassie Brilliant Blue staining. **(B)** U2OS cells were exposed to the indicated GFP fusion proteins (5 μ M) for 1h. Cells were then washed with PBS and live cells were imaged using fluorescence microscopy. All images were acquired using the same light intensity and microscope settings to permit direct comparison between the peptides.

Anti-tumoral effect of AAC-11 heptad leucine repeat-derived peptides. We have previously reported that a penetrating peptide (peptide RT53) spanning the heptad leucine repeat region of the survival protein AAC-11 (residues 363-399) fused to the CPP penetratin induces cancer cell death *in vitro* and inhibits melanoma tumor growth in a xenograft mouse model [28]. We here hypothesized that a peptide comprising a smaller portion of the heptad leucine repeat region of AAC-11 attached to hAP10 or hAP10DR might possess interesting anti-cancer properties. We therefore tested the anti-tumor effects of shorter peptides containing AAC-11 residues 377-399 attached to the C-terminus of hAP10 or hAP10DR (RT33 and RT33DR peptides, respectively). We first assessed the viability of various cancer or normal cells following exposure to increasing concentration of RT33 or RT33DR. As shown in Figure 6A, both peptides inhibited cell viability in all cancer cells in a dose-dependent manner, while sparing the normal cells tested. Of note, RT33DR exhibited substantially higher anticancer properties than RT33, maybe due to the high cell penetration capacity of its CPP. Neither the shuttles (Figure 4) nor the AAC-11 specific portion alone (not shown) decreased cell viability, indicating that the integrity of the peptides is required for their anti-tumoral effects. We next sought to investigate RT33 and RT33DR mechanisms of cancer cell death. We were especially interested in the response of HUT78 Sézary cells because effective therapeutic options for Sézary syndrome, an erythrodermic form of cutaneous T-Cell lymphoma (CTCL), are scarce

[29]. Pharmacological inhibition of the apoptotic pathways with the pan-caspase inhibitor zVAD-fmk did not block RT33 or RT33DR-induced cytotoxicity (Figure 6B), suggesting that the observed cell death does not depend on apoptosis. Furthermore, cell death was not prevented by the RIPK1 kinase inhibitor necrostatin-1, excluding necroptosis as cell death mechanism (Figure 6C). In previous studies, we found that RT53 induces tumor cell necrosis [28]. We therefore assessed LDH activity release in the culture medium of HUT78 cells treated with RT33 and RT33DR. Peptides exposure resulted in a massive release of LDH into HUT78 treated cells supernatant, indicative of membrane lysis and necrotic cell death (Figure 6D). Further, transmission electron microscopy micrographs revealed that, in contrast to control cells, HUT78 cells treated with RT33 and RT33DR exhibited ruptured and disintegrated plasma membranes, with total loss of membrane structure (Figure 6E). Combined, our data indicate that like RT53, RT33 and RT33DR induce necrosis of cancerous cells. The ability of RT33 and RT33DR to induce plasma membrane leaking suggests that both peptides target the plasma membrane. Previous data obtained with RT53 suggested that, in analogy with pore-forming toxins, its membranolytic property was a consequence of its accumulation at the plasma membrane of cancerous cells, leading to the formation of pore and subsequent necrosis [28]. In this mechanism, the cell-penetrating moiety of RT53 allows its plasma membrane penetration, where it can bind to a membrane protein partner through its AAC-11 sequence. Local accumulation of the

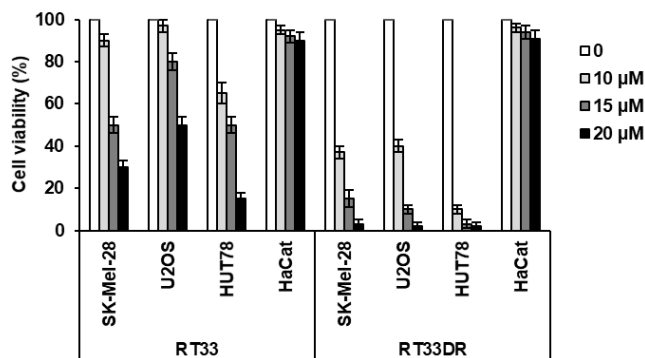
peptide would then lead to pores formation, owing to its alpha helical membrane active structure [28]. Structure prediction indicated that, like RT53, RT33 and RT33DR should essentially adopt an α -helical structure (Figure 6F). To provide evidence that RT33 and RT33DR target the plasma membrane, we incubated C8161 cells with FITC-labeled peptides and observed the fluorescence pattern. We chose C8161 cells as they are adherent and provide a big cytoplasm, which makes this cell line appropriate for imaging.

As shown in figure 6G, RT33- and RT33DR-treated cells showed punctate fluorescence over the cell surface, indicating that the peptides accumulate both at the plasma membrane and at the intracellular level. Combined, our results strongly suggest that RT33 and RT33DR, owing to the cell-penetrating properties of the hAP10 and hAP10DR shuttles, can insert into cancer cells plasma membrane where the peptides, upon binding to a membrane-interacting partner, induce pore formation, as witnessed for RT53.

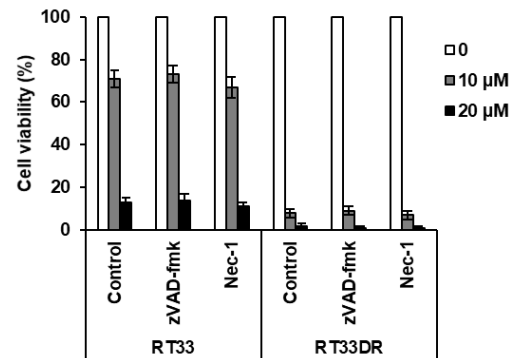
a

RT33: **RSRSRD~~RRR~~RK**LQYFARGLQVYIRQLRLALQGKT
 RT33DR: **RSRSR~~RRR~~RRK**LQYFARGLQVYIRQLRLALQGKT

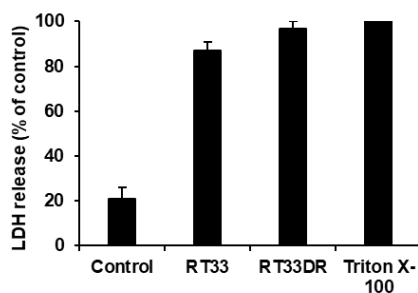
b



c



d



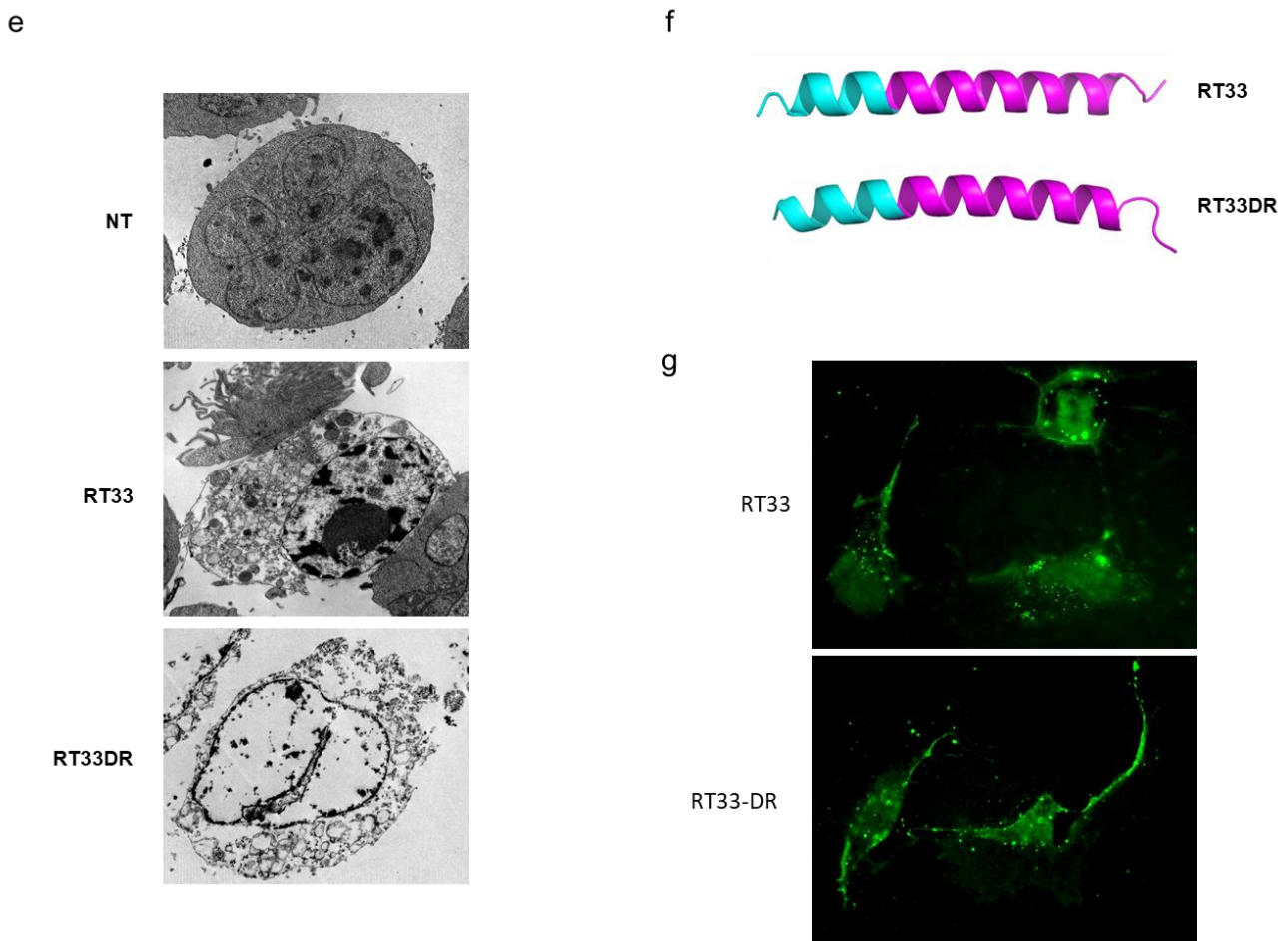


Figure 6 RT33 and RT33DR induces cancer cells, but not normal cells, death. (A) Amino-acid sequence of RT33 and RT33DR. hAP10 and hAP10DR sequences are in bold. (B) The indicated cells were exposed to increasing concentrations of RT33 or RT33DR for 20 h. Viability was then assessed by an MTT assay. Data are means \pm s.e.m. ($n=3$). (C) HUT78 cells were exposed to increasing concentrations of RT33 or RT33DR for 20 h in the presence and absence of 50 μ M zVAD-fmk or 50 μ M Necrostatin-1 (Nec-1). Viability was then assessed by an MTT assay. Data are means \pm s.e.m. ($n=3$). (D) HUT78 cells were exposed to 20 μ M of RT33 or RT33DR for 3 h. Necrotic cell death was monitored by lactate dehydrogenase (LDH) as in Figure 4 (B). Data are means \pm s.e.m. ($n=3$). (E) Ultrastructural analysis of HUT78 cells treated with 15 μ M of hAP10 or hAP10DR for 1 h. (F) Structural prediction of RT33 and RT33DR. The segments corresponding to the hAP10 and hAP10DR moieties are in magenta. (G) C8161 cells were exposed to FITC-labelled RT33 or RT33DR for 1 h. Cells were then examined by fluorescence microscopy.

RT33 and RT33DR induce targeted killing of circulating malignant T cells in Sézary patients' primary PBMC. We next tested the anti-tumor effect of RT33 and RT33DR against primary Sézary cells. For that purpose, an *in vivo* assay was established in which RT33 or RT33DR were directly incubated with peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from Sézary patients. The viability of three different cell populations was then assessed by flow cytometry through the incorporation of 7-AAD: the malignant T-cell clone (Sézary cells), defined as CD3⁺CD4⁺V β ⁺ cells, the non-malignant CD4⁺ T-cells, defined as CD3⁺CD4⁺V β ⁻ cells, and the non T-cells, defined as CD3⁻ cells. As shown on Figure 7 (right), both RT33 and RT33DR exhibited dose-

dependent cell death activity in the malignant CD4⁺ T-cells, RT33DR being the most efficient peptide toward Sézary cells. Strikingly, neither peptide decreased cell viability of the non-tumoral CD4⁺ T-cell as well as non-T-cell populations even at the highest doses. Therefore, these results demonstrate that RT33 and RT33DR selectively induce primary Sézary cells death in a dose-dependent manner, without harming primary normal cells, indicating that the peptides possess a cancer cell selective killing property. Finally, in line with our previous data, the hAP10 or hAP10DR shuttles did not induce cell death in the transformed or normal primary cell populations (Figure 7, left), confirming their safety profile as carrier.

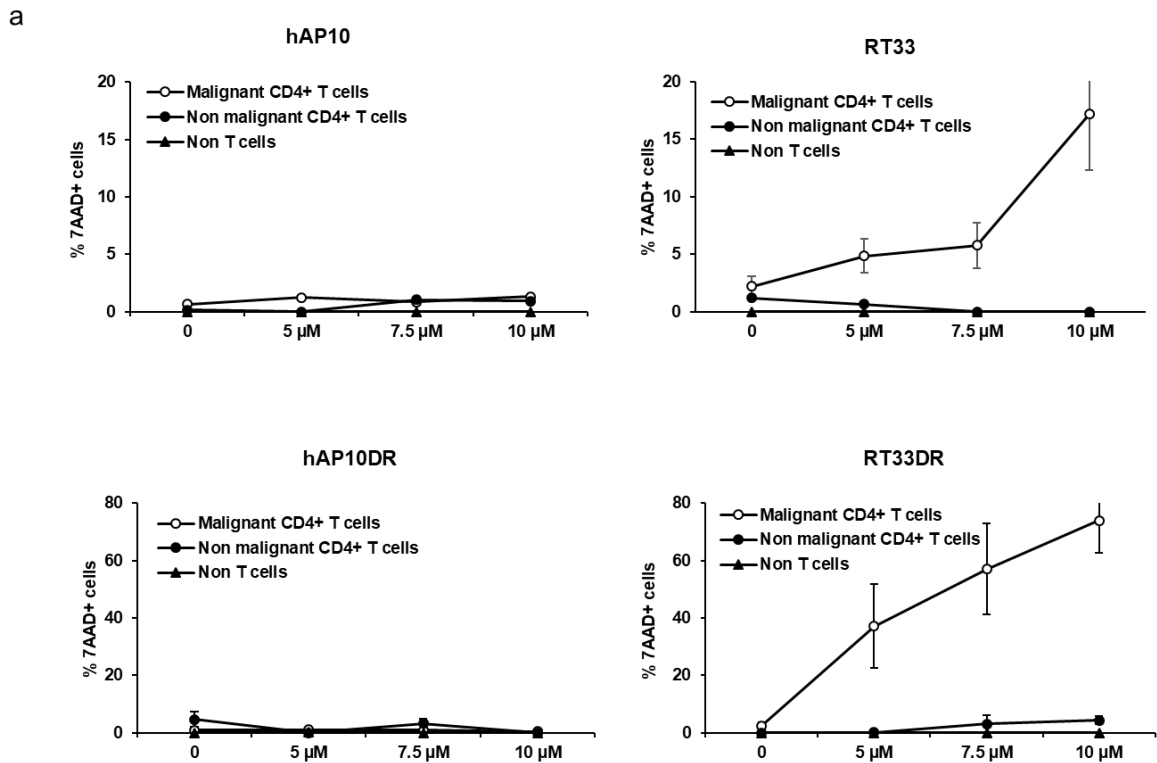
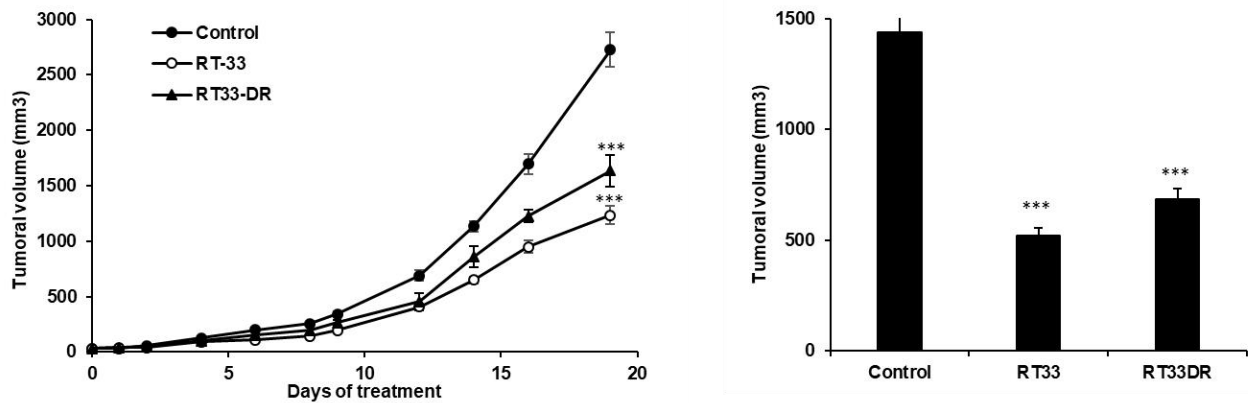


Figure 7 RT33 and RT33DR specifically induce primary Sézary cells death. Sézary patients' PBMC were incubated with increasing concentrations of the indicated peptides for 4h at 37°C. Cells were then analyzed by flow cytometry following labeling with anti-TCRV β -FITC, -CD4-PE, -CD3-PE-Cy7 mAbs and 7-AAD. Data are shown as the means \pm s.e.m. of the percentage of 7-AAD+ apoptotic cells within the following populations: malignant (CD3⁺CD4⁺TCR-V β ⁺) and non-malignant (CD3⁺CD4⁺TCR-V β ⁻) CD4+ T-cells and non T-cells (CD3⁻), derived from three different patients.

RT33 and RT33DR induce tumor growth reduction in a xenograft murine model of Sézary syndrome. To assess *in vivo* antitumor activity of RT33 and RT33DR, HUT78 Sézary cells were inoculated subcutaneously to NOD/SCID gamma (NSG) mice. When the xenografted tumors reached a volume of approximately 100 mm³, mice were randomized and injected daily with normal saline (NT) or 5 mg/kg of RT33 or RT33DR peptides. No obvious clinical symptoms were observed during the experimental period with either peptide (not shown). As shown in Figure 8A (left), both peptides induced significant tumor growth reduction as compared to control mice, with approximate tumor growth reduction of 66% ($p < 0.005$) for RT33 and 60% for RT33DR. Similarly, upon sacrifice at the study end point, xenograft tumors were excised and stripped of non-tumor tissue, if present, for more precise *in vivo*

measurement. As shown in Figure 8A (right), total tumor volume was decreased more than 2.6 times in RT33 treated mice and more than two-fold in RT33DR treated mice as compared with that in control mice. Assessment of tumor necrosis by H&E staining revealed a sharp increase of necrotic areas in RT33 or RT33DR treated groups compared to the control group (Figure 8B). Of note, immunohistochemical analyses of the tumors revealed comparable expression of Ki-67 as well apoptotic thresholds in the different groups (not shown). Combined, these data indicate that both RT33 and RT33DR are well tolerated *in vivo* and can reduce tumor growth as single agents upon systemic administration by inducing tumor cells necrosis.

a



b

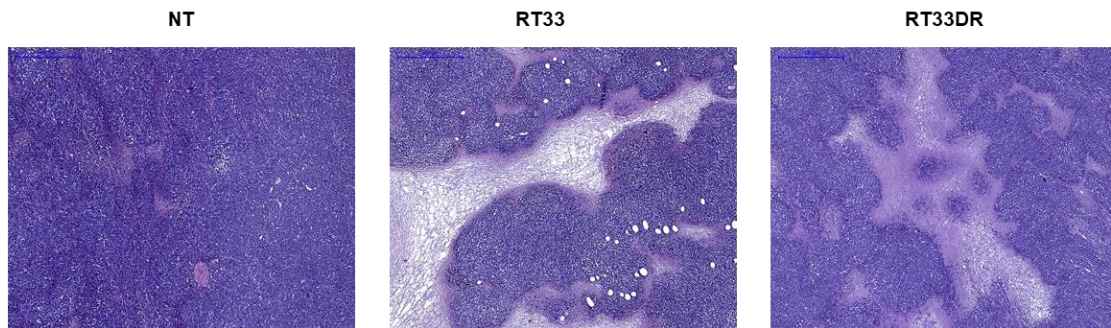


Figure 8 RT33 and RT33DR inhibit tumor growth *in vivo* in a mouse model for the Sézary syndrome. (A) Mice were engrafted subcutaneously with HUT78 Sézary cell line. Animals with preexisting tumors were treated daily with i.p. injections of RT33 or RT33DRM in normal saline (5 mg/kg) or normal saline as control. Tumors were calipered throughout the study and data were plotted as means \pm s.e.m. ($n=7$ mice per group). $p < 0.005$ relative to control. Subsequently, tumors were excised, stripped of non-tumor tissue and tumors volumes were calculated. (B) Representative pictures of H&E staining of tumors treated with RT33, RT33DRM, or normal saline. The scale bar represents 500 μ m.

Discussion

Here, we identified and characterized a new CPP corresponding to residues 1177-1186 of human Acinus-L, termed hAP10, as well as its derivative hAP10DR. *In vitro* approaches demonstrated that hAP10 displayed excellent cell penetration efficiencies in both normal and cancerous cells, equaling classical CPPs such as TAT and penetratin while being among the shortest CPPs identified thus far. Interestingly, we observed remarkably augmented cell penetration efficiency of the hAP10DR derivative, in which we replaced the negatively charged aspartic acid present in the wild type counterpart with an arginine, as hAP10DR largely outperformed hAP10 as well as TAT and penetratin. The cell penetration properties of CPPs is dependent of their secondary structure and it has been shown that peptides with a α -helical region can more efficiently enter cells [30, 31]. hAP10 and hAP10DR mostly adopt a helical structure, which can therefore explain their interesting CPP

properties. Importantly, neither hAP10 nor hAP10DR induced membrane disturbance or detectable cellular toxicity. Both peptides are also non-immunogenic, making them attractive and safe carriers for *in vivo* applications. Biochemical investigations revealed the involvement of a heparan sulfate proteoglycan-mediated micropinocytosis as a major route of internalization for hAP10 and hAP10DR. Still, as multi-endocytic routes are often involved in CPPs uptake, further studies would be needed to clarify the exact internalization mechanisms for hAP10 and hAP10DR. To further evaluating the potential of hAP10 and hAP10DR as macromolecules delivery tools, the peptides were firstly conjugated with GFP. Both hAP10-GFP and hAP10DR-GFP fusion proteins were efficiently transduced in cultured cells, demonstrating hAP10 and hAP10DR interest as novel vehicles for intracellular protein delivery. Of note, hAP10DR was a far better carrier than TAT or penetratin for GFP intracellular delivery, in line with its superior

penetrating ability. Finally, we evaluated the performances of hAP10 and hAP10DR through the design and study of tumor targeting peptides. Our previous studies showed that inhibiting interactions between the survival protein AAC-11 and its binding partners drastically increased susceptibility of tumor cells to apoptosis [21]. A cell penetrating peptide (RT53) based on the fusion of penetratin and the heptad leucine repeat region of AAC-11 (residues 363-399), which functions as a protein–protein interaction module, was shown to induce cancer cell death *in vitro* and to inhibit melanoma tumor growth in a xenograft mouse model [28, 32]. We hypothesized here that a peptide similar to RT53 but based on hAP10 and hAP10DR CPPs might possess valuable anti-cancer properties. The heptad leucine repeat region of AAC-11 is encoded by two exons (exons 9 and 10). As exons often correspond to structural and functional units of a protein [33], one can envision that only one of the two exons encoding AAC-11 heptad leucine repeat region could carry the anticancer activity exhibited by the RT53 peptide, making it possible to shorten the AAC-11 specific domain of the peptide. Our previous work indicated that mutation of two exon 10-encoded leucine residues in RT53 (corresponding to positions 384 and 391 of AAC-11), that were identified as critical for AAC-11 scaffolding and anti-apoptotic function [21, 34], abrogated RT53 anti-tumor activity [28]. We therefore designed two peptides, designed RT33 and RT33DR, consisting of AAC-11 residues 377-399, that are encoded by exon 10, attached to the C-terminus of hAP10 or hAP10DR, respectively, and tested their anticancer properties. Interestingly, both peptides were able to selectively kill cancer cells *in vitro*, without affecting normal cells. Our results show that RT33- and RT33DR-induced cancer cells death occurred through an apoptosis-independent, membranolytic mechanism. Like RT53, RT33 and RT33DR accumulate at the plasma membrane level of cancer cells. Even known a contribution of the physico-chemical properties of tumor cells membranes cannot formally be excluded, we hypothesize that RT33 and RT33DR, as witnessed with other cancer cells specific, membrane active peptides [35-37], interact with a membrane partner(s) that is mainly expressed in the membrane of transformed cells. Upon binding, the helical structure of RT33 and RT33DR could allow the formation of pores in the cancer cell membrane, as observed with other membranolytic, pore forming peptides [38]. Identification of RT33 and RT33DR membrane partner(s) is currently underway. The potential use of RT33 and RT33DR as novel anticancer drugs was then evaluated in the context of the Sézary Syndrom, a leukemic and aggressive form of cutaneous T cell lymphoma (CTCL) with poor prognosis [39]. Treatment of primary patient-derived samples with either RT33 or RT33DR, but not the hAP10 or

hAP10DR shuttles alone, induced selective death of malignant T-cell clone, while sparing the non-transformed T-cell and the non-T-cell populations. As observed with cancer cell lines, RT33 and RT33DR-induced Sézary cells death was necrotic, as validated by 7-AAD staining. In a xenograft model with HUT78 cells, systemic injection of RT33 and RT33DR resulted in significant reduction in tumor growth, confirmed by reduced tumor weight. Histological analysis of tumors derived from RT33 and RT33DR treated mice indicated increased necrotic cytotoxicity, compared to controls. In summary, we have developed novel, short, human-derived, non-cytotoxic and non-antigenic cell permeable peptides, showing excellent cell-penetrating ability. Importantly, fusion peptides consisting of the survival protein AAC-11 residues 377-399 linked to hAP10 or hAP10DR exhibited remarkable anticancer properties both *in vivo* and in a mouse model of Sézary Syndrom. Therefore, we expect that the unique characteristics of hAP10 and hAP10DR will allow their use for a wide variety of *in vitro* and *in vivo* applications.

Material and Methods

Peptides characterization

The support vector machine (SVM)-based prediction of cell penetrating properties was performed with the online CellPPD tool [23]. Secondary structure predictions were performed with PSIPRED [26]. Three-dimensional structure predictions were carried out with I-TASSER [27]. Figures were generated with PyMOL (<http://www.schrodinger.com>). Energy maps of the peptides were analyzed and generated using Molegro Molecular Viewer.

Cellular uptake quantification

Cellular internalization of FITC-labelled peptides was analyzed using flow cytometry. Cells were incubated in the presence of the peptides (5 μM each) in complete medium for 1 h. Cells were then washed three times in PBS and incubated with trypsin (1 mg/ml) for 10 min to remove the extracellular unbound peptides. Finally, cells were suspended in PBS and kept on ice. FITC fluorescence intensity of internalised peptides in live cells was measured by flow cytometry using BD FACS CANTO II™ by acquiring 1×10^4 cells. Data was obtained and analysed using FACSDIVA™ (BD biosciences) and FowJo software. In some experiments, cellular internalization was analysed using multimode spectrophotometry. Briefly, after incubation with the FITC-labelled peptides, cells were washed as described, centrifuged and the cell pellet resuspended in 300 μl of 0.1 M NaOH. Following 10 min incubation at room temperature, the cell lysate was centrifuged (14000 g for 5 min) and the fluorescence intensity of the supernatant determined (494/518 nm). The fluorescence of the

cellular uptake is expressed as fluorescence intensity per mg of total cellular protein.

Live cell microscopy

U2OS or C8161 cells (2×10^4) were seeded into Lab-Tek II chamber slides (Nalgen Nunc, Rochester, NY). 48 h later, cells were incubated with either FITC-labelled peptides ($5 \mu\text{M}$) or the studied EGFP fusion recombinant proteins ($5 \mu\text{M}$) in complete medium for 1h at 37°C . Following incubation, the cells were washed three times in PBS and imaged using a Zeiss Axiovert 200 M inverted fluorescence microscope.

Cell viability and lactate dehydrogenase (LDH) release assays

Cells survival was assessed with the CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay kit (Promega, Madison, WI). Necrotic plasma membrane permeabilization was assessed by lactate dehydrogenase (LDH) leakage in the culture medium with the CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay kit (Promega, Madison, WI).

Hemolysis assay

Mice blood was centrifuged at 2000 rpm for 10 min. Red blood cell pellets were washed five times with PBS and resuspended in normal saline. For each assay, 1×10^7 red blood cells were incubated with or without peptide ($30 \mu\text{M}$) in normal saline at 37°C for 1h. The samples were then centrifuged and the absorbance of the supernatant was measured at 540 nm. To determine the percentage of lysis, absorbance readings were normalized to lysis with 1% Triton X-100.

Immunogenicity assay

RAW 264.7 murine macrophages were seeded (1×10^4 cells/ cm^2) in a 24-well plate and allowed to grow for 24 h. Then, cells were left untreated or exposed to the hAP10 or hAP10DR peptides ($10 \mu\text{M}$) or to LPS (E. Coli O111:b4, $1 \mu\text{g}/\text{ml}$) as a positive control for 24 h. Levels of IL-6 in the supernatants were analyzed using an Mouse IL-6 Quantikine ELISA Kit (R&D system).

Recombinant protein purification

TAT, penetratin, hAP10 and hAP10DR nucleotide sequences with EGFP inserted at the C-terminal end were subcloned in the pET-21a vector system (Novagen) and the constructs used to transform *E. coli* BL21(DE3) cells (Invitrogen). The transformed cells were grown at 37°C in LB broth containing $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ of ampicillin to an A_{600} of 0.6 and induced with 1 mM IPTG for 3 h at 30°C . After harvest, the cells were resuspended in ice-cold Lysis buffer (20 mM HEPES, 100 mM NaCl, 10 uM ZNSO₄, 1 mM Tris-HCl, pH 8.0) containing proteases inhibitors and lysed using a French press. Cell lysates were centrifuged at 4°C for 30 min at

45000 rpm . Ni/NTA affinity purification was performed on an AKTA fast protein liquid chromatography (FPLC) system using 2 ml HisTrap HP columns (GE Healthcare Biosciences Uppsala, Sweden) equilibrated in wash buffer (20 mM HEPES, 100 mM NaCl, 10 uM ZNSO₄, 1 mM Tris-HCl, 20 mM imidazole, 10% glycerol, pH 8.0). Bound proteins were eluted using elution buffer B (20 mM HEPES, 100 mM NaCl, 10 uM ZNSO₄, 1 mM Tris-HCl, 300 mM imidazole, pH 8.0). Fractions were collected and analysed by Coomassie staining to assess purity.

Flow cytometry analysis of Sézary patients' cells

PBMC exposed or not to RT33 or RT33DR were processed for flow cytometry to assess cell death. Cells were labelled with a mix of anti-TCR-V β -FITC, -CD3-PE and -CD4-PE-Cy7 mAbs (Beckman Coulter). Detection of apoptotic cells was performed using 7AAD (BD Biosciences). Cells were analyzed on a CytoFlex cytometer (Beckman Coulter) and data treated with FlowJo software.

Xenograft tumor model

Animal experiments were approved by The University Board Ethics Committee for Experimental Animal Studies (#2303.01). Xenograft tumors were obtained by subcutaneous injection of 10^6 HUT78 cells in the right flank of 8-week-old female NOD-SCID-gamma (NSG) mice, bred and housed under pathogen-free conditions at our animal facility (IUH, Saint Louis Hospital, Paris, France). Treatment started after randomization when tumors were visible and consisted of daily intraperitoneal (i.p.) injection of normal saline or RT33 or RT33DR in normal saline ($n = 5$ per group). Tumor volume was measured every other day and calculated as: long axis X short axis² X 0.5. Animals were euthanized after 21 days of treatment or when tumor size reached the ethical end point and visceral organs were excised for a gross pathological examination. Tumors were fixed in 4% neutral buffered formalin and embedded in paraffin. Sections ($4 \mu\text{m}$) were stained with hematoxylin-eosin (H&E) and subjected to microscopic analysis.

Bibliography

- 1 Cardoso AM, Trabulo S, Cardoso AL, Lorents A, Morais CM, Gomes P *et al.* S4(13)-PV cell-penetrating peptide induces physical and morphological changes in membrane-mimetic lipid systems and cell membranes: implications for cell internalization. *Biochimica et biophysica acta* 2012; 1818: 877-888
- 2 Alves ID, Goasdoue N, Correia I, Aubry S, Galanth C, Sagan S *et al.* Membrane interaction and perturbation mechanisms

- induced by two cationic cell penetrating peptides with distinct charge distribution. *Biochimica et biophysica acta* 2008; 1780: 948-959.
- 3 Richard JP, Melikov K, Vives E, Ramos C, Verbeure B, Gait MJ *et al.* Cell-penetrating peptides. A reevaluation of the mechanism of cellular uptake. *The Journal of biological chemistry* 2003; 278: 585-590.
- 4 Maiolo JR, Ferrer M, Ottinger EA. Effects of cargo molecules on the cellular uptake of arginine-rich cell-penetrating peptides. *Biochimica et biophysica acta* 2005; 1712: 161-172.
- 5 Guidotti G, Brambilla L, Rossi D. Cell-Penetrating Peptides: From Basic Research to Clinics. *Trends Pharmacol Sci* 2017; 38: 406-424.
- 6 Bechara C, Sagan S. Cell-penetrating peptides: 20 years later, where do we stand? *FEBS letters* 2013; 587: 1693-1702.
- 7 Johnson RM, Harrison SD, Maclean D. Therapeutic applications of cell-penetrating peptides. *Methods in molecular biology* 2011; 683: 535-551.
- 8 de la Fuente JM, Berry CC. Tat peptide as an efficient molecule to translocate gold nanoparticles into the cell nucleus. *Bioconjug Chem* 2005; 16: 1176-1180.
- 9 Zatsepin TS, Turner JJ, Oretskaya TS, Gait MJ. Conjugates of oligonucleotides and analogues with cell penetrating peptides as gene silencing agents. *Curr Pharm Des* 2005; 11: 3639-3654.
- 10 Liu H, Zeng F, Zhang M, Huang F, Wang J, Guo J *et al.* Emerging landscape of cell penetrating peptide in reprogramming and gene editing. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 2016; 226: 124-137.
- 11 Suresh B, Ramakrishna S, Kim H. Cell-Penetrating Peptide-Mediated Delivery of Cas9 Protein and Guide RNA for Genome Editing. *Methods in molecular biology* 2017; 1507: 81-94.
- 12 Bullok KE, Dyszlewski M, Prior JL, Pica CM, Sharma V, Piwnica-Worms D. Characterization of novel histidine-tagged Tat-peptide complexes dual-labeled with (99m)Tc-tricarbonyl and fluorescein for scintigraphy and fluorescence microscopy. *Bioconjug Chem* 2002; 13: 1226-1237.
- 13 Nguyen QT, Olson ES, Aguilera TA, Jiang T, Scadeng M, Ellies LG *et al.* Surgery with molecular fluorescence imaging using activatable cell-penetrating peptides decreases residual cancer and improves survival. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2010; 107: 4317-4322.
- 14 Olson ES, Jiang T, Aguilera TA, Nguyen QT, Ellies LG, Scadeng M *et al.* Activatable cell penetrating peptides linked to nanoparticles as dual probes for *in vivo* fluorescence and MR imaging of proteases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2010; 107: 4311-4316.
- 15 De Groot AS, Scott DW. Immunogenicity of protein therapeutics. *Trends Immunol* 2007; 28: 482-490.
- 16 Chauhan A, Tikoo A, Kapur AK, Singh M. The taming of the cell penetrating domain of the HIV Tat: myths and realities. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 2007; 117: 148-162.
- 17 Vucetic Z, Zhang Z, Zhao J, Wang F, Soprano KJ, Soprano DR. Acinus-S' represses retinoic acid receptor (RAR)-regulated gene expression through interaction with the B domains of RARs. *Molecular and cellular biology* 2008; 28: 2549-2558.
- 18 Rodor J, Pan Q, Blencowe BJ, Eyraas E, Caceres JF. The RNA-binding profile of Acinus, a peripheral component of the exon junction complex, reveals its role in splicing regulation. *RNA* 2016; 22: 1411-1426.
- 19 Tange TO, Shibuya T, Jurica MS, Moore MJ. Biochemical analysis of the EJC reveals two new factors and a stable tetrameric protein core. *RNA* 2005; 11: 1869-1883.
- 20 Joselin AP, Schulze-Osthoff K, Schwerk C. Loss of Acinus inhibits oligonucleosomal DNA fragmentation but not chromatin condensation during apoptosis. *The Journal of biological chemistry* 2006; 281: 12475-12484.
- 21 Rigou P, Piddubnyak V, Faye A, Rain JC, Michel L, Calvo F *et al.* The antiapoptotic protein AAC-11 interacts with and regulates Acinus-mediated DNA fragmentation. *The EMBO journal* 2009; 28: 1576-1588.
- 22 Schwerk C, Prasad J, Degenhardt K, Erdjument-Bromage H, White E, Tempst P *et al.* ASAP, a novel protein complex involved in RNA processing and apoptosis. *Molecular and cellular biology* 2003; 23: 2981-2990.
- 23 Gautam A, Chaudhary K, Kumar R, Sharma A, Kapoor P, Tyagi A *et al.* In silico approaches for designing highly effective cell penetrating peptides. *J Transl Med* 2013; 11: 74.

- 24 Futaki S. Membrane-permeable arginine-rich peptides and the translocation mechanisms. *Advanced drug delivery reviews* 2005; 57: 547-558.
- 25 Eiriksdottir E, Konate K, Langel U, Divita G, Deshayes S. Secondary structure of cell-penetrating peptides controls membrane interaction and insertion. *Biochimica et biophysica acta* 2010; 1798: 1119-1128.
- 26 Buchan DW, Minneci F, Nugent TC, Bryson K, Jones DT. Scalable web services for the PSIPRED Protein Analysis Workbench. *Nucleic acids research* 2013; 41: W349-357.
- 27 Roy A, Kucukural A, Zhang Y. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nat Protoc* 2010; 5: 725-738.
- 28 Jagot-Lacoussiere L, Kotula E, Villoutreix BO, Bruzzoni-Giovanelli H, Poyet JL. A Cell-Penetrating Peptide Targeting AAC-11 Specifically Induces Cancer Cells Death. *Cancer research* 2016; 76: 5479-5490.
- 29 Kohnken R, Fabbro S, Hastings J, Porcu P, Mishra A. Sezary Syndrome: Clinical and Biological Aspects. *Curr Hematol Malig Rep* 2016; 11: 468-479.
- 30 Park CB, Yi KS, Matsuzaki K, Kim MS, Kim SC. Structure-activity analysis of buforin II, a histone H2A-derived antimicrobial peptide: the proline hinge is responsible for the cell-penetrating ability of buforin II. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2000; 97: 8245-8250.
- 31 Krautwald S, Dewitz C, Fandrich F, Kunzendorf U. Inhibition of regulated cell death by cell-penetrating peptides. *Cell Mol Life Sci* 2016; 73: 2269-2284.
- 32 Pasquereau-Kotula E, Habault J, Kroemer G, Poyet JL. The anticancer peptide RT53 induces immunogenic cell death. *PLoS one* 2018; 13: e0201220.
- 33 Go M. Correlation of DNA exonic regions with protein structural units in haemoglobin. *Nature* 1981; 291: 90-92.
- 34 Tewari M, Yu M, Ross B, Dean C, Giordano A, Rubin R. AAC-11, a novel cDNA that inhibits apoptosis after growth factor withdrawal. *Cancer research* 1997; 57: 4063-4069.
- 35 Do TN, Rosal RV, Drew L, Raffo AJ, Michl J, Pincus MR *et al.* Preferential induction of necrosis in human breast cancer cells by a p53 peptide derived from the MDM2 binding site. *Oncogene* 2003; 22: 1431-1444.
- 36 Kanovsky M, Raffo A, Drew L, Rosal R, Do T, Friedman FK *et al.* Peptides from the amino terminal mdm-2-binding domain of p53, designed from conformational analysis, are selectively cytotoxic to transformed cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2001; 98: 12438-12443.
- 37 Sarafraz-Yazdi E, Bowne WB, Adler V, Sookraj KA, Wu V, Shteyler V *et al.* Anticancer peptide PNC-27 adopts an HDM-2-binding conformation and kills cancer cells by binding to HDM-2 in their membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2010; 107: 1918-1923.
- 38 Polyansky AA, Chugunov AO, Vassilevski AA, Grishin EV, Efremov RG. Recent advances in computational modeling of alpha-helical membrane-active peptides. *Current protein & peptide science* 2012; 13: 644-657.
- 39 Hughes CF, Khot A, McCormack C, Lade S, Westerman DA, Twigger R *et al.* Lack of durable disease control with chemotherapy for mycosis fungoides and Sezary syndrome: a comparative study of systemic therapy. *Blood* 2015; 125: 71-81.

DISCUSSION

I. Rappel du contexte

On estime à l'heure actuelle le fardeau mondial du cancer à 18,1 millions de nouveaux cas et 9,6 millions de décès par an. Un homme sur cinq et une femme sur six dans le monde développeront un cancer au cours de leur vie, et un homme sur huit et une femme sur onze meurent de cette maladie (données GLOBOCAN). Les chimiothérapies, bien qu'efficaces en début de traitement, ne sont généralement pas suffisantes pour permettre une rémission complète des patients, résultant souvent au développement de clones résistants et à des rechutes souvent fatales. De plus, elles sont accompagnées de nombreux effets indésirables (immunosuppression, toxicité vis-à-vis des organes sains). Il apparaît donc nécessaire de proposer de nouvelles options thérapeutiques aux patients, afin de permettre une meilleure prise en charge de la maladie et espérer vaincre ces statistiques alarmantes.

De nombreuses approches innovantes ont déjà fait leurs preuves. L'essor du séquençage à haut débit a permis la découverte de nouvelles cibles en cancérologie et la mise au point de thérapies ciblées. Ce sont par exemple des anticorps ou des petites molécules inhibitrices qui bloquent l'interaction entre un ligand et son récepteur et/ou la transduction d'un signal anti-apoptotique, pro-prolifératif ou pro-angiogénique. L'immunothérapie, qui a vu le jour grâce aux avancées phénoménales dans notre compréhension du système immunitaire, a changé le paradigme du traitement. Les résultats en clinique sont extrêmement prometteurs, mais les coûts de production de ce type de traitement sont très élevés, limitant leur utilisation. De plus, de par leur spécificité, ces thérapies ciblées sont généralement limitées à un type particulier de tumeur, caractérisé par un profil génétique donné, et tous les patients ne répondent pas. Il faut donc adopter une médecine personnalisée, basée sur un diagnostic fin, parfois complexe, et dont tous les patients ne satisfont malheureusement pas les critères. Très récemment, un groupe de chercheurs a mis en évidence une nouvelle famille de récepteurs au fonctionnement similaire à celui du HLA, mais ne variant pas dans la population. Cette découverte pourrait potentiellement révolutionner les immunothérapies basées sur les cellules T (type thérapie CAR-T), puisqu'elle leur permettrait, en théorie, de reconnaître la quasi-totalité des tumeurs (Crowther et al., 2020).

Les défis sont donc nombreux concernant le développement de nouveaux médicaments : ils doivent être efficaces, suffisamment spécifiques pour être non-toxiques mais aussi suffisamment universels pour être applicables à une majorité des cancers. Parmi les autres atouts recherchés, un faible coût de production, ainsi qu'un mode d'administration facile sont aussi importants.

L'équipe du Dr. Jean-Luc Poyet a pour ambition la mise au point de stratégies thérapeutiques novatrices, réunissant tous ces paramètres. Une approche possible, peu étudiée à l'heure actuelle, est de cibler non pas des oncogènes ou des gènes suppresseurs de tumeurs qui peuvent être mutés et/ou dont l'activité peut être contournée par des voies de signalisation parallèles, mais des protéines définies comme des « non-oncogènes addictifs » (NOA). Ces NOA sont des protéines codées par des gènes exprimés aussi bien dans les cellules normales que les cellules tumorales, mais leur activité n'est indispensable qu'aux cellules tumorales. L'idée est de cibler des réseaux d'interactions protéine-protéine (PPIs), intervenant dans des voies de signalisation nécessaires à la biologie des cellules cancéreuses, comme la survie ou la réponse au stress. Une telle approche

permet de répondre aussi bien aux critères d'universalité que de spécificité. Une protéine particulièrement intéressante est la protéine anti-apoptotique AAC-11, qui intervient à l'interface de la majorité des processus impliqués dans la tumorigénèse : l'apoptose, la différenciation, la migration et l'invasion tumorale, la réponse au stress, la résistance aux chimiothérapies et l'échappement au système immunitaire. Elle est également connue pour être surexprimée dans de nombreux cancers, et associée à un mauvais pronostic (Kim et al., 2000; Sasaki et al., 2001; Krejci, 2012). AAC-11 exerce son activité en interagissant avec de nombreux partenaires impliqués dans ces différents mécanismes, via un domaine d'interaction en hélice α de type LZ. Ainsi, des mutations dans ce domaine ou son inactivation inhibent les propriétés de survie d'AAC-11, ce qui en fait une cible thérapeutique potentielle (Tewari et al., 1997; Morris et al., 2006; Rigou et al., 2009; Noh et al., 2014; Jagot-Lacoussiere et al., 2016).

Afin de tester cette hypothèse, notre laboratoire a conçu toute une série de peptides pénétrants interférents appelés LZDPs, dérivés du domaine LZ d'AAC-11 fusionné en N-terminal à la séquence de la pénétratine (brevet N° PCT/EP2015/053307). Les peptides pénétrants tels que la pénétratine sont de courtes séquences d'acides aminés, capables de traverser les membranes cellulaires et de transporter un cargo de haut poids moléculaire à l'intérieur des cellules. Ils ont l'avantage d'être des molécules naturelles de petite taille, spécifiques, faciles à synthétiser et à optimiser. Nos peptides LZDPs, en mimant le domaine LZ d'AAC-11 entrent en compétition avec la protéine complète elle-même pour l'interaction avec ses partenaires. Ainsi, l'ajout dans une cellule d'un excès de peptides bloque efficacement l'activité d'AAC-11, en interférant avec les PPIs auxquelles elle prend habituellement part (Rigou et al., 2009; Jagot-Lacoussiere et al., 2016). En termes thérapeutiques, les peptides offrent plusieurs avantages par rapport aux petites molécules, qui constituent les médicaments traditionnels. Le premier avantage est que, représentant souvent la plus petite partie fonctionnelle d'une protéine, ils offrent une efficacité, une sélectivité et une spécificité incomparables par rapport aux petites molécules (Hummel, Reineke, et Reimer 2006). Un deuxième avantage est que les produits de dégradation des peptides sont des acides aminés, ce qui élimine grandement les risques de toxicité. Enfin, les peptides s'accumulent peu dans les tissus en raison de leur temps de demi-vie court, ce qui, il est vrai, peut aussi réduire leur durée d'action.

II. Effet anti-tumoral des peptides LZDPs dans le Syndrome de Sézary et les leucémies aigües

Avant mon arrivée au laboratoire, le potentiel thérapeutique d'un peptide nommé RT53, correspondant à la séquence du domaine LZ d'AAC-11 dans son intégralité (résidus 363-399), avait déjà été testé dans plusieurs modèles de cancers solides, à savoir le mélanome (Jagot-Lacoussiere et al., 2016) et le cancer du sein (données non publiées). D'après les résultats obtenus dans ces études, RT53 est capable d'éliminer spécifiquement les cellules tumorales *in vitro* sur des lignées cellulaires et *in vivo* dans des modèles murins de xénogreffe.

Le premier objectif de ma thèse était d'étendre ces résultats prometteurs à d'autres types de cancers, en particulier des cancers circulants. Nous avons choisi deux pathologies qui nous paraissaient particulièrement pertinentes : le SS et les leucémies aigües. En effet, il s'agit de cancers très agressifs et pour lesquels les options thérapeutiques sont limitées, facilitant la mise en œuvre d'un futur essai clinique. De plus, étant sur le site de

l'hôpital St Louis, nous disposons d'un accès privilégié à des prélèvements humains (biopsies de peau, échantillons de sang).

Les résultats obtenus au cours de ma thèse sont très encourageants concernant le potentiel thérapeutique des peptides LZDPs dans ces maladies. En effet, nous avons démontré que deux peptides, RT53 et une version plus courte RT39 (résidus 377-399), étaient capables d'induire la mort cellulaire spécifique des cellules tumorales *in vitro*, sur diverses lignées cellulaires (Sézary, LAM, LAL), *ex vivo* sur des prélèvements de sang de patients, et *in vivo* dans des modèles murins de ces pathologies. Il est à noter que cette activité anti-tumorale dépend bien de l'intégrité du domaine LZ d'AAC-11, puisque des versions mutées de ces deux peptides (RT53M et RT39M) au niveau d'acides aminés cruciaux (correspondant aux leucines 384 et 391 et arginine 382 d'AAC-11 respectivement), sont complètement inactives.

En particulier, dans le contexte des LAMs, des résultats préliminaires semblent indiquer que le peptide RT39 est capable de détruire efficacement et spécifiquement les cellules souches cancéreuses, un résultat remarquable, puisque ce sont ces cellules qui sont à l'origine des rechutes chez la plupart des patients. Chez la souris, selon le type de modèle (xénogreffe ou modèle syngénique), le traitement par les peptides LZDPs induit une réduction significative de la croissance tumorale, et/ou permet d'augmenter drastiquement la survie des souris. Nous envisageons maintenant d'évaluer l'efficacité des peptides, en combinaison avec d'autres types de thérapies. En effet, il a été montré dans le contexte du mélanome que le peptide RT53 peut potentialiser l'effet de certaines chimiothérapies (données non publiées).

Dans le SS, nous avons développé un nouveau modèle murin de la pathologie basé sur l'injection de PBMC de patients présentant une charge tumorale élevée (>80%) et de cytokines IL-2 et IL-7 pour favoriser la prise de la greffe. Nous décrivons pour la première fois un modèle reproduisant fidèlement les caractéristiques anatomopathologiques du SS, avec invasion des cellules néoplasiques dans le derme des souris greffées, et épaissement de l'épiderme dû à une prolifération incontrôlée des kératinocytes (dépôt de brevet N° EP 19 18 441). Grâce à ce nouveau modèle pré-clinique, nous avons pu réellement mettre en évidence l'impact thérapeutique potentiel des peptides : en effet, d'après nos expériences, même injecté par voie systémique (en intrapéritonéale), RT39 est capable d'infiltrer le derme des souris et d'y éliminer le clone tumoral, permettant un retour progressif à un aspect et une épaisseur normale de la peau. Il pourrait être envisagé de développer une version humanisée de ce modèle de souris (souris BLT ou « Bone marrow-Liver-Thymus ») (Smith et al., 2016), qui nous permettrait d'étudier les effets des peptides sur le système immunitaire, ainsi que de tester, par exemple, des combinaisons thérapeutiques (peptide en association avec une immunothérapie anti-KIR3DL2 notamment).

De manière intéressante, la toxicité des peptides LZDPs vis-à-vis des cellules et tissus normaux est quasiment nulle. Comme ce qui avait déjà été montré pour RT53 (Jagot-Lacoussière et al., 2016; Kotula et al., 2016), des études de toxicologie réalisées dans des souris immunocompétentes ont montré qu'un traitement à dose élevée (20 fois plus haute que la dose efficace) ou à dose répétée par RT39 n'induisait pas de toxicité visible dans les organes vitaux. De plus, le peptide est capable d'atteindre la plupart des organes, et s'accumule dans la tumeur, mais il ne semble pas capable de traverser la barrière hémato-encéphalique (données non publiées, pour RT39

dans le mélanome). Enfin, nos expériences suggèrent que RT39 n'est pas immunogénique et qu'il possède une excellente stabilité *in vivo* (il est toujours détectable dans le plasma 2h après l'injection).

III. Activité membranolytique des peptides LZDPs et découverte du rôle de PAK1

Le second objectif de ma thèse était d'étudier plus en détails le mécanisme d'action des peptides LZDPs, en particulier leur potentiel pro-nécrotique vis-à-vis des cellules tumorales.

Pour rappel, d'après les expériences réalisées dans les modèles de cancers solides, RT53 est un peptide membranolytique, c'est-à-dire capable d'induire une rupture de la membrane plasmique rapide des cellules tumorales, à dose moyenne (>5 μ M). La mort cellulaire induite est non-régulée, c'est-à-dire indépendante de l'activité de protéines effectrices majeures des voies de mort classiques apoptose, nécroptose et autophagie (caspases, RIPK1, PI-3K respectivement). Morphologiquement, les cellules traitées présentent toutes les caractéristiques d'une mort par nécrose, vraisemblablement liée d'une part à l'accumulation des peptides dans la membrane des cellules cancéreuses et d'autre part à un stress oxydatif. De manière remarquable, le peptide présente en effet une localisation membranaire uniquement dans le contexte des cellules transformées, observée en microscopie à fluorescence, et son activité cytotoxique est très spécifique de ces cellules.

Dans les modèles de cancers circulants que j'ai étudiés, le mécanisme d'action des peptides RT53 et RT39 semble similaire. Les différentes expériences concernant les voies de mort impliquées dans l'activité cytotoxique du peptide ainsi que les observations en microscopie électronique et en microscopie à fluorescence confirment ce qui avait déjà été mis en évidence dans les cancers solides. Les prédictions *in silico* indiquent que RT39 adopte une structure en hélice α , avec la formation possible d'une face aromatique/hydrophobe compatible avec une interaction membranaire, similaire à celle d'autres peptides membranolytiques connus (Papo and Shai, 2005). Il est à noter qu'un autre peptide disponible au laboratoire, RL37, dont la séquence est quasiment identique à celle de RT39 mais dont la conformation n'est pas α -hélicoïdale, ne possède pas les propriétés membranolytiques des peptides RT53 et RT39. Ce peptide agit uniquement au niveau des PPIs dans les cellules, indiquant l'importance de la structure secondaire des peptides pour orienter leur mode d'action.

Pour expliquer le mécanisme membranolytique des peptides LZDPs, nous avons émis l'hypothèse que ceux-ci s'accumulent localement au niveau de la membrane des cellules tumorales grâce à leur conformation α -hélicoïdale membrane-active et grâce à la présence d'un ou plusieurs partenaire(s) exprimé(s) ou relocalisé(s) spécifiquement à la membrane de ces cellules malignes. Cette accumulation locale provoquerait une perturbation de la membrane plasmique, menant à la formation de pores et à la perte du potentiel membranaire, résultant *in fine*, à la mort des cellules par nécrose.

Ce type de mécanisme d'action avait déjà été proposé pour d'autres peptides membrane-actifs tels que le peptide PNC-7, également en hélice α , constitué de la séquence de la pénétratine liée à une portion de la protéine p53 capable d'interagir avec la protéine HDM2 à la membrane des cellules tumorales (Sarafraz-Yazdi et al., 2010; Kanovsky et al., 2001; Do et al., 2003).

Concernant l'identité de ce ou de ces partenaire(s), nous avons quelques indices : (1) ce n'est pas AAC -11, puisque des expériences de silencing ont montré que l'activité des peptides étaient indépendante de son niveau

d'expression. (2) la ou les région(s) protéique(s) impliquée(s) dans l'interaction avec les peptides ne sont pas exposés à la surface des cellules, puisque la séquence de pénétration est nécessaire à leur activité membranolytique.

Pour rechercher ce(s) interacteur(s), encore inconnu(s), nous avons utilisé une approche par peptide pull-down, suivie d'une analyse en spectrométrie de masse. Grâce à ces expériences, nous avons pu identifier plus de 200 protéines associées à RT39 mais pas au peptide contrôle. Parmi ces protéines, nous avons recherché des protéines pouvant être membranaires, et pertinentes en cancérologie. Nous avons étudié plusieurs candidats intéressants, parmi lesquels la sérine/thréonine kinase PAK1.

Les protéines de la famille PAK sont classées en deux groupes : le groupe I (PAK1-3) et le groupe II (PAK4-6), sur la base de leurs similarités de structure et de fonctions (Kumar et al., 2006; Rane et Minden, 2014). PAK1 a été identifiée par le groupe de Manser en 1994, comme étant une cible des GTPases Cdc42 et Rac1 (Manser et al., 1994).

Depuis, plusieurs études ont mis en évidence un rôle central de PAK1 dans la tumorigénèse et la progression tumorale liées à une activation aberrante des voies de signalisation des récepteurs aux facteurs de croissance. Il a été montré que l'activation des récepteurs aux tyrosines-kinases médiée par les facteurs de croissances permettait le recrutement de la protéine PAK1 à la membrane plasmique, via l'association avec la protéine adaptatrice Nck, augmentant son activité kinase (Galisteo et al., 1996; Bokoch et al., 1996). De plus, PAK1 intervient dans la voie de signalisation de la protéine HER2 et contrôle la transformation et les capacités invasives des cellules de cancers du sein (Adam et al., 1998; Arias-Romero et al., 2010).

PAK1 joue également un rôle dans le remodelage du cytosquelette. Ainsi, plusieurs études ont montré que PAK1 régule la dissolution des fibres de stress et la réorganisation des complexes focaux, ainsi que la structure du cytosquelette d'actine (Manser et al., 1994; Sells et Chernoff, 1997). PAK1 agit en phosphorylant des substrats qui agissent directement sur le cytosquelette, comme le complexe Arp2/3, la LIM-kinase qui se lie à l'actine F, la filamine A ainsi que la stathmine et le cofacteur B de la tubuline, des protéines déstabilisatrices des microtubules (Vadlamudi et al., 2004; Edwards et al., 1999; Vadlamudi et al., 2002; Daub et al., 2001; Vadlamudi et al., 2005). Ces découvertes suggèrent que PAK1 est une protéine effectrice pour la motilité cellulaire induite par Cdc42 et Rac1. De plus, il a été montré dans de nombreux modèles de cancers que PAK1 augmente la migration cellulaire et la formation de métastases (Kumar et al., 2006).

Enfin, PAK1 est impliquée dans la transformation et la survie des cellules tumorales via la voie de signalisation RAS-AKT (Tang et al., 1997; Tang et al., 2000; Schürmann et al., 2000). AKT stimule PAK1 via un mécanisme GTPase-indépendant puis PAK1 phosphoryle l'agoniste de mort BAD, ce qui protège les cellules de l'apoptose. PAK1 est aussi capable de promouvoir la survie cellulaire via la voie de signalisation NFκB (Frost et al., 2000). En 2006, Wang et al. montrent pour la première fois, grâce à un modèle de souris transgénique, que la dérégulation de PAK1 est suffisante pour induire la formation de tumeurs dans les glandes mammaires (Wang et al., 2006). De même, les agents thérapeutiques qui agissent sur les signaux de survie médiés par PAK1 permettent une amélioration de l'efficacité de certaines chimiothérapies (Deacon et al., 2003).

En plus de tous ces éléments qui font de PAK1 une protéine candidate idéale, des travaux récents ont montré qu'elle était un marqueur de cellules tumorales et une cible thérapeutique potentielle dans des contextes qui

nous intéressent particulièrement, à savoir les LAMs et le SS. Ainsi, dans les CTCL, PAK1 est surexprimée, et sa dérégulation induit l'apoptose des cellules et une inhibition de la croissance cellulaire en stimulant l'expression de PUMA et p21 (Wang et al., 2018). Dans les LAMs, l'expression de PAK1 est associée à un mauvais pronostic (Pandolfi et al., 2015). De plus, il a été montré que PAK1 agit en aval de la protéine HLX, surexprimée dans les progéniteurs leucémiques, et que l'inhibition de PAK1 induit une différenciation et l'apoptose des cellules AML (Kawahara et al., 2012).

Afin d'étudier le rôle de PAK1 dans l'activité membranolytique du peptide, nous avons réalisé plusieurs expériences, dans un premier temps dans le contexte du SS. D'après nos résultats, PAK1 est surexprimée et constitutivement active dans les cellules de Sézary. La forme active étant recrutée à la membrane (Lei et al., 2000, Bokoch, 2003), nous décrivons pour la première fois une localisation membranaire de PAK1 dans les cellules tumorales. RT39 interagit directement avec PAK1 *in vitro*. De plus, RT39 et la forme active de PAK1 co-localisent au niveau de la membrane plasmique des cellules tumorales. La dérégulation de PAK1 bloque l'effet membranolytique de RT39, tandis que sa surexpression au niveau membranaire favorise l'activité cytotoxique du peptide. Il est à noter que l'activité kinase de PAK1 n'est pas nécessaire à l'effet cytotoxique de RT39. Ces expériences restent à reproduire dans le contexte des LAMs, où nous avons d'ores et déjà montré que la sensibilité des lignées cellulaires leucémiques au peptide est directement corrélée au niveau d'expression de PAK1 à la membrane plasmique.

Toutes ces observations nous permettent, pour la première fois, de proposer un mécanisme d'action expliquant les propriétés membranolytiques du peptide. Pour valider définitivement notre modèle, il serait nécessaire de déterminer la structure tri-dimensionnelle du complexe PAK1-RT39 au niveau de la membrane plasmique, afin de vérifier si le peptide conserve sa structure membrane-active dans ces conditions.

Beaucoup de travail reste encore à accomplir. Par exemple, il est connu que l'activation de PAK1 s'accompagne de cascades de phosphorylation catalysées par des molécules de signalisation telles que PDK1, AKT ou encore PAK1 elle-même (Bokoch, 2003, Li et al. 2009). Nous ne savons pas, à l'heure actuelle, si l'interaction PAK-peptide est « silencieuse » en termes de signalisation intracellulaire, ou bien si elle a un impact sur les événements moléculaires sous-jacents.

Dans nos expériences, nous avons pu mettre en évidence l'interaction de PAK1 avec AAC-11 au niveau endogène, et nous avons montré que RT39 est capable de bloquer cette interaction à dose sub-létale. Il serait intéressant de savoir quels sont la signification biologique et le mécanisme menant à une expression et une aberrance de PAK1 dans les cellules de Sézary, ainsi que le rôle biologique de l'interaction PAK1-AAC-11 identifiée. Puisque les cellules de Sézary peuvent s'accumuler dans les ganglions lymphatiques et que PAK1 est connu pour promouvoir la migration des cellules T CD4+ via l'expression de marqueurs de localisation ganglionnaire CCR7 et L-sélectine (Dios-Esponera et al., 2019), il n'est en effet pas impossible que PAK1 joue un rôle important dans l'apparition et la progression de la maladie. Déterminer le rôle biologique de l'interaction PAK1-AAC-11 permettra, peut-être, de mieux comprendre la pathogénèse du Sézary et d'autres cancers. De la même façon, il est connu qu'AAC-11, tout comme PAK1, joue un rôle dans la capacité des cellules transformées à migrer et à former des métastases

(Cho et al., 2014 ; Song et al., 2015). Il se peut que ces deux protéines agissent dans le même réseau de signalisation, passant par la voie Erk.

Il est important de préciser que nous pensons que, même si PAK1 semble jouer un rôle très important, voire indispensable à l'activité du peptide, d'autres partenaire(s) protéiques ainsi que d'autres facteurs comme la composition glucido-lipidique et les propriétés physicochimiques des membranes des cellules cancéreuses et le microenvironnement tumoral peuvent également être impliqués dans l'affinité particulière des peptides LZDPs vis-à-vis des membranes des cellules cancéreuses. Par exemple, il est connu que les cellules de Sézary surexpriment la protéine syndécan-4, un récepteur pour les peptides pénétrants riches en arginines (Kawaguchi et al., 2016; Chung et al., 2011). De plus, d'autres protéines identifiées grâce aux expériences de peptide pull-down, tout aussi intéressantes que PAK1, devront être étudiées plus en détails. Enfin, nous n'avons pas encore validé l'universalité de notre modèle, bien que PAK1 soit une protéine candidate pertinente dans de nombreux contextes, y compris le mélanome métastatique.

Pour finir, nous savons que les peptides LZDPs induisent un autre type de mort cellulaire due à l'inhibition de l'interaction d'AAC-11 avec ses partenaires, rendant les cellules plus sensibles à la mort induite par le stress. Les cellules cancéreuses, en particulier les cellules souches tumorales, se trouvent toujours dans des conditions de stress importantes, notamment de stress oxydatif (Cairns et al., 2011 ; Kobayashi and Suda, 2012). Il est connu qu'AAC-11 interagit avec OXSR1, PRKAB1 et STK39, trois protéines jouant un rôle dans la réponse au stress cellulaire (respectivement le stress environnemental, le stress métabolique et le stress hypotonique). Il sera intéressant d'étudier le rôle précis de ces interactions et l'effet des peptides sur celles-ci. En particulier, nous ne sommes à l'heure actuelle pas en mesure de décrire précisément le mécanisme d'action du peptide *in vivo*. Bien que nous observions une augmentation de la nécrose des cellules dans les tumeurs solides traitées par les peptides, il se peut qu'il s'agisse d'un effet secondaire au traitement (diminution de l'angiogénèse par exemple). Il n'est pas à exclure que la concentration locale en peptide dans les tumeurs soit trop faible pour qu'ils exercent leur activité membranolytique, et que les effets observés soient plutôt le résultat d'une inhibition des PPIs impliquant AAC-11.

III. Mort cellulaire immunogène induite par les peptides LZDPs et effets sur le système immunitaire

La seconde partie de mon travail portant sur le mécanisme d'action des peptides LZDPs concerne leurs propriétés immunologiques. Il est connu que certains peptides oncolytiques, comme le peptide LTX-315 possèdent de telles propriétés. Ainsi, il a été montré que le peptide LTX-315 induit une nécrose des cellules tumorales, qui présentent toutes les caractéristiques d'une MCI. Ces cellules peuvent être utilisées en tant que vaccin dans des modèles de souris pré-cliniques immunocompétents (Camilio et al., 2014; Zhou et al., 2015; Forveille et al., 2015; Yamazaki et al., 2016; Zhou et al., 2016; Yamazaki et al., 2016). Ces données suggèrent que les cellules nécrotiques, tout comme les cellules apoptotiques, peuvent induire une MCI spécifique et efficace.

Pour rappel, des résultats préliminaires obtenus dans le contexte du mélanome indiquaient que la mort cellulaire induite par le peptide RT53 était caractérisée par le relargage de DAMPs, et que les cellules mourantes pouvaient

être utilisées en tant que vaccin prophylactique dans un modèle murin de xéno greffe de cellules de mélanome (Jagot-Lacoussiere et al. 2016). Ces données nous ont encouragé à poursuivre ces travaux, et nous avons ensuite cherché à savoir si RT53 pouvait induire une véritable MCI.

Nous avons montré que RT53 est effectivement capable d'induire tous les marqueurs d'une MCI : exposition de la CRT à la surface des cellules et relargage de LDH, HMGB1 et ATP. Dans un modèle de vaccination prophylactique, des cellules de fibrosarcome traitées *in vitro* par le peptide protègent les souris contre la croissance de tumeurs de fibrosarcome au niveau du site d'injection. De plus, l'injection intratumorale de RT53 dans des cancers établis induit une régression des tumeurs, accompagnée d'une infiltration de cellules T CD3+, et la mise en place d'une réponse inflammatoire (augmentation transitoire des niveaux de cytokines IL-1 β et IL-6, présence de ligands de chimiokines pro-inflammatoires CCL2 et CXCL10 dans les tumeurs) (Pasquereau-Kotula, Habault et al., 2018). Ces observations suggèrent que l'effet oncolytique direct de RT53 favorise l'activation systémique du système immunitaire et la mise en place d'un microenvironnement tumoral immunogénique, qui entraîne l'infiltration des lymphocytes.

L'infiltration des cellules immunitaires dans les tumeurs est gouvernée par la chimiotaxie, avec un réseau local de chimiokines qui influence le nombre et le type de lymphocytes recrutés (Balkwill, 2004). En particulier, les chimiokines CCL2, CCL3, CCL4, CXCL9 et CXCL10 sont connues pour être de bons chimio-attractants pour les cellules T (Harlin et al., 2009), et l'augmentation de l'expression de ces chimiokines est associée à l'infiltration de cellules T spécifiques des tumeurs chez les patients atteints de cancers et dans des modèles murins de cancers variés (Gough et al., 2005; Lida et al., 2010; González-Martín et al., 2011; Hong et al., 2011; Peng et al., 2012; Lança et al., 2013). De nombreux types cellulaires retrouvés dans le microenvironnement tumoral peuvent être impliqués dans la sécrétion de chimiokines spécifiques, notamment les cellules tumorales elles-mêmes, les macrophages, les cellules endothéliales ou encore des cellules T recrutées.

Nous avons ensuite étudié les propriétés immunologiques de RT53 dans le contexte des LAP, grâce à un modèle pré-clinique de transplantation de blastes leucémiques murins, dans des souris immunocompétentes. Nous avons démontré qu'il était possible de protéger les souris contre l'induction de la maladie, grâce à un vaccin consistant en une injection unique de blasts murins leucémiques exposés au peptide *in vitro* et présentant les caractéristiques d'une MCI. Ce vaccin (dépôt de brevet n°EP 19 435) protège les souris contre le développement de la maladie, que ce soit en traitement prophylactique ou en traitement thérapeutique. La protection générée est très spécifique, puisque seules les cellules LAP murines protègent contre l'induction de la maladie. Elle est également long-terme puisque les souris sont protégées contre plusieurs challenges de cellules tumorales.

D'après nos expériences, cette protection dépend majoritairement de la présence de lymphocytes T CD4+, car les souris déplétées ne sont quasiment plus protégées. Cela peut s'expliquer par le rôle crucial des cellules T CD4+ dans la mise en place de la mémoire immunitaire (Luckheeram et al., 2012), et suggère que le vaccin induit une réponse innée, impliquant des macrophages et des cellules NK qui peuvent être activées par les cellules T CD4+. Une activité cytotoxique des cellules T CD4+ est également envisageable (Quezada et al., 2010; Fu et al., 2013; Sharma et al., 2013). Nos résultats indiquent que les cellules T CD8+ jouent également un rôle dans la

réponse immunitaire induite, puisque la déplétion des deux populations (CD4+ et CD8+) provoque une perte totale de la protection. Il serait maintenant intéressant d'étudier plus en détails les populations de cellules T impliquées dans la réponse immunitaire générée, les autres populations de cellules immunitaires, ainsi que la réponse inflammatoire globale induite (cytokines, chimiokines).

Il est à noter qu'une nécrose accidentelle de cellules tumorales par congélation-décongélation ou ébullition n'est en théorie pas capable d'induire une réponse immunitaire efficace *in vivo* (Casares et al., 2005; Obeid et al., 2007; Apetoh et al., 2007; Kroemer et al., 2013; Vacchelli et al., 2014;). Cela suggère que nos résultats, comme ceux obtenus pour le peptide LTX-315, ne sont pas simplement la conséquence du relargage des composés intracellulaires dans le milieu, mais bien celle d'un mécanisme beaucoup plus régulé.

Une étude récente a mis en évidence un rôle nouveau de la protéine AAC-11 dans la réponse immunitaire. Il semble qu'AAC-11 soit capable de favoriser l'activation et la maturation des CD8 et d'activer la voie NFκB en stimulant la voie de signalisation du TLR4 (Kim et al., 2018). Les auteurs montrent qu'une vaccination avec des CD8 traitées par AAC-11 et stimulées avec les peptides antigéniques OVA, E7 ou AH1-A5 mène à la formation de cellules T CD8+ et de cellules T mémoires spécifiques, associée à une protection long-terme contre la formation des tumeurs associées chez la souris. D'après ces travaux, c'est la région LZ d'AAC-11 qui est responsable de cette activité, ce qui laisse supposer que nos peptides LZDPs pourraient eux-aussi posséder un effet adjuvant.

Dans nos conditions expérimentales, le vaccin est constitué des cellules lysées mais également des peptides qui ont servi à la lyse. A la lumière des résultats obtenus par Kim et al (2018)., il se peut donc que le fort effet protecteur observé dans nos expériences ne soit pas le seul fait des cellules lysées, mais qu'il soit également dû à un effet adjuvant directement provoqué par le peptide. Pour le savoir, nous envisageons de tester de nouvelles conditions expérimentales : (1) solution de cellules tumorales lysées par congélation-décongélation ou par sonication (qui doivent, en principe, être non-immunogènes) complétement ou non avec le peptide (2) solution de cellules tumorales lysées par le peptide sous formes biotinylée puis décomplémentées du peptide par utilisation de billes d'agarose liées à streptavidine.

De manière intéressante, nous avons construit un nouveau LZDP, appelé RL29, possédant les propriétés membranolytiques de RT53 et RT39 mais pas leurs propriétés immunologiques. Cette observation, si elle se confirme, devrait nous permettre d'identifier plus précisément la séquence d'AAC-11 impliquée dans son effet sur le système immunitaire puisque RL29 est basé sur une forme tronquée de 10 résidus de RT39.

Pour conclure, bien que les mécanismes moléculaires précis impliqués dans la réponse immunitaire induite par le peptide restent à élucider, l'ensemble de ces résultats est extrêmement encourageant, pour la mise au point d'une future immunothérapie. Même s'il serait intéressant de le mettre en évidence, cette approche possède l'avantage qu'il n'y a pas besoin d'identifier l'antigène tumoral reconnu par les cellules T pour que la protection fonctionne. De plus, les blasts leucémiques peuvent être facilement obtenus à partir du sang ou de la moëlle osseuse de patients au moment du diagnostic, générant des quantités de matériel suffisantes pour un usage clinique. Étant donné que la protection induite par le vaccin est efficace même en utilisation thérapeutique, cette stratégie pourrait être réellement applicable chez les patients, notamment pour anticiper le risque de rechutes.

IV. Optimisation des peptides LZDPs

La dernière partie de mon travail se concentrait sur l'optimisation des peptides LZDPs. Cette optimisation peut concerner soit la partie active des peptides, à savoir la portion du domaine LZ d'AAC-11 ; soit la séquence de pénétration. Elle a pour objectif d'améliorer l'activité, la biodistribution, la stabilité, la solubilité ainsi que les coûts de production des peptides, dans l'espoir d'un futur développement clinique.

Concernant la séquence active du peptide, beaucoup de travail a déjà été effectué. Ainsi, nos résultats ont montré que le peptide RT39, qui correspond à l'exon 10 de la protéine AAC-11 (résidus 377-399) est suffisante pour maintenir les propriétés anti-tumorales du peptide RT53 (exons 9 et 10, résidus 363-399). Ces deux peptides présentent une structure secondaire α -hélicoïdale avec 3 pas d'hélices et quelques résidus en N-Ter et C-Ter de celles-ci. Cette structure semble essentielle pour les propriétés antitumorales des peptides. Ces peptides sont aussi modifiés chimiquement en N-Ter (acétylation) et en C-Ter (amidation), ce qui leur confère une meilleure stabilité vis-à-vis des endopeptidases sériques et facilite leur repliement en hélice. En termes d'activité anti-tumorale, RT53 et RT39 possèdent une activité membranolytique à dose intermédiaire (de l'ordre de 5 μ M), dont le mécanisme semble similaire (interaction avec la protéine PAK1 membranaire notamment). Ils sont aussi capables d'inhiber les PPIs impliquant AAC-11.

De façon intéressante, nous avons remarqué que l'activité membranolytique des peptides est augmentée lorsque les cellules sont incubées en absence de sérum. Cela pourrait s'expliquer par la présence de l'albumine dans le sérum, pour laquelle les CPPs présentent une certaine affinité (Ignatovich et al., 2003). En interagissant avec l'albumine, la concentration effective du peptide diminue. Il se peut que cela soit avantageux *in vivo* : cette interaction peut permettre, par exemple, une meilleure distribution dans la circulation sanguine, une plus grande stabilité vis-à-vis des endopeptidases sériques et un relargage plus lent du peptide.

D'autres peptides, RL37 (résidus 371-391) et RL29 (résidus 379-391), que j'ai évoqué succinctement sont actuellement en cours d'évaluation. Ils sont encore plus courts que RT39 (de 2 et de 10 résidus respectivement). L'hélice α du peptide RL37 est coupée, et ce peptide présente donc des propriétés différentes de celles des peptides membranolytiques : il agit plus efficacement sur les PPIs, notamment sur les capacités d'invasion et de migration des cellules tumorales (données non publiées dans le contexte du mélanome). RL29 semble avoir une activité intermédiaire : à la fois une activité membranolytique mais également un effet important sur les PPIs. Cependant, il ne semble pas posséder d'effet protecteur dans les expériences de vaccination. Il sera maintenant important de déterminer le meilleur peptide ou la meilleure combinaison de peptides en fonction du contexte thérapeutique (cancer solide ou circulant par exemple).

De nombreuses optimisations sont encore envisageables, en modifiant la séquence du motif LZ par exemple en remplaçant des résidus sensibles aux endoprotéases afin d'améliorer sa stabilité ou encore par des modifications chimiques permettant d'augmenter sa solubilité. Ainsi, un analogue dit « rétro-inverso », de RT53, a été construit. Ce dernier est obtenu en inversant à la fois la chiralité de chaque carbone C α H et la direction de la propagation de la chaîne peptidique. Les extrémités de ce peptide ont aussi été bloquées par une amide C-terminale et par

acétylation de l'extrémité N-terminale. Les analogues rétro-inverso possèdent souvent la même topologie que les peptides dont ils sont dérivés, mais ils présentent généralement une stabilité vis-à-vis des protéases largement supérieure (Fletcher et Campbell, 1998). De façon intéressante, l'analogue rétro-inverso de RT53 semble posséder les mêmes propriétés cytotoxiques vis-à-vis des cellules tumorales que le peptide parental (données non publiées).

Il est aussi possible d'optimiser la séquence de pénétration des peptides LZDPs. Par exemple, il serait envisageable d'améliorer la spécificité des peptides vis-à-vis des cellules tumorales en remplaçant la pénétratine par un autre CPP plus spécifique des cellules transformées, ou en rajoutant des motifs ciblant ces dernières (**Annexe I**, [Habault et Poyet, 2019](#)).

Grâce à l'étude de la protéine AAC-11 et de ces partenaires, nous avons identifié, au sein de la protéine Acinus un motif de pénétration ressemblant à une séquence de type CPP (riche en acides aminés positifs). Nous avons démontré que cette séquence, nommée hAP10, ainsi qu'un dérivé hAP10DR (mutation d'un acide aspartique en arginine) sont bel et bien des CPPs, capables de transporter des cargos bioactifs dans les cellules (dépôt de brevet n°19 315 060.4). Cette découverte est intéressante aussi bien d'un point de vue fondamental (les CPPs sont des outils biologiques utilisés dans un nombre croissant d'applications) que d'un point de vue thérapeutique. En effet, ces nouveaux CPPs, RT33 et RT33DR, conjugués à la séquence active d'AAC-11 correspondant à RT39 (résidus 377-399), conservent les propriétés anti-tumorales du peptide original dans le contexte du SS. Reste à confirmer que le profil toxicologique et pharmacocinétique de ces peptides seconde génération est compatible avec un développement thérapeutique. Si tel est le cas, nous pourrions imaginer concevoir des peptides de plus en plus courts. Par exemple en combinant la séquence de hAP10 à la séquence active de RL29 (résidus 379-391), nous obtiendrions un peptide thérapeutique de seulement 21 acides aminés.

Enfin, nous avons prévu de synthétiser des petites molécules mimant l'effet des peptides LZDPs sur l'interaction entre AAC-11 et ses partenaires, en collaboration avec l'équipe du Dr. O. Villoutreix. Il faudra pour cela identifier les « hot spots » de la zone d'interaction ciblée par le peptide. Ces petites molécules seront criblées *in silico*, puis validées *in vitro* sur leur capacité à bloquer des interactions connues, à l'aide d'approches basées sur le FRET. L'avantage de ce type de petites molécules, et qu'elles seront potentiellement plus stables que les peptides. Cependant, il faut qu'elles soient suffisamment efficaces en termes d'inhibition des PPIs, afin de compenser la perte de l'activité membranolytique.

CONCLUSION

Les CPPs sont une classe émergente d'agents thérapeutiques, caractérisés par leur capacité à délivrer des cargos de haut poids moléculaire dans les cellules. Malgré leurs nombreux avantages (toxicité négligeable, faible coût de synthèse), à l'heure actuelle, aucune thérapie basée sur l'utilisation des CPPs n'a été approuvée par la FDA. En cause, plusieurs obstacles liés à la nature des CPPs, comme la voie d'administration (la route orale reste la meilleure option pour les industries pharmaceutiques), la stabilité *in vivo* et l'internalisation cellulaire aspécifique.

De nombreux laboratoires travaillent à l'amélioration de ces paramètres. Ainsi, l'introduction de modifications chimiques et/ou structurelles ainsi que des stratégies dites de « shielding » permettent de lutter contre une dégradation trop rapide. Concernant la spécificité, de grandes avancées ont également été faites, avec le développement de CPPs internalisés uniquement par les cellules tumorales (internalisation spécifique) ou de peptides agissant uniquement dans les cellules tumorales (activité spécifique). Concernant l'internalisation spécifique, elle peut être liée à la séquence du CPP lui-même (« tumor-homing CPP ») ou à la conjugaison avec une autre molécule ayant une affinité particulière pour les cellules tumorales. Ces différentes stratégies sont détaillées dans la revue présentée en **Annexe I** (Habault et Poyet, 2019).

Dans la perspective d'un développement clinique, de nombreux facteurs doivent être pris en compte : le coût, la facilité de synthèse, l'élimination et l'immunogénicité, entre autres. Si l'on compare les différentes stratégies permettant l'amélioration de la spécificité des CPPs, les CPPs de type « tumor-homing » sont les plus prometteurs : ils sont courts et rapidement éliminés, avec une toxicité négligeable. Ils sont moins chers à produire que les conjugués CPP-anticorps. De plus, il est connu que l'addition de molécules complexes, comme des anticorps, des liposomes, des nanoparticules ou des biopolymères peut accroître les risques d'immunogénicité. De la même façon, on peut comparer les différents types de cargos : agent chimiothérapeutique, acide nucléique (thérapie génique), protéine ou un peptide. Bien que coupler une molécule chimiothérapeutique à un CPP spécifique des cellules tumorales soit avantageux, les risques d'effets secondaires ainsi que de développement de résistances liés aux chimiothérapies restent considérables. Pour ce qui est de la thérapie génique, bien qu'elle soit extrêmement efficace dans le cas de désordres génétiques monogéniques, elle apparaît beaucoup plus difficile à appliquer dans le cancer, puisque les anomalies sont polygéniques, et que les populations de cellules tumorales sont extrêmement hétérogènes. A l'inverse, cibler des PPIs avec des conjugués CPP-protéine permet d'interférer avec différentes voies de signalisation communes à toutes les tumeurs, avec un risque faible de développement de résistances. Stimuler le système immunitaire avec des peptides présentant des propriétés vaccinales semble également être une approche très intéressante, cette technologie permettant aux cellules du système immunitaire de reconnaître des antigènes tumoraux de façon plus efficace, et d'attaquer spécifiquement les cellules tumorales.

Prenant ces éléments en compte, nous avons développé tout un panel de peptides thérapeutiques de type CPP-peptide. Ceux-ci présentent des propriétés anti-tumorales variées dans chacun des modèles de cancers que nous

avons testés. Ils sont extrêmement spécifiques des cellules cancéreuses, puisqu'ils ciblent les PPIs impliquées dans l'activité de la protéine AAC-11, un facteur de survie et de réponse au stress nécessaire à la biologie des cellules cancéreuses mais pas des cellules saines. De plus, ces peptides possèdent une activité membranolytique spécifique des cellules malignes qui passe, au moins en partie, par l'interaction des peptides avec la protéine PAK1 au niveau de la membrane des cellules tumorales. *In vivo*, ils ne sont ni toxiques, ni immunogéniques. Ils sont courts et relativement stables, bien que nous envisagions quelques optimisations. Enfin, nos peptides possèdent des propriétés vaccinales protectrices très intéressantes, permettant de considérer la mise au point d'une immunothérapie.

Il semble donc que nos peptides répondent aux différents critères favorables à un développement thérapeutique. Nous avons maintenant pour objectif d'identifier le peptide le plus efficace pour chacune des pathologies, et de débiter, en collaboration avec les équipes médicales de l'hôpital St Louis, un premier essai clinique de phase I, dans le contexte du SS et des leucémies aigües.

Étant donné l'universalité des voies ciblées, notamment la réponse au stress, nous avons engagé des collaborations avec des équipes travaillant sur d'autres maladies non-cancéreuses, comme le sida et la malaria. Les résultats préliminaires indiquent un potentiel effet thérapeutique des peptides LZDPs dans ces pathologies, ce qui nous encourage à poursuivre ces travaux.

RÉFÉRENCES

- Adam, L., R. Vadlamudi, S. B. Kondapaka, J. Chernoff, J. Mendelsohn, et R. Kumar. 1998. « Heregulin Regulates Cytoskeletal Reorganization and Cell Migration through the P21-Activated Kinase-1 via Phosphatidylinositol-3 Kinase ». *The Journal of Biological Chemistry* 273 (43): 28238-46. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.43.28238>.
- Adams, Peter D., Heinrich Jasper, et K. Lenhard Rudolph. 2015. « Aging-Induced Stem Cell Mutations as Drivers for Disease and Cancer ». *Cell Stem Cell* 16 (6): 601-12. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2015.05.002>.
- Ahel, Dragana, Zuzana Horejsí, Nicola Wiechens, Sophie E. Polo, Elisa Garcia-Wilson, Ivan Ahel, Helen Flynn, et al. 2009. « Poly(ADP-Ribose)-Dependent Regulation of DNA Repair by the Chromatin Remodeling Enzyme ALC1 ». *Science (New York, N.Y.)* 325 (5945): 1240-43. <https://doi.org/10.1126/science.1177321>.
- Ali, Niwa, Barry Flutter, Robert Sanchez Rodriguez, Ehsan Sharif-Paghaleh, Linda D. Barber, Giovanna Lombardi, et Frank O. Nestle. 2012. « Xenogeneic Graft-versus-Host-Disease in NOD-Scid IL-2R γ null Mice Display a T-Effector Memory Phenotype ». Édité par Cheryl A. Stoddart. *PLoS ONE* 7 (8): e44219. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044219>.
- Allen, Lucy, David H. Dockrell, Theresa Pattery, Daniel G. Lee, Pierre Cornelis, Paul G. Hellewell, et Moira K. B. Whyte. 2005. « Pyocyanin Production by *Pseudomonas Aeruginosa* Induces Neutrophil Apoptosis and Impairs Neutrophil-Mediated Host Defenses in Vivo ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 174 (6): 3643-49. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.6.3643>.
- Allolio, Christoph, Aniket Magarkar, Piotr Jurkiewicz, Katarína Baxová, Matti Javanainen, Philip E. Mason, Radek Šachl, et al. 2018. « Arginine-Rich Cell-Penetrating Peptides Induce Membrane Multilamellarity and Subsequently Enter via Formation of a Fusion Pore ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 115 (47): 11923-28. <https://doi.org/10.1073/pnas.1811520115>.
- Amadori, Sergio, Stefan Suciu, Dominik Selleslag, Franco Aversa, Gianluca Gaidano, Maurizio Musso, Luciana Annino, et al. 2016. « Gemtuzumab Ozogamicin Versus Best Supportive Care in Older Patients With Newly Diagnosed Acute Myeloid Leukemia Unsuitable for Intensive Chemotherapy: Results of the Randomized Phase III EORTC-GIMEMA AML-19 Trial ». *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 34 (9): 972-79. <https://doi.org/10.1200/JCO.2015.64.0060>.
- Amaravadi, Ravi, Alec C. Kimmelman, et Eileen White. 2016. « Recent Insights into the Function of Autophagy in Cancer ». *Genes & Development* 30 (17): 1913-30. <https://doi.org/10.1101/gad.287524.116>.
- Andersson, Anna K., Jing Ma, Jianmin Wang, Xiang Chen, Amanda Larson Gedman, Jinjun Dang, Joy Nakitandwe, et al. 2015. « The Landscape of Somatic Mutations in Infant MLL-Rearranged Acute Lymphoblastic Leukemias ». *Nature Genetics* 47 (4): 330-37. <https://doi.org/10.1038/ng.3230>.
- Antoniou, Aline, Aline Hébrant, Genevieve Dom, Jacques Dumont, et Carine Maenhaut. 2013. « Cancer Stem Cells, a Fuzzy Evolving Concept: A Cell Population or a Cell Property? » *Cell Cycle* 12 (24): 3743-48. <https://doi.org/10.4161/cc.27305>.
- Apetoh, Lionel, François Ghiringhelli, Antoine Tesniere, Michel Obeid, Carla Ortiz, Alfredo Criollo, Grégoire Mignot, et al. 2007. « Toll-like Receptor 4-Dependent Contribution of the Immune System to Anticancer Chemotherapy and Radiotherapy ». *Nature Medicine* 13 (9): 1050-59. <https://doi.org/10.1038/nm1622>.
- Arias-Romero, Luis E., Olga Villamar-Cruz, Almudena Pacheco, Rachelle Kosoff, Min Huang, Senthil K. Muthuswamy, et Jonathan Chernoff. 2010. « A Rac-Pak signaling pathway is essential for ErbB2-mediated transformation of human breast epithelial cancer cells ». *Oncogene* 29 (43): 5839-49. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.318>.
- Arnaud, E., C. Touriol, C. Boutonnet, M. C. Gensac, S. Vagner, H. Prats, et A. C. Prats. 1999. « A New 34-Kilodalton Isoform of Human Fibroblast Growth Factor 2 Is Cap Dependently Synthesized by Using a Non-AUG Start Codon and Behaves as a Survival Factor ». *Molecular and Cellular Biology* 19 (1): 505-14. <https://doi.org/10.1128/mcb.19.1.505>.
- Askmyr, Maria, Helena Ågerstam, Nils Hansen, Sandra Gordon, Alexandros Arvanitakis, Marianne Rissler, Gunnar Juliusson, Johan Richter, Marcus Järås, et Thoas Fioretos. 2013. « Selective Killing of Candidate AML Stem

- Cells by Antibody Targeting of IL1RAP ». *Blood* 121 (18): 3709-13. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-09-458935>.
- Atlasi, Yaser, Leendert Looijenga, et Riccardo Fodde. 2014. « Cancer Stem Cells, Pluripotency, and Cellular Heterogeneity: A WNTer Perspective ». *Current Topics in Developmental Biology* 107: 373-404. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416022-4.00013-5>.
- Bagot, M. 2019. « Données récentes sur la physiopathologie et les approches thérapeutiques des lymphomes T cutanés épidermotropes ». *Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine* 203 (8): 701-5. <https://doi.org/10.1016/j.banm.2019.10.003>.
- Bagot, M., M. Nikolova, F. Schirm-Chabanette, J. Wechsler, L. Boumsell, et A. Bensussan. 2001. « Crosstalk between Tumor T Lymphocytes and Reactive T Lymphocytes in Cutaneous T Cell Lymphomas ». *Annals of the New York Academy of Sciences* 941 (septembre): 31-38. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2001.tb03708.x>.
- Balkwill, Fran. 2004. « Cancer and the Chemokine Network ». *Nature Reviews. Cancer* 4 (7): 540-50. <https://doi.org/10.1038/nrc1388>.
- Baoum, Abdulgader, Sheng-Xue Xie, Amir Fakhari, et Cory Berkland. 2009. « "Soft" Calcium Crosslinks Enable Highly Efficient Gene Transfection Using TAT Peptide ». *Pharmaceutical research* 26 (12): 2619-29. <https://doi.org/10.1007/s11095-009-9976-1>.
- Barkla, David H., et Peter R. Gibson. 1999. « The Fate of Epithelial Cells in the Human Large Intestine ». *Pathology* 31 (3): 230-38. <https://doi.org/10.1080/003130299105043>.
- Bechara, Chérine, et Sandrine Sagan. 2013. « Cell-Penetrating Peptides: 20 Years Later, Where Do We Stand? » *FEBS Letters* 587 (12): 1693-1702. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.04.031>.
- Bégué, Elodie, Francette Jean-Louis, Martine Bagot, Sébastien Jauliac, Jean-Michel Cayuela, Liliane Laroche, Nathalie Parquet, et al. 2012. « Inducible Expression and Pathophysiologic Functions of T-Plastin in Cutaneous T-Cell Lymphoma ». *Blood* 120 (1): 143-54. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-09-379156>.
- Belmar, Johannes, et Stephen W. Fesik. 2015. « Small Molecule Mcl-1 Inhibitors for the Treatment of Cancer ». *Pharmacology & Therapeutics* 145 (janvier): 76-84. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2014.08.003>.
- Benoit, Bernice M., Neha Jariwala, Geraldine O'Connor, Landon K. Oetjen, Timothy M. Whelan, Adrienne Werth, Andrea B. Troxel, et al. 2017. « CD164 Identifies CD4+ T Cells Highly Expressing Genes Associated with Malignancy in Sézary Syndrome: The Sézary Signature Genes, FCRL3, Tox, and MiR-214 ». *Archives of Dermatological Research* 309 (1): 11-19. <https://doi.org/10.1007/s00403-016-1698-8>.
- Bensussan, Armand, Baptiste Janela, Nicolas Thonnart, Martine Bagot, Philippe Musette, Florent Ginhoux, et Anne Marie-Cardine. 2019. « Identification of CD39 as a Marker for the Circulating Malignant T-Cell Clone of Sézary Syndrome Patients ». *Journal of Investigative Dermatology* 139 (3): 725-28. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2018.09.026>.
- Bensussan, Armand, Natacha Remtoula, Simona Sivori, Martine Bagot, Alessandro Moretta, et Anne Marie-Cardine. 2011. « Expression and Function of the Natural Cytotoxicity Receptor NKp46 on Circulating Malignant CD4+ T Lymphocytes of Sézary Syndrome Patients ». *The Journal of Investigative Dermatology* 131 (4): 969-76. <https://doi.org/10.1038/jid.2010.404>.
- Besbes, Samaher, Massoud Mirshahi, Marc Pocard, et Christian Billard. 2015. « New dimension in therapeutic targeting of BCL-2 family proteins ». *Oncotarget* 6 (15): 12862-71.
- Betts, Corinne A., et Matthew J. A. Wood. 2013. « Cell Penetrating Peptide Delivery of Splice Directing Oligonucleotides as a Treatment for Duchenne Muscular Dystrophy ». *Current Pharmaceutical Design* 19 (16): 2948-62.
- Bi, Meixia, Chris Hopson, Tianqian Zhang, James Smothers, et Axel Hoos. 2016. « Abstract A054: In Vivo Characterization of Ipilimumab T Cell Modulation and Antitumor Activity in a Tumor Bearing Humanized NSG Mouse Model ». *Cancer Immunology Research* 4 (1 Supplement): A054-A054. <https://doi.org/10.1158/2326-6074.CRICIMTEATIAACR15-A054>.
- Boise, L. H., et C. M. Collins. 2001. « Salmonella-Induced Cell Death: Apoptosis, Necrosis or Programmed Cell Death? » *Trends in Microbiology* 9 (2): 64-67. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(00\)01937-5](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(00)01937-5).

- Bokoch, G. M., Y. Wang, B. P. Bohl, M. A. Sells, L. A. Quilliam, et U. G. Knaus. 1996. « Interaction of the Nck Adapter Protein with P21-Activated Kinase (PAK1) ». *The Journal of Biological Chemistry* 271 (42): 25746-49. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.42.25746>.
- Bolhassani, Azam, Behnaz Sadat Jafarzade, et Golnaz Mardani. 2017. « In Vitro and in Vivo Delivery of Therapeutic Proteins Using Cell Penetrating Peptides ». *Peptides* 87: 50-63. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2016.11.011>.
- Bonnet, P., M. Battistella, M. Roelens, C. Ram-Wolff, F. Herms, L. Frumholtz, J.-D. Bouaziz, et al. 2019. « Association of Autoimmunity and Long-Term Complete Remission in Patients with Sézary Syndrome Treated with Mogamulizumab ». *British Journal of Dermatology* 180 (2): 419-20. <https://doi.org/10.1111/bjd.17320>.
- Boon, T, Vg Brichard, et B Van den Eynde. 1995. « Antigènes de rejet des tumeurs et immunothérapie spécifique du cancer ». *médecine/sciences* 11 (9): 1279. <https://doi.org/10.4267/10608/2448>.
- Bosly, A. 2006. « Anticorps monoclonal anti-CD20 (rituximab) dans les maladies hématologiques et les affections auto-immunes ». *Réanimation* 15 (4): 270-77. <https://doi.org/10.1016/j.reaurg.2006.06.015>.
- Braun, Pascal, et Anne-Claude Gingras. 2012. « History of Protein-Protein Interactions: From Egg-White to Complex Networks ». *Proteomics* 12 (10): 1478-98. <https://doi.org/10.1002/pmic.201100563>.
- Brooks, Nicole, Jennifer Hsu, Sandra Esparon, Dodie Pouniotis, et Geoffrey A. Pietersz. 2018. « Immunogenicity of a Tripartite Cell Penetrating Peptide Containing a MUC1 Variable Number of Tandem Repeat (VNTR) and A T Helper Epitope ». *Molecules (Basel, Switzerland)* 23 (9). <https://doi.org/10.3390/molecules23092233>.
- Brown, Diane, Scott Kogan, Eric Lagasse, Irving Weissman, Myriam Alcalay, Pier Giuseppe Pelicci, Susan Atwater, et J. Michael Bishop. 1997. « A PMLRAR α transgene initiates murine acute promyelocytic leukemia ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (6): 2551-56.
- Brown, J. Martin, et Laura D. Attardi. 2005. « The Role of Apoptosis in Cancer Development and Treatment Response ». *Nature Reviews. Cancer* 5 (3): 231-37. <https://doi.org/10.1038/nrc1560>.
- Cain, K., S. B. Bratton, C. Langlais, G. Walker, D. G. Brown, X. M. Sun, et G. M. Cohen. 2000. « Apaf-1 Oligomerizes into Biologically Active Approximately 700-KDa and Inactive Approximately 1.4-MDa Apoptosome Complexes ». *The Journal of Biological Chemistry* 275 (9): 6067-70. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.9.6067>.
- Camilio, Ketil André, Gerd Berge, Chandra Sekhar Ravuri, Oystein Rekdal, et Baldur Sveinbjörnsson. 2014. « Complete Regression and Systemic Protective Immune Responses Obtained in B16 Melanomas after Treatment with LTX-315 ». *Cancer Immunology, Immunotherapy: CII* 63 (6): 601-13. <https://doi.org/10.1007/s00262-014-1540-0>.
- Camilio, Ketil André, Oystein Rekdal, et Baldur Sveinbjörnsson. 2014. « LTX-315 (Oncopore™): A Short Synthetic Anticancer Peptide and Novel Immunotherapeutic Agent ». *Oncoimmunology* 3: e29181. <https://doi.org/10.4161/onci.29181>.
- Campbell, James J., Rachael A. Clark, Rei Watanabe, et Thomas S. Kupper. 2010. « Sézary syndrome and mycosis fungoides arise from distinct T-cell subsets: a biologic rationale for their distinct clinical behaviors ». *Blood* 116 (5): 767-71. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-11-251926>.
- Cancer Genome Atlas Research Network, Timothy J. Ley, Christopher Miller, Li Ding, Benjamin J. Raphael, Andrew J. Mungall, A. Gordon Robertson, et al. 2013. « Genomic and Epigenomic Landscapes of Adult de Novo Acute Myeloid Leukemia ». *The New England Journal of Medicine* 368 (22): 2059-74. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1301689>.
- Candé, Céline, Isabelle Cohen, Eric Daugas, Luigi Ravagnan, Nathanael Larochette, Naoufal Zamzami, et Guido Kroemer. 2002. « Apoptosis-Inducing Factor (AIF): A Novel Caspase-Independent Death Effector Released from Mitochondria ». *Biochimie* 84 (2-3): 215-22. [https://doi.org/10.1016/s0300-9084\(02\)01374-3](https://doi.org/10.1016/s0300-9084(02)01374-3).
- Cao, Erhu, Xingxing Zang, Udupi A. Ramagopal, Arunika Mukhopadhaya, Alexander Fedorov, Elena Fedorov, Wendy D. Zencheck, et al. 2007. « T Cell Immunoglobulin Mucin-3 Crystal Structure Reveals a Galectin-9-Independent Ligand-Binding Surface ». *Immunity* 26 (3): 311-21. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.01.016>.

- Cao, Renhai, Hong Ji, Ninghan Feng, Yin Zhang, Xiaojuan Yang, Patrik Andersson, Yuping Sun, et al. 2012. « Collaborative interplay between FGF-2 and VEGF-C promotes lymphangiogenesis and metastasis ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (39): 15894-99. <https://doi.org/10.1073/pnas.1208324109>.
- Casares, Noelia, Marie O. Pequignot, Antoine Tesniere, François Ghiringhelli, Stéphan Roux, Nathalie Chaput, Elise Schmitt, et al. 2005. « Caspase-Dependent Immunogenicity of Doxorubicin-Induced Tumor Cell Death ». *The Journal of Experimental Medicine* 202 (12): 1691-1701. <https://doi.org/10.1084/jem.20050915>.
- Catros-Quemener, Véronique, Françoise Bouet, et Noëlle Genetet. 2003. « Immunité anti-tumorale et thérapies cellulaires du cancer ». *médecine/sciences* 19 (1): 43-53. <https://doi.org/10.1051/medsci/200319143>.
- Caudron, A., A. Marie-Cardine, A. Bensussan, et M. Bagot. 2012. « Actualités sur le syndrome de Sézary ». *Annales de Dermatologie et de Vénérologie* 139 (1): 31-40. <https://doi.org/10.1016/j.annder.2011.09.188>.
- Chan, Francis Ka-Ming, Joanna Shisler, Jacqueline G. Bixby, Martin Felices, Lixin Zheng, Michael Appel, Jan Orenstein, Bernard Moss, et Michael J. Lenardo. 2003. « A Role for Tumor Necrosis Factor Receptor-2 and Receptor-Interacting Protein in Programmed Necrosis and Antiviral Responses ». *The Journal of Biological Chemistry* 278 (51): 51613-21. <https://doi.org/10.1074/jbc.M305633200>.
- Chautan, M., G. Chazal, F. Cecconi, P. Gruss, et P. Golstein. 1999. « Interdigital Cell Death Can Occur through a Necrotic and Caspase-Independent Pathway ». *Current Biology: CB* 9 (17): 967-70. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(99\)80425-4](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(99)80425-4).
- Chen, Dongshi, Jian Yu, et Lin Zhang. 2016. « Necroptosis: An Alternative Cell Death Program Defending against Cancer ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1865 (2): 228-36. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2016.03.003>.
- Chen, Wenqi, Yinyi Sun, Kangyong Liu, et Xiaojiang Sun. 2014. « Autophagy: a double-edged sword for neuronal survival after cerebral ischemia ». *Neural Regeneration Research* 9 (12): 1210-16. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.135329>.
- Cheng, Hong, Jing-Yi Zhu, Xiao-Ding Xu, Wen-Xiu Qiu, Qi Lei, Kai Han, Yin-Jia Cheng, et Xian-Zheng Zhang. 2015. « Activable Cell-Penetrating Peptide Conjugated Prodrug for Tumor Targeted Drug Delivery ». *ACS Applied Materials & Interfaces* 7 (29): 16061-69. <https://doi.org/10.1021/acsami.5b04517>.
- Choudhary, Chunaram, Chanchal Kumar, Florian Gnad, Michael L. Nielsen, Michael Rehman, Tobias C. Walther, Jesper V. Olsen, et Matthias Mann. 2009. « Lysine Acetylation Targets Protein Complexes and Co-Regulates Major Cellular Functions ». *Science (New York, N.Y.)* 325 (5942): 834-40. <https://doi.org/10.1126/science.1175371>.
- Chung, Jin-Sung, Lisa H. Shiue, Madeleine Duvic, Amit Pandya, Ponciano D. Cruz, et Kiyoshi Ariizumi. 2011. « Sézary syndrome cells overexpress syndecan-4 bearing distinct heparan sulfate moieties that suppress T-cell activation by binding DC-HIL and trapping TGF- β on the cell surface ». *Blood* 117 (12): 3382-90. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-08-302034>.
- Clevers, Hans. 2006. « Wnt/Beta-Catenin Signaling in Development and Disease ». *Cell* 127 (3): 469-80. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.10.018>. 2011. « The Cancer Stem Cell: Premises, Promises and Challenges ». *Nature Medicine* 17 (3): 313-19. <https://doi.org/10.1038/nm.2304>.
- Coley, W. B. 1991. « The Treatment of Malignant Tumors by Repeated Inoculations of Erysipelas. With a Report of Ten Original Cases. 1893 ». *Clinical Orthopaedics and Related Research*, n° 262 (janvier): 3-11.
- Cong, Qian, et Nick V. Grishin. 2012. « MESSA: MEta-Server for Protein Sequence Analysis ». *BMC Biology* 10 (octobre): 82. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-10-82>.
- Contassot, Emmanuel, Katrin Kerl, Stéphanie Roques, Ryan Shane, Olivier Gaide, Marc Dupuis, Alain H. Rook, et Lars E. French. 2008. « Resistance to FasL and Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand-Mediated Apoptosis in Sezary Syndrome T-Cells Associated with Impaired Death Receptor and FLICE-Inhibitory Protein Expression ». *Blood* 111 (9): 4780-87. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-08-109074>.
- Cookson, B. T., et M. A. Brennan. 2001. « Pro-Inflammatory Programmed Cell Death ». *Trends in Microbiology* 9 (3): 113-14. [https://doi.org/10.1016/s0966-842x\(00\)01936-3](https://doi.org/10.1016/s0966-842x(00)01936-3).
- Cooper, Stacy L., et Patrick A. Brown. 2015. « Treatment of Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia ». *Pediatric clinics of North America* 62 (1): 61-73. <https://doi.org/10.1016/j.pcl.2014.09.006>.

- Copolovici, Dana Maria, Kent Langel, Elo Eriste, et Ülo Langel. 2014. « Cell-Penetrating Peptides: Design, Synthesis, and Applications ». *ACS Nano* 8 (3): 1972-94. <https://doi.org/10.1021/nn4057269>.
- Cortes, J. E., D.-W. Kim, J. Pinilla-Ibarz, P. le Coutre, R. Paquette, C. Chuah, F. E. Nicolini, et al. 2013. « A Phase 2 Trial of Ponatinib in Philadelphia Chromosome-Positive Leukemias ». *The New England Journal of Medicine* 369 (19): 1783-96. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1306494>.
- Cosgrave, Lynda, Marc Devocelle, Robert J. Forster, et Tia E. Keyes. 2010. « Multimodal Cell Imaging by Ruthenium Polypyridyl Labelled Cell Penetrating Peptides ». *Chemical Communications (Cambridge, England)* 46 (1): 103-5. <https://doi.org/10.1039/b918611e>.
- Crowther, Michael D., Garry Dolton, Mateusz Legut, Marine E. Caillaud, Angharad Lloyd, Meriem Attaf, Sarah A. E. Galloway, et al. 2020. « Genome-Wide CRISPR–Cas9 Screening Reveals Ubiquitous T Cell Cancer Targeting via the Monomorphic MHC Class I-Related Protein MR1 ». *Nature Immunology*, janvier, 1-8. <https://doi.org/10.1038/s41590-019-0578-8>.
- Cuervo, Ana Maria, et Esther Wong. 2014. « Chaperone-Mediated Autophagy: Roles in Disease and Aging ». *Cell Research* 24 (1): 92-104. <https://doi.org/10.1038/cr.2013.153>.
- Czabotar, Peter E., Guillaume Lessene, Andreas Strasser, et Jerry M. Adams. 2014. « Control of Apoptosis by the BCL-2 Protein Family: Implications for Physiology and Therapy ». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 15 (1): 49-63. <https://doi.org/10.1038/nrm3722>.
- Dalloul, A., L. Laroche, M. Bagot, M. Djavad Mossalayi, C. Fourcade, D. J. Thacker, D. E. Hogge, H. Merle-Beral, P. Debre, et C. Schmitt. 1992. « Interleukin-7 is a growth factor for Sézary lymphoma cells. » *Journal of Clinical Investigation* 90 (3): 1054.
- Darwish, Shaban, Neda Sadeghiani, Shirley Fong, Saghar Mozaffari, Parinaz Hamidi, Thimanthi Withana, Sun Yang, Rakesh Kumar Tiwari, et Keykavous Parang. 2019. « Synthesis and Antiproliferative Activities of Doxorubicin Thiol Conjugates and Doxorubicin-SS-Cyclic Peptide ». *European Journal of Medicinal Chemistry* 161 (janvier): 594-606. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.10.042>.
- Daub, H., K. Gevaert, J. Vandekerckhove, A. Sobel, et A. Hall. 2001. « Rac/Cdc42 and P65PAK Regulate the Microtubule-Destabilizing Protein Stathmin through Phosphorylation at Serine 16 ». *The Journal of Biological Chemistry* 276 (3): 1677-80. <https://doi.org/10.1074/jbc.C000635200>.
- Davis, Julian R., David J. Benjamin, et Brian A. Jonas. 2018. « New and Emerging Therapies for Acute Myeloid Leukaemia ». *Journal of Investigative Medicine: The Official Publication of the American Federation for Clinical Research* 66 (8): 1088-95. <https://doi.org/10.1136/jim-2018-000807>.
- Deacon, Karl, Pratibha Mistry, Jonathan Chernoff, Jonathan L. Blank, et Rajnikant Patel. 2003. « P38 Mitogen-Activated Protein Kinase Mediates Cell Death and P21-Activated Kinase Mediates Cell Survival during Chemotherapeutic Drug-Induced Mitotic Arrest ». *Molecular Biology of the Cell* 14 (5): 2071-87. <https://doi.org/10.1091/mbc.e02-10-0653>.
- Decaudin, D., S. Geley, T. Hirsch, M. Castedo, P. Marchetti, A. Macho, R. Kofler, et G. Kroemer. 1997. « Bcl-2 and Bcl-XL Antagonize the Mitochondrial Dysfunction Preceding Nuclear Apoptosis Induced by Chemotherapeutic Agents ». *Cancer Research* 57 (1): 62-67.
- Decaudin, D., I. Marzo, C. Brenner, et G. Kroemer. 1998. « Mitochondria in Chemotherapy-Induced Apoptosis: A Prospective Novel Target of Cancer Therapy (Review) ». *International Journal of Oncology* 12 (1): 141-52.
- Degenhardt, Kurt, Robin Mathew, Brian Beaudoin, Kevin Bray, Diana Anderson, Guanghua Chen, Chandreyee Mukherjee, et al. 2006. « Autophagy Promotes Tumor Cell Survival and Restricts Necrosis, Inflammation, and Tumorigenesis ». *Cancer Cell* 10 (1): 51-64. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2006.06.001>.
- Degos, L., H. Dombret, C. Chomienne, M. T. Daniel, J. M. Micléa, C. Chastang, S. Castaigne, et P. Fenaux. 1995. « All-Trans-Retinoic Acid as a Differentiating Agent in the Treatment of Acute Promyelocytic Leukemia ». *Blood* 85 (10): 2643-53.
- Degterev, Alexei, Zhihong Huang, Michael Boyce, Yaqiao Li, Prakash Jagtap, Noboru Mizushima, Gregory D. Cuny, Timothy J. Mitchison, Michael A. Moskowitz, et Junying Yuan. 2005. « Chemical Inhibitor of Nonapoptotic Cell Death with Therapeutic Potential for Ischemic Brain Injury ». *Nature Chemical Biology* 1 (2): 112-19. <https://doi.org/10.1038/nchembio711>.

- Delfau-Larue, M. H., L. Laroche, J. Wechsler, E. Lepage, C. Lahet, M. Asso-Bonnet, M. Bagot, et J. P. Farcet. 2000. « Diagnostic Value of Dominant T-Cell Clones in Peripheral Blood in 363 Patients Presenting Consecutively with a Clinical Suspicion of Cutaneous Lymphoma ». *Blood* 96 (9): 2987-92.
- Delrieu, I. 2000. « The High Molecular Weight Isoforms of Basic Fibroblast Growth Factor (FGF-2): An Insight into an Intracrine Mechanism ». *FEBS Letters* 468 (1): 6-10. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(00\)01189-3](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(00)01189-3).
- Dereure, O., P. Portales, J. Clot, et J. J. Guilhou. 2000. « Decreased Expression of Fas (APO-1/CD95) on Peripheral Blood CD4+ T Lymphocytes in Cutaneous T-Cell Lymphomas ». *The British Journal of Dermatology* 143 (6): 1205-10. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2133.2000.03889.x>.
- Derivery, Emmanuel, Eline Bartolami, Stefan Matile, et Marcos Gonzalez-Gaitan. 2017. « Efficient Delivery of Quantum Dots into the Cytosol of Cells Using Cell-Penetrating Poly(Disulfide)s ». *Journal of the American Chemical Society* 139 (30): 10172-75. <https://doi.org/10.1021/jacs.7b02952>.
- Derossi, Daniele, Sophie Calvet, Alain Trembleau, Alié Brunissen, Gérard Chassaing, et Alain Prochiantz. 1996. « Cell internalization of the third helix of the Antennapedia homeodomain is receptor-independent ». *Journal of Biological Chemistry* 271 (30): 18188–18193.
- Deshpande, Pranali P, Swati Biswas, et Vladimir P Torchilin. 2013. « Current trends in the use of liposomes for tumor targeting ». *Nanomedicine (London, England)* 8 (9). <https://doi.org/10.2217/nnm.13.118>.
- Dick, John E. 2005. « Acute Myeloid Leukemia Stem Cells ». *Annals of the New York Academy of Sciences* 1044 (juin): 1-5. <https://doi.org/10.1196/annals.1349.001>.
- Doebbeling, Udo. 2010. « A mouse model for the Sézary syndrome ». *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 29 (1): 11.
- Doonan, Francesca, et Thomas G. Cotter. 2008. « Morphological Assessment of Apoptosis ». *Methods, Apoptosis*, 44 (3): 200-204. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2007.11.006>.
- Dorrance, Adrienne M., Shujun Liu, Anita Chong, Benjamin Pulley, David Nemer, Martin Guimond, Weifeng Yuan, et al. 2008. « The MII Partial Tandem Duplication: Differential, Tissue-Specific Activity in the Presence or Absence of the Wild-Type Allele ». *Blood* 112 (6): 2508-11. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-01-134338>.
- Drozdetskiy, Alexey, Christian Cole, James Procter, et Geoffrey J. Barton. 2015. « JPred4: A Protein Secondary Structure Prediction Server ». *Nucleic Acids Research* 43 (W1): W389-394. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv332>.
- Duan, Ziqing, Cuitian Chen, Jing Qin, Qi Liu, Qi Wang, Xinchun Xu, et Jianxin Wang. 2017. « Cell-Penetrating Peptide Conjugates to Enhance the Antitumor Effect of Paclitaxel on Drug-Resistant Lung Cancer ». *Drug Delivery* 24 (1): 752-64. <https://doi.org/10.1080/10717544.2017.1321060>.
- Duchardt, Falk, Mariola Fotin-Mleczek, Heinz Schwarz, Rainer Fischer, et Roland Brock. 2007. « A Comprehensive Model for the Cellular Uptake of Cationic Cell-Penetrating Peptides ». *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 8 (7): 848-66. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2007.00572.x>.
- Dummer, R., S. A. Michie, D. Kell, J. W. Gould, A. C. Haeffner, B. R. Smoller, R. A. Warnke, et G. S. Wood. 1995. « Expression of Bcl-2 Protein and Ki-67 Nuclear Proliferation Antigen in Benign and Malignant Cutaneous T-Cell Infiltrates ». *Journal of Cutaneous Pathology* 22 (1): 11-17. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0560.1995.tb00733.x>.
- Dunn, Gavin P., Catherine M. Koebel, et Robert D. Schreiber. 2006. « Interferons, Immunity and Cancer Immunoediting ». *Nature Reviews Immunology* 6 (11): 836-48. <https://doi.org/10.1038/nri1961>.
- Edelman, J., et H. J. Meyerson. 2000. « Diminished CD3 Expression Is Useful for Detecting and Enumerating Sézary Cells ». *American Journal of Clinical Pathology* 114 (3): 467-77. <https://doi.org/10.1093/ajcp/114.3.467>.
- Edwards, D. C., L. C. Sanders, G. M. Bokoch, et G. N. Gill. 1999. « Activation of LIM-Kinase by Pak1 Couples Rac/Cdc42 GTPase Signalling to Actin Cytoskeletal Dynamics ». *Nature Cell Biology* 1 (5): 253-59. <https://doi.org/10.1038/12963>.
- Elliott, Michael R., et Kodi S. Ravichandran. 2010. « Clearance of Apoptotic Cells: Implications in Health and Disease ». *The Journal of Cell Biology* 189 (7): 1059-70. <https://doi.org/10.1083/jcb.201004096>.
- Elmore, Susan. 2007. « Apoptosis: a review of programmed cell death ». *Toxicologic pathology* 35 (4): 495–516.

- El-Sayed, Naglaa Salem, Taryn Miyake, Amir N. Shirazi, Shang Eun Park, Jimmy Clark, Stephani Buchholz, Keykavous Parang, et Rakesh Tiwari. 2018. « Design, Synthesis, and Evaluation of Homochiral Peptides Containing Arginine and Histidine as Molecular Transporters ». *Molecules (Basel, Switzerland)* 23 (7). <https://doi.org/10.3390/molecules23071590>.
- Faderl, Stefan, Carlos Bueso-Ramos, Zhiming Liu, Ashutosh Pal, William Bornmann, Diana V. Ciurea, David Harris, Inbal Hazan-Halevy, Hagop M. Kantarjian, et Zeev Estrov. 2011. « Kit inhibitor APcK110 extends survival in an AML xenograft mouse model ». *Investigational new drugs* 29 (5): 1094-97. <https://doi.org/10.1007/s10637-010-9459-6>.
- Fang, Wei Bin, Min Yao, Gage Brummer, Diana Acevedo, Nabil Alhakamy, Cory Berkland, et Nikki Cheng. 2016. « Targeted Gene Silencing of CCL2 Inhibits Triple Negative Breast Cancer Progression by Blocking Cancer Stem Cell Renewal and M2 Macrophage Recruitment ». *Oncotarget* 7 (31): 49349-67. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9885>.
- Faye, Audrey, et Jean-Luc Poyet. 2010. « Targeting AAC-11 in Cancer Therapy ». *Expert Opinion on Therapeutic Targets* 14 (1): 57-65. <https://doi.org/10.1517/14728220903431077>.
- Feni, Lucia, et Ines Neundorf. 2017. « The Current Role of Cell-Penetrating Peptides in Cancer Therapy ». *Advances in Experimental Medicine and Biology* 1030: 279-95. https://doi.org/10.1007/978-3-319-66095-0_13.
- Ferrari, Aldo, Vittorio Pellegrini, Caterina Arcangeli, Antonio Fittipaldi, Mauro Giacca, et Fabio Beltram. 2003. « Caveolae-Mediated Internalization of Extracellular HIV-1 Tat Fusion Proteins Visualized in Real Time ». *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 8 (2): 284-94.
- Festjens, Nele, Tom Vanden Berghe, et Peter Vandenabeele. 2006. « Necrosis, a Well-Orchestrated Form of Cell Demise: Signalling Cascades, Important Mediators and Concomitant Immune Response ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics, Mitochondria: from Molecular Insight to Physiology and Pathology*, 1757 (9): 1371-87. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2006.06.014>.
- Fink, Susan L., et Brad T. Cookson. 2005. « Apoptosis, Pyroptosis, and Necrosis: Mechanistic Description of Dead and Dying Eukaryotic Cells ». *Infection and Immunity* 73 (4): 1907-16. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.4.1907-1916.2005>.
- Fircanis, Sophia, Priscilla Merriam, Naushaba Khan, et Jorge J. Castillo. 2014. « The Relation between Cigarette Smoking and Risk of Acute Myeloid Leukemia: An Updated Meta-Analysis of Epidemiological Studies ». *American Journal of Hematology* 89 (8): E125-132. <https://doi.org/10.1002/ajh.23744>.
- Fits, Leslie van der, Heggert G. Rebel, Jacoba J. Out-Luiting, Stephan M. Pouw, Fiona Smit, Kim G. Vermeer, Lianne van Zijl, Cornelis P. Tensen, Kees Weijer, et Maarten H. Vermeer. 2012. « A Novel Mouse Model for Sézary Syndrome Using Xenotransplantation of Sézary Cells into Immunodeficient RAG2(-/-) Γ c(-/-) Mice ». *Experimental Dermatology* 21 (9): 706-9. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2012.01556.x>.
- Fletcher, Matthew David, et Malcolm M. Campbell. 1998. « Partially Modified Retro-Inverso Peptides: Development, Synthesis, and Conformational Behavior ». *Chemical Reviews* 98 (2): 763-96. <https://doi.org/10.1021/cr970468t>.
- Follis, Arielle Viacava, Dalia I. Hammoudeh, Huabo Wang, Edward V. Prochownik, et Steven J. Metallo. 2008. « Structural Rationale for the Coupled Binding and Unfolding of the C-Myc Oncoprotein by Small Molecules ». *Chemistry & Biology* 15 (11): 1149-55. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2008.09.011>.
- Forozan, F., R. Veldman, C. A. Ammerman, N. Z. Parsa, A. Kallioniemi, O. P. Kallioniemi, et S. P. Ethier. 1999. « Molecular Cytogenetic Analysis of 11 New Breast Cancer Cell Lines ». *British Journal of Cancer* 81 (8): 1328-34. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6695007>.
- Forveille, Sabrina, Heng Zhou, Allan Sauvat, Lucillia Bezu, Kevin Müller, Peng Liu, Laurence Zitvogel, et al. 2015. « The Oncolytic Peptide LTX-315 Triggers Necrotic Cell Death ». *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* 14 (21): 3506-12. <https://doi.org/10.1080/15384101.2015.1093710>.
- Fridman, Wolf Herman, Franck Pagès, Catherine Sautès-Fridman, et Jérôme Galon. 2012. « The Immune Contexture in Human Tumours: Impact on Clinical Outcome ». *Nature Reviews. Cancer* 12 (4): 298-306. <https://doi.org/10.1038/nrc3245>.

- Frost, J. A., J. L. Swantek, S. Stippec, M. J. Yin, R. Gaynor, et M. H. Cobb. 2000. « Stimulation of NFkappa B Activity by Multiple Signaling Pathways Requires PAK1 ». *The Journal of Biological Chemistry* 275 (26): 19693-99. <https://doi.org/10.1074/jbc.M909860199>.
- Fu, Junliang, Zheng Zhang, Lin Zhou, Zhaorui Qi, Shaojun Xing, Jiyun Lv, Jianfei Shi, et al. 2013. « Impairment of CD4+ Cytotoxic T Cells Predicts Poor Survival and High Recurrence Rates in Patients with Hepatocellular Carcinoma ». *Hepatology (Baltimore, Md.)* 58 (1): 139-49. <https://doi.org/10.1002/hep.26054>.
- Fu, Lin-Shien, Yu-Rou Wu, Shun-Lung Fang, Jaw-Ji Tsai, Heng-Kuei Lin, Yee-Jun Chen, Ting-Yu Chen, et Margaret Dah-Tsyr Chang. 2017. « Cell Penetrating Peptide Derived from Human Eosinophil Cationic Protein Decreases Airway Allergic Inflammation ». *Scientific Reports* 7 (1): 12352. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-12390-8>.
- Fu, Zeze, Biyong Deng, Yuxin Liao, Liancheng Shan, Fei Yin, Zhuoying Wang, Hui Zeng, Dongqing Zuo, Yingqi Hua, et Zhengdong Cai. 2013. « The Anti-Tumor Effect of Shikonin on Osteosarcoma by Inducing RIP1 and RIP3 Dependent Necroptosis ». *BMC Cancer* 13 (décembre): 580. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-13-580>.
- Galisteo, M. L., J. Chernoff, Y. C. Su, E. Y. Skolnik, et J. Schlessinger. 1996. « The Adaptor Protein Nck Links Receptor Tyrosine Kinases with the Serine-Threonine Kinase Pak1 ». *The Journal of Biological Chemistry* 271 (35): 20997-0. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.35.20997>.
- Galluzzi, L., I. Vitale, J. M. Abrams, E. S. Alnemri, E. H. Baehrecke, M. V. Blagosklonny, T. M. Dawson, et al. 2012. « Molecular Definitions of Cell Death Subroutines: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012 ». *Cell Death and Differentiation* 19 (1): 107-20. <https://doi.org/10.1038/cdd.2011.96>.
- Galluzzi, Lorenzo, Oliver Kepp, Francis Ka-Ming Chan, et Guido Kroemer. 2017. « Necroptosis: Mechanisms and Relevance to Disease ». *Annual review of pathology* 12 (janvier): 103-30. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-052016-100247>.
- Galluzzi, Lorenzo, Ilio Vitale, Stuart A. Aaronson, John M. Abrams, Dieter Adam, Patrizia Agostinis, Emad S. Alnemri, et al. 2018. « Molecular Mechanisms of Cell Death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018 ». *Cell Death and Differentiation* 25 (3): 486-541. <https://doi.org/10.1038/s41418-017-0012-4>.
- Garatti, S. A., E. Roscetti, D. Trecca, N. S. Fracchiolla, A. Neri, et E. Berti. 1995. « Bcl-1, Bcl-2, P53, c-Myc, and Lym-10 Analysis in Cutaneous Lymphomas ». *Recent Results in Cancer Research. Fortschritte Der Krebsforschung. Progres Dans Les Recherches Sur Le Cancer* 139: 249-61. https://doi.org/10.1007/978-3-642-78771-3_19.
- Garcia-Caballero, Agustin, Vinicius M. Gadotti, Lina Chen, et Gerald W. Zamponi. 2016. « A Cell-Permeant Peptide Corresponding to the CUBP Domain of USP5 Reverses Inflammatory and Neuropathic Pain ». *Molecular Pain* 12. <https://doi.org/10.1177/1744806916642444>.
- Garg, Abhishek D., Lorenzo Galluzzi, Lionel Apetoh, Thais Baert, Raymond B. Birge, José Manuel Bravo-San Pedro, Karine Breckpot, et al. 2015. « Molecular and Translational Classifications of DAMPs in Immunogenic Cell Death ». *Frontiers in Immunology* 6: 588. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00588>.
- Garrido, Marcelo, Geraldine Melgoza, Héctor Galindo, Jorge Madrid, César Sánchez, Bruno Nervi, Manuel Alvarez, et Eric Orellana. 2007. « [Treatment of advanced gastric cancer with oxaliplatin plus 5-fluorouracil/leucovorin (FOLFOX-4 chemotherapy)] ». *Revista Medica De Chile* 135 (11): 1380-87. <https://doi.org/S0034-98872007001100003>.
- Gatenby, R A, K Smallbone, P K Maini, F Rose, J Averill, R B Nagle, L Worrall, et R J Gillies. 2007. « Cellular adaptations to hypoxia and acidosis during somatic evolution of breast cancer ». *British Journal of Cancer* 97 (5): 646-53. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6603922>.
- Gauci, Sharon, Andreas O. Helbig, Monique Slijper, Jeroen Krijgsveld, Albert J. R. Heck, et Shabaz Mohammed. 2009. « Lys-N and Trypsin Cover Complementary Parts of the Phosphoproteome in a Refined SCX-Based Approach ». *Analytical Chemistry* 81 (11): 4493-4501. <https://doi.org/10.1021/ac9004309>.
- Geserick, P., J. Wang, R. Schilling, S. Horn, P. A. Harris, J. Bertin, P. J. Gough, M. Feoktistova, et M. Leverkus. 2015. « Absence of RIPK3 Predicts Necroptosis Resistance in Malignant Melanoma ». *Cell Death & Disease* 6 (septembre): e1884. <https://doi.org/10.1038/cddis.2015.240>.

- Gianfrancesco, F., T. Esposito, A. Ciccodicola, M. D'Esposito, R. Mazzarella, M. D'Urso, et A. Forabosco. 1999. « Molecular Cloning and Fine Mapping of API5L1, a Novel Human Gene Strongly Related to an Antiapoptotic Gene ». *Cytogenetics and Cell Genetics* 84 (3-4): 164-66. <https://doi.org/10.1159/000015247>.
- Gilliland, D. G. 2001. « Hematologic Malignancies ». *Current Opinion in Hematology* 8 (4): 189-91. <https://doi.org/10.1097/00062752-200107000-00001>.
- Gilmore, Andrew, et Louise King. 2019. « Emerging Approaches to Target Mitochondrial Apoptosis in Cancer Cells ». *F1000Research* 8. <https://doi.org/10.12688/f1000research.18872.1>.
- Ginsberg, Doron. 2002. « E2F1 Pathways to Apoptosis ». *FEBS Letters* 529 (1): 122-25. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(02\)03270-2](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(02)03270-2).
- Girardi, M., D. E. Oppenheim, C. R. Steele, J. M. Lewis, E. Glusac, R. Filler, P. Hobby, B. Sutton, R. E. Tigelaar, et A. C. Hayday. 2001. « Regulation of Cutaneous Malignancy by Gammadelta T Cells ». *Science (New York, N.Y.)* 294 (5542): 605-9. <https://doi.org/10.1126/science.1063916>.
- Godley, Lucy A. 2014. « Inherited Predisposition to Acute Myeloid Leukemia ». *Seminars in Hematology* 51 (4): 306-21. <https://doi.org/10.1053/j.seminhematol.2014.08.001>.
- Goering, P. L., H. V. Aposhian, M. J. Mass, M. Cebrián, B. D. Beck, et M. P. Waalkes. 1999. « The Enigma of Arsenic Carcinogenesis: Role of Metabolism ». *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology* 49 (1): 5-14. <https://doi.org/10.1093/toxsci/49.1.5>.
- Golstein, Pierre, et Guido Kroemer. 2007. « Cell Death by Necrosis: Towards a Molecular Definition ». *Trends in Biochemical Sciences* 32 (1): 37-43. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2006.11.001>.
- Gong, Yitao, Zhiyao Fan, Guopei Luo, Chao Yang, Qiuyi Huang, Kun Fan, He Cheng, et al. 2019. « The role of necroptosis in cancer biology and therapy ». *Molecular Cancer* 18 (mai). <https://doi.org/10.1186/s12943-019-1029-8>.
- González-Martín, Alicia, Lucio Gómez, Joseph Lustgarten, Emilia Mira, et Santos Mañes. 2011. « Maximal T Cell-Mediated Antitumor Responses Rely upon CCR5 Expression in Both CD4(+) and CD8(+) T Cells ». *Cancer Research* 71 (16): 5455-66. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-1687>.
- Goswami, Meghali, Madeleine Duvic, Alexis Dougherty, et Xiao Ni. 2012. « Increased Twist expression in advanced stage of Mycosis fungoides and Sézary syndrome ». *Journal of cutaneous pathology* 39 (5): 500-507. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0560.2012.01883.x>.
- Gough, Michael, Marka Crittenden, Uma Thanarajasingam, Luis Sanchez-Perez, Jill Thompson, Dragan Jevremovic, et Richard Vile. 2005. « Gene Therapy to Manipulate Effector T Cell Trafficking to Tumors for Immunotherapy ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 174 (9): 5766-73. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.9.5766>.
- Greaves, Mel, et Carlo C. Maley. 2012. « Clonal Evolution in Cancer ». *Nature* 481 (7381): 306-13. <https://doi.org/10.1038/nature10762>.
- Green, Douglas R., Thomas Ferguson, Laurence Zitvogel, et Guido Kroemer. 2009. « Immunogenic and Tolerogenic Cell Death ». *Nature Reviews. Immunology* 9 (5): 353-63. <https://doi.org/10.1038/nri2545>.
- Green, Douglas R., et Guido Kroemer. 2004. « The Pathophysiology of Mitochondrial Cell Death ». *Science (New York, N.Y.)* 305 (5684): 626-29. <https://doi.org/10.1126/science.1099320>.
- Greer, Eric L., Travis J. Maures, Anna G. Hauswirth, Erin M. Green, Dena S. Leeman, Géraldine S. Maro, Shuo Han, Max R. Banko, Or Gozani, et Anne Brunet. 2010. « Members of the H3K4 Trimethylation Complex Regulate Lifespan in a Germline-Dependent Manner in *C. Elegans* ». *Nature* 466 (7304): 383-87. <https://doi.org/10.1038/nature09195>.
- Grivennikov, Sergei I., Florian R. Greten, et Michael Karin. 2010. « Immunity, Inflammation, and Cancer ». *Cell* 140 (6): 883-99. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.025>.
- Groves, Jay T. 2019. « Membrane Mechanics in Living Cells ». *Developmental Cell* 48 (1): 15-16. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2018.12.011>.
- Gruszka, Alicja M, Debora Valli, et Myriam Alcalay. 2017. « Understanding the molecular basis of acute myeloid leukemias: where are we now? » *International Journal of Hematologic Oncology* 6 (2): 43-53. <https://doi.org/10.2217/ijh-2017-0002>.

- Guidotti, Giulia, Liliana Brambilla, et Daniela Rossi. 2017. « Cell-Penetrating Peptides: From Basic Research to Clinics ». *Trends in Pharmacological Sciences* 38 (4): 406-24. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2017.01.003>.
- Guo, Haitao, Justin B. Callaway, et Jenny P.-Y. Ting. 2015. « Inflammasomes: Mechanism of Action, Role in Disease, and Therapeutics ». *Nature Medicine* 21 (7): 677-87. <https://doi.org/10.1038/nm.3893>.
- Gurbel, Paul A., Kevin P. Bliden, Susan E. Turner, Udaya S. Tantry, Martin G. Gesheff, Travis P. Barr, Lidija Covic, et Athan Kuliopulos. 2016. « Cell-Penetrating Pepducin Therapy Targeting PAR1 in Subjects With Coronary Artery Disease ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 36 (1): 189-97. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.115.306777>.
- Gurney, Leo R. I., Julie Taggart, Wing-Chiu Tong, Arwyn T. Jones, Stephen C. Robson, et Michael J. Taggart. 2018. « Inhibition of Inflammatory Changes in Human Myometrial Cells by Cell Penetrating Peptide and Small Molecule Inhibitors of NFκB ». *Frontiers in Immunology* 9: 2966. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02966>.
- Gurung, Prajwal, John R. Lukens, et Thirumala-Devi Kanneganti. 2015. « Mitochondria: Diversity in the Regulation of the NLRP3 Inflammasome ». *Trends in Molecular Medicine* 21 (3): 193-201. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2014.11.008>.
- Gutierrez, Kimberley D., Michael A. Davis, Brian P. Daniels, Tayla M. Olsen, Pooja Ralli-Jain, Stephen W. G. Tait, Michael Gale, et Andrew Oberst. 2017. « MLKL Activation Triggers NLRP3-Mediated Processing and Release of IL-1β Independently of Gasdermin-D ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 198 (5): 2156-64. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1601757>.
- Habault, Justine, et Jean-Luc Poyet. 2019. « Recent Advances in Cell Penetrating Peptide-Based Anticancer Therapies ». *Molecules (Basel, Switzerland)* 24 (5). <https://doi.org/10.3390/molecules24050927>.
- Hällbrink, Mattias, Kalle Kilk, Anna Elmquist, Pontus Lundberg, Maria Lindgren, Yang Jiang, Margus Pooga, Ursel Soomets, et Ülo Langel. 2005. « Prediction of Cell-Penetrating Peptides ». *International Journal of Peptide Research and Therapeutics* 11 (4): 249-59. <https://doi.org/10.1007/s10989-005-9393-1>.
- Han, Byeong-Gu, Kyoung Hoon Kim, Sang Jae Lee, Kyung-Chae Jeong, Jea-Won Cho, Kyung Hee Noh, Tae Woo Kim, et al. 2012. « Helical Repeat Structure of Apoptosis Inhibitor 5 Reveals Protein-Protein Interaction Modules ». *Journal of Biological Chemistry* 287 (14): 10727-37. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.317594>.
- Hanahan, Douglas, et Robert A. Weinberg. 2011. « Hallmarks of Cancer: The next Generation ». *Cell* 144 (5): 646-74. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>.
- Handy, Catherine E., et Emmanuel S. Antonarakis. 2018. « Sipuleucel-T for the Treatment of Prostate Cancer: Novel Insights and Future Directions ». *Future Oncology (London, England)* 14 (10): 907-17. <https://doi.org/10.2217/fon-2017-0531>.
- Hansen, Mats, Kalle Kilk, et Ülo Langel. 2008. « Predicting cell-penetrating peptides ». *Advanced Drug Delivery Reviews, Membrane Permeable Peptide Vectors: Chemistry and Functional Design for the Therapeutic Applications*, 60 (4): 572-79. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2007.09.003>.
- Harlin, Helena, Yuru Meng, Amy C. Peterson, Yuanyuan Zha, Maria Tretiakova, Craig Slingluff, Mark McKee, et Thomas F. Gajewski. 2009. « Chemokine Expression in Melanoma Metastases Associated with CD8+ T-Cell Recruitment ». *Cancer Research* 69 (7): 3077-85. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-2281>.
- Hayakawa, F., K. Sugimoto, Y. Harada, N. Hashimoto, N. Ohi, S. Kurahashi, et T. Naoe. 2013. « A Novel STAT Inhibitor, OPB-31121, Has a Significant Antitumor Effect on Leukemia with STAT-Addictive Oncokinasases ». *Blood Cancer Journal* 3 (11): e166-e166. <https://doi.org/10.1038/bcj.2013.63>.
- Heery, D. M., E. Kalkhoven, S. Hoare, et M. G. Parker. 1997. « A Signature Motif in Transcriptional Co-Activators Mediates Binding to Nuclear Receptors ». *Nature* 387 (6634): 733-36. <https://doi.org/10.1038/42750>.
- Hegardt, P., B. Widegren, L. Li, B. Sjögren, C. Kjellman, I. Sur, et H. O. Sjögren. 2001. « Nitric Oxide Synthase Inhibitor and IL-18 Enhance the Anti-Tumor Immune Response of Rats Carrying an Intrahepatic Colon Carcinoma ». *Cancer Immunology, Immunotherapy: CII* 50 (9): 491-501. <https://doi.org/10.1007/s002620100230>.
- Hills, Robert K., Sylvie Castaigne, Frederick R. Appelbaum, Jacques Delaunay, Stephen Petersdorf, Megan Othus, Elihu H. Estey, et al. 2014. « Addition of Gemtuzumab Ozogamicin to Induction Chemotherapy in Adult Patients with Acute Myeloid Leukaemia: A Meta-Analysis of Individual Patient Data from Randomised

- Controlled Trials ». *The Lancet. Oncology* 15 (9): 986-96. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(14\)70281-5](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(14)70281-5).
- Hiramatsu, Hidefumi, Ryuta Nishikomori, Toshio Heike, Mamoru Ito, Kimio Kobayashi, Kenji Katamura, et Tatsutoshi Nakahata. 2003. « Complete Reconstitution of Human Lymphocytes from Cord Blood CD34+ Cells Using the NOD/SCID/Gammacnull Mice Model ». *Blood* 102 (3): 873-80. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-09-2755>.
- Höckendorf, Ulrike, Monica Yabal, Tobias Herold, Enkhtsetseg Munkhbaatar, Stephanie Rott, Stefanie Jilg, Johanna Kauschinger, et al. 2016. « RIPK3 Restricts Myeloid Leukemogenesis by Promoting Cell Death and Differentiation of Leukemia Initiating Cells ». *Cancer Cell* 30 (1): 75-91. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2016.06.002>.
- Holohan, Brody, Woodring E. Wright, et Jerry W. Shay. 2014. « Cell Biology of Disease: Telomeropathies: An Emerging Spectrum Disorder ». *The Journal of Cell Biology* 205 (3): 289-99. <https://doi.org/10.1083/jcb.201401012>.
- Hong, Michelle, Anne-Laure Puaux, Caleb Huang, Laure Loumagne, Charlene Tow, Charles Mackay, Masashi Kato, et al. 2011. « Chemotherapy Induces Intratumoral Expression of Chemokines in Cutaneous Melanoma, Favoring T-Cell Infiltration and Tumor Control ». *Cancer Research* 71 (22): 6997-7009. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-1466>.
- Hosen, Naoki, Christopher Y. Park, Naoya Tatsumi, Yusuke Oji, Haruo Sugiyama, Martin Gramatzki, Alan M. Krensky, et Irving L. Weissman. 2007. « CD96 Is a Leukemic Stem Cell-Specific Marker in Human Acute Myeloid Leukemia ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (26): 11008-13. <https://doi.org/10.1073/pnas.0704271104>.
- Houghton, J. A. 1999. « Apoptosis and Drug Response ». *Current Opinion in Oncology* 11 (6): 475-81. <https://doi.org/10.1097/00001622-199911000-00008>.
- Housman, Genevieve, Shannon Byler, Sarah Heerboth, Karolina Lapinska, Mckenna Longacre, Nicole Snyder, et Sibaji Sarkar. 2014. « Drug Resistance in Cancer: An Overview ». *Cancers* 6 (3): 1769-92. <https://doi.org/10.3390/cancers6031769>.
- Hu, Yuanxin, Joyce Yao, Zhixue Liu, Xia Liu, Haiyan Fu, et Keqiang Ye. 2005. « Akt phosphorylates acinus and inhibits its proteolytic cleavage, preventing chromatin condensation ». *The EMBO journal* 24 (20): 3543–3554.
- Huang, He, et Xi He. 2008. « Wnt/Beta-Catenin Signaling: New (and Old) Players and New Insights ». *Current Opinion in Cell Biology* 20 (2): 119-25. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2008.01.009>.
- Huang, M. E., Y. C. Ye, S. R. Chen, J. R. Chai, J. X. Lu, L. Zhao, L. J. Gu, et Z. Y. Wang. 1988. « Use of All-Trans Retinoic Acid in the Treatment of Acute Promyelocytic Leukemia ». *Blood* 72 (2): 567-72.
- Hummel, Gerd, Ulrich Reineke, et Ulf Reimer. 2006. « Translating Peptides into Small Molecules ». *Molecular BioSystems* 2 (10): 499-508. <https://doi.org/10.1039/b611791k>.
- Hung, Man-Hsin, et Kuen-Feng Chen. 2017. « Reprogramming the Oncogenic Response: SET Protein as a Potential Therapeutic Target in Cancer ». *Expert Opinion on Therapeutic Targets* 21 (7): 685-94. <https://doi.org/10.1080/14728222.2017.1336226>.
- Hurabielle, Charlotte, Laurence Michel, Caroline Ram-Wolff, Maxime Battistella, Francette Jean-Louis, Marie Beylot-Barry, Michel d'Incan, Armand Bensussan, et Martine Bagot. 2016. « Expression of Sézary Biomarkers in the Blood of Patients with Erythrodermic Mycosis Fungoides ». *The Journal of Investigative Dermatology* 136 (1): 317-20. <https://doi.org/10.1038/JID.2015.360>.
- Hurabielle, Charlotte, Nicolas Thonnart, Caroline Ram-Wolff, Helene Sicard, Armand Bensussan, Martine Bagot, et Anne Marie-Cardine. 2017. « Usefulness of KIR3DL2 to Diagnose, Follow-Up and Manage the Treatment of Sézary Syndrome Patients ». *Clinical Cancer Research*, clincanres–3185.
- Iida, Noriyo, Yasunari Nakamoto, Tomohisa Baba, Hidetoshi Nakagawa, Eishiro Mizukoshi, Makoto Naito, Naofumi Mukaida, et Shuichi Kaneko. 2010. « Antitumor Effect after Radiofrequency Ablation of Murine Hepatoma Is Augmented by an Active Variant of CC Chemokine Ligand 3/Macrophage Inflammatory Protein-1alpha ». *Cancer Research* 70 (16): 6556-65. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-0096>.
- Ishihara, Masayuki, Masanori Fujita, Kiyohaya Obara, Hidemi Hattori, Shingo Nakamura, Masaki Nambu, Tomoharu Kiyosawa, et al. 2006. « Controlled Releases of FGF-2 and Paclitaxel from Chitosan Hydrogels

- and Their Subsequent Effects on Wound Repair, Angiogenesis, and Tumor Growth ». *Current Drug Delivery* 3 (4): 351-58. <https://doi.org/10.2174/156720106778559047>.
- Ishikawa, Fumihiko, Shuro Yoshida, Yoriko Saito, Atsushi Hijikata, Hiroshi Kitamura, Satoshi Tanaka, Ryu Nakamura, et al. 2007. « Chemotherapy-Resistant Human AML Stem Cells Home to and Engraft within the Bone-Marrow Endosteal Region ». *Nature Biotechnology* 25 (11): 1315-21. <https://doi.org/10.1038/nbt1350>.
- Ito, Asahi, Takashi Ishida, Hiroki Yano, Atsushi Inagaki, Susumu Suzuki, Fumihiko Sato, Hisashi Takino, et al. 2009. « Defucosylated Anti-CCR4 Monoclonal Antibody Exercises Potent ADCC-Mediated Antitumor Effect in the Novel Tumor-Bearing Humanized NOD/Shi-Scid, IL-2R γ null Mouse Model ». *Cancer Immunology, Immunotherapy* 58 (8): 1195-1206. <https://doi.org/10.1007/s00262-008-0632-0>.
- Jagot-Lacoussiere, Léonard, Ewa Kotula, Bruno O. Villoutreix, Heriberto Bruzzoni-Giovanelli, et Jean-Luc Poyet. 2016. « A Cell-Penetrating Peptide Targeting AAC-11 Specifically Induces Cancer Cells Death ». *Cancer Research* 76 (18): 5479-90. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-0302>.
- Jain, Salvia, Dina Stroopinsky, Li Yin, Jacalyn Rosenblatt, Maroof Alam, Parul Bhargava, Rachael A. Clark, et al. 2015. « Mucin 1 is a potential therapeutic target in cutaneous T-cell lymphoma ». *Blood* 126 (3): 354-62. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-02-628149>.
- Jaiswal, Siddhartha, Catriona H. M. Jamieson, Wendy W. Pang, Christopher Y. Park, Mark P. Chao, Ravindra Majeti, David Traver, Nico van Rooijen, et Irving L. Weissman. 2009. « CD47 Is Upregulated on Circulating Hematopoietic Stem Cells and Leukemia Cells to Avoid Phagocytosis ». *Cell* 138 (2): 271-85. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.05.046>.
- Jan, Max, Mark P. Chao, Adriel C. Cha, Ash A. Alizadeh, Andrew J. Gentles, Irving L. Weissman, et Ravindra Majeti. 2011. « Prospective Separation of Normal and Leukemic Stem Cells Based on Differential Expression of TIM3, a Human Acute Myeloid Leukemia Stem Cell Marker ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (12): 5009-14. <https://doi.org/10.1073/pnas.1100551108>.
- Janka, M., U. Fischer, J. C. Tonn, S. Kerkau, K. Roosen, et E. Meese. 1996. « Comparative Amplification Analysis of Human Glioma Tissue and Glioma Derived Fragment Spheroids Using Reverse Chromosome Painting (RCP) ». *Anticancer Research* 16 (5A): 2601-6.
- Jeziarska, Agnieszka, et Tomasz Motyl. 2009. « Matrix Metalloproteinase-2 Involvement in Breast Cancer Progression: A Mini-Review ». *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research* 15 (2): RA32-40.
- Jia, Lee, Gregory S. Gorman, Lori U. Coward, Patricia E. Noker, David McCormick, Thomas L. Horn, J. Brooks Harder, et al. 2011. « Preclinical Pharmacokinetics, Metabolism, and Toxicity of Azurin-P28 (NSC745104) a Peptide Inhibitor of P53 Ubiquitination ». *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 68 (2): 513-24. <https://doi.org/10.1007/s00280-010-1518-3>.
- Jin, Liqing, Erwin M. Lee, Hayley S. Ramshaw, Samantha J. Busfield, Armando G. Peoppl, Lucy Wilkinson, Mark A. Guthridge, et al. 2009. « Monoclonal Antibody-Mediated Targeting of CD123, IL-3 Receptor Alpha Chain, Eliminates Human Acute Myeloid Leukemic Stem Cells ». *Cell Stem Cell* 5 (1): 31-42. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2009.04.018>.
- Joliot, A., C. Pernelle, H. Deagostini-Bazin, et A. Prochiantz. 1991. « Antennapedia Homeobox Peptide Regulates Neural Morphogenesis ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88 (5): 1864-68.
- Jorgensen, Ine, et Edward A. Miao. 2015. « Pyroptotic Cell Death Defends against Intracellular Pathogens ». *Immunological Reviews* 265 (1): 130-42. <https://doi.org/10.1111/imr.12287>.
- Joselin, Alvin P., Klaus Schulze-Osthoff, et Christian Schwerk. 2006. « Loss of Acinus Inhibits Oligonucleosomal DNA Fragmentation but Not Chromatin Condensation during Apoptosis ». *The Journal of Biological Chemistry* 281 (18): 12475-84. <https://doi.org/10.1074/jbc.M509859200>.
- Kakizuka, A., W. H. Miller, K. Umesono, R. P. Warrell, S. R. Frankel, V. V. Murty, E. Dmitrovsky, et R. M. Evans. 1991. « Chromosomal Translocation t(15;17) in Human Acute Promyelocytic Leukemia Fuses RAR Alpha with a Novel Putative Transcription Factor, PML ». *Cell* 66 (4): 663-74. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90112-c](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90112-c).

- Kapuy, Orsolya, P.K. Vinod, et Gábor Bánhegyi. 2014. « mTOR inhibition increases cell viability via autophagy induction during endoplasmic reticulum stress – An experimental and modeling study ». *FEBS Open Bio* 4 (juillet): 704-13. <https://doi.org/10.1016/j.fob.2014.07.006>.
- Kar, Gozde, Attila Gursoy, et Ozlem Keskin. 2009. « Human Cancer Protein-Protein Interaction Network: A Structural Perspective ». *PLoS Computational Biology* 5 (12): e1000601. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1000601>.
- Karagiota, Angeliki, Maria Kourti, George Simos, et Ilias Mylonis. 2018. « HIF-1 α -Derived Cell-Penetrating Peptides Inhibit ERK-Dependent Activation of HIF-1 and Trigger Apoptosis of Cancer Cells under Hypoxia ». *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, décembre. <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2985-7>.
- Karelson, Mati, et Dimitar Dobchev. 2011. « Using Artificial Neural Networks to Predict Cell-Penetrating Compounds ». *Expert Opinion on Drug Discovery* 6 (8): 783-96. <https://doi.org/10.1517/17460441.2011.586689>.
- Karsli-Uzunbas, Gizem, Jessie Yanxiang Guo, Sandy Price, Xin Teng, Saurabh V. Laddha, Sinan Khor, Nada Y. Kalaany, et al. 2014. « Autophagy is Required for Glucose Homeostasis and Lung Tumor Maintenance ». *Cancer discovery* 4 (8): 914-27. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-14-0363>.
- Katayama, M., T. Kawaguchi, M. S. Berger, et R. O. Pieper. 2007. « DNA Damaging Agent-Induced Autophagy Produces a Cytoprotective Adenosine Triphosphate Surge in Malignant Glioma Cells ». *Cell Death and Differentiation* 14 (3): 548-58. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4402030>.
- Kawaguchi, Yoshimasa, Toshihide Takeuchi, Keiko Kuwata, Junya Chiba, Yasumaru Hatanaka, Ikuhiko Nakase, et Shiroh Futaki. 2016. « Syndecan-4 Is a Receptor for Clathrin-Mediated Endocytosis of Arginine-Rich Cell-Penetrating Peptides ». *Bioconjugate Chemistry* 27 (4): 1119-30. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.6b00082>.
- Kawahara, Masahiro, Ashley Pandolfi, Boris Bartholdy, Laura Barreyro, Britta Will, Michael Roth, Ujunwa C. Okoye-Okafor, et al. 2012. « H2O-like Homeobox Regulates Early Hematopoiesis and Promotes Acute Myeloid Leukemia ». *Cancer Cell* 22 (2): 194-208. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.06.027>.
- Kawamoto, Shuhei, Masako Takasu, Takeshi Miyakawa, Ryota Morikawa, Tatsuki Oda, Shiroh Futaki, et Hidemi Nagao. 2011. « Inverted Micelle Formation of Cell-Penetrating Peptide Studied by Coarse-Grained Simulation: Importance of Attractive Force between Cell-Penetrating Peptides and Lipid Head Group ». *The Journal of Chemical Physics* 134 (9): 095103. <https://doi.org/10.1063/1.3555531>.
- Kenderian, SS, M Ruella, O Shestova, M Klichinsky, V Aikawa, JJD Morrissette, J Scholler, et al. 2015. « CD33-specific chimeric antigen receptor T cells exhibit potent preclinical activity against human acute myeloid leukemia ». *Leukemia* 29 (8): 1637-47. <https://doi.org/10.1038/leu.2015.52>.
- Kermi, Chames. 2016. « Functional interaction between the DNA damage tolerance pathway and the DNA damage checkpoint : implications for genome stability and oncogenesis ».
- Kerr, J. F. R., A. H. Wyllie, et A. R. Currie. 1972. « Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wide-ranging Implications in Tissue Kinetics ». *British Journal of Cancer* 26 (4): 239-57.
- Khong, Hung T., et Nicholas P. Restifo. 2002. « Natural Selection of Tumor Variants in the Generation of “Tumor Escape” Phenotypes ». *Nature Immunology* 3 (11): 999-1005. <https://doi.org/10.1038/ni1102-999>.
- Kikuchi, Akira, et Hideki Yamamoto. 2008. « Tumor Formation Due to Abnormalities in the Beta-Catenin-Independent Pathway of Wnt Signaling ». *Cancer Science* 99 (2): 202-8. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2007.00675.x>.
- Kim, J. W., H. S. Cho, J. H. Kim, S. Y. Hur, T. E. Kim, J. M. Lee, I. K. Kim, et S. E. Namkoong. 2000. « AAC-11 Overexpression Induces Invasion and Protects Cervical Cancer Cells from Apoptosis ». *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology* 80 (4): 587-94. <https://doi.org/10.1038/labinvest.3780063>.
- Kim, Young Seob, Hyun Jin Park, Jung Hwa Park, Eun Ji Hong, Gun-Young Jang, In Duk Jung, Hee Dong Han, et al. 2018. « A novel function of API5 (apoptosis inhibitor 5), TLR4-dependent activation of antigen presenting cells ». *Oncoimmunology* 7 (10). <https://doi.org/10.1080/2162402X.2018.1472187>.
- Kimmelman, Alec C., et Eileen White. 2017. « Autophagy and Tumor Metabolism ». *Cell Metabolism* 25 (5): 1037-43. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.04.004>.

- Klionsky, Daniel J., et Scott D. Emr. 2000. « Autophagy as a Regulated Pathway of Cellular Degradation ». *Science (New York, N.Y.)* 290 (5497): 1717-21.
- Kono, Hajime, et Kenneth L. Rock. 2008. « How dying cells alert the immune system to danger ». *Nature reviews. Immunology* 8 (4): 279-89. <https://doi.org/10.1038/nri2215>.
- Konopleva, Marina, Daniel A. Pollyea, Jalaja Potluri, Brenda Chyla, Leah Hogdal, Todd Busman, Evelyn McKeegan, et al. 2016. « Efficacy and Biological Correlates of Response in a Phase II Study of Venetoclax Monotherapy in Patients with Acute Myelogenous Leukemia ». *Cancer Discovery* 6 (10): 1106-17. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-16-0313>.
- Koo, Gi-Bang, Michael J. Morgan, Da-Gyum Lee, Woo-Jung Kim, Jung-Ho Yoon, Ja Seung Koo, Seung Il Kim, et al. 2015. « Methylation-Dependent Loss of RIP3 Expression in Cancer Represses Programmed Necrosis in Response to Chemotherapeutics ». *Cell Research* 25 (6): 707-25. <https://doi.org/10.1038/cr.2015.56>.
- Kotula, Ewa, Léonard Jagot-Lacoussiere, Heriberto Bruzzoni-Giovanelli, et Jean-Luc Poyet. 2016. « Specific Accumulation of a Cell Penetrating Peptide Targeting AAC-11 in Melanoma Tumors ». *Archives in Cancer Research* 4 (3). <https://doi.org/10.21767/2254-6081.100095>.
- Koutsokeras, Apostolos, Nirupam Purkayastha, Nirupam Purkayashta, Anne Rigby, Maria C. Subang, Michelle Sclanders, Sandrine Vessillier, Lisa Mullen, Yuti Chernajovsky, et David Gould. 2014. « Generation of an Efficiently Secreted, Cell Penetrating NF-KB Inhibitor ». *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 28 (1): 373-81. <https://doi.org/10.1096/fj.13-236570>.
- Kozhikhova, Ksenia V., Sergey M. Andreev, Igor P. Shilovskiy, Anastasiia V. Timofeeva, Alina R. Gaisina, Artem A. Shatilov, Evgeny A. Turetskiy, et al. 2018. « A Novel Peptide Dendrimer LTP Efficiently Facilitates Transfection of Mammalian Cells ». *Organic & Biomolecular Chemistry* 16 (43): 8181-90. <https://doi.org/10.1039/c8ob02039f>.
- Krejci, Pavel. 2012. « Apoptosis inhibitor 5 (API-5; AAC-11; FIF) is upregulated in human carcinomas in vivo ». *Oncology Letters*, février. <https://doi.org/10.3892/ol.2012.593>.
- Kroemer, Guido, Lorenzo Galluzzi, Oliver Kepp, et Laurence Zitvogel. 2013. « Immunogenic Cell Death in Cancer Therapy ». *Annual Review of Immunology* 31: 51-72. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032712-100008>.
- Kroemer, Guido, et Seamus J. Martin. 2005. « Caspase-Independent Cell Death ». *Nature Medicine* 11 (7): 725-30. <https://doi.org/10.1038/nm1263>.
- Krueger, Michael, Matthew Minus, Wei Liu, Xin Long, Alexandra Stevens, Mikhail Kolosov, Edward Sison, David Twardy, Zachary Ball, et Michele Redell. 2015. « A Novel STAT3 Inhibitor Has Potent Activity in Preclinical Models of Acute Myeloid Leukemia That Incorporate the Stromal Environment ». *Blood* 126 (décembre): 569-569. <https://doi.org/10.1182/blood.V126.23.569.569>.
- Kumar, Rakesh, Anupama E. Gururaj, et Christopher J. Barnes. 2006. « P21-Activated Kinases in Cancer ». *Nature Reviews Cancer* 6 (6): 459-71. <https://doi.org/10.1038/nrc1892>.
- Kunz, Manfred, et Saleh M Ibrahim. 2003. « Molecular responses to hypoxia in tumor cells ». *Molecular Cancer* 2 (avril): 23. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-2-23>.
- Lallemand-Breitenbach, Valérie, Marie-Claude Guillemin, Anne Janin, Marie-Thérèse Daniel, Laurent Degos, Scott C. Kogan, J. Michael Bishop, et Hugues de Thé. 1999. « Retinoic Acid and Arsenic Synergize to Eradicate Leukemic Cells in a Mouse Model of Acute Promyelocytic Leukemia ». *The Journal of Experimental Medicine* 189 (7): 1043-52.
- Lallemand-Breitenbach, Valerie, Jun Zhu, Zhu Chen, et Hugues de Thé. 2012. « Curing APL through PML/RARA Degradation by As2O3 ». *Trends in Molecular Medicine* 18 (1): 36-42. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2011.10.001>.
- Lallemand-Breitenbach, Valérie, Jun Zhu, Scott Kogan, Zhu Chen, et Hugues Thé. 2005. « How patients have benefited from mouse models of acute promyelocytic leukaemia ». *Nature reviews. Cancer* 5 (novembre): 821-27. <https://doi.org/10.1038/nrc1719>.
- Lança, Telma, Maria Fernanda Costa, Natacha Gonçalves-Sousa, Margarida Rei, Ana Rita Grosso, Carmen Penido, et Bruno Silva-Santos. 2013. « Protective Role of the Inflammatory CCR2/CCL2 Chemokine Pathway

- through Recruitment of Type 1 Cytotoxic $\Gamma\delta$ T Lymphocytes to Tumor Beds ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 190 (12): 6673-80. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1300434>.
- Laplane, Lucie, et Éric Solary. 2017. « Identité des cellules souches normales et cancéreuses ». *médecine/sciences* 33 (10): 899-904. <https://doi.org/10.1051/medsci/20173310023>.
- Laplane, Lucie, et Eric Solary. s. d. « Towards a classification of stem cells ». *eLife* 8. Consulté le 6 février 2020. <https://doi.org/10.7554/eLife.46563>.
- Ledgerwood, Elizabeth C., et Ian M. Morison. 2009. « Targeting the Apoptosome for Cancer Therapy ». *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 15 (2): 420-24. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-1172>.
- Lee, Su Yeon, Min Kyung Ju, Hyun Min Jeon, Eui Kyong Jeong, Yig Ji Lee, Cho Hee Kim, Hye Gyeong Park, Song Iy Han, et Ho Sung Kang. 2018. « Regulation of Tumor Progression by Programmed Necrosis ». *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2018: 3537471. <https://doi.org/10.1155/2018/3537471>.
- Lee, Yongchan, et Michael Overholtzer. 2019. « After-Death Functions of Cell Death ». *The Yale Journal of Biology and Medicine* 92 (4): 687-94.
- Lefort, Sylvain, Carine Joffre, Yann Kieffer, Anne-Marie Givel, Brigitte Bourachot, Giulia Zago, Ivan Bieche, et al. 2014. « Inhibition of Autophagy as a New Means of Improving Chemotherapy Efficiency in High-LC3B Triple-Negative Breast Cancers ». *Autophagy* 10 (12): 2122-42. <https://doi.org/10.4161/15548627.2014.981788>.
- Legrain, Pierre, et Jean-Christophe Rain. 2014. « Twenty Years of Protein Interaction Studies for Biological Function Deciphering ». *Journal of Proteomics* 107 (juillet): 93-97. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2014.03.038>.
- Leonard, W. J. 2001. « Cytokines and Immunodeficiency Diseases ». *Nature Reviews. Immunology* 1 (3): 200-208. <https://doi.org/10.1038/35105066>.
- Lessene, Guillaume, Peter E. Czabotar, et Peter M. Colman. 2008. « BCL-2 Family Antagonists for Cancer Therapy ». *Nature Reviews. Drug Discovery* 7 (12): 989-1000. <https://doi.org/10.1038/nrd2658>.
- Letai, Anthony G. 2008. « Diagnosing and Exploiting Cancer's Addiction to Blocks in Apoptosis ». *Nature Reviews. Cancer* 8 (2): 121-32. <https://doi.org/10.1038/nrc2297>.
- Levy, Jean M. Mulcahy, Christina G. Towers, et Andrew Thorburn. 2017. « Targeting Autophagy in Cancer ». *Nature Reviews. Cancer* 17 (9): 528-42. <https://doi.org/10.1038/nrc.2017.53>.
- Li, Faqiang, et Richard D. Vierstra. 2012. « Autophagy: A Multifaceted Intracellular System for Bulk and Selective Recycling ». *Trends in Plant Science* 17 (9): 526-37. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2012.05.006>.
- Li, Xingwang, Xinqiang Gao, Yi Wei, Li Deng, Yidan Ouyang, Guoxing Chen, Xianghua Li, Qifa Zhang, et Changyin Wu. 2011. « Rice APOPTOSIS INHIBITOR5 Coupled with Two DEAD-Box Adenosine 5'-Triphosphate-Dependent RNA Helicases Regulates Tapetum Degeneration ». *The Plant Cell* 23 (4): 1416-34. <https://doi.org/10.1105/tpc.110.082636>.
- Lin, Jen-Jyh, Hui-Ying Hsu, Jai-Sing Yang, Kung-Wen Lu, Rick Sai-Chuen Wu, King-Chuen Wu, Tung-Yuan Lai, et al. 2011. « Molecular Evidence of Anti-Leukemia Activity of Gypenosides on Human Myeloid Leukemia HL-60 Cells in Vitro and in Vivo Using a HL-60 Cells Murine Xenograft Model ». *Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology* 18 (12): 1075-85. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2011.03.009>.
- Lockshin, Richard A, et Zahra Zakeri. 2007. « Cell death in health and disease ». *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 11 (6): 1214-24. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2007.00150.x>.
- Logan, Catriona Y., et Roel Nusse. 2004. « The Wnt Signaling Pathway in Development and Disease ». *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 20: 781-810. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.20.010403.113126>.
- Luckheeram, Rishi Vishal, Rui Zhou, Asha Devi Verma, et Bing Xia. 2012. « CD4⁺T Cells: Differentiation and Functions ». *Clinical & Developmental Immunology* 2012: 925135. <https://doi.org/10.1155/2012/925135>.
- Luo, Ji, Nicole L. Solimini, et Stephen J. Elledge. 2009. « Principles of Cancer Therapy: Oncogene and Non-Oncogene Addiction ». *Cell* 136 (5): 823-37. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.02.024>.

- Madani, Fatemeh, Staffan Lindberg, Ülo Langel, Shiroh Futaki, et Astrid Gräslund. 2011. « Mechanisms of Cellular Uptake of Cell-Penetrating Peptides ». *Journal of Biophysics* 2011: 1-10. <https://doi.org/10.1155/2011/414729>.
- Maestro, R., A. P. Dei Tos, Y. Hamamori, S. Krasnokutsky, V. Sartorelli, L. Kedes, C. Doglioni, D. H. Beach, et G. J. Hannon. 1999. « Twist Is a Potential Oncogene That Inhibits Apoptosis ». *Genes & Development* 13 (17): 2207-17. <https://doi.org/10.1101/gad.13.17.2207>.
- Majeti, R. 2011. « Monoclonal Antibody Therapy Directed against Human Acute Myeloid Leukemia Stem Cells ». *Oncogene* 30 (9): 1009-19. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.511>.
- Mandelli, F., D. Diverio, G. Avvisati, A. Luciano, T. Barbui, C. Bernasconi, G. Broccia, et al. 1997. « Molecular Remission in PML/RAR Alpha-Positive Acute Promyelocytic Leukemia by Combined All-Trans Retinoic Acid and Idarubicin (AIDA) Therapy. Gruppo Italiano-Malattie Ematologiche Maligne Dell'Adulto and Associazione Italiana Di Ematologia Ed Oncologia Pediatrica Cooperative Groups ». *Blood* 90 (3): 1014-21.
- Manser, E., T. Leung, H. Salihuddin, Z. S. Zhao, et L. Lim. 1994. « A Brain Serine/Threonine Protein Kinase Activated by Cdc42 and Rac1 ». *Nature* 367 (6458): 40-46. <https://doi.org/10.1038/367040a0>.
- Martinez, Xochiquetzal U., Cosimo Di Raimondo, Farah R. Abdulla, Jasmine Zain, Steven T. Rosen, et Christiane Querfeld. 2019. « Leukaemic Variants of Cutaneous T-Cell Lymphoma: Erythrodermic Mycosis Fungoides and Sézary Syndrome ». *Best Practice & Research. Clinical Haematology* 32 (3): 239-52. <https://doi.org/10.1016/j.beha.2019.06.004>.
- Masson, Adèle de, Marie Beylot-Barry, Jean-David Bouaziz, Régis Peffault de Latour, François Aubin, Sylvain Garciaz, Michel d'Incan, et al. 2014. « Allogeneic Stem Cell Transplantation for Advanced Cutaneous T-Cell Lymphomas: A Study from the French Society of Bone Marrow Transplantation and French Study Group on Cutaneous Lymphomas ». *Haematologica* 99 (3): 527-34. <https://doi.org/10.3324/haematol.2013.098145>.
- Matsuzaki, Katsumi, Ken-ichi Sugishita, et Koichiro Miyajima. 1999. « Interactions of an antimicrobial peptide, magainin 2, with lipopolysaccharide-containing liposomes as a model for outer membranes of Gram-negative bacteria ». *FEBS Letters* 449 (2): 221-24. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(99\)00443-3](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(99)00443-3).
- Mattson, Mark P., et Aiwu Cheng. 2006. « Neurohormetic Phytochemicals: Low-Dose Toxins That Induce Adaptive Neuronal Stress Responses ». *Trends in Neurosciences* 29 (11): 632-39. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2006.09.001>.
- Mayor, Satyajit, et Richard E. Pagano. 2007. « Pathways of Clathrin-Independent Endocytosis ». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 8 (8): 603-12. <https://doi.org/10.1038/nrm2216>.
- McLendon, Patrick M., Bradley S. Ferguson, Hanna Osinska, Md. Shenuarin Bhuiyan, Jeanne James, Timothy A. McKinsey, et Jeffrey Robbins. 2014. « Tubulin hyperacetylation is adaptive in cardiac proteotoxicity by promoting autophagy ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111 (48): E5178-86. <https://doi.org/10.1073/pnas.1415589111>.
- Medzhitov, R. 2002. « Decoding the Patterns of Self and Nonself by the Innate Immune System ». *Science* 296 (5566): 298-300. <https://doi.org/10.1126/science.1068883>.
- Mehta, Rajeshwari R., Tohru Yamada, Brad N. Taylor, Konstantin Christov, Marissa L. King, Dibyen Majumdar, Fatima Lekmine, et al. 2011. « A Cell Penetrating Peptide Derived from Azurin Inhibits Angiogenesis and Tumor Growth by Inhibiting Phosphorylation of VEGFR-2, FAK and Akt ». *Angiogenesis* 14 (3): 355-69. <https://doi.org/10.1007/s10456-011-9220-6>.
- Meyer, C., J. Hofmann, T. Burmeister, D. Gröger, T. S. Park, M. Emerenciano, M. Pombo de Oliveira, et al. 2013. « The MLL Recombinome of Acute Leukemias in 2013 ». *Leukemia* 27 (11): 2165-76. <https://doi.org/10.1038/leu.2013.135>.
- Minet, E, T Arnould, G Michel, I Roland, D Mottet, M Raes, J Remacle, et C Michiels. 2000. « ERK activation upon hypoxia: involvement in HIF-1 activation ». *FEBS Letters* 468 (1): 53-58. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(00\)01181-9](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(00)01181-9).
- Mizushima, Noboru, Beth Levine, Ana Maria Cuervo, et Daniel J. Klionsky. 2008. « Autophagy Fights Disease through Cellular Self-Digestion ». *Nature* 451 (7182): 1069-75. <https://doi.org/10.1038/nature06639>.

- Moreno-Gonzalez, Gabriel, Peter Vandenabeele, et Dmitri V. Krysko. 2016. « Necroptosis: A Novel Cell Death Modality and Its Potential Relevance for Critical Care Medicine ». *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 194 (4): 415-28. <https://doi.org/10.1164/rccm.201510-2106Cl>.
- Morice, William G., Jerry A. Katzmann, Mark R. Pittelkow, Rokea A. el-Azhary, Lawrence E. Gibson, et Curtis A. Hanson. 2006. « A Comparison of Morphologic Features, Flow Cytometry, TCR-Vbeta Analysis, and TCR-PCR in Qualitative and Quantitative Assessment of Peripheral Blood Involvement by Sézary Syndrome ». *American Journal of Clinical Pathology* 125 (3): 364-74.
- Moriwaki, Kenta, Sakthi Balaji, Thomas McQuade, Nidhi Malhotra, Joonsoo Kang, et Francis Ka-Ming Chan. 2014. « The Necroptosis Adaptor RIPK3 Promotes Injury-Induced Cytokine Expression and Tissue Repair ». *Immunity* 41 (4): 567-78. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.09.016>.
- Morris, Erick J., William A. Michaud, Jun-Yuan Ji, Nam-Sung Moon, James W. Rocco, et Nicholas J. Dyson. 2006. « Functional Identification of Api5 as a Suppressor of E2F-Dependent Apoptosis In Vivo ». *PLoS Genetics* 2 (11): e196. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0020196>.
- Moshaver, Bijan, Anna van Rhenen, Angèle Kelder, Marjolein van der Pol, Monique Terwijn, Costa Bachas, August H. Westra, Gert J. Ossenkoppele, Sonja Zweegman, et Gerrit Jan Schuurhuis. 2008. « Identification of a Small Subpopulation of Candidate Leukemia-Initiating Cells in the Side Population of Patients with Acute Myeloid Leukemia ». *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 26 (12): 3059-67. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-0861>.
- Movafegh, Bahareh, Razieh Jalal, Zobeideh Mohammadi, et Seyyede Araste Aldaghi. 2018. « Poly-L-Arginine: Enhancing Cytotoxicity and Cellular Uptake of Doxorubicin and Necrotic Cell Death ». *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*. <https://doi.org/10.2174/1871520618666180412114750>.
- Muller, Sylviane, Susana Brun, Frédérique René, Jérôme de Sèze, Jean-Philippe Loeffler, et Hélène Jeltsch-David. 2017. « Autophagy in Neuroinflammatory Diseases ». *Autoimmunity Reviews* 16 (8): 856-74. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2017.05.015>.
- Nagarajan, Kanipandian, Kannan Soundarapandian, Rick F Thorne, Dongxiao Li, et Deyu Li. 2019. « Activation of Pyroptotic Cell Death Pathways in Cancer: An Alternative Therapeutic Approach ». *Translational Oncology* 12 (7): 925-31. <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2019.04.010>.
- Nagel, Remco, Ekaterina A. Semenova, et Anton Berns. 2016. « Drugging the Addict: Non-Oncogene Addiction as a Target for Cancer Therapy ». *EMBO Reports* 17 (11): 1516-31. <https://doi.org/10.15252/embr.201643030>.
- Nakase, Ikuhiko, Kosuke Noguchi, Ayako Aoki, Tomoka Takatani-Nakase, Ikuo Fujii, et Shiroh Futaki. 2017. « Arginine-Rich Cell-Penetrating Peptide-Modified Extracellular Vesicles for Active Macropinocytosis Induction and Efficient Intracellular Delivery ». *Scientific Reports* 7 (1): 1991. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02014-6>.
- Nasr, Riham, Marie-Claude Guillemin, Omar Ferhi, Hassan Soilihi, Laurent Peres, Caroline Berthier, Philippe Rousselot, et al. 2008. « Eradication of Acute Promyelocytic Leukemia-Initiating Cells through PML-RARA Degradation ». *Nature Medicine* 14 (12): 1333-42. <https://doi.org/10.1038/nm.1891>.
- Nasrollahi, Saman Ahmad, Shamileh Fouladdel, Changiz Taghibiglou, Ebrahim Azizi, et Effat Sadat Farboud. 2012. « A Peptide Carrier for the Delivery of Elastin into Fibroblast Cells ». *International Journal of Dermatology* 51 (8): 923-29. <https://doi.org/10.1111/j.1365-4632.2011.05214.x>.
- Ndoye, Abibatou, et Ashani T. Weeraratna. 2016. « Autophagy- An emerging target for melanoma therapy ». *F1000Research* 5 (juillet). <https://doi.org/10.12688/f1000research.8347.1>.
- Nischan, Nicole, Henry D. Herce, Francesco Natale, Nina Bohlke, Nediljko Budisa, M. Cristina Cardoso, et Christian P. R. Hackenberger. 2015. « Covalent Attachment of Cyclic TAT Peptides to GFP Results in Protein Delivery into Live Cells with Immediate Bioavailability ». *Angewandte Chemie (International Ed. in English)* 54 (6): 1950-53. <https://doi.org/10.1002/anie.201410006>.
- Niu, Xiuran, Zhihui Gao, Shanshan Qi, Linjia Su, Nan Yang, Xiuli Luan, Jia Li, Qing Zhang, Yingli An, et Sihe Zhang. 2018. « Macropinocytosis Activated by Oncogenic Dbl Enables Specific Targeted Delivery of Tat/PDNA Nano-Complexes into Ovarian Cancer Cells ». *International Journal of Nanomedicine* 13: 4895-4911. <https://doi.org/10.2147/IJN.S171361>.

- Nixon, Ralph A., et Dun-Sheng Yang. 2011. « Autophagy Failure in Alzheimer's Disease – Locating the Primary Defect ». *Neurobiology of disease* 43 (1): 38-45. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2011.01.021>.
- Noh, K. H., S.-H. Kim, J. H. Kim, K.-H. Song, Y.-H. Lee, T. H. Kang, H. D. Han, et al. 2014. « API5 Confers Tumoral Immune Escape through FGF2-Dependent Cell Survival Pathway ». *Cancer Research* 74 (13): 3556-66. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-3225>.
- Obeid, Michel, Antoine Tesniere, François Ghiringhelli, Gian Maria Fimia, Lionel Apetoh, Jean-Luc Perfettini, Maria Castedo, et al. 2007. « Calreticulin Exposure Dictates the Immunogenicity of Cancer Cell Death ». *Nature Medicine* 13 (1): 54-61. <https://doi.org/10.1038/nm1523>.
- Olsen, Elise A., Sean Whittaker, Youn H. Kim, Madeleine Duvic, H. Miles Prince, Stuart R. Lessin, Gary S. Wood, et al. 2011. « Clinical End Points and Response Criteria in Mycosis Fungoides and Sézary Syndrome: A Consensus Statement of the International Society for Cutaneous Lymphomas, the United States Cutaneous Lymphoma Consortium, and the Cutaneous Lymphoma Task Force of the European Organisation for Research and Treatment of Cancer ». *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 29 (18): 2598-2607. <https://doi.org/10.1200/JCO.2010.32.0630>.
- Olsen, Jesper V., Blagoy Blagoev, Florian Gnad, Boris Macek, Chanchal Kumar, Peter Mortensen, et Matthias Mann. 2006. « Global, in Vivo, and Site-Specific Phosphorylation Dynamics in Signaling Networks ». *Cell* 127 (3): 635-48. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.09.026>.
- Olson, Emilia S., Todd A. Aguilera, Tao Jiang, Lesley G. Ellies, Quyen T. Nguyen, Edmund H. Wong, Larry A. Gross, et Roger Y. Tsien. 2009. « In Vivo Characterization of Activatable Cell Penetrating Peptides for Targeting Protease Activity in Cancer ». *Integrative Biology: Quantitative Biosciences from Nano to Macro* 1 (5-6): 382-93. <https://doi.org/10.1039/b904890a>.
- Onorati, Angelique V., Matheus Dyczynski, Rani Ojha, et Ravi K. Amaravadi. 2018. « Targeting Autophagy in Cancer ». *Cancer* 124 (16): 3307-18. <https://doi.org/10.1002/cncr.31335>.
- Opferman, Joseph T., et Stanley J. Korsmeyer. 2003. « Apoptosis in the Development and Maintenance of the Immune System ». *Nature Immunology* 4 (5): 410-15. <https://doi.org/10.1038/ni0503-410>.
- Oppenheim, R. W. 1991. « Cell Death during Development of the Nervous System ». *Annual Review of Neuroscience* 14: 453-501. <https://doi.org/10.1146/annurev.ne.14.030191.002321>.
- Oppenheim, R. W., R. A. Flavell, S. Vinsant, D. Pevette, C. Y. Kuan, et P. Rakic. 2001. « Programmed Cell Death of Developing Mammalian Neurons after Genetic Deletion of Caspases ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 21 (13): 4752-60.
- Ortonne, Nicolas, Delphine Huet, Caroline Gaudez, Anne Marie-Cardine, Valérie Schiavon, Martine Bagot, Philippe Musette, et Armand Bensussan. 2006. « Significance of Circulating T-Cell Clones in Sezary Syndrome ». *Blood* 107 (10): 4030-38. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-10-4239>.
- Ortonne, Nicolas, Sabine Le Gouvello, Hicham Mansour, Catherine Poillet, Nadine Martin, Marie-Hélène Delfau-Larue, Karen Leroy, Jean-Pierre Farcet, Martine Bagot, et Armand Bensussan. 2008. « CD158K/KIR3DL2 Transcript Detection in Lesional Skin of Patients with Erythroderma Is a Tool for the Diagnosis of Sézary Syndrome ». *The Journal of Investigative Dermatology* 128 (2): 465-72. <https://doi.org/10.1038/sj.jid.5701013>.
- Osella-Abate, Simona, Alessandro Zaccagna, Paola Savoia, Pietro Quaglino, Barbara Salomone, et Maria Grazia Bernengo. 2001. « Expression of Apoptosis Markers on Peripheral Blood Lymphocytes from Patients with Cutaneous T-Cell Lymphoma during Extracorporeal Photochemotherapy ». *Journal of the American Academy of Dermatology* 44 (1): 40-47. <https://doi.org/10.1067/mjd.2001.108376>.
- Osman, Gizem, Jason Rodriguez, Sze Yan Chan, Jane Chisholm, Gregg Duncan, Namho Kim, Amanda L. Tatler, et al. 2018. « PEGylated enhanced cell penetrating peptide nanoparticles for lung gene therapy ». *Journal of Controlled Release* 285 (septembre): 35-45. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2018.07.001>.
- Pace, K. E., H. P. Hahn, M. Pang, J. T. Nguyen, et L. G. Baum. 2000. « CD7 Delivers a Pro-Apoptotic Signal during Galectin-1-Induced T Cell Death ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 165 (5): 2331-34. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.165.5.2331>.

- Panaretakis, Theocharis, Oliver Kepp, Ulf Brockmeier, Antoine Tesniere, Ann-Charlotte Bjorklund, Daniel C Chapman, Michael Durchschlag, et al. 2009. « Mechanisms of pre-apoptotic calreticulin exposure in immunogenic cell death ». *The EMBO Journal* 28 (5): 578-90. <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.1>.
- Pandolfi, Ashley, Robert F. Stanley, Yiting Yu, Boris Bartholdy, Gopichand Pendurti, Kira Gritsman, Jacqueline Boulwood, Jonathan Chernoff, Amit Verma, et Ulrich Steidl. 2015. « PAK1 Is a Therapeutic Target in Acute Myeloid Leukemia and Myelodysplastic Syndrome ». *Blood* 126 (9): 1118-27. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-12-618801>.
- Panigrahi, Bijayananda, Rohit Kumar Singh, Sourav Mishra, et Dindyal Mandal. 2018. « Cyclic Peptide-Based Nanostructures as Efficient siRNA Carriers ». *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, octobre, 1-11. <https://doi.org/10.1080/21691401.2018.1511574>.
- Park, Han-Hee, Se-Yeon Park, Shinmee Mah, Jung-Hee Park, Soon-Sun Hong, Sungwoo Hong, et You-Sun Kim. 2018. « HS-1371, a novel kinase inhibitor of RIP3-mediated necroptosis ». *Experimental & Molecular Medicine* 50 (9). <https://doi.org/10.1038/s12276-018-0152-8>.
- Pasqualini, R., E. Koivunen, et E. Ruoslahti. 1995. « A Peptide Isolated from Phage Display Libraries Is a Structural and Functional Mimic of an RGD-Binding Site on Integrins ». *The Journal of Cell Biology* 130 (5): 1189-96.
- Pasquereau-Kotula, Ewa, Justine Habault, Guido Kroemer, et Jean-Luc Poyet. 2018. « The Anticancer Peptide RT53 Induces Immunogenic Cell Death ». *PloS One* 13 (8): e0201220. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201220>.
- Peng, Charline, Axel Knebel, Nick A. Morrice, Xiang Li, Kevin Barringer, Jun Li, Scott Jakes, Brian Werneburg, et Lian Wang. 2007. « Pim Kinase Substrate Identification and Specificity ». *Journal of Biochemistry* 141 (3): 353-62. <https://doi.org/10.1093/jb/mvm040>.
- Peng, Jie, Yun Rao, Xue Yang, Ji Jia, Youping Wu, Jianhua Lu, Yuanxiang Tao, et Weifeng Tu. 2017. « Targeting Neuronal Nitric Oxide Synthase by a Cell Penetrating Peptide Tat-LK15/siRNA Bioconjugate ». *Neuroscience Letters* 650: 153-60. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2017.04.045>.
- Peng, Weiyi, Chengwen Liu, Chunyu Xu, Yanyan Lou, Jieqing Chen, Yan Yang, Hideo Yagita, et al. 2012. « PD-1 BLOCKADE ENHANCES T CELL MIGRATION TO TUMORS BY ELEVATING IFN- γ INDUCIBLE CHEMOKINES ». *Cancer research* 72 (20): 5209-18. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-1187>.
- Piper, D. E., A. H. Batchelor, C. P. Chang, M. L. Cleary, et C. Wolberger. 1999. « Structure of a HoxB1-Pbx1 Heterodimer Bound to DNA: Role of the Hexapeptide and a Fourth Homeodomain Helix in Complex Formation ». *Cell* 96 (4): 587-97. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80662-5](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80662-5).
- Plevin, Michael J., Morgon M. Mills, et Mitsuhiro Ikura. 2005. « The LxxLL Motif: A Multifunctional Binding Sequence in Transcriptional Regulation ». *Trends in Biochemical Sciences* 30 (2): 66-69. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2004.12.001>.
- Pollyea, Daniel A., Jonathan A. Gutman, Lia Gore, Clayton A. Smith, et Craig T. Jordan. 2014. « Targeting acute myeloid leukemia stem cells: a review and principles for the development of clinical trials ». *Haematologica* 99 (8): 1277-84. <https://doi.org/10.3324/haematol.2013.085209>.
- Poszepczynska, E., M. Bagot, H. Echchakir, D. Martinvalet, M. Ramez, D. Charue, L. Boumsell, et A. Bensussan. 2000. « Functional Characterization of an IL-7-Dependent CD4(+)CD8 α alpha(+) Th3-Type Malignant Cell Line Derived from a Patient with a Cutaneous T-Cell Lymphoma ». *Blood* 96 (3): 1056-63.
- Poszepczynska-Guigné, Ewa, Valérie Schiavon, Michel D'Incan, Hamid Echchakir, Philippe Musette, Nicolas Ortonne, Laurence Boumsell, Alessandro Moretta, Armand Bensussan, et Martine Bagot. 2004. « CD158k/KIR3DL2 Is a New Phenotypic Marker of Sezary Cells: Relevance for the Diagnosis and Follow-up of Sezary Syndrome ». *The Journal of Investigative Dermatology* 122 (3): 820-23. <https://doi.org/10.1111/j.0022-202X.2004.22326.x>.
- Pouniotis, Dodie S., Vasso Apostolopoulos, et Geoffrey A. Pietersz. 2006. « Penetratin Tandemly Linked to a CTL Peptide Induces Anti-Tumour T-Cell Responses via a Cross-Presentation Pathway ». *Immunology* 117 (3): 329-39. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2005.02304.x>.
- Pouniotis, Dodie, Choon-Kit Tang, Vasso Apostolopoulos, et Geoffrey Pietersz. 2016. « Vaccine Delivery by Penetratin: Mechanism of Antigen Presentation by Dendritic Cells ». *Immunologic Research* 64 (4): 887-900. <https://doi.org/10.1007/s12026-016-8799-5>.

- Poynter, Jenny N., Michaela Richardson, Michelle Roesler, Cindy K. Blair, Betsy Hirsch, Phuong Nguyen, Adina Cioc, James R. Cerhan, et Erica Warlick. 2017. « Chemical Exposures and Risk of Acute Myeloid Leukemia and Myelodysplastic Syndromes in a Population-Based Study ». *International Journal of Cancer* 140 (1): 23-33. <https://doi.org/10.1002/ijc.30420>.
- Presta, Marco, Pasqua Oreste, Giorgio Zoppetti, Mirella Belleri, Elena Tanghetti, Daria Leali, Chiara Urbinati, et al. 2005. « Antiangiogenic Activity of Semisynthetic Biotechnological Heparins: Low-Molecular-Weight-Sulfated Escherichia Coli K5 Polysaccharide Derivatives as Fibroblast Growth Factor Antagonists ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 25 (1): 71-76. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000148863.24445.b4>.
- Prince, H. Miles, Sean Whittaker, et Richard T. Hoppe. 2009. « How I Treat Mycosis Fungoides and Sézary Syndrome ». *Blood* 114 (20): 4337-53. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-07-202895>.
- Pujals, Sílvia, Jimena Fernández-Carneado, M. Dolors Ludevid, et Ernest Giralt. 2008. « D-SAP: A New, Noncytotoxic, and Fully Protease Resistant Cell-Penetrating Peptide ». *ChemMedChem* 3 (2): 296-301. <https://doi.org/10.1002/cmdc.200700267>.
- Pützer, B. M. 2007. « E2F1 Death Pathways as Targets for Cancer Therapy ». *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 11 (2): 239-51. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2007.00030.x>.
- Quezada, Sergio A., Tyler R. Simpson, Karl S. Peggs, Taha Merghoub, Jelena Vider, Xiaozhou Fan, Ronald Blasberg, et al. 2010. « Tumor-Reactive CD4(+) T Cells Develop Cytotoxic Activity and Eradicate Large Established Melanoma after Transfer into Lymphopenic Hosts ». *The Journal of Experimental Medicine* 207 (3): 637-50. <https://doi.org/10.1084/jem.20091918>.
- Ramelyte, Egle, Reinhard Dummer, et Emmanuella Guenova. 2019. « Investigative Drugs for the Treatment of Cutaneous T-Cell Lymphomas (CTCL): An Update ». *Expert Opinion on Investigational Drugs* 28 (9): 799-809. <https://doi.org/10.1080/13543784.2019.1654995>.
- Ramsey, Joshua D., et Nicholas H. Flynn. 2015. « Cell-Penetrating Peptides Transport Therapeutics into Cells ». *Pharmacology & Therapeutics* 154 (octobre): 78-86. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2015.07.003>.
- Randhawa, Jasleen, Hagop Kantarjian, Gautam Borthakur, Philip Thompson, Maria Konopleva, Naval Daver, Naveen Pemmaraju, et al. 2014. « Results of a Phase II Study of Crenolanib in Relapsed/Refractory Acute Myeloid Leukemia Patients (Pts) with Activating FLT3 Mutations ». *Blood* 124 (décembre): 389-389. <https://doi.org/10.1182/blood.V124.21.389.389>.
- Rane, Chetan K, et Audrey Minden. 2014. « P21 activated kinases ». *Small GTPases* 5 (mars). <https://doi.org/10.4161/sgtp.28003>.
- Rappl, G., J. M. Muche, H. Abken, W. Sterry, W. Tilgen, S. Ugurel, et U. Reinhold. 2001. « CD4(+)CD7(-) T Cells Compose the Dominant T-Cell Clone in the Peripheral Blood of Patients with Sézary Syndrome ». *Journal of the American Academy of Dermatology* 44 (3): 456-61. <https://doi.org/10.1067/mjd.2001.110900>.
- Reinisch, Andreas, Steven M. Chan, Daniel Thomas, et Ravindra Majeti. 2015. « Biology and Clinical Relevance of Acute Myeloid Leukemia Stem Cells ». *Seminars in hematology* 52 (3): 150-64. <https://doi.org/10.1053/j.seminhematol.2015.03.008>.
- Renouf, B., E. Hollville, A. Pujals, C. Tétaud, J. Garibal, et J. Wiels. 2009. « Activation of P53 by MDM2 Antagonists Has Differential Apoptotic Effects on Epstein-Barr Virus (EBV)-Positive and EBV-Negative Burkitt's Lymphoma Cells ». *Leukemia* 23 (9): 1557-63. <https://doi.org/10.1038/leu.2009.92>.
- Rhnen, Anna van, Nicole Feller, Angèle Kelder, August H. Westra, Elwin Rombouts, Sonja Zweegman, Marjolein A. van der Pol, Quinten Waisfisz, Gert J. Ossenkoppele, et Gerrit Jan Schuurhuis. 2005. « High Stem Cell Frequency in Acute Myeloid Leukemia at Diagnosis Predicts High Minimal Residual Disease and Poor Survival ». *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 11 (18): 6520-27. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-05-0468>.
- Richard, Jean Philippe, Kamran Melikov, Hilary Brooks, Paul Prevot, Bernard Lebleu, et Leonid V. Chernomordik. 2005. « Cellular Uptake of Unconjugated TAT Peptide Involves Clathrin-Dependent Endocytosis and Heparan Sulfate Receptors ». *The Journal of Biological Chemistry* 280 (15): 15300-306. <https://doi.org/10.1074/jbc.M401604200>.

- Rigou, Patricia, Valeria Piddubnyak, Audrey Faye, Jean-Christophe Rain, Laurence Michel, Fabien Calvo, et Jean-Luc Poyet. 2009. « The antiapoptotic protein AAC-11 interacts with and regulates Acinus-mediated DNA fragmentation ». *The EMBO journal* 28 (11): 1576–1588.
- Roach, H. I., et N. M. Clarke. 2000. « Physiological Cell Death of Chondrocytes in Vivo Is Not Confined to Apoptosis. New Observations on the Mammalian Growth Plate ». *The Journal of Bone and Joint Surgery. British Volume* 82 (4): 601-13. <https://doi.org/10.1302/0301-620x.82b4.9846>.
- Roberts, Andrew W., Matthew S. Davids, John M. Pagel, Brad S. Kahl, Soham D. Puvvada, John F. Gerecitano, Thomas J. Kipps, et al. 2016. « Targeting BCL2 with Venetoclax in Relapsed Chronic Lymphocytic Leukemia ». *The New England Journal of Medicine* 374 (4): 311-22. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1513257>.
- Roelens, M., A. de Masson, C. Ram-Wolff, G. Maki, J.-M. Cayuela, A. Marie-Cardine, A. Bensussan, A. Toubert, M. Bagot, et H. Moins-Teisserenc. 2019. « Revisiting the Initial Diagnosis and Blood Staging of Mycosis Fungoides and Sézary Syndrome with the KIR3DL2 Marker ». *The British Journal of Dermatology*, septembre. <https://doi.org/10.1111/bjd.18481>.
- Roelens, Marie, Marc Delord, Caroline Ram-Wolff, Anne Marie-Cardine, Antonio Alberdi, Guitta Maki, Laurence Homyrda, et al. 2017. « Circulating and Skin-Derived Sézary Cells: Clonal but with Phenotypic Plasticity ». *Blood* 130 (12): 1468-71. <https://doi.org/10.1182/blood-2017-03-772996>.
- Rosenberg, Steven A. 2014. « IL-2: The First Effective Immunotherapy for Human Cancer ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 192 (12): 5451-58. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1490019>.
- Roset, Ramon, Laura Ortet, et Gabriel Gil-Gomez. 2007. « Role of Bcl-2 Family Members on Apoptosis: What We Have Learned from Knock-out Mice ». *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library* 12 (mai): 4722-30. <https://doi.org/10.2741/2421>.
- Rovere-Querini, Patrizia, Annalisa Capobianco, Paola Scaffidi, Barbara Valentinis, Federica Catalanotti, Marta Giazzon, Ingrid E Dumitriu, et al. 2004. « HMGB1 is an endogenous immune adjuvant released by necrotic cells ». *EMBO Reports* 5 (8): 825-30. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400205>.
- Saelens, Xavier, Nele Festjens, Lieselotte Vande Walle, Maria van Gorp, Geert van Loo, et Peter Vandenabeele. 2004. « Toxic Proteins Released from Mitochondria in Cell Death ». *Oncogene* 23 (16): 2861-74. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207523>.
- Sahara, S., M. Aoto, Y. Eguchi, N. Imamoto, Y. Yoneda, et Y. Tsujimoto. 1999. « Acinus Is a Caspase-3-Activated Protein Required for Apoptotic Chromatin Condensation ». *Nature* 401 (6749): 168-73. <https://doi.org/10.1038/43678>.
- Saito, Yoriko, Naoyuki Uchida, Satoshi Tanaka, Nahoko Suzuki, Mariko Tomizawa-Murasawa, Akiko Sone, Yuho Najima, et al. 2010. « Induction of Cell Cycle Entry Eliminates Human Leukemia Stem Cells in a Mouse Model of AML ». *Nature Biotechnology* 28 (3): 275-80. <https://doi.org/10.1038/nbt.1607>.
- Sasaki, Hidefumi, Satoru Moriyama, Haruhiro Yukiue, Yoshihiro Kobayashi, Yoshiaki Nakashima, Masahiro Kaji, Ichiro Fukai, Masanobu Kiriya, Yosuke Yamakawa, et Yoshitaka Fujii. 2001. « Expression of the antiapoptosis gene, AAC-11, as a prognosis marker in non-small cell lung cancer ». *Lung Cancer* 34 (1): 53–57.
- Savill, J S, A H Wyllie, J E Henson, M J Walport, P M Henson, et C Haslett. 1989. « Macrophage phagocytosis of aging neutrophils in inflammation. Programmed cell death in the neutrophil leads to its recognition by macrophages. » *Journal of Clinical Investigation* 83 (3): 865-75.
- Schaffhausen, Joanna. 2015. « Remaining Hurdles to Effective Cancer Therapy ». *Trends in Pharmacological Sciences* 36 (6): v. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2015.04.008>.
- Schenk, Robyn L., Andreas Strasser, et Grant Dewson. 2017. « BCL-2: Long and Winding Path from Discovery to Therapeutic Target ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 482 (3): 459-69. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.10.100>.
- Schmidt, Nathan, Abhijit Mishra, Ghee Hwee Lai, et Gerard C. L. Wong. 2010. « Arginine-rich cell-penetrating peptides ». *FEBS Letters, Frontiers in Membrane Biochemistry*, 584 (9): 1806-13. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.11.046>.

- Schmidt, Susanne V., Stefanie Seibert, Barbara Walch-Rückheim, Benjamin Vicinus, Eva-Maria Kamionka, Jennifer Pahne-Zeppenfeld, Erich-Franz Solomayer, Yoo-Jin Kim, Rainer M. Bohle, et Sigrun Smola. 2015. « RIPK3 expression in cervical cancer cells is required for PolyIC-induced necroptosis, IL-1 α release, and efficient paracrine dendritic cell activation ». *Oncotarget* 6 (11): 8635-47.
- Schmitt, Christian, Anne Marie-Cardine, et Armand Bensussan. 2017. « Therapeutic Antibodies to KIR3DL2 and Other Target Antigens on Cutaneous T-Cell Lymphomas ». *Frontiers in Immunology* 8 (août). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01010>.
- Schreiber, R. D., L. J. Old, et M. J. Smyth. 2011. « Cancer Immunoediting: Integrating Immunity's Roles in Cancer Suppression and Promotion ». *Science* 331 (6024): 1565-70. <https://doi.org/10.1126/science.1203486>.
- Schürmann, A., A. F. Mooney, L. C. Sanders, M. A. Sells, H. G. Wang, J. C. Reed, et G. M. Bokoch. 2000. « P21-Activated Kinase 1 Phosphorylates the Death Agonist Bad and Protects Cells from Apoptosis ». *Molecular and Cellular Biology* 20 (2): 453-61. <https://doi.org/10.1128/mcb.20.2.453-461.2000>.
- Schwab, Cornelia, Jörg Willers, Eva Niederer, Elisabeth Ludwig, Thomas Kündig, Peter Grob, Günter Burg, et Reinhard Dummer. 2002. « The Use of Anti-T-Cell Receptor-Vbeta Antibodies for the Estimation of Treatment Success and Phenotypic Characterization of Clonal T-Cell Populations in Cutaneous T-Cell Lymphomas ». *British Journal of Haematology* 118 (4): 1019-26. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2141.2002.03726.x>.
- Seifert, Lena, Gregor Werba, Shaun Tiwari, Nancy Ngoc Giao Ly, Sara Alothman, Dalia Alqunaibit, Antonina Avanzi, et al. 2016. « The Necrosome Promotes Pancreatic Oncogenesis via CXCL1 and Mincle-Induced Immune Suppression ». *Nature* 532 (7598): 245-49. <https://doi.org/10.1038/nature17403>.
- Sells, M. A., et J. Chernoff. 1997. « Emerging from the Pak: The P21-Activated Protein Kinase Family ». *Trends in Cell Biology* 7 (4): 162-67. [https://doi.org/10.1016/S0962-8924\(97\)01003-9](https://doi.org/10.1016/S0962-8924(97)01003-9).
- Sharma, Rajesh K., Esma S. Yolcu, Abhishek K. Srivastava, et Haval Shirwan. 2013. « CD4+ T Cells Play a Critical Role in the Generation of Primary and Memory Antitumor Immune Responses Elicited by SA-4-1BBL and TAA-Based Vaccines in Mouse Tumor Models ». *PLoS One* 8 (9): e73145. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073145>.
- Shen, Z. X., G. Q. Chen, J. H. Ni, X. S. Li, S. M. Xiong, Q. Y. Qiu, J. Zhu, et al. 1997. « Use of Arsenic Trioxide (As₂O₃) in the Treatment of Acute Promyelocytic Leukemia (APL): II. Clinical Efficacy and Pharmacokinetics in Relapsed Patients ». *Blood* 89 (9): 3354-60.
- Shin, Meong Cheol, Jian Zhang, Kyoung Ah Min, Kyuri Lee, Cheol Moon, Joseph P. Balthasar, et Victor C. Yang. 2014. « Combination of Antibody Targeting and PTD-Mediated Intracellular Toxin Delivery for Colorectal Cancer Therapy ». *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society* 194 (novembre): 197-210. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.08.030>.
- Slack, J. L. 1999. « Biology and Treatment of Acute Progranulocytic Leukemia ». *Current Opinion in Hematology* 6 (4): 236-40. <https://doi.org/10.1097/00062752-199907000-00007>.
- Smith, Drake J., Levina J. Lin, Heesung Moon, Alexander T. Pham, Xi Wang, Siyuan Liu, Sunjong Ji, et al. 2016. « Propagating Humanized BLT Mice for the Study of Human Immunology and Immunotherapy ». *Stem Cells and Development* 25 (24): 1863-73. <https://doi.org/10.1089/scd.2016.0193>.
- Smith, Kortnye Maureen, et Jayesh Desai. 2018. « Nivolumab for the Treatment of Colorectal Cancer ». *Expert Review of Anticancer Therapy* 18 (7): 611-18. <https://doi.org/10.1080/14737140.2018.1480942>.
- Smyth, M. J., N. Y. Crowe, et D. I. Godfrey. 2001. « NK Cells and NKT Cells Collaborate in Host Protection from Methylcholanthrene-Induced Fibrosarcoma ». *International Immunology* 13 (4): 459-63. <https://doi.org/10.1093/intimm/13.4.459>.
- Smyth, Mark J., Gavin P. Dunn, et Robert D. Schreiber. 2006. « Cancer Immunosurveillance and Immunoediting: The Roles of Immunity in Suppressing Tumor Development and Shaping Tumor Immunogenicity ». In *Advances in Immunology*, 90:1-50. Cancer Immunotherapy. Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0065-2776\(06\)90001-7](https://doi.org/10.1016/S0065-2776(06)90001-7).
- Soignet, S. L., P. Maslak, Z. G. Wang, S. Jhanwar, E. Calleja, L. J. Dardashti, D. Corso, et al. 1998. « Complete Remission after Treatment of Acute Promyelocytic Leukemia with Arsenic Trioxide ». *The New England Journal of Medicine* 339 (19): 1341-48. <https://doi.org/10.1056/NEJM199811053391901>.

- Soignet, Steven, et Peter Maslak. 2004. « Therapy of Acute Promyelocytic Leukemia ». *Advances in Pharmacology (San Diego, Calif.)* 51: 35-58. [https://doi.org/10.1016/S1054-3589\(04\)51002-5](https://doi.org/10.1016/S1054-3589(04)51002-5).
- Solary, E. 1998. « [Apoptosis: molecular mechanisms] ». *Comptes Rendus Des Seances De La Societe De Biologie Et De Ses Filiales* 192 (6): 1065-76.
- Solimini, Nicole L., Ji Luo, et Stephen J. Elledge. 2007. « Non-Oncogene Addiction and the Stress Phenotype of Cancer Cells ». *Cell* 130 (6): 986-88. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.09.007>.
- Song, Jian, Chuan Wu, Eva Korpos, Xueli Zhang, Smriti M. Agrawal, Ying Wang, Cornelius Faber, et al. 2015. « Focal MMP-2 and MMP-9 Activity at the Blood-Brain Barrier Promotes Chemokine-Induced Leukocyte Migration ». *Cell Reports* 10 (7): 1040-54. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.01.037>.
- Sors, Aurore, Francette Jean-Louis, Elodie Bégué, Laurent Parmentier, Louis Dubertret, Michel Dreano, Gilles Courtois, Hervé Bachelez, et Laurence Michel. 2008. « Inhibition of IκappaB Kinase Subunit 2 in Cutaneous T-Cell Lymphoma down-Regulates Nuclear Factor-KappaB Constitutive Activation, Induces Cell Death, and Potentiates the Apoptotic Response to Antineoplastic Chemotherapeutic Agents ». *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 14 (3): 901-11. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-1419>.
- Stutman, O. 1974. « Tumor Development after 3-Methylcholanthrene in Immunologically Deficient Athymic-Nude Mice ». *Science (New York, N.Y.)* 183 (4124): 534-36. <https://doi.org/10.1126/science.183.4124.534>.
- . 1979. « Chemical Carcinogenesis in Nude Mice: Comparison between Nude Mice from Homozygous Matings and Heterozygous Matings and Effect of Age and Carcinogen Dose ». *Journal of the National Cancer Institute* 62 (2): 353-58.
- Suojanen, Juho, Justus Reunanen, Tanja-Maria Ranta, Oula Peñate-Medina, Tuula Salo, Per Saris, et Timo Sorsa. 2014. « Peptides against Mac-1 Do Not Sufficiently Target Leukemia or Lymphoma in Vivo ». *Anticancer Research* 34 (2): 645-50.
- Swain, Suryakanta, Prafulla Kumar Sahu, Sarwar Beg, et Sitty Manohar Babu. 2016. « Nanoparticles for Cancer Targeting: Current and Future Directions ». *Current Drug Delivery* 13 (8): 1290-1302.
- Syntichaki, Popi, et Nektarios Tavernarakis. 2002. « Death by necrosis ». *EMBO Reports* 3 (7): 604-9. <https://doi.org/10.1093/embo-reports/kvf138>.
- Szabó, Ildikó, Erika Orbán, Gitta Schlosser, Ferenc Hudecz, et Zoltán Bánóczy. 2016. « Cell-Penetrating Conjugates of Pentaglutamylated Methotrexate as Potential Anticancer Drugs against Resistant Tumor Cells ». *European Journal of Medicinal Chemistry* 115 (juin): 361-68. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.03.034>.
- Tait, Stephen W. G., Andrew Oberst, Giovanni Quarato, Sandra Milasta, Martina Haller, Ruoning Wang, Maria Karvela, et al. 2013. « Widespread Mitochondrial Depletion via Mitophagy Does Not Compromise Necroptosis ». *Cell Reports* 5 (4): 878-85. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.10.034>.
- Tallman, M. S. 1998. « Therapy of Acute Promyelocytic Leukemia: All-Trans Retinoic Acid and Beyond ». *Leukemia* 12 Suppl 1 (septembre): S37-40.
- Tang, Y., Z. Chen, D. Ambrose, J. Liu, J. B. Gibbs, J. Chernoff, et J. Field. 1997. « Kinase-Deficient Pak1 Mutants Inhibit Ras Transformation of Rat-1 Fibroblasts ». *Molecular and Cellular Biology* 17 (8): 4454-64. <https://doi.org/10.1128/mcb.17.8.4454>.
- Tang, Y., H. Zhou, A. Chen, R. N. Pittman, et J. Field. 2000. « The Akt Proto-Oncogene Links Ras to Pak and Cell Survival Signals ». *The Journal of Biological Chemistry* 275 (13): 9106-9. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.13.9106>.
- Tanida, Isei. 2011. « Autophagy Basics ». *Microbiology and Immunology* 55 (1): 1-11. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2010.00271.x>.
- Teng, Michele W. L., Jeremy B. Swann, Catherine M. Koebel, Robert D. Schreiber, et Mark J. Smyth. 2008. « Immune-Mediated Dormancy: An Equilibrium with Cancer ». *Journal of Leukocyte Biology* 84 (4): 988-93. <https://doi.org/10.1189/jlb.1107774>.
- Tesei, Giulio, Mario Vazdar, Malene Ringkjøbing Jensen, Carolina Cragnell, Phil E. Mason, Jan Heyda, Marie Skepö, Pavel Jungwirth, et Mikael Lund. 2017. « Self-Association of a Highly Charged Arginine-Rich Cell-

- Penetrating Peptide ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114 (43): 11428-33. <https://doi.org/10.1073/pnas.1712078114>.
- Tewari, M., M. Yu, B. Ross, C. Dean, A. Giordano, et R. Rubin. 1997. « AAC-11, a Novel CDNA That Inhibits Apoptosis after Growth Factor Withdrawal ». *Cancer Research* 57 (18): 4063-69.
- Thé, H. de, C. Lavau, A. Marchio, C. Chomienne, L. Degos, et A. Dejean. 1991. « The PML-RAR Alpha Fusion MRNA Generated by the t(15;17) Translocation in Acute Promyelocytic Leukemia Encodes a Functionally Altered RAR ». *Cell* 66 (4): 675-84. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90113-d](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90113-d).
- Thé, Hugues de, Morgane Le Bras, et Valérie Lallemand-Breitenbach. 2012. « The Cell Biology of Disease: Acute Promyelocytic Leukemia, Arsenic, and PML Bodies ». *The Journal of Cell Biology* 198 (1): 11-21. <https://doi.org/10.1083/jcb.201112044>.
- Thonnart, Nicolas, Anne Caudron, Isabel Legaz, Martine Bagot, Armand Bensussan, et Anne Marie-Cardine. 2014. « KIR3DL2 Is a Coinhibitory Receptor on Sézary Syndrome Malignant T Cells That Promotes Resistance to Activation-Induced Cell Death ». *Blood* 124 (22): 3330-32. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-09-598995>.
- Tian, Jane, Ana Maria Avalos, Su-Yau Mao, Bo Chen, Kannaki Senthil, Herren Wu, Peggy Parroche, et al. 2007. « Toll-like Receptor 9-Dependent Activation by DNA-Containing Immune Complexes Is Mediated by HMGB1 and RAGE ». *Nature Immunology* 8 (5): 487-96. <https://doi.org/10.1038/ni1457>.
- Tian, Lu, Xiguang Zhang, Dorien Haesen, Jeronimo Bravo, Jesus Fominaya, Sylvain Choquet, Jean Marc Zini, et al. 2018. « Identification of PP2A/Set Binding Sites and Design of Interacting Peptides with Potential Clinical Applications ». *International Journal of Peptide Research and Therapeutics* 24 (4): 479-88. <https://doi.org/10.1007/s10989-017-9633-1>.
- Tomes, Ladislav, Ethan Emberley, Yulian Niu, Sandra Troup, Jaromir Pastorek, Karen Strange, Adrian Harris, et Peter H. Watson. 2003. « Necrosis and Hypoxia in Invasive Breast Carcinoma ». *Breast Cancer Research and Treatment* 81 (1): 61-69. <https://doi.org/10.1023/A:1025476722493>.
- Touzeau, C. 2016. « BH3 mimétiques, molécules ciblant les protéines antiapoptotiques : du rationnel biologique aux succès cliniques », 6.
- Trabulo, Sara, Ana Luísa Cardoso, Miguel Mano, et Maria C. Pedroso de Lima. 2010. « Cell-Penetrating Peptides—Mechanisms of Cellular Uptake and Generation of Delivery Systems ». *Pharmaceuticals* 3 (4): 961-93. <https://doi.org/10.3390/ph3040961>.
- Vacchelli, Erika, Fernando Aranda, Alexander Eggermont, Jérôme Galon, Catherine Sautès-Fridman, Isabelle Cremer, Laurence Zitvogel, Guido Kroemer, et Lorenzo Galluzzi. 2014. « Trial Watch: Chemotherapy with Immunogenic Cell Death Inducers ». *Oncoimmunology* 3 (1): e27878. <https://doi.org/10.4161/onci.27878>.
- Vadlamudi, Ratna K., Christopher J. Barnes, Suresh Rayala, Feng Li, Seetharaman Balasenthil, Stevan Marcus, Holly V. Goodson, Aysegul A. Sahin, et Rakesh Kumar. 2005. « p21-Activated Kinase 1 Regulates Microtubule Dynamics by Phosphorylating Tubulin Cofactor B ». *Molecular and Cellular Biology* 25 (9): 3726-36. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.9.3726-3736.2005>.
- Vadlamudi, Ratna K., Feng Li, Liana Adam, Diep Nguyen, Yasutaka Ohta, Thomas P. Stossel, et Rakesh Kumar. 2002. « Filamin Is Essential in Actin Cytoskeletal Assembly Mediated by P21-Activated Kinase 1 ». *Nature Cell Biology* 4 (9): 681-90. <https://doi.org/10.1038/ncb838>.
- Vadlamudi, Ratna K., Feng Li, Christopher J. Barnes, Rozita Bagheri-Yarmand, et Rakesh Kumar. 2004. « P41-Arc Subunit of Human Arp2/3 Complex Is a P21-Activated Kinase-1-Interacting Substrate ». *EMBO Reports* 5 (2): 154-60. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400079>.
- Vakkila, Jukka, et Michael T. Lotze. 2004. « Inflammation and Necrosis Promote Tumour Growth ». *Nature Reviews. Immunology* 4 (8): 641-48. <https://doi.org/10.1038/nri1415>.
- Van den Berghe, Loïc, Henrik Laurell, Isabelle Huez, Catherine Zanibellato, Herve Prats, et Beatrix Bugler. 2000. « FIF [fibroblast growth factor-2 (FGF-2)-interacting-factor], a nuclear putatively antiapoptotic factor, interacts specifically with FGF-2 ». *Molecular Endocrinology* 14 (11): 1709-1724.
- Vanden Berghe, Tom, Andreas Linkermann, Sandrine Jouan-Lanhouet, Henning Walczak, et Peter Vandenabeele. 2014. « Regulated Necrosis: The Expanding Network of Non-Apoptotic Cell Death Pathways ». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 15 (2): 135-47. <https://doi.org/10.1038/nrm3737>.



- Vassilev, Lyubomir T., Binh T. Vu, Bradford Graves, Daisy Carvajal, Frank Podlaski, Zoran Filipovic, Norman Kong, et al. 2004. « In Vivo Activation of the P53 Pathway by Small-Molecule Antagonists of MDM2 ». *Science (New York, N.Y.)* 303 (5659): 844-48. <https://doi.org/10.1126/science.1092472>.
- Vermeer, Maarten H., Remco van Doorn, Remco Dijkman, Xin Mao, Sean Whittaker, Pieter C. van Voorst Vader, Marie-Jeanne P. Gerritsen, et al. 2008. « Novel and Highly Recurrent Chromosomal Alterations in Sézary Syndrome ». *Cancer Research* 68 (8): 2689-98. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-6398>.
- Viallard, Claire, et Bruno Larrivé. 2017. « Tumor Angiogenesis and Vascular Normalization: Alternative Therapeutic Targets ». *Angiogenesis* 20 (4): 409-26. <https://doi.org/10.1007/s10456-017-9562-9>.
- Vonderheid, Eric C., Maria Grazia Bernengo, Günter Burg, Madeleine Duvic, Peter Heald, Liliane Laroche, Elise Olsen, et al. 2002. « Update on Erythrodermic Cutaneous T-Cell Lymphoma: Report of the International Society for Cutaneous Lymphomas ». *Journal of the American Academy of Dermatology* 46 (1): 95-106. <https://doi.org/10.1067/mjd.2002.118538>.
- Walter, Dagmar, Amelie Lier, Anja Geiselhart, Frederic B. Thalheimer, Sina Huntscha, Mirko C. Sobotta, Bettina Moehrle, et al. 2015. « Exit from Dormancy Provokes DNA-Damage-Induced Attrition in Haematopoietic Stem Cells ». *Nature* 520 (7548): 549-52. <https://doi.org/10.1038/nature14131>.
- Wang, Fang, Jeremy Travins, Byron DeLaBarre, Virginie Penard-Lacronique, Stefanie Schalm, Erica Hansen, Kimberly Straley, et al. 2013. « Targeted Inhibition of Mutant IDH2 in Leukemia Cells Induces Cellular Differentiation ». *Science (New York, N.Y.)* 340 (6132): 622-26. <https://doi.org/10.1126/science.1234769>.
- Wang, R.-A., H. Zhang, S. Balasenthil, D. Medina, et R. Kumar. 2006. « PAK1 Hyperactivation Is Sufficient for Mammary Gland Tumor Formation ». *Oncogene* 25 (20): 2931-36. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209309>.
- Wang, Y., H. Wang, Y. Tao, S. Zhang, J. Wang, et X. Feng. 2014. « Necroptosis Inhibitor Necrostatin-1 Promotes Cell Protection and Physiological Function in Traumatic Spinal Cord Injury ». *Neuroscience* 266 (avril): 91-101. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.02.007>.
- Wang, Yimeng, Xiaoguang Gu, Weiwei Li, Qian Zhang, et Chunlei Zhang. 2018. « PAK1 Overexpression Promotes Cell Proliferation in Cutaneous T Cell Lymphoma via Suppression of PUMA and P21 ». *Journal of Dermatological Science* 90 (1): 60-67. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2017.11.019>.
- Wang, Yupeng, Wenqing Gao, Xuyan Shi, Jingjin Ding, Wang Liu, Huabin He, Kun Wang, et Feng Shao. 2017. « Chemotherapy Drugs Induce Pyroptosis through Caspase-3 Cleavage of a Gasdermin ». *Nature* 547 (7661): 99-103. <https://doi.org/10.1038/nature22393>.
- Wang, Zhuomin, Hongyu Liu, Baoxing Liu, Wei Ma, Xingyang Xue, Jun Chen, et Qinghua Zhou. 2010. « Gene Expression Levels of CSNK1A1 and AAC-11, but Not NME1, in Tumor Tissues as Prognostic Factors in NSCLC Patients ». *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research* 16 (8): CR357-364.
- Warrell, R. P., S. R. Frankel, W. H. Miller, D. A. Scheinberg, L. M. Itri, W. N. Hittelman, R. Vyas, M. Andreeff, A. Tafuri, et A. Jakubowski. 1991. « Differentiation Therapy of Acute Promyelocytic Leukemia with Tretinoin (All-Trans-Retinoic Acid) ». *The New England Journal of Medicine* 324 (20): 1385-93. <https://doi.org/10.1056/NEJM199105163242002>.
- Wechsler, Janine, Martine Bagot, Maria Nikolova, Silvia Parolini, Nadine Martin-Garcia, Laurence Bousmell, Alessandro Moretta, et Armand Bensussan. 2003. « Killer Cell Immunoglobulin-like Receptor Expression Delineates in Situ Sézary Syndrome Lymphocytes ». *The Journal of Pathology* 199 (1): 77-83. <https://doi.org/10.1002/path.1251>.
- Wei, Qing, Kun Mu, Tao Li, Ying Zhang, Zhaowen Yang, Xiaoqing Jia, Wei Zhao, Wanwan Huai, Pengbo Guo, et Lihui Han. 2014. « Deregulation of the NLRP3 Inflammasome in Hepatic Parenchymal Cells during Liver Cancer Progression ». *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology* 94 (1): 52-62. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2013.126>.
- Weinstein, I. Bernard. 2002. « Cancer. Addiction to Oncogenes--the Achilles Heal of Cancer ». *Science (New York, N.Y.)* 297 (5578): 63-64. <https://doi.org/10.1126/science.1073096>.

- Weinstein, I. Bernard, et Andrew K. Joe. 2006. « Mechanisms of Disease: Oncogene Addiction--a Rationale for Molecular Targeting in Cancer Therapy ». *Nature Clinical Practice. Oncology* 3 (8): 448-57. <https://doi.org/10.1038/ncponc0558>.
- Wender, P. A., D. J. Mitchell, K. Pattabiraman, E. T. Pelkey, L. Steinman, et J. B. Rothbard. 2000. « The Design, Synthesis, and Evaluation of Molecules That Enable or Enhance Cellular Uptake: Peptoid Molecular Transporters ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (24): 13003-8. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.24.13003>.
- Werthmüller, N., B. Frey, R. Wunderlich, R. Fietkau, et U. S. Gaigl. 2015. « Modulation of Radiochemoimmunotherapy-Induced B16 Melanoma Cell Death by the Pan-Caspase Inhibitor ZVAD-Fmk Induces Anti-Tumor Immunity in a HMGB1-, Nucleotide- and T-Cell-Dependent Manner ». *Cell Death & Disease* 6 (mai): e1761. <https://doi.org/10.1038/cddis.2015.129>.
- Willemze, R., H. Kerl, W. Sterry, E. Berti, L. Cerroni, S. Chimenti, J. L. Diaz-Peréz, et al. 1997. « EORTC Classification for Primary Cutaneous Lymphomas: A Proposal from the Cutaneous Lymphoma Study Group of the European Organization for Research and Treatment of Cancer ». *Blood* 90 (1): 354-71.
- Winter, Anja, Alicia P. Higuero, May Marsh, Anna Sigurdardottir, Will R. Pitt, et Tom L. Blundell. 2012. « Biophysical and Computational Fragment-Based Approaches to Targeting Protein-Protein Interactions: Applications in Structure-Guided Drug Discovery ». *Quarterly Reviews of Biophysics* 45 (4): 383-426. <https://doi.org/10.1017/S0033583512000108>.
- Xiang, Bai, Xue-Li Jia, Jin-Long Qi, Li-Ping Yang, Wei-Hong Sun, Xiao Yan, Shao-Kun Yang, De-Ying Cao, Qing Du, et Xian-Rong Qi. 2017. « Enhancing siRNA-based cancer therapy using a new pH-responsive activatable cell-penetrating peptide-modified liposomal system ». *International Journal of Nanomedicine* 12 (mars): 2385-2405. <https://doi.org/10.2147/IJN.S129574>.
- Xuan, Yanyan, et Xun Hu. 2009. « Naturally-Occurring Shikonin Analogues--a Class of Necroptotic Inducers That Circumvent Cancer Drug Resistance ». *Cancer Letters* 274 (2): 233-42. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2008.09.029>.
- Yagi, H., Y. Tokura, F. Furukawa, et M. Takigawa. 1996. « CD7-Positive Sézary Syndrome with a Th1 Cytokine Profile ». *Journal of the American Academy of Dermatology* 34 (2 Pt 2): 368-74. [https://doi.org/10.1016/s0190-9622\(07\)80011-9](https://doi.org/10.1016/s0190-9622(07)80011-9).
- Yamada, T., K. Christov, A. Shilkaitis, L. Bratescu, A. Green, S. Santini, A. R. Bizzarri, S. Cannistraro, T. K. D. Gupta, et C. W. Beattie. 2013. « P28, a First in Class Peptide Inhibitor of Cop1 Binding to P53 ». *British Journal of Cancer* 108 (12): 2495-2504. <https://doi.org/10.1038/bjc.2013.266>.
- Yamamoto, Jennifer F., et Marc T. Goodman. 2008. « Patterns of Leukemia Incidence in the United States by Subtype and Demographic Characteristics, 1997-2002 ». *Cancer Causes & Control: CCC* 19 (4): 379-90. <https://doi.org/10.1007/s10552-007-9097-2>.
- Yamashita, Hiroko, Takashi Misawa, Makoto Oba, Masakazu Tanaka, Mikihiro Naito, Masaaki Kurihara, et Yosuke Demizu. 2017. « Development of Helix-Stabilized Cell-Penetrating Peptides Containing Cationic α,α -Disubstituted Amino Acids as Helical Promoters ». *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 25 (6): 1846-51. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.01.044>.
- Yamazaki, T., J. M. Pitt, M. Vétizou, A. Marabelle, C. Flores, Ø Rekdal, G. Kroemer, et L. Zitvogel. 2016. « The Oncolytic Peptide LTX-315 Overcomes Resistance of Cancers to Immunotherapy with CTLA4 Checkpoint Blockade ». *Cell Death and Differentiation* 23 (6): 1004-15. <https://doi.org/10.1038/cdd.2016.35>.
- Yano, Hiroki, Takashi Ishida, Atsushi Inagaki, Toshihiko Ishii, Jianmin Ding, Shigeru Kusumoto, Hirokazu Komatsu, Shinsuke Iida, Hiroshi Inagaki, et Ryuzo Ueda. 2007. « Defucosylated Anti CC Chemokine Receptor 4 Monoclonal Antibody Combined with Immunomodulatory Cytokines: A Novel Immunotherapy for Aggressive/Refractory Mycosis Fungoides and Sezary Syndrome ». *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 13 (21): 6494-6500. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-1324>.
- Yatim, Nader, Hélène Jusforgues-Saklani, Susana Orozco, Oliver Schulz, Rosa Barreira da Silva, Caetano Reis e Sousa, Douglas R. Green, Andrew Oberst, et Matthew L. Albert. 2015. « RIPK1 and NF-KB Signaling in Dying

- Cells Determines Cross-Priming of CD8⁺ T Cells ». *Science (New York, N.Y.)* 350 (6258): 328-34. <https://doi.org/10.1126/science.aad0395>.
- Ye, Junxiao, Meong Cheol Shin, Qiuling Liang, Huining He, et Victor C. Yang. 2015. « 15 Years of ATTEMPTS: A Macromolecular Drug Delivery System Based on the CPP-Mediated Intracellular Drug Delivery and Antibody Targeting ». *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society* 205 (mai): 58-69. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.12.002>.
- Yoshizaki, Tomokazu, Hiroshi Sato, et Mitsuru Furukawa. 2002. « Recent Advances in the Regulation of Matrix Metalloproteinase 2 Activation: From Basic Research to Clinical Implication (Review) ». *Oncology Reports* 9 (3): 607-11.
- Yu, Mei, Xiaolong Li, Xiaofeng Huang, Jing Zhang, Yan Zhang, et Hua Wang. 2018. « A New Cell Penetrating Peptide (KRP) with Multiple Physicochemical Properties Endows Doxorubicin with Tumor Targeting and Improves Its Therapeutic Index ». *ACS Applied Materials & Interfaces*, décembre. <https://doi.org/10.1021/acsami.8b21027>.
- Zaki, Md. Hasan, Mohamed Lamkanfi, et Thirumala-Devi Kanneganti. 2011. « The Nlrp3 Inflammasome: Contributions to Intestinal Homeostasis ». *Trends in Immunology* 32 (4): 171-79. <https://doi.org/10.1016/j.it.2011.02.002>.
- Zanzoni, Andreas, Montserrat Soler-López, et Patrick Aloy. 2009. « A Network Medicine Approach to Human Disease ». *FEBS Letters* 583 (11): 1759-65. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.03.001>.
- Zeng, Zhihong, Yue Xi Shi, Ismael J. Samudio, Rui-Yu Wang, Xiaoyang Ling, Olga Frolova, Mark Levis, et al. 2009. « Targeting the Leukemia Microenvironment by CXCR4 Inhibition Overcomes Resistance to Kinase Inhibitors and Chemotherapy in AML ». *Blood* 113 (24): 6215-24. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-05-158311>.
- Zhang, Pengcheng, Andrew G. Cheetham, Lye Lin Lock, et Honggang Cui. 2013. « Cellular Uptake and Cytotoxicity of Drug-Peptide Conjugates Regulated by Conjugation Site ». *Bioconjugate Chemistry* 24 (4): 604-13. <https://doi.org/10.1021/bc300585h>.
- Zhang, Su-Jiang, Raajit Rampal, Taghi Manshouri, Jay Patel, Nana Mensah, Andrew Kayserian, Todd Hricik, et al. 2012. « Genetic Analysis of Patients with Leukemic Transformation of Myeloproliferative Neoplasms Shows Recurrent SRSF2 Mutations That Are Associated with Adverse Outcome ». *Blood* 119 (19): 4480-85. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-11-390252>.
- Zhang, T. D., G. Q. Chen, Z. G. Wang, Z. Y. Wang, S. J. Chen, et Z. Chen. 2001. « Arsenic Trioxide, a Therapeutic Agent for APL ». *Oncogene* 20 (49): 7146-53. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204762>.
- Zhang, Yingchi, Yufeng Gao, Hui Zhang, Jingliao Zhang, Fuhong He, Aleš Hnízda, Maoxiang Qian, et al. 2018. « PDGFRB mutation and tyrosine kinase inhibitor resistance in Ph-like acute lymphoblastic leukemia ». *Blood* 131 (20): 2256-61. <https://doi.org/10.1182/blood-2017-11-817510>.
- Zhivotovsky, Boris, et Sten Orrenius. 2003. « Defects in the Apoptotic Machinery of Cancer Cells: Role in Drug Resistance ». *Seminars in Cancer Biology* 13 (2): 125-34. [https://doi.org/10.1016/s1044-579x\(02\)00130-x](https://doi.org/10.1016/s1044-579x(02)00130-x).
- Zhou, H., S. Forveille, A. Sauvat, T. Yamazaki, L. Senovilla, Y. Ma, P. Liu, et al. 2016. « The Oncolytic Peptide LTX-315 Triggers Immunogenic Cell Death ». *Cell Death & Disease* 7 (mars): e2134. <https://doi.org/10.1038/cddis.2016.47>.
- Zhou, Heng, Sabrina Forveille, Allan Sauvat, Valentina Sica, Valentina Izzo, Sylvère Durand, Kevin Müller, et al. 2015. « The Oncolytic Peptide LTX-315 Kills Cancer Cells through Bax/Bak-Regulated Mitochondrial Membrane Permeabilization ». *Oncotarget* 6 (29): 26599-614. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.5613>.
- Zhou, Jingyi, Gangyang Wang, Yinze Chen, Hongxia Wang, Yingqi Hua, et Zhengdong Cai. 2019. « Immunogenic cell death in cancer therapy: Present and emerging inducers ». *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 23 (8): 4854-65. <https://doi.org/10.1111/jcmm.14356>.
- Zitvogel, Laurence, Noelia Casares, Marie O. Péquignot, Nathalie Chaput, Matthew L. Albert, et Guido Kroemer. 2004. « Immune Response against Dying Tumor Cells ». *Advances in Immunology* 84: 131-79. [https://doi.org/10.1016/S0065-2776\(04\)84004-5](https://doi.org/10.1016/S0065-2776(04)84004-5).

Review

Recent Advances in Cell Penetrating Peptide-Based Anticancer Therapies

Justine Habault ^{1,2}  and Jean-Luc Poyet ^{1,2,3,*} 

¹ INSERM U976, Institut de Recherche St Louis, 1 avenue Claude Vellefaux, 75010 Paris, France; justine.habault@inserm.fr

² Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, 75013 Paris, France

³ c-Dithem, Inserm Consortium for Discovery and Innovation in Therapy and Medicine, 75013 Paris, France

* Correspondence: jean-luc.poyet@inserm.fr

Academic Editor: Rakesh K. Tiwari

Received: 28 January 2019; Accepted: 3 March 2019; Published: 7 March 2019



Abstract: Cell-penetrating-peptides (CPPs) are small amino-acid sequences characterized by their ability to cross cellular membranes. They can transport various bioactive cargos inside cells including nucleic acids, large proteins, and other chemical compounds. Since 1988, natural and synthetic CPPs have been developed for applications ranging from fundamental to applied biology (cell imaging, gene editing, therapeutics delivery). In recent years, a great number of studies reported the potential of CPPs as carriers for the treatment of various diseases. Apart from a good efficacy due to a rapid and potent delivery, a crucial advantage of CPP-based therapies is the peptides low toxicity compared to most drug carriers. On the other hand, they are quite unstable and lack specificity. Higher specificity can be obtained using a cell-specific CPP to transport the therapeutic agent or using a non-specific CPP to transport a cargo with a targeted activity. CPP-cargo complexes can also be conjugated to another moiety that brings cell- or tissue-specificity. Studies based on all these approaches are showing promising results. Here, we focus on recent advances in the potential usage of CPPs in the context of cancer therapy, with a particular interest in CPP-mediated delivery of anti-tumoral proteins.

Keywords: cell-penetrating-peptides; protein transduction domains; cancer

1. Introduction

According to the World Health Organization, cancer (or malignant neoplasm) is the second leading cause of death worldwide (about 1 death in 6). This term regroups a large number of diseases all characterized by an abnormal division of cells that can invade nearby tissues and other parts of the body through the blood and lymph system (source: National Institutes of Health (NIH)—National Cancer Institute). Much effort has been dedicated to finding novel therapies against cancer in the past decades, but many obstacles must be overcome, such as drug-resistance, toxicity towards non-malignant cells and side effects, and inefficiency of drug delivery [1]. For the latter, one cause can be the inaptitude of pharmaceutical compounds to cross the plasma membrane, a semi-permeable hydrophobic barrier that insures the integrity of cells [2]. Hence, several recent studies focus on the development of alternative drug delivery systems, such as viral based-vectors, nanoparticles, or cell-penetrating peptides (CPPs) that enhance cell internalization [3–5]. CPPs, also known as protein transduction domains (PTDs), are defined as short peptides (less than 30 residues) with the ability to cross biological membranes in an energy-dependent or -independent manner [5]. In 1988, Joliot and his team discovered the Antennapedia homeodomain protein, a drosophila transcription factor able to enter nerve cells and control neural morphogenesis genes [6]. Shortly after, Derossi and colleagues identified the first CPP by demonstrating that the third helix of the Antennapedia homeodomain protein, named Penetratin, was the minimal sequence necessary for cell entrance [7]. Since then, more than 1700 CPPs have been

characterized and listed in the CPPsite 2.0 database [8]. They have been experimentally validated for in vitro and in vivo delivery of small or large (up to 120 kDA) bioactive cargo inside cells [7,9–22]. Several complete reviews describe different ways to classify CPPs, for example, depending on their origin (protein-derived, synthetic, or chimeric), their physicochemical properties (cationic, amphipatic, or hydrophobic), or their uptake mechanism [5,16,23–34]. A non-exhaustive list of well-known CPPs is shown in Table 1.

Table 1. Classification of cell penetrating peptides.

Peptide	Sequence	Type	Length	Origin	References
Antennapedia Penetratin (43–58)	RQIKIWFQNRRMKWKK	Cationic and amphipatic	16	Protein-derived	Derossi et al., 1996 [7]
HIV-1 TAT protein (48–60)	GRKKRRQRRRPPQ	Cationic	13	Protein-derived	Green and Loewenstein, 1988; Frankel and Pabo, 1988 [8,9]
pVEC Cadherin (615–632)	LLIILRRRIRKQAHASK	Amphipatic	18	Protein-derived	Elmquist et al., 2001 [10]
Transportan Galanine/Mastoparan	GWTLNSAGYLLGKINKAL AALAKKIL	Amphipatic	27	Chimeric	Pooga et al., 1998 [11]; Langel et al., 1996 [12]
MPG HIV-gp41/SV40 T-antigen	GALFLGFLGAAGSTMGAWS QPKKKRKY	Amphipatic	27	Chimeric	Morris et al., 1997 [13]
Pep-1 HIV-reverse transcriptase/SV40 T-antigen	KETWWETWWTEWSQPKKKRKY	Amphipatic	21	Chimeric	Morris et al., 2001 [14]
Polyarginines	R(n); 6 < n < 12	Cationic	6–12	Synthetic	Wender et al., 2000 [15]
MAP	KLALKLALKALKAALKLA	Amphipatic	18	Synthetic	Oehlke et al., 1998 [16]
R6W3	RRWRRRWR	Cationic	9	Synthetic	Delaroché et al., 2007 [17]
NLS	CGYGPKKKRKYGG	Cationic	13	Protein-derived	Ragin et al., 2002 [18]
8-lysines	KKKKKKKK	Cationic	8	Synthetic	Mai et al., 2002 [19]
ARF (1–22)	MVRRFLVTLRIRACGPPRVRV	Amphipatic	22	Protein-derived	Johansson et al., 2008 [20]
Azurin-p28	LSTAADMQGVVTDGMASGLDKD YLKPDD	Anionic	28	Protein-derived	Taylor BN et al., 2009 [21]

It is also possible to sort CPPs depending on their range of applications. Indeed, thanks to their unique ability to transport various cargos inside cells with limited toxicity [28], CPPs are now considered as a powerful tool for both fundamental biology and medical applications. For instance, they can deliver contrast agents, such as Quantum dots [35] or metal chelates [36], for cell imaging purposes. Moreover, they can transport nucleic acids (siRNA, antisense oligomers, plasmids, decoy DNA), for which intracellular delivery is often limited by high molecular weight and negative charges, making the regulation of gene expression easier [29]. Finally, they can mediate drug delivery, ranging from nanoparticles to therapeutic proteins, and have been successfully used in a number of in vitro and in vivo studies. Importantly, while CPPs are able to cross cellular membranes, several studies demonstrated that most of them cannot cross the blood-brain barrier (BBB), which protects the central nervous system from toxicity. More than 25 CPP-conjugated drugs are under clinical development in applications as diverse as inflammation [37,38], pain [39–41], cancer [42], heart diseases [43–45], and aging [46]. An up-to-date version of completed phase I to III clinical trials is shown in Table 2.

Table 2. Selection of CPP-based therapies under clinical development.

CPP	Cargo	Application	Status	Compound	Company	ClinicalTrial.gov ID
R7	Cyclosporine A	Psoriasis	Phase II terminated 2003	PsorBan	CellGate. Inc	N/A
TAT	δ PKC inhibitor	Heart attack	Phase II completed 2011	KAI-9803	KAI Pharmaceutical	NCT00785954
PTD4	HSP20 phosphopeptide	Wound healing	Phase II completed 2012	AZX-100	Capstone Therapeutics	NCT00825916
P28	P28	Central Nervous System Tumors	Phase I completed 2013	P28	Pediatric Brain Tumor Consortium	NCT01975116
P28	P28	Solid tumors	Phase I completed 2014	P28	CDG Therapeutics. Inc	NCT00914914
N/A	N/A	Duchenne Muscular Dystrophy (DMD)	Phase II completed 2015	AVI-4658	Sarepta Therapeutics	NCT00844597
TAT	JNK-1	Intraocular inflammation and pain	Phase III completed 2016	XG-102	Xigen SA	NCT02235272
TAT	JNK-1	Acute inner ear hearing loss	Phase III completed 2017	AM-111	Auris Medical	NCT02561091
MTS	Botulinum toxin A	Cervical Dystonia	Phase II completed 2018	R-002	Reavance Therapeutics	NCT02706795

The diversity of pathways and cell types targeted demonstrates the boundless potential of CPP-based therapies. Their success comes not only from their great intracellular delivery performance but also from their versatility; they are simple to synthesize, to modify, and to improve. However, to date, there are still no FDA approved CPP-conjugated drugs and several clinical trials have been discontinued. Among the reasons we can quote are: (1) *in vivo* stability issues, due to frequent susceptibility to proteolytic degradation [47]; (2) immunogenicity issues; (3) poor efficiency due to the drug's failure to escape from endosomes after being internalized by cells; (4) toxicity due to the degradation of excipients; and (5) toxicity or poor efficiency due to the CPP's lack of specificity. Indeed, while it is known that cationic CPPs interact with glycosaminoglycans [48], it is not yet established whether they can bind to specific membrane receptors. A wide biodistribution of CPP-conjugated drugs can lead to a reduction of drug efficiency due to a lower local concentration. Cost must also be considered, as well as risks of off-target effects. Hence, maximizing tumoral cell targeting while sparing normal cells is crucial.

In view of these challenges, we here present a review of the methods for CPP optimization and the latest promising CPP-based anticancer therapeutic strategies, especially CPP-protein complexes.

2. CPPs as Molecular Carriers in Cancer

2.1. CPP-Cargo Complexes Internalization

CPPs and their molecular cargoes can be bound using two different approaches. One way is to link CPPs and cargoes non-covalently using electrostatic interactions. For example, amphipathic peptide carriers, such as MPG and Pep-1, can form complexes with cargoes without the need for any crosslinking or chemical alterations [30,31,49,50]. The other way, which is more frequent, is to make a covalent connection between the two molecules. This method has been extensively used and has shown good results with carriers as varied as Penetratin, TAT, or Polyarginines [31,51,52].

Several models have been proposed for CPP internalization, but the exact mechanism remains poorly understood. However, evidence supports that both direct translocation (energy-independent mechanism) and endocytosis (energy-dependent) are involved in the cellular uptake process [27,32,53]. For direct translocation, at least three models have been described: the inverted micelle model due

to the lipid bilayer interaction with the peptide [54], the pore formation [55], and the “carpet” model (membrane destabilization) [56]. For endocytosis, caveolae, and clathrin independent or dependent pathways have been reported [57–59], as well as macropinocytosis [60–62]. A summary of CPP internalization models is shown in Figure 1. It also seems that many factors, such as experimental conditions (temperature and pH), cell type, nature of CPP, nature of cargo, amount of CPP, and cargo are influencing the translocation process, as well as endosomal escape efficiency [27,32,53].

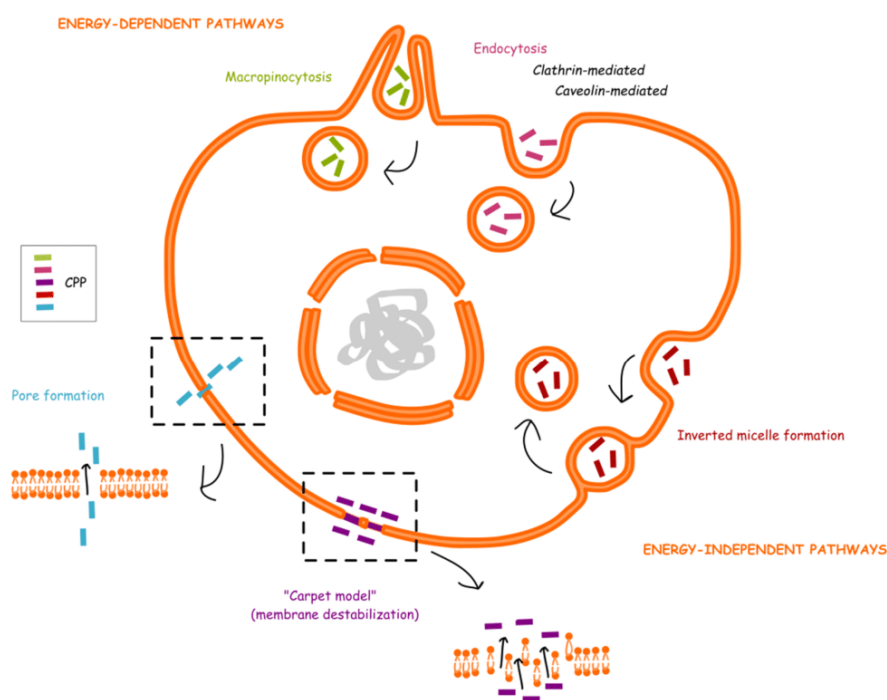


Figure 1. CPP translocation mechanisms.

2.2. Delivery of Chemotherapeutic Agents

In the past few years, a handful of studies suggested that linking chemotherapeutic agents to CPPs could increase their efficiency by promoting intracellular delivery. For instance, Szabo et al. showed that methotrexate (MTX) covalently attached to the N-terminal of CPPs (Penetratin or R8) via peptide bonds more efficiently enter breast cancer cells, especially MTX-resistant cells [63]. More recently, Movafegh and co-workers demonstrated that poly-L-arginine could also increase the cellular uptake of doxorubicin (DOX), as well as its cytotoxicity towards human prostate cancer cells [64]. Likewise, doxorubicin's stable conjugation via covalent bond with other CPPs, such as TAT (transactivator of transcription) and Penetratin, as well as the novel KRP, enhances its therapeutic effect [65–67]. In particular, KRP-DOX accumulates in the tumors by the enhanced permeability and retention (EPR) effect and KRP, thanks to its two nuclear localization sequences, leads the drug to the nucleus. Another example is the combination of Paclitaxel (PTX) with TAT—the covalent drug-peptide complexes display a greater anti-tumoral activity against human lung and breast cancer cell lines. Based on their uptake experiment results, the authors speculate that PTX-TAT may enter the tumor cells via an energy-independent, direct translocation pathway [68]. Finally, the experiment by Izabela et al. indicated that Transportan 10 (TP10) significantly improves the anti-cancer effect of cisplatin in human cervical tumoral and osteosarcoma cells compared to the drug alone. In this setting, non-covalent carrier-cargo complexes are formed with a metal-affinity-based linkage, and TP10-cisplatin seems to enter tumor cells via non-endocytic concentration-dependent pathways [69]. All these reports

and several others provide evidence that the use of CPP for the delivery of chemotherapy may be therapeutically valuable thanks to enhanced pharmaceutical features.

2.3. Delivery of Nucleic Acids

Another field of medicine that could benefit from the use of CPP is gene therapy. Gene therapy represents a real hope for the prevention and treatment of many diseases, including cancer. However, nucleic acids are large and hydrophilic, meaning they are not able to cross cell membranes [29]. To overcome this problem, different vectors have been used but most of them, especially viral particles, display a high toxicity [70]. It is now known that cationic CPPs, such as TAT [61] or hPP10 [70], can be bound in a covalent or non-covalent fashion to unprotected nucleic acids (plasmid DNA and small interfering RNA). In the context of cancer, Lee and colleagues recently investigated the ability of a new CPP, BR2, to bind to VEGF siRNA and inhibit the expression of target genes [71]. VEGF is a key mediator of angiogenesis, a hallmark of cancer [72]. Their experiments suggest that cationic BR2 can form electrostatic interactions with anionic VEGF-siRNA thanks to the addition of nitrogen/phosphate (ratios above 4) and that the positively charged complexes of BR2-siRNA can enter the cytoplasm of cells to promote knockdown of target genes. Another interesting work has been performed by Fang et al. on breast cancer models. They developed and characterized a new gene silencing approach: siRNA targeting CCL2 linked to TAT by non-covalent “soft” calcium bounds [73], which regulates the balance between TAT-siRNA complex stabilization and siRNA release after cellular uptake [74]. The chemokine CCL2 is overexpressed in invasive breast cancers and regulates their progression through multiple mechanisms [75]. They show that Ca-TAT/CCL2 siRNA can be efficiently delivered *in vitro* to breast cancer cells and *in vivo* to mice bearing triple negative breast cancer cell (MDA-MB-231) tumors. The results indicate that CPP-cargo complexes inhibit growth tumor and metastasis, as well as cancer stem cell renewal and recruitment of M2 macrophages. Among many other promising targets for CPP-siRNA therapeutic strategies, we can quote Nrf2, a transcription factor which can provide cancer cells with a growth advantage and cause resistance to chemotherapy in many cancers, including lung cancers [76,77]. Cyclin B1, the regulatory subunit of cyclin-dependent kinase 1 (Cdk1), is another interesting target, as it is overexpressed in several cancer cells and plays a role in cancer cell survival and proliferation [78]. In their study, Morris et al. used a peptide nucleic acid (PNA) analog of anti-cyclin B1 linked to a CPP called Pep-3. They showed that the intra-tumoral injection of the drug into prostatic tumor-bearing mice inhibits tumor growth [79]. Of note, as described initially by Gait and his team, PNA are a good alternative to oligonucleotides as they are unaffected by cellular nucleases and have strong RNA binding ability [80]. Moreover, they lack negative charge, which facilitates CPP conjugation.

2.4. Delivery of Proteins

Last but not least, an emerging strategy for the treatment of cancers relies on protein therapy. Twenty years ago, Dowdy and colleagues made the observation that CPPs such as TAT could delivery large biologically active proteins (120kDa β -galactosidase) into several organs after intraperitoneal injection into the mouse, without crossing the BBB [81]. This important breakthrough opened the gate for the use of CPP-conjugated therapeutic proteins and vaccine peptides. In the past 10 years, many research groups have tried to use CPPs for the development of vaccine delivery systems [82]. The aim is to deliver antigenic peptides into any antigen presenting cell, such as dendritic cells, ensuing processing and presentation followed by induction of an immune response. For instance, Pouniotis et al. describe the use of Penetratin linked to cytotoxic T lymphocyte epitopes derived from ovalbumin or mucin-1 tumor-associated antigens. In their paper, they show that these complexes are able to induce a stimulation of CD4+ and CD8+ T cells *in vitro*. *In vivo*, the secretion of cytokines due to T cell response inhibits B16.OVA melanoma cell growth. Moreover, pre-immunization with Penetratin-OVA protects mice from a subsequent tumor challenge [83,84]. This year, Brooks et al.’s work highlighted the therapeutic potential of a CPP linked to mucin-1 and T-cell epitopes. In a tumor vaccination model,

this peptide induces multiple immune responses and delays mucin-1 tumors in mice [85]. In the same period, Shahbazi and Bolhassani performed a comparison of six cell penetrating peptides for the delivery of HPV16 E7 antigen in the context of HPV. E7 is an oncoprotein constitutively expressed by HPV-infected cells, and as such, a therapeutic vaccine target. Data obtained indicate that CPPs Pep-1, Cady-2, p28, and hPP10 can mediate E7 antigen entry into tumoral cells and that immunization of mice induces a long-term protection against tumor challenge, especially in the p28-E7 group [86].

Interestingly, p28 itself presents an anti-tumoral activity; p28 holds its penetrating properties from a domain derived from the protein azurin (amino acids 50 to 67), called p18 [22]. The full-length peptide prevents p53 ubiquitination in cancer cells, and thus induces a post-translational increase of p53 [87]. This peptide is able to inhibit angiogenesis and cancer cell growth [42,87,88]. In addition, p28 has been characterized as a tumor-homing peptide, meaning that it preferentially enters tumor cells [22]. In fact, Noei and his team took advantage of this property to design a novel therapeutic strategy, based on the fusion of p28 to apoptin [89]. Apoptin accumulates in the nucleus of tumoral cells, where it induces apoptosis in a p53-dependent manner [90]. Noei et al. show that p28-mediated targeted delivery of apoptin allows a selective cytotoxicity towards breast cancer cells, while sparing normal cells.

In the development of therapeutic peptides, the modulation of protein-protein interactions (PPIs) is also receiving a great deal of attention. PPIs are involved in almost every cellular process and tidily regulate signaling pathways. Thus, targeting deregulated PPIs in cancer could be an efficient therapeutic strategy. Tian et al.'s work focuses on SET-PP2A interaction [91]. SET is an oncoprotein that inhibits PP2A activity, a well-known tumor suppressor [92]. They engineered two peptides composed of a CPP Mut3DPT, linked to either SET or PP2A interaction sites: Mut3DPT-SET and Mut3DPT-PP2A. Data suggest that these peptides can both disrupt SET-PP2A interaction and have an anti-tumoral effect in vitro and in vivo. The same research team generated a Ras/Raf interfering peptide linked to Mut3DPT [93]. Ras/Raf activation is involved in the development of lymphoid cancers. The results of the study indicate that their peptide can interfere with the Ras/Raf pathway and induce tumoral cell death in vitro in chronic lymphocytic leukemia cell lines and primary cells. In vivo, treatment with the peptide extends survival in mice xenograft models. Other groups have identified interesting protein-protein interactions that could be potential targets in cancer [94–96]. 10 years ago, we reported the great interest of targeting the anti-apoptosis clone-11 (AAC-11) protein activity [97]. AAC-11 is an anti-apoptotic protein overexpressed in many cancer cells and tissues [98]. Its interaction with apoptosis-related proteins is known to be involved in different mechanisms leading to the development and progression of cancer [89]. A particularly interesting protein is the nuclear factor Acinus, which plays a role in the DNA fragmentation involved in the apoptotic process, and in which interaction with AAC-11 abrogates this function [98]. Results obtained previously showed that AAC-11 also has a critical role in the sensitivity to apoptosis induced by antitumor agents [99]. In particular, this protein negatively controls E2F1-dependent apoptosis [98]. It was also demonstrated that AAC-11 increased the formation of metastases via the Erk pathway [100] and that it was involved in the immune system escape through the FGF-2 cellular survival pathway [101]. Interestingly, inactivating mutations within the LZ domain of AAC-11, which functions as a protein-protein interaction module, reveals its pro-metastatic and anti-apoptotic properties, indicating the importance of this LZ domain for the carcinogenic properties of AAC-11 [100,101]. Thus, blocking AAC-11 sites of interaction (an alpha-helical leucine-zipper domain) could potentially inhibit the downstream pathways involved in tumoral cell activity. Therefore, we designed RT53, a peptide composed of the CPP Penetratin linked to the leucine zipper domain of AAC-11 as a competitive inhibitor of AAC-11 [89]. Our results show that RT53 is a tumor-homing peptide, able to selectively induce cell death in cancer cells while sparing normal cells [92,93]. In vivo, RT53 inhibits the growth of both BRAF wild-type and V600E mutant melanoma xenograft tumors [93]. More recently, we demonstrated that RT53 can induce immunogenic cell death via the emission of danger signals and in a fibrosarcoma tumor vaccination model [102]. Hence, this peptide could represent a promising therapeutic approach for melanoma

and other cancers patients, as it encompasses both anti-tumor and immunotherapeutic effects, while presenting a tumor-homing property.

3. CPP-Based Anti-Cancer Therapy Optimization

As stated before, clinical applications of CPPs depend on the improvement of important parameters: the delay of degradation of CPPs by enzymes circulating in the plasma, the endosomal escape efficiency, and the improvement of cell/tissue-specificity.

3.1. Chemical Modifications to Enhance Therapeutic Delivery and Stability

Although the sequences of CPPs are rather variable, some structural features are commonly retrieved. For example, CPPs are generally composed of positively charged amino acids, with an advantage of arginine residues over lysines for internalization due to the presence of a guanidium group [65,103–106]. They also often display α -helical regions which have been shown to enter cells more effectively [107]. An optimal size and hydrophobicity are also important factors. Because of these known elements, it is now easier to predict the ability of a short peptide to penetrate cell membranes, using computational approaches, such as Hällbrink/Hansen et al., algorithm [108,109], or the AAN modeling method [110].

Several research groups focus on the synthesis of novel CPP sequences or the optimization of existing CPP sequences [104,111]. Their work consists of finding the shortest sequence necessary for cell entrance with the best delivery efficiency (cellular uptake and endosomal escape) and the best stability. This can be done by replacing some residues. For instance, in order to decrease sensitivity to cellular degradation, lysines can be replaced with unnatural ornithines [112], and L-amino acids can be replaced by D-amino acids [47]. It is possible to design protease-resistant CPP by the use of a shielding strategy. Indeed, positively charged CPPs can interact with negatively charged polymers, such as polyethylene glycol (PEG). Addition of PEG protects CPPs against degradation, bringing metabolic stability in the bloodstream and a longer biological half-time [113]. It is important to find the right balance between a good stability, insuring the delivery of the CPP-conjugated drug to the targeted cellular component, and its necessary elimination that prevents unwanted toxicity.

Another approach is to modify the structure of the CPP. For example, it is possible to enhance cellular uptake by changing peptides into cyclic peptides [51,114,115], dendrimers [116], or transform their side chains [117–119]. Furthermore, the addition of trifluoromethylquinoline moieties [120] or replacement of certain residues with histidines are common strategies to make endosomolytic CPPs [121,122]. As another option, Oskolkov et al. engineered stearylated TP10 analogs, named NickFects, with enhanced endosomal escape efficiency [123]. It is important to ensure that none of the peptides' modifications alter their solubility, ease of synthesis, or toxicity.

Of note, the conditions and biochemical/structural modifications should be optimized individually according to the transduction task, due to a strong relationship between cell types, cargoes, and CPPs. Indeed, non-covalent cargo/CPP complexes are stabilized by common interactions between molecules, including polar, ionic, or hydrophobic interactions. Thus, different cargoes show different rank orders for "best" carrier. Moreover, it has been shown that the CPP's mechanism of entry into cells is strongly influenced by the properties of the cargo. For instance, CPP TAT cellular uptake varies depending on the size of the cargo: for short peptides (less than 50 amino acids), a rapid and direct penetration occurs, while for bigger proteins (more than 50 amino acids), CPP-cargo are internalized via endosomal vesicles with slow rates [124].

3.2. Tumor-Homing CPPs

The most straightforward way to obtain specificity towards cancer cells is to develop tumor-homing CPPs. Biopanning of phage displayed peptide libraries on cells or tissues is one of the most common methods to identify such peptides. In this technique, the target cell type is exposed to a large combinatorial library of phages, which are modified in a way that their envelope

can carry peptides of different lengths and structures. It is then possible to discriminate which phages associated to which peptides can bind or be internalized by tumoral cells and their normal counterparts. The strength of this method is that cell-specific peptides can be isolated without the prerequisite of knowing a surface biomarker [125,126]. In recent years, it allowed for identification of some tumor-homing peptides. For example, it has been found that the tripeptide motif Arg-Gly-Asp (RGD) was able to recognize specific integrins present at the surface of cancer cells [127]. Shortly after, it has been shown that coupling RGD-motif integrin ligands to chemotherapeutic agent doxorubicin allows for improvement of its efficiency towards humans breast cancer cells in vivo with limited toxicity [128]. Using the same technique, Zhou et al. found a novel CPP called MT23 with mouse melanoma cell specificity. MT23 can only enter B16 melanoma cancer cells and MT23-apoptin can significantly inhibit tumor growth and induce the cell apoptosis in B16 tumor-bearing mice [129].

The preference of some peptides for cancer cells has been discovered more randomly. For instance, BR2, which was initially designed as a shorter derivative of the anti-tumoral peptide buforin IIb, showed unexpected tumor-homing ability through interaction with ganglioside, via lipid-mediated macropinocytosis [130]. For its part, KRP is a basic polypeptide, which tends to accumulate in the acidic microenvironment of tumors. Then, cationic KRP is apt to adsorb to the negative charges of heparin D sulfate in the membrane of tumor cells through electrostatic interaction [67], while p28 and RT53 have also been shown to specifically target tumor cells [22,89]. The factor(s) responsible for this favorable property still remain to be investigated. It could be due to intrinsic features of tumoral tissues and cells or to the expression of a specific surface biomarker.

In addition, some groups have tried to engineer more complex delivery systems, conjugating a third molecule that confers specificity to the CPP-cargo composite. For example, Xiang et al. designed a novel tumor targeting drug delivery system by attaching a CPP called dNP2 to HPMA, a copolymer known to specifically target tumor tissues via the passive-targeting process (EPR effect) [131]. Results show that HPMA-dNP2-doxorubicin conjugates display higher and more specific uptake in cancer cells with enhanced activity compared to the drug alone.

3.3. CPP-Antibody Conjugates

Another strategy to improve specificity is based on tumor targeting using monoclonal antibodies (mAb). For example, Shin and colleagues designed a complex system composed on one side of a conjugate of heparin and a murine anti-CEA (anti-carcinoembryonic antigen) monoclonal antibody, and on the other side of a TAT-gelonin fusion protein [132]. CEA stands for anti-carcinoembryonic antigen, a receptor overexpressed at the surface of colorectal cancer cells. Gelonin is an inhibitor of protein synthesis with a strong cytotoxic effect. The two conjugates are able to associate through an electrostatic interaction between the cationic TAT and anionic heparin. The antibody specifically binds to CEA antigens overexpressed in the cancer cells. Once targeted, slowly released TAT-gelonin from the anti-CEA-heparin conjugate counterpart internalizes into tumor cells via TAT-mediated transduction, which results in apoptosis of the tumor cells. In vivo, treatment with the CPP-antibody conjugate induces a significant inhibition of tumor growth. This system, called "ATTEMPTS" (antibody targeted triggered electrically modified prodrug type strategy) has been declined in several other CPP-conjugated drugs and enables the drug to efficiently address potential specificity issues [133].

3.4. Activatable CPPs

Activatable cell-penetrating peptides (ACPP) are systems in which the CPP's cell-penetrating function is masked with an anionic peptide by a cleavable linker. Once in the tumor tissue, proteolysis of the linker activates the cell-penetrating function of CPP [26]. Ingeniously, Tsien and his team took advantage of ACPP cleavable by matrix metalloproteinase-2 (MMP-2), known to be upregulated in most solid tumors, and to promote tumorigenesis. These ACPPs can target many xenograft tumor models from different cancer sites [134]. Similar strategies have been successfully used in several studies. For instance, in Cheng et al.'s experiments, the shielding group of 2,3-dimethylmaleic

anhydride (DMA) is used to inhibit the cell-penetrating ability of the CPP (R8) at physiological pH 7.4. At tumor extracellular pH 6.8, the hydrolysis of DMA leads to charge reversal, activating the function of CPP to lead the cargo (doxorubicine) inside cells. Data showed that the ACPD exhibited significant tumor growth inhibition *in vivo* [135]. In another study, the ACPD is composed of a CPP (R8), an acid-labile linker (hydrazone), and a polyanionic domain. At pH 7.4, the positive charges of R8 are shielded by electrostatic interactions with the polyanionic domain. At pH 6.8, however, the inhibitory peptide detaches due to interaction breakage. Then, the unshielded CPP enters tumoral cells where it delivers its cargo, a polo-like kinase 1 siRNA that favors apoptosis [136]. There are numerous application examples of this novel ACPD system that take advantage of the tumoral microenvironment properties, in particular pH [26].

3.5. Passive Targeting with Intracellular Specificity

Finally, an interesting lead could be to rely on cellular mechanisms (deregulated pathways or conditions) unique to tumoral cells. In this strategy, there is no need for a cell-specific CPP. In practice, one example could be to take advantage of hypoxia, a phenomenon common to the majority of cancer cells. Hypoxia-inducible factors (HIFs) are the main effectors of cell response to hypoxia, by which they promote cancer cell survival and progression. Overexpression of ETD (ERK Targeted Domain) variants cause HIF-1 inactivation [137]. Thus, Karagiota and co-workers designed TAT-EDT peptides to target cancer cells under hypoxia in hepatocarcinoma models. Their data show a specific cytotoxic effect towards those tumoral cells, while producing no effects in normoxic cells [138]. In another strategy, Darwish and his team have designed a cyclic CPP conjugated with doxorubicine via disulfide bridge to construct a smart drug delivery system Dox-SS-CPP. The disulfide bridge is expected to increase the activity of the conjugate inside cancer cells because it can be cleaved with intracellular thiol, such as glutathione, which is more active in cancer cells compared to normal cells. Indeed, their results demonstrate an enhance cytotoxic effect of the conjugate towards cancer cells compared to the drug alone, with a limited toxicity [139].

4. Summary and Concluding Remarks

In the past 30 years, much effort has been dedicated to finding novel therapies against cancer. CPPs are receiving more attention thanks to their ability to deliver large cargoes of various nature inside cells. However, there is still no FDA (Food and Drug Administration) approved CPP-conjugated drug, although p28 is listed in two phase I trials (clinicaltrials.gov) for the treatment of solid p53 tumor [42]. The issues to address before translating CPPs into clinics are the following: the route of administration (oral administration is the best option for pharmaceutical industries); the stability *in vivo* and the non-specific intracellular uptake. Great progress has been made to improve those parameters. Indeed, many novel CPP-based delivery systems have been developed, introducing chemical and structural modifications or anti-proteases shielding for example. In the search for enhanced specificity, incredible advance has been made. Two main strategies have received particular attention: engineering peptides with a preference for tumoral cells or targeting cancer cell intracellular properties (summarized in Figure 2).

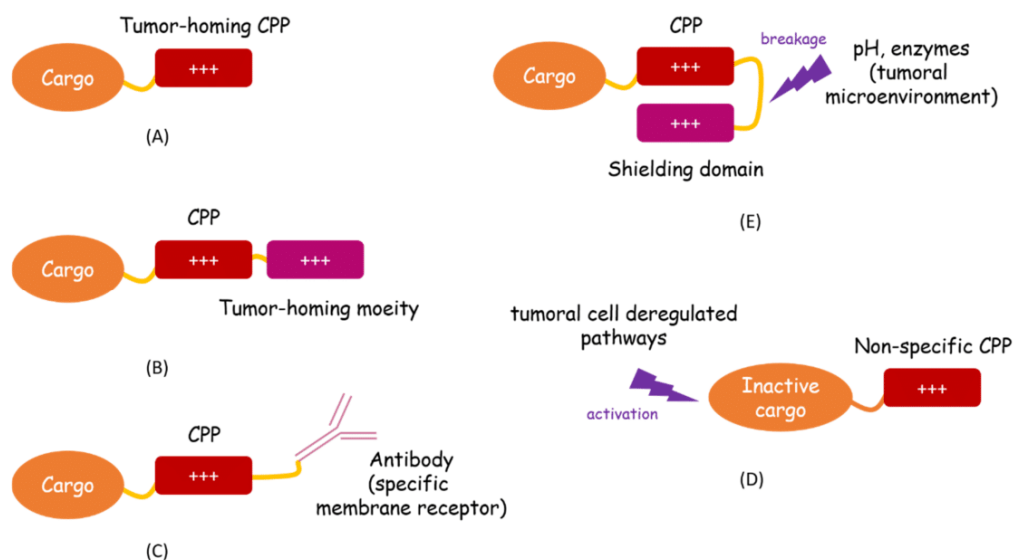


Figure 2. Strategies for tumor-specific CPP-conjugate delivery. To further enhance CCP-mediated intracellular uptake of conjugates, cargos can be linked to either tumor-homing CPPs (A), tumor-homing moiety (B) or membrane receptor specific antibody (C). Moreover, CPP-based drugs can be designed so they are only activated in the close neighborhood of tumor, where the microenvironment is different (D) or inside the transformed cell (E).

For the first strategy, the easiest way is to develop tumor-homing CPPs (Figure 2A). These peptides have a particular affinity for cancer cells or tissues because of physicochemical features of the tumor, or because of the expression of a specific biomarker. CPPs can also be coupled to a moiety that brings specificity towards tumoral cells (Figure 2B) or to an antibody that recognizes a specific marker expressed at the membrane of cancer cells (Figure 2C). Finally, it is possible to use ACP— that is to say, shielding strategies, in which the CPP function is inactive in physiological conditions but activated in the close neighborhood of tumor, where the microenvironment is different (Figure 2D). For the second approach, CPP can enter any kind of cell but the cargo is only active inside tumoral cells, where molecular pathways are deregulated (Figure 2E). In terms of clinical applications, many factors need to be considered: cost, ease of synthesis, elimination, and immunogenicity, among others. Taking these elements into account, tumor-homing CPPs seems to be the most promising approach. Indeed, they are short and quickly eliminated, with a negligible toxicity. They are less expensive to produce than CPP-antibody conjugates. Moreover, the addition of complex molecules, such as antibodies, liposomes, nanoparticles, or biopolymers, increases the risk of immunogenicity. The same evaluation should be made concerning the cargo. Although coupling with a tumor-homing CPP appears to be a useful tool to reduce the chemotherapeutic agent's toxicity, the risk of off-target effects, as well as development of resistance mechanisms, remain substantial. Application of gene therapy, while very promising in the case of inherited monogenic disorders, seems to be much more complicated in the context of cancer. The abnormalities are polygenic and there is high genetic heterogeneity, not only between tumors in different patients, but also between tumors at different sites within the same individual. On the contrary, targeting protein-protein interactions with CPP-protein conjugates allows for interference with many different pathways which are common to all tumors, with a limited risk of resistance-mechanism development. Stimulating the immune system with vaccine peptides also holds great promise. This technology allows the immune system cells to recognize tumor antigens more effectively and specifically attack and destroy cancer cells. Ultimately, peptides such as RT53 that combine (1) a tumor-homing property to (2) a specific effect on protein-protein interactions involved in cancer to (3) a specific immune response seem to be the most promising therapeutic strategy.

Author Contributions: J.H. drafted the manuscript. J.-L.P. discussed the manuscript, contributed to the final version, and approved the final manuscript.

Funding: This research was founded by la Ligue Contre le Cancer (Grant No SR17/75-38) to J.-L.P.

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

References

1. Schaffhausen, J. Remaining hurdles to effective cancer therapy. *Trends Pharmacol. Sci.* **2015**, *36*, v. [CrossRef] [PubMed]
2. Groves, J.T. Membrane Mechanics in Living Cells. *Dev. Cell* **2019**, *48*, 15–16. [CrossRef] [PubMed]
3. Swain, S.; Sahu, P.K.; Beg, S.; Babu, S.M. Nanoparticles for Cancer Targeting: Current and Future Directions. *Curr. Drug Deliv.* **2016**, *13*, 1290–1302. [CrossRef] [PubMed]
4. Deshpande, P.P.; Biswas, S.; Torchilin, V.P. Current trends in the use of liposomes for tumor targeting. *Nanomedicine (Lond.)* **2013**, *8*, 1509–1528. [CrossRef] [PubMed]
5. Ye, J.; Liu, E.; Yu, Z.; Pei, X.; Chen, S.; Zhang, P.; Shin, M.-C.; Gong, J.; He, H.; Yang, V.C. CPP-Assisted Intracellular Drug Delivery, What Is Next? *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17*, 1892. [CrossRef] [PubMed]
6. Joliot, A.; Pernelle, C.; Deagostini-Bazin, H.; Prochiantz, A. Antennapedia homeobox peptide regulates neural morphogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, *88*, 1864–1868. [CrossRef] [PubMed]
7. Derossi, D.; Joliot, A.H.; Chassaing, G.; Prochiantz, A. The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 10444–10450. [PubMed]
8. CPPsite 2.0: A Repository of Experimentally Validated Cell-Penetrating Peptides. Available online: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26586798> (accessed on 20 January 2019).
9. Green, M.; Loewenstein, P.M. Autonomous functional domains of chemically synthesized human immunodeficiency virus tat trans-activator protein. *Cell* **1988**, *55*, 1179–1188. [CrossRef]
10. Frankel, A.D.; Bredt, D.S.; Pabo, C.O. Tat protein from human immunodeficiency virus forms a metal-linked dimer. *Science* **1988**, *240*, 70–73. [CrossRef] [PubMed]
11. Elmquist, A.; Lindgren, M.; Bartfai, T.; Langel, U. VE-cadherin-derived cell-penetrating peptide, pVEC, with carrier functions. *Exp. Cell Res.* **2001**, *269*, 237–244. [CrossRef] [PubMed]
12. Pooga, M.; Hällbrink, M.; Zorko, M.; Langel, U. Cell penetration by transportan. *FASEB J.* **1998**, *12*, 67–77. [CrossRef] [PubMed]
13. Langel, U.; Pooga, M.; Kairane, C.; Zilmer, M.; Bartfai, T. A galanin-mastoparan chimeric peptide activates the Na⁺,K⁺-ATPase and reverses its inhibition by ouabain. *Regul. Pept.* **1996**, *62*, 47–52. [CrossRef]
14. Morris, M.C.; Vidal, P.; Chaloin, L.; Heitz, F.; Divita, G. A new peptide vector for efficient delivery of oligonucleotides into mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* **1997**, *25*, 2730–2736. [CrossRef] [PubMed]
15. Morris, M.C.; Depollier, J.; Mery, J.; Heitz, F.; Divita, G. A peptide carrier for the delivery of biologically active proteins into mammalian cells. *Nat. Biotechnol.* **2001**, *19*, 1173–1176. [CrossRef] [PubMed]
16. Wender, P.A.; Mitchell, D.J.; Pattabiraman, K.; Pelkey, E.T.; Steinman, L.; Rothbard, J.B. The design, synthesis, and evaluation of molecules that enable or enhance cellular uptake: Peptoid molecular transporters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 13003–13008. [CrossRef] [PubMed]
17. Oehlke, J.; Scheller, A.; Wiesner, B.; Krause, E.; Beyermann, M.; Klauschenz, E.; Melzig, M.; Bienert, M. Cellular uptake of an alpha-helical amphipathic model peptide with the potential to deliver polar compounds into the cell interior non-endocytically. *Biochim. Biophys. Acta* **1998**, *1414*, 127–139. [CrossRef]
18. Delaroche, D.; Aussedat, B.; Aubry, S.; Chassaing, G.; Burlina, F.; Clodic, G.; Bolbach, G.; Lavielle, S.; Sagan, S. Tracking a new cell-penetrating (W/R) nonapeptide, through an enzyme-stable mass spectrometry reporter tag. *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 1932–1938. [CrossRef] [PubMed]
19. Ragin, A.D.; Morgan, R.A.; Chmielewski, J. Cellular import mediated by nuclear localization signal Peptide sequences. *Chem. Biol.* **2002**, *9*, 943–948. [CrossRef]
20. Mai, J.C.; Shen, H.; Watkins, S.C.; Cheng, T.; Robbins, P.D. Efficiency of protein transduction is cell type-dependent and is enhanced by dextran sulfate. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 30208–30218. [CrossRef] [PubMed]
21. Johansson, H.J.; El-Andaloussi, S.; Holm, T.; Mäe, M.; Jänes, J.; Maimets, T.; Langel, Ü. Characterization of a Novel Cytotoxic Cell-penetrating Peptide Derived From p14ARF Protein. *Mol. Ther.* **2008**, *16*, 115–123. [CrossRef] [PubMed]

22. Taylor, B.N.; Mehta, R.R.; Yamada, T.; Lekmine, F.; Christov, K.; Chakrabarty, A.M.; Green, A.; Bratescu, L.; Shilkaitis, A.; Beattie, C.W.; et al. Noncationic peptides obtained from azurin preferentially enter cancer cells. *Cancer Res.* **2009**, *69*, 537–546. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Bechara, C.; Sagan, S. Cell-penetrating peptides: 20 years later, where do we stand? *FEBS Lett.* **2013**, *587*, 1693–1702. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Copolovici, D.M.; Langel, K.; Eriste, E.; Langel, Ü. Cell-Penetrating Peptides: Design, Synthesis, and Applications. *ACS Nano* **2014**, *8*, 1972–1994. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Guo, Z.; Peng, H.; Kang, J.; Sun, D. Cell-penetrating peptides: Possible transduction mechanisms and therapeutic applications. *Biomed. Rep.* **2016**, *4*, 528–534. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Jafari, S.; Maleki Dizaj, S.; Adibkia, K. Cell-penetrating peptides and their analogues as novel nanocarriers for drug delivery. *Bioimpacts* **2015**, *5*, 103–111. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Madani, F.; Lindberg, S.; Langel, Ü.; Futaki, S.; Gräslund, A. Mechanisms of Cellular Uptake of Cell-Penetrating Peptides. *J. Biophys.* **2011**, *2011*, 414729. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Guidotti, G.; Brambilla, L.; Rossi, D. Cell-Penetrating Peptides: From Basic Research to Clinics. *Trends Pharmacol. Sci.* **2017**, *38*, 406–424. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Ramsey, J.D.; Flynn, N.H. Cell-penetrating peptides transport therapeutics into cells. *Pharmacol. Ther.* **2015**, *154*, 78–86. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Feni, L.; Neundorff, I. The Current Role of Cell-Penetrating Peptides in Cancer Therapy. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2017**, *1030*, 279–295. [[PubMed](#)]
31. Bolhassani, A.; Jafarzade, B.S.; Mardani, G. In vitro and in vivo delivery of therapeutic proteins using cell penetrating peptides. *Peptides* **2017**, *87*, 50–63. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Trabulo, S.; Cardoso, A.L.; Mano, M.; de Lima, M.C.P. Cell-Penetrating Peptides—Mechanisms of Cellular Uptake and Generation of Delivery Systems. *Pharmaceuticals* **2010**, *3*, 961–993. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Zahid, M.; Robbins, P. Cell-Type Specific Penetrating Peptides: Therapeutic Promises and Challenges. *Molecules* **2015**, *20*, 13055–13070. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Skotland, T.; Iversen, T.G.; Torgersen, M.L.; Sandvig, K. Cell-penetrating peptides: Possibilities and challenges for drug delivery in vitro and in vivo. *Molecules* **2015**, *20*, 13313–13323. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Derivery, E.; Bartolami, E.; Matile, S.; Gonzalez-Gaitan, M. Efficient Delivery of Quantum Dots into the Cytosol of Cells Using Cell-Penetrating Poly(disulfide)s. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 10172–10175. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Cosgrave, L.; Devocelle, M.; Forster, R.J.; Keyes, T.E. Multimodal cell imaging by ruthenium polypyridyl labelled cell penetrating peptides. *Chem. Commun. (Camb.)* **2010**, *46*, 103–105. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Fu, L.-S.; Wu, Y.-R.; Fang, S.-L.; Tsai, J.-J.; Lin, H.-K.; Chen, Y.-J.; Chen, T.-Y.; Chang, M.D.-T. Cell Penetrating Peptide Derived from Human Eosinophil Cationic Protein Decreases Airway Allergic Inflammation. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 12352. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Gurney, L.R.I.; Taggart, J.; Tong, W.-C.; Jones, A.T.; Robson, S.C.; Taggart, M.J. Inhibition of Inflammatory Changes in Human Myometrial Cells by Cell Penetrating Peptide and Small Molecule Inhibitors of NFκB. *Front. Immunol.* **2018**, *9*, 2966. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Peng, J.; Rao, Y.; Yang, X.; Jia, J.; Wu, Y.; Lu, J.; Tao, Y.; Tu, W. Targeting neuronal nitric oxide synthase by a cell penetrating peptide Tat-LK15/siRNA bioconjugate. *Neurosci. Lett.* **2017**, *650*, 153–160. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Garcia-Caballero, A.; Gadotti, V.M.; Chen, L.; Zamponi, G.W. A cell-permeant peptide corresponding to the cUBP domain of USP5 reverses inflammatory and neuropathic pain. *Mol. Pain* **2016**, *12*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Ma, W.-Y.; Murata, E.; Ueda, K.; Kuroda, Y.; Cao, M.-H.; Abe, M.; Shigemi, K.; Hirose, M. A synthetic cell-penetrating peptide antagonizing TrkA function suppresses neuropathic pain in mice. *J. Pharmacol. Sci.* **2010**, *114*, 79–84. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Jia, L.; Gorman, G.S.; Coward, L.U.; Noker, P.E.; McCormick, D.; Horn, T.L.; Harder, J.B.; Muzzio, M.; Prabhakar, B.; Ganesh, B.; et al. Preclinical pharmacokinetics, metabolism, and toxicity of azurin-p28 (NSC745104) a peptide inhibitor of p53 ubiquitination. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2011**, *68*, 513–524. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Betts, C.A.; Wood, M.J.A. Cell penetrating peptide delivery of splice directing oligonucleotides as a treatment for Duchenne muscular dystrophy. *Curr. Pharm. Des.* **2013**, *19*, 2948–2962. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

44. Koutsokeras, A.; Purkayastha, N.; Purkayashtha, N.; Rigby, A.; Subang, M.C.; Sclanders, M.; Vessillier, S.; Mullen, L.; Chernajovsky, Y.; Gould, D. Generation of an efficiently secreted, cell penetrating NF- κ B inhibitor. *FASEB J.* **2014**, *28*, 373–381. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Gurbel, P.A.; Bliden, K.P.; Turner, S.E.; Tantry, U.S.; Gesheff, M.G.; Barr, T.P.; Covic, L.; Kuliopulos, A. Cell-Penetrating Peptiducin Therapy Targeting PAR1 in Subjects With Coronary Artery Disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2016**, *36*, 189–197. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Nasrollahi, S.A.; Fouladdel, S.; Taghibiglou, C.; Azizi, E.; Farboud, E.S. A peptide carrier for the delivery of elastin into fibroblast cells. *Int. J. Dermatol.* **2012**, *51*, 923–929. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Pujals, S.; Fernández-Carneado, J.; Ludevid, M.D.; Giralt, E. D-SAP: A new, nontoxic, and fully protease resistant cell-penetrating peptide. *ChemMedChem* **2008**, *3*, 296–301. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Walrant, A.; Cardon, S.; Burlina, F.; Sagan, S. Membrane Crossing and Membranotropic Activity of Cell-Penetrating Peptides: Dangerous Liaisons? *Acc. Chem. Res.* **2017**, *50*, 2968–2975. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Crombez, L.; Morris, M.C.; Heitz, F.; Divita, G. A non-covalent peptide-based strategy for ex vivo and in vivo oligonucleotide delivery. *Methods Mol. Biol.* **2011**, *764*, 59–73. [[PubMed](#)]
50. Gros, E.; Deshayes, S.; Morris, M.C.; Aldrian-Herrada, G.; Depollier, J.; Heitz, F.; Divita, G. A non-covalent peptide-based strategy for protein and peptide nucleic acid transduction. *Biochim. Biophys. Acta* **2006**, *1758*, 384–393. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Nischan, N.; Herce, H.D.; Natale, F.; Bohlke, N.; Budisa, N.; Cardoso, M.C.; Hackenberger, C.P.R. Covalent attachment of cyclic TAT peptides to GFP results in protein delivery into live cells with immediate bioavailability. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2015**, *54*, 1950–1953. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Nielsen, E.J.B.; Yoshida, S.; Kamei, N.; Iwamae, R.; Khafagy, E.-S.; Olsen, J.; Rahbek, U.L.; Pedersen, B.L.; Takayama, K.; Takeda-Morishita, M. In vivo proof of concept of oral insulin delivery based on a co-administration strategy with the cell-penetrating peptide penetratin. *J. Control. Release* **2014**, *189*, 19–24. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Duchardt, F.; Fotin-Mleczek, M.; Schwarz, H.; Fischer, R.; Brock, R. A comprehensive model for the cellular uptake of cationic cell-penetrating peptides. *Traffic* **2007**, *8*, 848–866. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Kawamoto, S.; Takasu, M.; Miyakawa, T.; Morikawa, R.; Oda, T.; Futaki, S.; Nagao, H. Inverted micelle formation of cell-penetrating peptide studied by coarse-grained simulation: Importance of attractive force between cell-penetrating peptides and lipid head group. *J. Chem. Phys.* **2011**, *134*, 095103. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Allolio, C.; Magarkar, A.; Jurkiewicz, P.; Baxová, K.; Javanainen, M.; Mason, P.E.; Šachl, R.; Cebecauer, M.; Hof, M.; Horinek, D.; et al. Arginine-rich cell-penetrating peptides induce membrane multilamellarity and subsequently enter via formation of a fusion pore. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2018**, *115*, 11923–11928. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Matsuzaki, K.; Sugishita, K.; Miyajima, K. Interactions of an antimicrobial peptide, magainin 2, with lipopolysaccharide-containing liposomes as a model for outer membranes of Gram-negative bacteria. *FEBS Lett.* **1999**, *449*, 221–224. [[CrossRef](#)]
57. Mayor, S.; Pagano, R.E. Pathways of clathrin-independent endocytosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2007**, *8*, 603–612. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Richard, J.P.; Melikov, K.; Brooks, H.; Prevot, P.; Lebleu, B.; Chernomordik, L.V. Cellular uptake of unconjugated TAT peptide involves clathrin-dependent endocytosis and heparan sulfate receptors. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 15300–15306. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Ferrari, A.; Pellegrini, V.; Arcangeli, C.; Fittipaldi, A.; Giacca, M.; Beltram, F. Caveolae-mediated internalization of extracellular HIV-1 tat fusion proteins visualized in real time. *Mol. Ther.* **2003**, *8*, 284–294. [[CrossRef](#)]
60. Nakase, I.; Noguchi, K.; Aoki, A.; Takatani-Nakase, T.; Fujii, I.; Futaki, S. Arginine-rich cell-penetrating peptide-modified extracellular vesicles for active macropinocytosis induction and efficient intracellular delivery. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 1991. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
61. Niu, X.; Gao, Z.; Qi, S.; Su, L.; Yang, N.; Luan, X.; Li, J.; Zhang, Q.; An, Y.; Zhang, S. Macropinocytosis activated by oncogenic Dbl enables specific targeted delivery of Tat/pDNA nano-complexes into ovarian cancer cells. *Int. J. Nanomed.* **2018**, *13*, 4895–4911. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Wu, X.; Gehring, W. Cellular uptake of the Antennapedia homeodomain polypeptide by macropinocytosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2014**, *443*, 1136–1140. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

63. Szabó, I.; Orbán, E.; Schlosser, G.; Hudecz, F.; Bánóczy, Z. Cell-penetrating conjugates of pentaglutamylated methotrexate as potential anticancer drugs against resistant tumor cells. *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, *115*, 361–368. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Movafegh, B.; Jalal, R.; Mohammadi, Z.; Aldaghi, S.A. Poly-L-arginine: Enhancing Cytotoxicity and Cellular Uptake of Doxorubicin and Necrotic Cell Death. *Anticancer Agents Med. Chem.* **2018**, *18*, 1448–1456. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Zhang, P.; Cheetham, A.G.; Lock, L.L.; Cui, H. Cellular uptake and cytotoxicity of drug-peptide conjugates regulated by conjugation site. *Bioconjug. Chem.* **2013**, *24*, 604–613. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Soudy, R.; Chen, C.; Kaur, K. Novel peptide-doxorubicin conjugates for targeting breast cancer cells including the multidrug resistant cells. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 7564–7573. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Yu, M.; Li, X.; Huang, X.; Zhang, J.; Zhang, Y.; Wang, H. New Cell Penetrating Peptide (KRP) with Multiple Physicochemical Properties Endows Doxorubicin with Tumor Targeting and Improves Its Therapeutic Index. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2018**, *11*, 2448–2458. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
68. Duan, Z.; Chen, C.; Qin, J.; Liu, Q.; Wang, Q.; Xu, X.; Wang, J. Cell-penetrating peptide conjugates to enhance the antitumor effect of paclitaxel on drug-resistant lung cancer. *Drug Deliv.* **2017**, *24*, 752–764. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
69. Izabela, R.; Jarosław, R.; Magdalena, A.; Piotr, R.; Ivan, K. Transportan 10 improves the anticancer activity of cisplatin. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **2016**, *389*, 485–497. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
70. Ding, Y.; Zhao, X.; Geng, J.; Guo, X.; Ma, J.; Wang, H.; Liu, C. Intracellular delivery of nucleic acid by cell-permeable hPP10 peptide. *J. Cell. Physiol.* **2018**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
71. Lee, Y.W.; Hwang, Y.E.; Lee, J.Y.; Sohn, J.-H.; Sung, B.H.; Kim, S.C. VEGF siRNA Delivery by a Cancer-Specific Cell-Penetrating Peptide. *J. Microbiol. Biotechnol.* **2018**, *28*, 367–374. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Viallard, C.; Larrivière, B. Tumor angiogenesis and vascular normalization: Alternative therapeutic targets. *Angiogenesis* **2017**, *20*, 409–426. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Baoum, A.; Xie, S.-X.; Fakhari, A.; Berkland, C. “Soft” Calcium Crosslinks Enable Highly Efficient Gene Transfection Using TAT Peptide. *Pharm. Res.* **2009**, *26*, 2619–2629. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Fang, W.B.; Yao, M.; Brummer, G.; Acevedo, D.; Alhakamy, N.; Berkland, C.; Cheng, N. Targeted gene silencing of CCL2 inhibits triple negative breast cancer progression by blocking cancer stem cell renewal and M2 macrophage recruitment. *Oncotarget* **2016**, *7*, 49349–49367. [[PubMed](#)]
75. Mandal, P.K.; Biswas, S.; Mandal, G.; Purohit, S.; Gupta, A.; Majumdar Giri, A.; Roy Chowdhury, S.; Bhattacharyya, A. CCL2 conditionally determines CCL2-dependent Th2-accumulation during TGF- β -induced breast cancer progression. *Immunobiology* **2018**, *223*, 151–161. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Steel, R.; Cowan, J.; Payerne, E.; O’Connell, M.A.; Searcey, M. Anti-inflammatory Effect of a Cell-Penetrating Peptide Targeting the Nrf2/Keap1 Interaction. *ACS Med. Chem. Lett.* **2012**, *3*, 407–410. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
77. Menegon, S.; Columbano, A.; Giordano, S. The Dual Roles of NRF2 in Cancer. *Trends Mol. Med.* **2016**, *22*, 578–593. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
78. Yuan, J.; Yan, R.; Krämer, A.; Eckerdt, F.; Roller, M.; Kaufmann, M.; Strebhardt, K. Cyclin B1 depletion inhibits proliferation and induces apoptosis in human tumor cells. *Oncogene* **2004**, *23*, 5843–5852. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
79. Morris, M.C.; Gros, E.; Aldrian-Herrada, G.; Choob, M.; Archdeacon, J.; Heitz, F.; Divita, G. A non-covalent peptide-based carrier for in vivo delivery of DNA mimics. *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, e49. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
80. Turner, J.J.; Jones, S.; Fabani, M.M.; Ivanova, G.; Arzumanov, A.A.; Gait, M.J. RNA targeting with peptide conjugates of oligonucleotides, siRNA and PNA. *Blood Cells Mol. Dis.* **2007**, *38*, 1–7. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
81. Schwarze, S.R.; Ho, A.; Vocero-Akbani, A.; Dowdy, S.F. In vivo protein transduction: Delivery of a biologically active protein into the mouse. *Science* **1999**, *285*, 1569–1572. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
82. Jiang, Y.; Li, M.; Zhang, Z.; Gong, T.; Sun, X. Cell-penetrating peptides as delivery enhancers for vaccine. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **2014**, *15*, 256–266. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Pouniotis, D.S.; Apostolopoulos, V.; Pietersz, G.A. Penetratin tandemly linked to a CTL peptide induces anti-tumour T-cell responses via a cross-presentation pathway. *Immunology* **2006**, *117*, 329–339. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Pouniotis, D.; Tang, C.-K.; Apostolopoulos, V.; Pietersz, G. Vaccine delivery by penetratin: Mechanism of antigen presentation by dendritic cells. *Immunol. Res.* **2016**, *64*, 887–900. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

85. Brooks, N.; Hsu, J.; Esparon, S.; Pouniotis, D.; Pietersz, G.A. Immunogenicity of a Tripartite Cell Penetrating Peptide Containing a MUC1 Variable Number of Tandem Repeat (VNTR) and A T Helper Epitope. *Molecules* **2018**, *23*, 2233. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
86. Shahbazi, S.; Bolhassani, A. Comparison of six cell penetrating peptides with different properties for in vitro and in vivo delivery of HPV16 E7 antigen in therapeutic vaccines. *Int. Immunopharmacol.* **2018**, *62*, 170–180. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
87. Yamada, T.; Christov, K.; Shilkaitis, A.; Bratescu, L.; Green, A.; Santini, S.; Bizzarri, A.R.; Cannistraro, S.; Gupta, T.K.D.; Beattie, C.W. p28, a first in class peptide inhibitor of cop1 binding to p53. *Br. J. Cancer* **2013**, *108*, 2495–2504. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
88. Mehta, R.R.; Yamada, T.; Taylor, B.N.; Christov, K.; King, M.L.; Majumdar, D.; Lekmine, F.; Tirupathi, C.; Shilkaitis, A.; Bratescu, L.; et al. A cell penetrating peptide derived from azurin inhibits angiogenesis and tumor growth by inhibiting phosphorylation of VEGFR-2, FAK and Akt. *Angiogenesis* **2011**, *14*, 355–369. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
89. Jagot-Lacoussiere, L.; Kotula, E.; Villoutreix, B.O.; Bruzzoni-Giovanelli, H.; Poyet, J.-L. A Cell-Penetrating Peptide Targeting AAC-11 Specifically Induces Cancer Cells Death. *Cancer Res.* **2016**, *76*, 5479–5490. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
90. Bullenkamp, J.; Tavassoli, M. Signalling of Apoptin. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2014**, *818*, 11–37. [[PubMed](#)]
91. Tian, L.; Zhang, X.; Haesen, D.; Bravo, J.; Fominaya, J.; Choquet, S.; Zini, J.M.; Loisel, S.; Waelkens, E.; Janssens, V.; et al. Identification of PP2A/Set Binding Sites and Design of Interacting Peptides with Potential Clinical Applications. *Int. J. Pept. Res. Ther.* **2018**, *24*, 479–488. [[CrossRef](#)]
92. Hung, M.-H.; Chen, K.-F. Reprogramming the oncogenic response: SET protein as a potential therapeutic target in cancer. *Expert Opin. Ther. Targets* **2017**, *21*, 685–694. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
93. Marin, G.; Bruzzoni-Giovanelli, H.; Schinella, G. T cell leukemia control via Ras-Raf pathway inhibition with peptides. *J. Med. Life* **2017**, *10*, 172–175. [[PubMed](#)]
94. Beez, S.; Demmer, P.; Puccetti, E. Targeting the acute promyelocytic leukemia-associated fusion proteins PML/RAR α and PLZF/RAR α with interfering peptides. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e48636. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
95. Baar, M.P.; Brandt, R.M.C.; Putavet, D.A.; Klein, J.D.D.; Derks, K.W.J.; Bourgeois, B.R.M.; Stryeck, S.; Rijksen, Y.; van Willigenburg, H.; Feijtel, D.A.; et al. Targeted Apoptosis of Senescent Cells Restores Tissue Homeostasis in Response to Chemotoxicity and Aging. *Cell* **2017**, *169*, 132–147. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
96. Maly, D.J.; Allen, J.A.; Shokat, K.M. A mechanism-based cross-linker for the identification of kinase-substrate pairs. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 9160–9161. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
97. Krejci, P. Apoptosis inhibitor 5 (API-5; AAC-11; FIF) is upregulated in human carcinomas in vivo. *Oncol. Lett.* **2012**, *3*, 913–916. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
98. Rigou, P.; Piddubnyak, V.; Faye, A.; Rain, J.-C.; Michel, L.; Calvo, F.; Poyet, J.-L. The antiapoptotic protein AAC-11 interacts with and regulates Acinus-mediated DNA fragmentation. *EMBO J.* **2009**, *28*, 1576–1588. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
99. Faye, A.; Poyet, J.-L. Targeting AAC-11 in cancer therapy. *Expert Opin. Ther. Targets* **2010**, *14*, 57–65. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
100. Song, K.-H.; Kim, S.-H.; Noh, K.H.; Bae, H.C.; Kim, J.H.; Lee, H.-J.; Song, J.; Kang, T.H.; Kim, D.-W.; Oh, S.-J.; et al. Apoptosis inhibitor 5 increases metastasis via Erk-mediated MMP expression. *BMB Rep.* **2015**, *48*, 330–335. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
101. Krejci, P.; Pejchalova, K.; Rosenbloom, B.E.; Rosenfelt, F.P.; Tran, E.L.; Laurell, H.; Wilcox, W.R. The antiapoptotic protein Api5 and its partner, high molecular weight FGF2, are up-regulated in B cell chronic lymphoid leukemia. *J. Leukoc. Biol.* **2007**, *82*, 1363–1364. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
102. Pasquereau-Kotula, E.; Habault, J.; Kroemer, G.; Poyet, J.-L. The anticancer peptide RT53 induces immunogenic cell death. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0201220. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
103. Su, Y.; Doherty, T.; Waring, A.J.; Ruchala, P.; Hong, M. Roles of Arginine and Lysine Residues in the Translocation of a Cell-Penetrating Peptide from 13C, 31P and 19F Solid-State NMR. *Biochemistry* **2009**, *48*, 4587–4595. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
104. Peraro, L.; Kritzer, J.A. Emerging Methods and Design Principles for Cell-Penetrant Peptides. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2018**, *57*, 11868–11881. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

105. El-Sayed, N.S.; Miyake, T.; Shirazi, A.N.; Park, S.E.; Clark, J.; Buchholz, S.; Parang, K.; Tiwari, R. Design, Synthesis, and Evaluation of Homochiral Peptides Containing Arginine and Histidine as Molecular Transporters. *Molecules* **2018**, *23*, 1590. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
106. Shirazi, A.N.; Mozaffari, S.; Sherpa, R.T.; Tiwari, R.; Parang, K. Efficient Intracellular Delivery of Cell-Impermeable Cargo Molecules by Peptides Containing Tryptophan and Histidine. *Molecules* **2018**, *23*, 1536. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
107. Yamashita, H.; Misawa, T.; Oba, M.; Tanaka, M.; Naito, M.; Kurihara, M.; Demizu, Y. Development of helix-stabilized cell-penetrating peptides containing cationic α,α -disubstituted amino acids as helical promoters. *Bioorg. Med. Chem.* **2017**, *25*, 1846–1851. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
108. Hällbrink, M.; Kilk, K.; Elmquist, A.; Lundberg, P.; Lindgren, M.; Jiang, Y.; Pooga, M.; Soomets, U.; Langel, Ü. Prediction of Cell-Penetrating Peptides. *Int. J. Pept. Res. Ther.* **2005**, *11*, 249–259. [[CrossRef](#)]
109. Hansen, M.; Kilk, K.; Langel, Ü. Predicting cell-penetrating peptides. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2008**, *60*, 572–579. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
110. Karelson, M.; Dobchev, D. Using artificial neural networks to predict cell-penetrating compounds. *Expert Opin. Drug Discov.* **2011**, *6*, 783–796. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
111. Zhang, D.; Wang, J.; Xu, D. Cell-penetrating peptides as noninvasive transmembrane vectors for the development of novel multifunctional drug-delivery systems. *J. Control. Release* **2016**, *229*, 130–139. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
112. Schmidt, N.; Mishra, A.; Lai, G.H.; Wong, G.C.L. Arginine-rich cell-penetrating peptides. *FEBS Lett.* **2010**, *584*, 1806–1813. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
113. Osman, G.; Rodriguez, J.; Chan, S.Y.; Chisholm, J.; Duncan, G.; Kim, N.; Tatler, A.L.; Shakesheff, K.M.; Hanes, J.; Suk, J.S.; et al. PEGylated enhanced cell penetrating peptide nanoparticles for lung gene therapy. *J. Control. Release* **2018**, *285*, 35–45. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
114. Panigrahi, B.; Singh, R.K.; Mishra, S.; Mandal, D. Cyclic peptide-based nanostructures as efficient siRNA carriers. *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.* **2018**, 1–11. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
115. Khalily, M.P.; Gerekeçi, S.; Güleç, E.A.; Özen, C.; Özçubukçu, S. Structure-based design, synthesis and anticancer effect of cyclic Smac-polyarginine peptides. *Amino Acids* **2018**, *50*, 1607–1616. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
116. Kozhikhova, K.V.; Andreev, S.M.; Shilovskiy, I.P.; Timofeeva, A.V.; Gaisina, A.R.; Shatilov, A.A.; Turetskiy, E.A.; Andreev, I.M.; Smirnov, V.V.; Dvornikov, A.S.; et al. A novel peptide dendrimer LTP efficiently facilitates transfection of mammalian cells. *Org. Biomol. Chem.* **2018**, *16*, 8181–8190. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
117. Tesei, G.; Vazdar, M.; Jensen, M.R.; Cragnell, C.; Mason, P.E.; Heyda, J.; Skepö, M.; Jungwirth, P.; Lund, M. Self-association of a highly charged arginine-rich cell-penetrating peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2017**, *114*, 11428–11433. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
118. Hoyer, J.; Schatzschneider, U.; Schulz-Siegmund, M.; Neundorff, I. Dimerization of a cell-penetrating peptide leads to enhanced cellular uptake and drug delivery. *Beilstein J. Org. Chem.* **2012**, *8*, 1788–1797. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
119. Demizu, Y.; Oba, M.; Okitsu, K.; Yamashita, H.; Misawa, T.; Tanaka, M.; Kurihara, M.; Gellman, S.H. A preorganized β -amino acid bearing a guanidinium side chain and its use in cell-penetrating peptides. *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 5617–5620. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
120. Andaloussi, S.E.L.; Lehto, T.; Mäger, I.; Rosenthal-Aizman, K.; Oprea, I.I.; Simonson, O.E.; Sork, H.; Ezzat, K.; Copolovici, D.M.; Kurrikoff, K.; et al. Design of a peptide-based vector, PepFect6, for efficient delivery of siRNA in cell culture and systemically in vivo. *Nucleic Acids Res.* **2011**, *39*, 3972–3987. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
121. El-Sayed, A.; Futaki, S.; Harashima, H. Delivery of macromolecules using arginine-rich cell-penetrating peptides: Ways to overcome endosomal entrapment. *AAPS J.* **2009**, *11*, 13–22. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
122. Endoh, T.; Ohtsuki, T. Cellular siRNA delivery using cell-penetrating peptides modified for endosomal escape. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2009**, *61*, 704–709. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
123. Oskolkov, N.; Arukuusk, P.; Copolovici, D.-M.; Lindberg, S.; Margus, H.; Padari, K.; Pooga, M.; Langel, Ü. NickFects, Phosphorylated Derivatives of Transportan 10 for Cellular Delivery of Oligonucleotides. *Int. J. Pept. Res. Ther.* **2011**, *17*, 147. [[CrossRef](#)]
124. Tünnemann, G.; Martin, R.M.; Haupt, S.; Patsch, C.; Edenhofer, F.; Cardoso, M.C. Cargo-dependent mode of uptake and bioavailability of TAT-containing proteins and peptides in living cells. *FASEB J.* **2006**, *20*, 1775–1784. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

125. Shukla, G.S.; Krag, D.N. Phage display selection for cell-specific ligands: Development of a screening procedure suitable for small tumor specimens. *J. Drug Target* **2005**, *13*, 7–18. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
126. Kamada, H.; Okamoto, T.; Kawamura, M.; Shibata, H.; Abe, Y.; Ohkawa, A.; Nomura, T.; Sato, M.; Mukai, Y.; Sugita, T.; et al. Creation of novel cell-penetrating peptides for intracellular drug delivery using systematic phage display technology originated from Tat transduction domain. *Biol. Pharm. Bull.* **2007**, *30*, 218–223. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
127. Pasqualini, R.; Koivunen, E.; Ruoslahti, E. A peptide isolated from phage display libraries is a structural and functional mimic of an RGD-binding site on integrins. *J. Cell Biol.* **1995**, *130*, 1189–1196. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
128. Sun, Y.; Kang, C.; Liu, F.; Zhou, Y.; Luo, L.; Qiao, H. RGD Peptide-Based Target Drug Delivery of Doxorubicin Nanomedicine. *Drug Dev. Res.* **2017**, *78*, 283–291. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
129. Zhou, N.; Wu, J.; Qin, Y.-Y.; Zhao, X.-L.; Ding, Y.; Sun, L.-S.; He, T.; Huang, X.-W.; Liu, C.-B.; Wang, H. Novel peptide MT23 for potent penetrating and selective targeting in mouse melanoma cancer cells. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2017**, *120*, 80–88. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
130. Lim, K.J.; Sung, B.H.; Shin, J.R.; Lee, Y.W.; Kim, D.J.; Yang, K.S.; Kim, S.C. A cancer specific cell-penetrating peptide, BR2, for the efficient delivery of an scFv into cancer cells. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e66084. [[CrossRef](#)]
131. Xiang, Y.; Shan, W.; Huang, Y. Improved anticancer efficacy of doxorubicin mediated by human-derived cell-penetrating peptide dNP2. *Int. J. Pharm.* **2018**, *551*, 14–22. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
132. Shin, M.C.; Zhang, J.; Ah Min, K.; Lee, K.; Moon, C.; Balthasar, J.P.; Yang, V.C. Combination of antibody targeting and PTD-mediated intracellular toxin delivery for colorectal cancer therapy. *J. Control. Release* **2014**, *194*, 197–210. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
133. Ye, J.; Shin, M.C.; Liang, Q.; He, H.; Yang, V.C. 15 years of ATTEMPTS: A macromolecular drug delivery system based on the CPP-mediated intracellular drug delivery and antibody targeting. *J. Control. Release* **2015**, *205*, 58–69. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
134. Olson, E.S.; Aguilera, T.A.; Jiang, T.; Ellies, L.G.; Nguyen, Q.T.; Wong, E.H.; Gross, L.A.; Tsien, R.Y. In vivo characterization of activatable cell penetrating peptides for targeting protease activity in cancer. *Integr. Biol. (Camb.)* **2009**, *1*, 382–393. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
135. Cheng, H.; Zhu, J.-Y.; Xu, X.-D.; Qiu, W.-X.; Lei, Q.; Han, K.; Cheng, Y.-J.; Zhang, X.-Z. Activable Cell-Penetrating Peptide Conjugated Prodrug for Tumor Targeted Drug Delivery. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2015**, *7*, 16061–16069. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
136. Xiang, B.; Jia, X.-L.; Qi, J.-L.; Yang, L.-P.; Sun, W.-H.; Yan, X.; Yang, S.-K.; Cao, D.-Y.; Du, Q.; Qi, X.-R. Enhancing siRNA-based cancer therapy using a new pH-responsive activatable cell-penetrating peptide-modified liposomal system. *Int. J. Nanomed.* **2017**, *12*, 2385–2405. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
137. Minet, E.; Arnould, T.; Michel, G.; Roland, I.; Mottet, D.; Raes, M.; Remacle, J.; Michiels, C. ERK activation upon hypoxia: Involvement in HIF-1 activation. *FEBS Lett.* **2000**, *468*, 53–58. [[CrossRef](#)]
138. Karagiota, A.; Kourti, M.; Simos, G.; Mylonis, I. HIF-1 α -derived cell-penetrating peptides inhibit ERK-dependent activation of HIF-1 and trigger apoptosis of cancer cells under hypoxia. *Cell. Mol. Life Sci.* **2019**, *76*, 809–825. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
139. Darwish, S.; Sadeghiani, N.; Fong, S.; Mozaffari, S.; Hamidi, P.; Withana, T.; Yang, S.; Tiwari, R.K.; Parang, K. Synthesis and antiproliferative activities of doxorubicin thiol conjugates and doxorubicin-SS-cyclic peptide. *Eur. J. Med. Chem.* **2019**, *161*, 594–606. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

DÉVELOPPEMENT ET CARACTÉRISATION DE L'EFFET THÉRAPEUTIQUE DE PEPTIDES PÉNÉTRANTS DÉRIVÉS DE LA PROTÉINE AAC-11 DANS LE CONTEXTE DE CANCERS CUTANÉS ET/OU HÉMATOLOGIQUES

L'équipe du Dr. Poyet s'intéresse à l'étude des interactions protéine-protéine (PPIs) dans le contrôle de l'apoptose et leur modulation dans le cadre de nouvelles stratégies médicamenteuses et a démontré le rôle important de la protéine AAC-11 pour le développement et la progression tumorale. AAC-11 est une protéine anti-apoptotique, surexprimée dans de nombreux tissus et cellules néoplasiques. Elle possède un rôle crucial dans la survie de ces cellules et leur sensibilité aux agents anti-cancéreux, dû à des PPIs impliquant son domaine Leucin-Zipper (LZ).

Notre équipe a donc eu l'idée de concevoir des peptides pénétrants (CPPs) dérivés du domaine LZ d'AAC-11 et agissant comme inhibiteurs compétitifs de son activité. Les CPPs sont de petites séquences d'acides aminés capables de traverser la membrane plasmique des cellules pour y délivrer un cargo. Ils ont l'avantage d'être faciles à synthétiser et à modifier et surtout d'être généralement non-toxiques in vivo. Nos peptides sont constitués de deux domaines : la pénétratine (séquence de pénétration cellulaire), couplée à des portions du domaine LZ d'AAC-11. Ces peptides appelés LZDPs ont été brevetés (PCT/EP2015/053307) sur la base de la démonstration de leur activité anti-tumorale dans divers modèles de cancers, parmi lesquels le mélanome.

Mon projet de thèse visait à évaluer les propriétés anti-tumorales de ces peptides dans d'autres types de cancers, en particulier le Syndrome de Sézary (SS) et les Leucémies Aigües Myéloïdes (LAMs). Les résultats obtenus dans ces pathologies ont mis en évidence un fort effet cytotoxique des peptides LZDPs vis-à-vis des cellules malignes, mais pas des cellules saines environnantes. Cette activité anti-tumorale spécifique est non seulement observée in vitro sur des lignées cellulaires, mais aussi ex vivo sur des prélèvements de patients et in vivo dans des modèles murins pré-cliniques.

J'avais également pour objectif d'approfondir nos connaissances concernant le mécanisme d'action des peptides LZDPs. Les données obtenues au cours de ma thèse ont montré qu'ils agissaient en induisant une rupture de la membrane des cellules cancéreuses qui semble due à l'interaction avec un ou des partenaires exprimés uniquement à la membrane des cellules tumorales. Un de ces partenaires est la protéine PAK1, exprimée à la membrane des cellules de Sézary et des cellules leucémiques et dont la présence est nécessaire à l'activité membranolytique des peptides. PAK1 est particulièrement intéressante car elle est connue pour être impliquée dans plusieurs étapes de la tumorigénèse, et son interaction avec AAC-11 pourrait potentiellement expliquer le développement de certains cancers.

Fait intéressant, nos résultats indiquent que les peptides LZDPs induisent une mort cellulaire immunogène des cellules cancéreuses. Dans des modèles murins immunocompétents, nous avons mis en évidence que cela permettait l'activation du système immunitaire. Ainsi, dans ces modèles, il est possible d'utiliser les lysats cellulaires obtenus après exposition de cellules cancéreuses aux peptides en tant que vaccins prophylactiques ou thérapeutiques.

Enfin, un autre axe de ma thèse consistait à optimiser la séquence de pénétration et la séquence active des peptides dérivés d'AAC-11. D'une part, nous avons amélioré la portion LZ du peptide, en concevant des peptides plus courts, conservant les propriétés anti-tumorales du peptide original. D'autre part, nous avons construit une séquence de pénétration plus courte et plus efficace en termes de pénétration cellulaire que la pénétratine. Les peptides « seconde génération » constitués de cette séquence associée à celle du LZ d'AAC-11 possèdent des propriétés anti-tumorales comparables à celles des peptides de première génération.

Forts de ces résultats, nous espérons désormais débiter un ou plusieurs essai(s) clinique(s) dans les contextes du SS et de la LAM, en collaboration avec les équipes médicales de l'hôpital St-Louis.

Mots clés : apoptose, cancer, AAC-11, Cell-Penetrating-Peptides, Leucin-Zipper, PAK1, Syndrome de Sézary, Leucémie Aigüe Myélocytaire, vaccin anti-cancéreux