

Université de Montréal

Construction d'un adénovirus recombinant codant pour la molécule pro-apoptotique TRAIL. But: étude du rôle de TRAIL *in vivo* et de son potentiel thérapeutique.

par

Lina Kozhaya

Programme de microbiologie et immunologie

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M.Sc.)
en microbiologie et immunologie

Janvier 2000

© Lina Kozhaya, 2000



1.155.1105

W
4
U58
2000
v.025



Université de Montréal

Faculté de médecine

Ce mémoire intitulé :

Construction d'un adénovirus recombinant codant pour la molécule pro-apoptotique TRAIL. But: étude du rôle de TRAIL *in vivo* et de son potentiel thérapeutique.

présenté par :

Lina Kozhaya

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Dr. Jacques Thibodeau

Président-rapporteur

Dr. François Denis

Membre du jury

Dr. Rafick-P. Sékaly

Directeur de recherche

SOMMAIRE

TRAIL (tumor necrosis factor [TNF]-related apoptosis-inducing ligand) est un membre de la famille du TNF nouvellement identifié. Il présente de nombreuses activités potentiellement intéressantes sur le plan thérapeutique. Ses fonctions biologiques sont de mieux en mieux connues, sans pour autant lui définir un rôle physiologique clair pour le moment.

Notre travail a pour objectif de générer des outils qui nous permettront, d'une part d'élucider le rôle biologique de TRAIL *in vivo*, notamment dans la régulation de la réponse immune, et d'autre part, de tester son potentiel thérapeutique comme agent anti-tumoral. L'adénovirus recombinant étant l'un des vecteurs les plus efficaces pour transférer des gènes *in vivo*, nous avons procédé à la génération d'un adénovirus recombinant codant pour TRAIL, par la méthode de recombinaison homologue *in vitro*. La toxicité induite sur les cellules 293 de la lignée de trans-complémentation lors de la production du virus nous a conduit à y exprimer un inhibiteur d'apoptose à large spectre, la protéine p35 du baculovirus. Cette lignée a été utilisée pour amplifier les virus produits dans des cellules 293 provenant d'un autre laboratoire, et qui semblent être plus résistantes à TRAIL. A l'aide d'une réaction de PCR, nous avons pu amplifier l'ADNc de TRAIL à partir de l'ADN extra-chromosomal extrait des cellules infectées. Nous avons pu également mettre en évidence l'expression de la protéine TRAIL dans les cellules infectées. Ces résultats démontrent la présence de virus recombinants codant pour TRAIL. Ce dernier nécessite une purification pour en tester la fonctionnalité.

Afin de démontrer la spécificité des effets dus à TRAIL tout en éliminant un rôle potentiel des autres molécules de la famille du TNF, nous avons généré les récepteurs solubles DR5-Fc, DR3-Fc et Fas-Fc. Dans l'intérêt de délivrer des gènes et d'étudier leurs fonctions dans les cellules T, une tentative d'infection par des adénovirus recombinants classiques montre l'absence de transduction des cellules T primaires ou activées. Ces résultats contredisent des travaux déjà publiés. En revanche une bonne efficacité de transduction a été obtenue dans le modèle des cellules Jurkat.

Globalement, ce travail a abouti à la génération de plusieurs outils qui seront utilisés pour caractériser le rôle de TRAIL aussi bien *in vivo* qu'*in vitro*

Table des matières

Page d'identification du jury.....	ii
Sommaire.....	iii
Table des matières.....	v
Liste des tableaux.....	ix
Liste des figures.....	x
Liste des abréviations.....	xi
Remerciements.....	xiv

INTRODUCTION.....1

1. Généralités sur l'apoptose.....	1
2. La famille des TNF-R et leurs ligands.....	2
2.1. Caractéristiques générales.....	2
2.1.1. Les récepteurs.....	2
2.1.2. Les Ligands.....	4
2.2. Fonctions biologiques des récepteurs de mort.....	4
2.3. Signalisation de l'apoptose instructive à travers les récepteurs de mort.....	5
3. Etude du système TRAIL et ses récepteurs.....	7
3.1. Identification et caractérisation de TRAIL.....	7
3.2. Distribution tissulaire de TRAIL.....	8
3.3. Les récepteurs de TRAIL.....	8
3.3.1. TRAIL-R1 ou DR4.....	9
3.3.2. TRAIL-R2 ou DR5.....	9
3.3.3. TRAIL-R3 ou DcR1.....	11

3.3.4. TRAIL-R4 ou DcR2.....	11
3.3.5. Ostéoprotégerin (OPG).....	12
3.4. Localisation chromosomique des récepteurs de TRAIL.....	13
3.5. Signalisation à travers le système TRAIL/TRAIL-R.....	14
3.6. Rôle de TRAIL dans l'apoptose des cellules T.....	19
3.6.1. Expression de TRAIL dans les cellules T.....	19
3.6.2. Modulation de l'expression de TRAIL membranaire.....	19
3.6.3. Régulation de l'expression de TRAIL dans les cellules T.....	19
3.6.4. Rôle de TRAIL dans l'apoptose des cellules T.....	21
3.7. TRAIL dans les tumeurs.....	22
3.7.1. Effet anti-tumoral de TRAIL <i>in vitro</i>	22
3.7.2. Modulation de l'effet anti-tumoral de TRAIL.....	27
3.7.3. Expression et fonctions de TRAIL dans différentes composantes cellulaires du système immunitaire.....	28
3.7.3.1. Expression et fonctions de TRAIL dans les lymphocytes T.....	28
3.7.3.2. Expression et fonctions de TRAIL dans les cellules "Natural Killer".....	30
3.7.3.3. Expression et fonctions de TRAIL dans les monocytes.....	31
3.7.3.4. Expression et fonctions de TRAIL dans les cellules dendritiques.....	32
3.7.4. Rôle anti-tumoral de TRAIL <i>in vivo</i> et son potentiel thérapeutique.....	32
BUT DU PROJET ET INTRODUCTION AU TRAVAIL.....	35
CONSTRUCTION D'ADENOVIRUS RECOMBINANTS.....	37
1. Le vecteur adénoviral pour le transfert de gènes.....	37
2. Construction des vecteurs adénoviraux.....	38
3. Avantages.....	40
4. Inconvénients.....	40
MATERIELS ET METHODES.....	42

RESULTATS	53
1. Clonage de l'ADNc, expression de la protéine et test de l'activité biologique de TRAIL.....	53
1.1. Clonage de TRAIL.....	53
1.2. Expression de la partie extracellulaire de la protéine TRAIL dans la bactérie.....	53
1.3. Test de l'activité biologique de TRAIL.....	57
2. Génération d'un adénovirus recombinant codant pour TRAIL.....	59
2.1. Clonage de TRAIL dans les plasmides adénoviraux.....	59
2.2. Cotransfection dans les cellules HEK 293.....	59
3. Génération d'une lignée de cellules 293 qui expriment le p35.....	61
4. Vérification de la présence de virus recombinants codant pour TRAIL.....	62
5. Génération de récepteurs solubles.....	64
5.1. Clonage de l'ADNc de DR5, Fas et DR3.....	65
5.2. Production des protéines de fusion.....	65
5.2.1. Les cellules CHO déficientes en DHFR.....	65
5.2.2. Système de production de protéines utilisant le couple Ori SV40/ antigène T de SV40.....	67
5.3. Vérification de la fonctionnalité des protéines de fusion.....	68
5.3.1. Inhibition de l'apoptose médiée par Fas sur les cellules Jurkat par la protéine de fusion Fas-Fc.....	69
6. Infection des cellules T.....	70
6.1. Infection des cellules Jurkat.....	70
6.2. Infection des PBL.....	72

DISCUSSION ET PERSPECTIVES	73
BIBLIOGRAPHIE	79
ANNEXE I	i
1. Génération d'un anticorps polyclonal anti-DR5.....	i
2. Génération d'une lignée stable de cellules CHO qui expriment DR5.....	ii

Liste des tableaux

Tableau 1 : Sensibilité des cellules d'origine hématopoïétique à l'apoptose induite par TRAIL.....	24
Tableau 2 : Sensibilité des cellules d'origine non hématopoïétique à l'apoptose induite par TRAIL.....	25

Listes des figures

Figure 1 : La structure des récepteurs de TRAIL.....	13
Figure 2 : La voie de signalisation de l'apoptose à travers DR4 et DR5.....	17
Figure 3 : Construction d'adénovirus recombinants par la technique de recombinaison homologue <i>in vitro</i>	39
Figure 4 : Production du TRAIL recombinant dans la bactérie.....	56
Figure 5 : Cytotoxicité de la GST-TRAIL sur les cellules Jurkat.....	58
Figure 6 : Toxicité de TRAIL sur les cellules 293.....	60
Figure 7 : Expression des messagers de l'inhibiteur d'apoptose, p35, dans les cellules 293 transfectées.....	62
Figure 8 : Présence de l'ADNc de TRAIL dans l'ADN adénoviral extrait des cellules 293 infectées.....	63
Figure 9 : Expression de la protéine TRAIL dans les cellules 293 infectées avec les virus recombinants.....	64
Figure 10 : Expression des messagers de Fas et de DR5 dans les cellules CHO transfectées avec les plasmides codant pour les protéines de fusions.....	66
Figure 11 : Les récepteurs solubles dans les surnageants des cellules 293T transfectées avec les différentes fusions Fc.....	67
Figure 12 : Inhibition de l'apoptose médiée par Fas des Jurkat par la protéine de fusion Fas-Fc.....	69
Figure 13 : Infection des cellules Jurkat avec des adénovirus recombinants codant pour la β galactosidase.....	71
Figure 14 : Microscopie optique de cellules Jurkat infectées par un adénovirus recombinant	71
Figure 15 : Expression et purification du domaine extracellulaire de DR5 dans la bactérie.....	i
Figure 16 : Reconnaissance de DR5 par l'anti-sérum de lapin immunisé avec la protéine recombinante DR5 _{EC}	ii
Figure 17 : Reconnaissance de DR5 dans les cellules CHO transfectées.....	iii

Liste des abréviations

ActD	Actinomycine D
Ad	Adénovirus
Adr	Adénovirus recombinant
AICD	"Activation Induced Cell Death"
β gal	β galactosidase
CAR	"Coxsakiavirus and Adenovirus receptor"
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CMV	Cytomégalovirus
ConA	Concavaline A
CrmA	"Cytokine response modifier A"
DC	"Dendritic Cell"
DcR	"Decoy receptor"
DD	"Death Domain"
DHFR	Déhydrofolate Réductase
EST	"Expressed sequence Tag"
FADD	"Fas-Associated Death Domain"
FasL	Fas ligand
FLICE	"Fadd-like Interleukin-1 β Converting Enzyme"
FLIP	"FLICE Inhibitory Protein"
5-FU	5-Fluorouracil
GFP	"Green Fluorescent Protein"
GPI	Glycosyl Phosphatidyl Inositol
GS4B	Gluthatione Sépharose 4 B
GST	Gluthatione S-Transférase
GVHD	"Graft Versus Host Disease"
GVT	"Graft Versus Tumor"
Hu	Humain
IAP	"Inhibitory of Apoptosis Protein"
IFN	Interféron

Ig	Immunoglobuline
IL	Interleukine
IPTG	Isopropyl β -D-thiogalactopyranoside
IRES	"Internal Ribosome Entry Site"
ITR	"Inverted Terminal Repeat"
JNK	"c-Jun N-terminal Kinase"
LT	Lymphotoxine
LZ	"Leucine Zipper"
MM	Myélomes Multiples
MO	Moelle osseuse
MOI	"Multiplicity Of Infection"
MTX	Méthotrexate
Mu	Murin
NF κ B	"Nuclear Factor κ B"
NK	"Natural Killer"
OPG	"Osteoprotegerin"
PARP	"Poly (ADP ribose) polymerase"
PBL	"Peripheral Blood Lymphocyte"
PBMC	"Peripheral Blood Mononuclear Cell"
PBS	"Phosphate Buffer Saline"
PBT	"Peripheral Blood T Cells"
PHA	PhytoHémagglutinine A
PI	"Propidium Iodide"
PI 3-K	"Phosphatidyl Inositol 3-Kinase"
PKC	Protéine Kinase C
PMA	"Phorbol Myristate Acetate"
PTK	Protéine Tyrosine Kinase
RIP	"Receptor Interacting Protein"
RSV	"Rous Sarcoma Virus"
SV40	"Simian Virus 40"

SIDA	Syndrome d'Immuno-Déficience Acquise
TCR	"T cell Receptor"
TNF	"Tumor Necrosis Factor"
TNF-R	"Tumor Necrosis Factor- receptor"
TRADD	"TNF Receptor1 Associated Death Domain"
TRAF	"TNF Receptor Associated Factor"
TRAIL	"TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand"
TRAIL-R	"TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand-Receptor"
VIH	Virus de l'Immuno-Déficience Humaine
zVAD-fmk	Benzyloxy-Valine-Alanine-Aspartate-O-methyl- fluoromethylketone

Remerciements

MERCI est plus qu'un devoir ou expression de gratitude, c'est une façon de rendre hommage à tous ceux qui ont veillé sur notre formation et ceux qui ont aidé à la réalisation de ce mémoire.

Je remercie sincèrement mon directeur de recherche, Dr. Rafick-P. Sékaly, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire et m'avoir donnée la chance de faire cette maîtrise.

Je remercie spécialement Dr. Amine Abina pour avoir supervisé mes travaux tout le long du projet.

Je remercie Dr. Antoine Alam, qui a supervisé une partie du projet.

Je remercie profondément mes collègues au Laboratoire pour leur soutien et leur aide, spécialement Dr. Bader Yassine Diab, Laurent Sabbagh et Salah Aouad.

Je remercie Jean-Pierre Fortin et Hélène Mcgrath pour leur assistance.

Je remercie également les membres du jury Dr. Jacques Thibodeau et Dr. François Denis pour avoir accepté d'évaluer ce mémoire.

Je remercie les membres du programme canadien de bourses de la francophonie pour m'avoir accordée une bourse pour mes études de deuxième cycle et pour leur aide continue tout le long de ces études.

Je remercie spécialement mes chers parents, mes frères et sœurs, mes amis et mes cousins, pour leur soutien continu et permanent.

INTRODUCTION

1. Généralités sur l'apoptose

Bien que la mort cellulaire fut observée depuis plus de 150 ans, au cours des études sur la métamorphose des amphibiens, elle n'était pas perçue avec le même intérêt que les autres processus cellulaires de base. Les scientifiques croyaient qu'il s'agissait d'un simple phénomène de dégénérescence suite à une lésion. L'idée que la mort cellulaire peut être un événement génétiquement contrôlé, n'a été acceptée qu'au début des années 80, lors d'études sur le nématode *Caenorhabditis elegans* (1).

Depuis, l'apoptose est considérée comme un phénomène, impliqué dans différentes situations physiologiques tel que le développement embryonnaire, l'homéostasie cellulaire, ainsi que le développement et le contrôle de la réponse immune. De plus, l'apoptose est un des mécanismes utilisés par le système immunitaire pour éliminer les cellules cancéreuses ou infectées par des virus. La dérégulation de l'apoptose, peut être à l'origine de nombreuses pathologies. Ainsi, l'apoptose aberrante de certains neurones pourrait entraîner des désordres du système nerveux tels que ceux décrits dans la maladie d'Alzheimer et la maladie de Parkinson. En revanche, les cellules en division qui ne réussissent pas à entrer en apoptose après avoir subi un dommage sévère à l'ADN, peuvent proliférer de manière non contrôlée et aboutir à des pathologies néoplasiques (2).

Les cellules qui meurent par apoptose montrent une séquence d'événements morphologiques caractérisés par une perte de l'assymétrie membranaire, un rétrécissement cellulaire et une condensation de la chromatine. Ces altérations sont associées à la translocation de la phosphatidylsérine vers l'extérieur de la membrane cytoplasmique, à l'activation des caspases et à la libération d'une endonucléase qui dégrade l'ADN génomique en plusieurs fragments internucléosomiaux.

Contrairement à la nécrose, qui est caractérisée par une atteinte irréversible de la membrane cytoplasmique, un dysfonctionnement mitochondrial et une lyse cellulaire responsable du déclenchement d'une réponse inflammatoire, l'apoptose, est un phénomène au cours duquel, les cellules sont éliminées par phagocytose sans libérer leur contenu intracellulaire et sans provoquer d'inflammation (3).

L'apoptose est un phénomène de mort cellulaire génétiquement programmé qui se déclenche en réponse à divers stimuli. Les signaux de survie fournis par l'environnement cellulaire ainsi que les détecteurs internes de l'intégrité cellulaire, gardent la machinerie apoptotique de la cellule sous haute surveillance. Dans les cas où la cellule perd le contact avec son environnement ou subit un dommage interne irréparable tel qu'un dommage à l'ADN, elle initie le programme de mort par apoptose. Ceci est important pour prévenir la croissance des cellules en dehors de leur site approprié ou pour éliminer les cellules qui effectuent une fonction qui n'est plus utile à la survie de l'animal. L'initiation de l'apoptose en réponse à un manque de signaux de survie ou à une dérégulation intracellulaire est un processus de signalisation à plusieurs étapes qui requiert une synthèse protéique *de novo*.

L'identification des facteurs de mort tel que ceux appartenant à la famille des récepteurs du TNF (TNF-R) (et plus particulièrement les récepteurs de morts (DR)) et leurs ligands a permis de comprendre que des facteurs extracellulaires peuvent également participer aux mécanismes concourant à l'apoptose. Ce mécanisme, appelé apoptose "instructive", est particulièrement important dans le système immunitaire (4). Il ne nécessite pas de synthèse protéique *de novo* (2) car ces récepteurs peuvent activer des effecteurs de l'apoptose tel que les cystéines protéases (caspases) à peine quelques secondes après la fixation du ligand, induisant ainsi une mort rapide (4).

2. La famille des TNF-R et leurs ligands

2.1. Caractéristiques générales

2.1.1. Les récepteurs

Les récepteurs de la famille du TNF (Tumor Necrosis Factor Receptor : TNF-R) jouent un rôle primordial dans de nombreux processus physiologiques ou pathologiques (5). Ils ont une fonction pléiotropique, et sont ainsi capables d'induire aussi bien la prolifération cellulaire par activation du facteur NF κ B que l'induction de l'apoptose par activation des caspases (5;6).

Leurs activités biologiques sont nombreuses parmi lesquelles, le développement et le contrôle de la réponse immune, la production de cytokines et chimiokines, la

prolifération des cellules tumorales, l'activation de la réplication virale et peuvent même servir comme corécepteurs pour l'entrée de certains virus (5;7). Le nombre de gènes codant pour des homologues du TNF-R, ne cesse d'augmenter et une vingtaine de récepteurs sont actuellement connus chez l'homme.

Les TNF-Rs sont des protéines membranaires de type I, la partie extracellulaire contient de multiples domaines riches en cystéines impliqués dans l'interaction avec le ligand (8). Il y a moins de 30 % d'homologie entre les parties extracellulaires des différents récepteurs de cette famille. La partie intracellulaire est de taille variable permettant de subdiviser cette famille en 3 catégories :

1. Les TNF-Rs avec une longue partie intracellulaire contenant une séquence, d'environ 80 acides aminés, responsable de la transduction du signal apoptotique (9;10). Cette séquence appelée "death domain (DD)" ou domaine de mort ne possède pas d'activité kinase ou phosphatase montrant que la transduction du signal apoptotique est indirecte. Mis à part leur rôle dans l'induction de l'apoptose, ces récepteurs sont capables de transmettre un signal de vie par l'activation du facteur de transcription NF κ B (nuclear factor κ B) (5).
2. Les TNF-Rs qui ne possèdent pas de domaine intracellulaire sont appelés "Decoy receptors". Ils sont capables de bloquer la transduction de signaux de deux manières : soit par séquestration du ligand, soit par formation d'un trimère mixte inactif. On distingue 2 types de "Decoys", membranaires ou solubles. Les formes solubles ne possèdent pas de région transmembranaires, ils résultent de l'action de protéases. Ils peuvent également être dus à l'épissage alternatif, c'est le cas de la forme soluble de Fas, ou être le produit d'un gène qui ne code que pour la partie extracellulaire tel que décrit pour DcR3 (11). Les "decoys" membranaires peuvent résulter du produit d'un gène qui code uniquement pour les régions extracellulaires et membranaires tel que DcR1 (12;14).
3. Les TNF-Rs ayant une courte partie intracellulaire ou ne possédant pas de DD, sont principalement impliqués dans l'activation cellulaire par la voie du facteur NF κ B. Ces récepteurs sont également capables, dans certaines conditions, de transmettre un signal de mort, mais par un mécanisme entièrement inconnu.

2.1.2. Les ligands

Les ligands de la majorité de ces récepteurs ont été identifiés. Ce sont des protéines de type II où l'extrémité NH₂-terminal est cytoplasmique. Ils présentent 12 à 36% d'homologie entre eux dans leur partie extracellulaire. Leur forme biologique active est un complexe trimérique. Ces ligands peuvent être exprimés sous formes membranaires ou solubles. Certains sont capables de reconnaître plusieurs récepteurs, et plusieurs d'entre eux sont capables de transmettre des signaux lorsqu'ils sont engagés par leurs récepteurs (i.e. CD27L, CD40L, 4-1BBL et FasL; (15)), mais les voies de signalisations restent entièrement inconnues.

2.2. Fonctions biologiques des récepteurs de mort

Les systèmes de signalisation les mieux caractérisés dans cette famille sont ceux de FasL/Fas et TNF/TNF-R1.

Fas et FasL jouent un rôle important essentiellement dans trois types d'apoptose physiologique : 1- délétion des cellules T matures activées à la fin d'une réponse immunitaire, 2- lyse des cellules cibles infectées par des virus et les cellules cancéreuses et 3- éliminations des cellules inflammatoires (lymphocytes infiltrés) dans les sites immuno-privilégiés tels que les yeux et les testicules. Le rôle biologique de Fas est mis en évidence par les études faites chez certaines souches de souris et chez des patients déficients pour les gènes Fas ou FasL. Des mutations dans ces gènes peuvent mener à l'accumulation de cellules lymphoïdes en périphérie et à un syndrome auto-immun caractérisé par une hypertrophie massive des ganglions lymphatiques. Fas et FasL sont également impliqués dans la suppression pathologique de l'immuno-surveillance. Il a ainsi été décrit que certaines tumeurs expriment de façon constitutive FasL, leur permettant d'éliminer les cellules T activées qui sont supposées les détruire (4).

Les souris déficientes en TNF ou en TNF-R ont une plus grande susceptibilité aux infections microbiennes, et une absence de réponse inflammatoire suite à l'injection d'endotoxine bactérienne. Les résultats de ces travaux ainsi que ceux des analyses effectuées *in vitro* montrent que le rôle biologique du TNF est essentiellement

l'activation des gènes pro-inflammatoires, via l'activation des facteurs de transcription AP-1 et NF κ B. La plupart des activités biologiques du TNF sont médiées par le récepteur TNF-R1 (3). Le rôle du TNF dans l'apoptose *in vivo* est loin d'être élucidé (16).

DR3 et son ligand Apo-3L nouvellement identifié, présentent des homologies de séquences avec TNF-R1 et TNF respectivement. Ils constituent un système de signalisation très proche de celui du TNF-R1/TNF. L'interaction d'Apo-3L avec son récepteur DR3 peut induire soit l'activation de NF κ B, soit l'apoptose. Apo-3L active l'apoptose dans certaines lignées tumorales. D'autre part, Apo-3L peut induire l'expression de l'interleukine-8 (4;16).

Des différences notables existent au niveau de l'expression de ce ligand et de son récepteur. Des transcrits de DR3 ont été détectés essentiellement dans la rate, le thymus, le sang périphérique et dans les lymphocytes T après activation. Ceci suggère un rôle important du système Apo-3L/DR3 dans la régulation des fonctions lymphocytaires.

DR4 et DR5 sont deux autres récepteurs de mort qui interagissent avec un même ligand TRAIL. Suite à leur surexpression, ils peuvent induire l'apoptose comme ils sont capables d'activer le facteur de transcription NF κ B (4). Les fonctions biologiques de ces deux récepteurs ainsi que le système de signalisation à travers TRAIL et ses récepteurs seront détaillés plus loin.

DR6, le sixième récepteur de mort décrit, exprime des transcrits dans plusieurs tissus humains, et dans une variété de lignées tumorales. La surexpression de DR6 induit, en fonction du type cellulaire, soit l'apoptose (dans les cellules Hela), soit l'activation des voies NF κ B et JNK (c-Jun NH2-terminal Kinase)/AP-1 (dans les HEK 293). Le ligand ainsi que la fonction physiologique de DR6 restent encore à déterminer (16).

2.3. Signalisation de l'apoptose instructive à travers les récepteurs de mort

De nombreuses études biochimiques ont été nécessaires pour la caractérisation des voies de signalisation intracellulaire déclenchées par Fas ou par TNF-R1 pour initier

l'apoptose. Aucun membre de la famille du TNF-R n'est doué d'une activité enzymatique. Par conséquent, pour accomplir leurs fonctions cellulaires, ils doivent recruter des adaptateurs permettant l'initiation de la cascade apoptotique (4).

Suite à son engagement par FasL, Fas recrute l'adaptateur FADD (Fas-associated Death Domain)/Mort via son domaine de mort (4). FADD à son tour, recrute la protéase initiatrice caspase-8 par l'interaction de son domaine effecteur de mort avec le pro-domaine de la caspase. La juxtaposition de plusieurs molécules de caspase-8 entraîne son activation par auto-clivage. Par la suite, la caspase-8 initie l'apoptose par l'activation des caspases effectrices en aval tel que la caspase-3. Ces dernières clivent plusieurs substrats cellulaires, parmi lesquelles, des protéines de structure, des protéines de signalisation et des protéines qui régulent la transcription et la réplication de l'ADN. Le clivage de ces substrats est responsable de plusieurs changements biochimiques et morphologiques caractéristiques de l'apoptose. Un des substrats des caspases est l'inhibiteur de la DNase activée par les caspases (ICAD pour Inhibitor of Caspase-activated DNase) encore appelé DFF45 pour DNA Fragmentation Factor. ICAD se fixe sur CAD (Caspase-Activated DNase) et l'inactive. Le clivage d'ICAD par les caspases permet la libération de CAD qui initie la fragmentation internucléosomale de l'ADN (16).

La voie de signalisation de l'apoptose par le TNF est similaire à celle de FasL. L'interaction entre TNF et TNF-R1 induit le recrutement de l'adaptateur TRADD (TNFR-Associated Death Domain) au domaine de mort du récepteur. TRADD à son tour, recrute FADD sur lesquelles la procaspase-8 va interagir pour initier l'apoptose. TRADD peut aussi recruter la sérine/thréonine kinase, RIP (receptor-interacting protein) et l'adaptateur TRAF2 (TNFR-associated factor-2) qui sont impliqués dans les voies d'activation de NF κ B et de JNK/AP-1. TRAF2 et RIP activent la kinase NIK (NF κ B-inducing kinase), qui à son tour active le complexe IKK (inhibitor of κ B (I κ B) kinase). IKK phosphoryle I κ B et entraîne sa dégradation, permettant la libération de NF κ B, capable à ce moment de se déplacer vers le noyau pour activer la transcription. La voie de signalisation à travers TRAF2 et RIP qui mène à l'activation de JNK fait intervenir une cascade de kinases telles que MEKK1 (MAP (mitogen-activated protein)/Erk kinase kinase-1), JNKK (JNK kinase) et JNK (4).

Les études du système Apo-3L/DR3 ont montré, par utilisation du ligand (Apo-3L) et de surexpression du récepteur DR3, d'une part, l'implication de TRADD et FADD dans l'induction de l'apoptose, et d'autre part, l'implication de TRADD, RIP et TRAF2 dans l'activation de NF κ B et de JNK/AP-1 (4).

3. Etude du système TRAIL et ses récepteurs

3.1. Identification et caractérisation de TRAIL

TRAIL est une protéine de 281 acides aminés (a.a.) chez l'homme qui a 65% d'homologie avec son homologue murin qui a une taille de 291 a.a.. Le gène codant pour TRAIL est localisé sur le chromosome 3 à la position 3q26, loin des gènes codant pour les autres membres connus de la famille du TNF ainsi que ceux codant pour les récepteurs de TRAIL (voir plus loin). C'est une protéine membranaire de type II. Son domaine extracellulaire présente des homologies dans la séquence en a.a. avec celui des autres membres de la famille du TNF, qui sont de l'ordre de 28% avec Fas ligand, de 23% avec le TNF- α et la lymphotoxine- α et de 22% avec la lymphotoxine β . A la différence de la plupart des membres de la famille du TNF, TRAIL possède un domaine cytoplasmique très court de 17 a.a. seulement. Ce domaine n'est pas conservé entre l'homme et la souris ce qui suggère qu'il ne transmet pas un signal dans la cellule (17).

La forme soluble de TRAIL semble être trimérique. Les deux formes de TRAIL, membranaire et soluble, sont capables d'induire rapidement l'apoptose dans une variété de lignées de cellules transformées d'origines diverses. De plus, les résultats des tests de réactions croisées entre TRAIL humain et TRAIL murin, montrent que ce dernier est capable d'activer l'apoptose dans les cellules humaines et vice versa (4). La cytotoxicité induite par TRAIL sur les cellules cibles est mise en évidence par les changements morphologiques, l'activation des caspases, la fragmentation de l'ADN et l'exposition de la phosphatidylsérine à la surface cellulaire externe, caractéristiques des phénomènes apoptotiques (18).

3.2. Distribution tissulaire de TRAIL

Une des caractéristiques de TRAIL, qui le différencie des autres ligands de la famille du TNF est sa distribution tissulaire ubiquitaire. Alors que l'expression de la plupart des ligands est fortement régulée ou transitoire sur les cellules T activées, les transcrits de TRAIL sont détectés dans une grande variété de tissus humains tel que les lymphocytes du sang périphérique (PBL), la rate, le thymus, la prostate, les ovaires, l'intestin grêle, le colon, le placenta ainsi que dans plusieurs lignées cellulaires. Aucun transcrit de TRAIL n'est détecté dans le cerveau, le foie, et les testicules (17;18). Des études récentes montrent des résultats contradictoires concernant l'expression de TRAIL dans le cerveau. En effet, certaines études notent l'absence de TRAIL dans le cerveau, alors que d'autres ont pu détecter l'ARNm de TRAIL dans les tissus nerveux normaux, dans les lignées de cellules gliales ainsi que dans une variété de tumeurs du cerveau (19). L'absence de transcrits de TRAIL dans le foie est intéressante à noter, car le foie est un organe qui peut être détruit *in vivo* suite à l'injection de l'anticorps anti-Fas. Par analogie à FasL dont l'expression a été associée au rôle immuno-privilegié de certains organes, TRAIL pourrait être doué de fonctions protectrices similaires. Mais la contribution de TRAIL à l'immuno-privilegié par l'induction de l'apoptose des lymphocytes T cytotoxiques, n'a pas encore été démontrée.

Etant donné que TRAIL s'exprime dans plusieurs tissus, il a été suggéré qu'il induirait l'apoptose dans un nombre limité de circonstances biologiques et/ou son récepteur montrerait une distribution tissulaire plus restreinte. Mais la régulation de la mort cellulaire médiée par TRAIL semble être plus complexe, car jusqu'à présent, au moins 5 récepteurs de TRAIL ont été identifiés et caractérisés.

3.3. Les récepteurs de TRAIL

Cinq récepteurs de la famille du TNF-R capables de reconnaître TRAIL ont été identifiés (figure 1), trois d'entre eux nommés TRAIL-R1 (ou DR4 pour Death Receptor 4), TRAIL-R2 (ou DR5) et TRAIL-R4 (ou DcR2) sont des protéines membranaires. TRAIL-R3 (ou DcR1), à la différence des autres récepteurs, ne

contient pas de domaine cytoplasmique. Il est ancré dans la membrane cytoplasmique via un motif glycosyl-phosphatidyinositol (GPI) (figure 1). Le cinquième récepteur de TRAIL, nommé ostéoprotégerin (OPG) est une protéine sécrétée. Chacun des 5 récepteurs de TRAIL sera décrit en détail dans les sections suivantes.

3.3.1. TRAIL-R1 ou DR4

DR4, le premier récepteur décrit pour TRAIL, a été identifié à partir d'une banque de données EST, suite à la recherche de séquences présentant des homologies avec le motif DD (13). DR4 est une protéine de type I. Son domaine extracellulaire est caractérisé par deux pseudo-répétitions riches en cystéine qui sont homologues à celles caractérisant le domaine d'interaction avec le ligand des autres membres de la famille des TNFR. Une forme soluble de cette molécule, constituée du domaine extracellulaire de DR4 avec la portion Fc de l'IgG humaine a été construite et a été capable de lier TRAIL avec une grande affinité (20). Comme pour les autres récepteurs portant un DD dans leur partie cytoplasmique, la surexpression de DR4 entraîne l'apoptose (13), mais aussi une activation du facteur de transcription NFκB (21). Contrairement à ce qui est attendu, DR4 semble être exprimée d'une façon ubiquitaire avec des transcrits détectés dans la plupart des tissus humains.

3.3.2. TRAIL-R2 ou DR5

Peu de temps après l'identification de DR4, un deuxième récepteur pour TRAIL a été cloné et caractérisé par plusieurs groupes. Walczak et al. (22) ont purifié TRAIL-R2 directement de la surface de Jurkat sensibles à l'apoptose via TRAIL, en utilisant des approches biochimiques. Ensuite, TRAIL-R2 a été identifié par d'autres groupes, à partir d'une banque EST et il a été nommé DR5 (12;14;23), TRAIL-R2 (24) et TRICK2 (25). Dans une étude visant à explorer la voie de mort cellulaire p53-dépendante, Wu. et al ont isolé un clone à partir d'une librairie enrichie avec des transcrits induits par la doxorubicine à partir des cellules d'un tétatocarcinome ovarien chimiosensible. Dû à la présence d'un DD dans sa partie cytoplasmique, à l'induction

de son expression par une chimiothérapie cytotoxique ainsi qu'à l'induction de l'apoptose suite à sa surexpression, ce clone a été nommé Killer/DR5 (26).

DR5 montre une structure très similaire à celle de DR4. C'est une protéine de 411 a.a. transmembranaire de type I. Sa région extracellulaire contient deux domaines riches en cystéine, très homologues avec la région de DR4 (66% d'identité) impliquée dans l'interaction avec TRAIL. Son DD cytoplasmique montre une identité de 64% avec celui de DR4 (22;26).

Des tests de co-immunoprécipitation ont démontré l'interaction de DR5 avec TRAIL. De même, une protéine de fusion soluble DR5-Fc est capable de bloquer l'apoptose induite par TRAIL ce qui confirme la spécificité de l'interaction entre DR5 et TRAIL (14). Suite à sa surexpression dans les cellules Hela ou dans les cellules 293, DR5 induit l'apoptose (22;23). D'autre part, la surexpression de DR5 dans d'autres types cellulaires est capable d'induire l'activation de NFκB (14;21;27). L'analyse du messager de DR5, par Northern blot, montre la présence de deux transcrits. Il s'agit de deux variants qui diffèrent entre eux par l'insertion de 87 bp dans le même cadre de lecture, due probablement à de l'épissage alternatif (25).

Les transcrits de DR5 ont été détectés dans plusieurs tissus fœtaux et adultes tels que les PBL, la rate, le foie, et les poumons. De plus, une expression abondante du transcrit de DR5 est détectée dans plusieurs lignées de cellules tumorales (14). La forte expression de base de DR5 observée dans les PBL et la rate est augmentée suite à l'activation des lymphocytes (25). Alors que l'absence des transcrits de DR5 dans le cerveau humain a été rapportée par 2 groupes (14;25), une étude récente a pu mettre en évidence la présence des deux variants de DR5 dans le tissu cérébral normal ainsi que dans toutes les lignées et les échantillons de tumeurs cérébrales (19).

Enfin, des tests de co-immunoprécipitation ont démontré que DR5 peut s'associer avec DR4 pour former un hétérotrimère. Ceci suggère que TRAIL pourrait induire une signalisation à travers des hétérocomplexes (21). Cependant, la preuve que TRAIL pourrait lier un tel hétérocomplexe reste à déterminer.

3.3.3. TRAIL-R3 ou DcR1

TRAIL-R3 (20),(24) également connu sous les noms de DcR1 (Decoy Receptor 1 ; (14)), TRID (TRAIL Receptor without an intracellular Domain; (12)) et LIT (Lymphocyte inhibitor of TRAIL ; (28)), est une troisième protéine membranaire capable de lier TRAIL avec une grande affinité. A la différence des deux précédents récepteurs de TRAIL, DcR1 ne possède ni région transmembranaire ni domaine cytoplasmique (12;20;24;28). Malgré l'absence d'une structure transmembranaire classique, DcR1 existe sous forme de protéine de surface ancrée à la membrane via un motif GPI (fig1) (14;20). DcR1 est ainsi incapable de transduire un signal apoptotique (12;20;24;28) ou de survie. En outre, du fait de sa grande affinité pour TRAIL il bloque l'apoptose induite par ce dernier.

La distribution tissulaire et cellulaire de DcR1 est plus limitée que celle de DR4 et DR5. Les transcrits de DcR1 ont été détectés dans plusieurs tissus humains normaux, parmi lesquels, le cœur, le placenta, les poumons, le foie, les reins ainsi que dans la rate, les PBL et la moelle osseuse (MO) (12;20;24;28). En revanche, son expression est retrouvée à des niveaux relativement faibles dans certaines lignées de cellules transformées. L'expression de DcR1 dans les tissus normaux peut expliquer leur résistance à l'apoptose induite par TRAIL. En effet, un rôle protecteur de DcR1 a été proposé (12;23). Des études plus poussées ont détecté les ARNm de DcR1 dans des métastases cérébrales, dans des lignées primaires de cellules cérébrales ainsi que dans du tissu cérébral sain (19). Par ailleurs, les transcrits de DcR1 ont été détectés dans certaines lignées cellulaires qui sont sensibles à l'apoptose médiée par TRAIL. De plus sa surexpression réduit partiellement et temporairement l'effet cytotoxique de TRAIL (29).

3.3.4. TRAIL-R4 ou DcR2

Le quatrième récepteur de TRAIL, appelé TRAIL-R4 (29), DcR2 (Decoy receptor 2 ; (30)), ou encore TRUNDD (TRAIL receptor with a truncated DD; (31)), est une protéine membranaire de type I. DcR2 lie TRAIL avec une affinité comparable à celles des autres récepteurs de TRAIL (29) et une protéine de fusion soluble DcR2-Fc

bloque d'une manière efficace la cytotoxicité induite par TRAIL. Il est intéressant de noter que dans le domaine carboxy-terminal de la partie cytoplasmique de ce récepteur il manque 52 des 76 a.a. qui constituent le DD de DR4 et DR5. Ceci suggère l'impossibilité pour DcR2 de transmettre un signal de mort. En effet, la surexpression transitoire de DcR2 n'induit pas l'apoptose (29-31), par contre son expression dans les cellules normalement sensibles à l'apoptose par TRAIL les rend complètement résistantes. Bien que la région cytoplasmique de DcR2 soit incapable de donner un signal de mort, elle est capable d'induire une activation de NF κ B (29).

Les transcrits de DcR2 ont été détectés dans plusieurs tissus humains normaux à des niveaux relativement élevés, particulièrement dans le foie fœtal et les testicules, suggérant une fonction protectrice de ce récepteur dans ces tissus. De même, l'expression des transcrits de DcR2 dans certaines lignées tumorales a été rapportée par plusieurs groupes (29;30). Leur expression dans le cerveau semble être exceptionnelle, puisqu'ils ont été détectés dans un sur trois tissus cérébraux normaux examinés(19).

3.3.5. Ostéoprotégerin (OPG)

L'OPG a été décrit comme étant un membre de la famille du TNF-R, qui régule la résorption osseuse (32). C'est une molécule sécrétée, son domaine amino-terminal est caractérisé par un peptide signal hydrophobique et des pseudo-répétitions riches en cystéine. A la différence des autres membres de la famille de TNF-R, l'OPG ne contient ni domaine transmembranaire ni région cytoplasmique. Une étude récente a montré que l'OPG est un récepteur pour TRAIL; l'affinité de son interaction avec TRAIL est légèrement inférieure à celle de DR5-Fc et DcR1-Fc, mais reste cependant capable d'inhiber l'apoptose induite par TRAIL (33). L'effet de l'OPG sur l'os résulte de sa capacité à inhiber l'ostéoclastogenèse. Cet effet ne semble pas être dû à TRAIL, mais à un autre ligand appelé OPGL/RANKL/TRANCE (34). Ce même ligand est impliqué dans la régulation de la présentation de l'antigène par les cellules dendritiques et dans l'activation des cellules T.

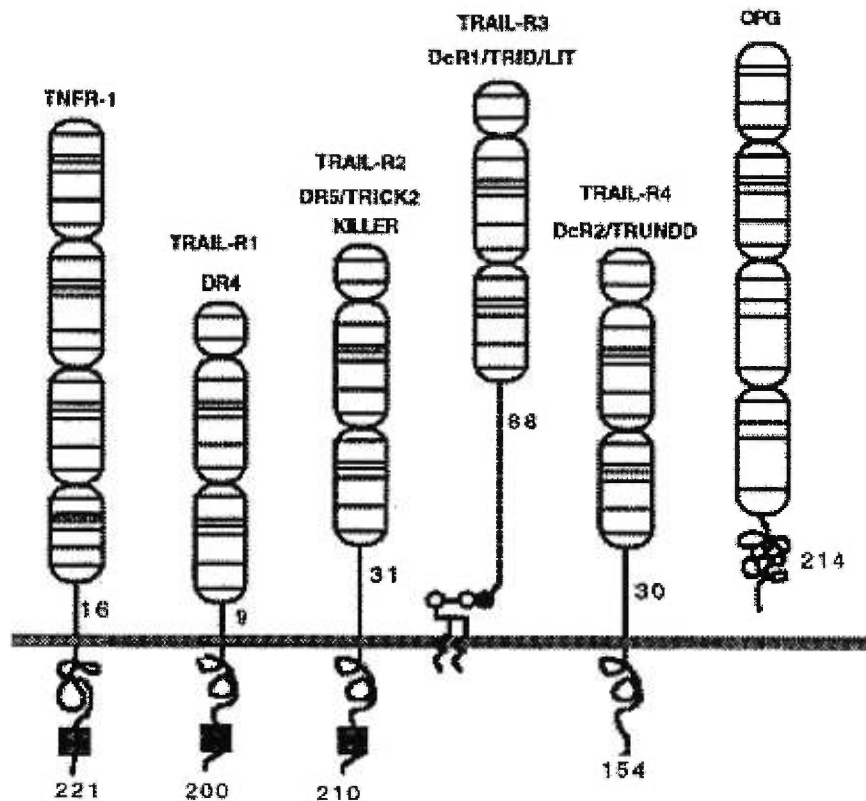


Figure 1: La structure des récepteurs de TRAIL est montrée en comparaison avec celle du TNF-R1, le prototype de la famille des récepteurs de mort. Les pseudo-répétitions riches en cystéine dans le domaine extracellulaire des membres de la famille des TNF-R, sont présentées sous forme de boîtes ouvertes avec des lignes horizontales représentant les résidus cystéine conservés qui forment des ponts disulfure. La longueur de la séquence de la région extracellulaire, ainsi que celle du domaine cytoplasmique sont montrées. Les boîtes noires dans la région cytoplasmique représentent le domaine de mort. Le motif GPI attachant TRAIL-R3 à la cellule est présenté. (Degli-Esposti, M. 1999. *J Leukoc. Biol* 65).

3.4. Localisation chromosomique des récepteurs de TRAIL

Les gènes codant pour quatre des cinq récepteurs de TRAIL, DR4, DR5, DcR1 et DcR2 forment un bloc sur le chromosome 8p21 humain. Ceci suggère que ces gènes ont évolué à partir d'un précurseur commun grâce à des événements de duplication (34). La proximité chromosomique étroite des gènes codant pour les récepteurs de TRAIL est surprenante, vu le haut degré d'homologie qui les caractérise. De telles proximité et homologie suggèrent un risque pour ces gènes d'être éliminés ensemble par des événements de recombinaison homologue. La caractérisation de ces gènes chez la souris va probablement aider à clarifier ces énigmes. Il est intéressant de noter

que le gène codant pour l'OPG humain est également localisé sur le chromosome 8 en position q23-24 (32).

3.5. Signalisation à travers le système TRAIL/TRAIL-R

Les premières expériences qui étudiaient la signalisation des récepteurs de TRAIL étaient basées sur leur similarité avec Fas et TNF-R1. Ainsi, l'association de DR4 et DR5 avec des protéines adaptatrices, telles FADD, TRADD et RIP a été testée. Les résultats des expériences utilisant des cellules transfectées avec ces molécules adaptatrices démontrent que DR4 et DR5 n'interagissent pas directement avec ces molécules. Des analyses plus approfondies des voies de signalisation de DR4 et DR5 montrent que l'expression d'un dominant négatif de FADD est incapable de bloquer l'apoptose, alors que l'addition d'inhibiteurs des caspases tels que CrmA (cytokine response modifier) et zVAD, inhibaient l'apoptose médiée par DR4 et DR5 (13;14). Ceci suggère une association avec un adaptateur inconnu qui connecte DR4 et DR5 à la machinerie de mort cellulaire. D'autres études contradictoires montrent une interaction directe de FADD et TRADD avec ces deux récepteurs ainsi qu'une inhibition de l'apoptose induite par TRAIL avec un dominant négatif de FADD ou de TRADD (21;22;27;35). DR4 et DR5 interagissent avec TRADD pour induire l'activation de NFκB (14;21;27).

D'autres groupes, ont utilisé le ligand TRAIL plutôt que les récepteurs, pour étudier les voies de signalisation, et ont aboutit au même résultat. En effet, Marsters et al. ont montré, en exprimant, d'une façon transitoire un dominant négatif de FADD dans les cellules Hela, que TRAIL induit l'apoptose indépendamment de FADD, (36). A l'opposé, Wajant et al. ont généré des cellules Hela qui expriment d'une façon stable un dominant négatif de FADD, et ont montré une inhibition de l'apoptose induite par TRAIL dans ces cellules (37), ce même groupe était incapable de détecter une interaction entre TRAIL et le dominant négatif de FADD dans les réactions d'immunoprécipitation (37). Ces observations contradictoires peuvent être expliquées par des différences dans les niveaux relatifs d'expression de ces molécules dans les transfectants utilisés dans les expériences. Des cellules provenant de souris déficientes en FADD montrent une résistance à l'apoptose induite par Fas, TNFR1 et DR3. Ces

mêmes cellules restent complètement sensibles à l'apoptose induite par DR4, ce qui confirme l'existence d'une voie FADD-indépendante qui relie TRAIL aux caspases (38).

Des études analysant l'activation des caspases, ont montré que plusieurs caspases parmi celles impliquées dans l'apoptose médiée par Fas et TNF sont aussi importantes durant l'apoptose induite par TRAIL. L'activation de la caspase-8 peut être observée à peine quelques minutes après l'addition de TRAIL sur les cellules sensibles, ce qui suggère que caspase-8 peut être un des composants proximaux dans la voie de signalisation (39). Les études faites par d'autres groupes ont démontré le recrutement de la caspase-10 vers les complexes de signalisation de DR4 et DR5 (12). Peu de temps après l'activation de caspase-8, une activation de caspase-3, un substrat de caspase-8 et caspase-10, a pu être détectée (39). De même, un clivage de PARP, un substrat de caspase-3, a été mis en évidence (39-41). De plus, l'inhibiteur de caspases Ac-DEVD-CHO a été capable de bloquer le clivage de PARP dans les cellules de myélomes et de leucémies lors de l'apoptose induite par TRAIL (41). D'autres substrats cellulaires peuvent également être recrutés dans la voie de signalisation de l'apoptose induite par TRAIL. La tyrosine kinase FAK (focal adhesion kinase) est clivée par les caspases au cours de l'apoptose médiée par TRAIL, ce qui contribue aux changements morphologiques observés dans les cellules apoptotiques (42). De même, un clivage de Bid (une molécule proapoptotique appartenant à la famille Bcl-2) par caspase-8 est observé 1 heure après l'incubation des cellules de la lignée BJAB avec TRAIL (43).

Au total, ces résultats indiquent une possibilité de régulation intracellulaire de la cascade de signalisation des caspases à partir des récepteurs de TRAIL, comme c'est le cas pour d'autres récepteurs de mort. Un certain degré de régulation intracellulaire est mis en évidence lorsque des cellules de mélanomes résistantes à l'apoptose par TRAIL, y deviennent sensibles quand elles sont cultivées en présence d'actinomycine D ou de cycloheximide (39). Une explication possible est la présence d'une molécule anti-apoptotique qui a une demi-vie courte, et qui est capable d'inhiber l'activation des caspases ou les altérations mitochondriales associées à l'induction de l'apoptose. Au cours de l'analyse des niveaux d'expression des inhibiteurs de l'apoptose connus,

des niveaux élevés de FLIP (Flice-like inhibitory protein) ont été détectés dans les lignées de mélanomes résistantes à TRAIL (39). FLIP, une protéine cellulaire nouvellement identifiée, est un homologue de caspase-8, dépourvue d'activité catalytique. Les niveaux de FLIP diminuaient quand les cellules sont cultivées avec l'actinomycine D, parallèlement à une augmentation de la sensibilité aux effets de TRAIL (39). Bien que ces résultats suggèrent un rôle important de FLIP dans le contrôle de la susceptibilité des cellules tumorales à l'apoptose induite par TRAIL, on ne peut pas éliminer la possibilité que d'autres facteurs, intra et/ou extra cellulaires peuvent aussi jouer un rôle dans la protection des cellules normales de l'apoptose médiée par TRAIL.

Dans une étude récente, l'expression des ARNm et des protéines des récepteurs de TRAIL a été analysée dans une série de cellules de mélanomes et dans les mélanocytes. Cette étude avait pour but de déterminer si la variabilité de la sensibilité à l'apoptose induite par TRAIL est due à l'expression différentielle des différents récepteurs de TRAIL, et/ou au niveau d'expression de la protéine FLIP. Les résultats de cette étude confirment l'importance de l'expression de DR4 et DR5 pour l'induction de l'apoptose par TRAIL, puisque les cellules qui n'exprimaient ni l'ARNm ni la protéine de ces récepteurs, ainsi que les cellules qui exprimaient ces mêmes récepteurs dans leur cytoplasme et non pas à la surface, étaient résistantes à l'apoptose induite par TRAIL (44). Un résultat identique est apporté dans une autre étude, qui utilisait un anticorps monoclonal bloquant DR5 pour montrer que les signaux transmis à travers un des deux récepteurs, DR4 ou DR5, sont suffisants pour médier l'apoptose (45). L'expression de DcR1 et DcR2 ne semble pas affecter la sensibilité de ces cellules à l'apoptose induite par TRAIL. De même les niveaux d'expression de FLIP ne corrélaient pas avec la résistance à l'apoptose par TRAIL (44), ce qui contredit les résultats de l'étude faite par Griffith et al. (39). Ces résultats suggèrent l'implication d'autres protéines capables d'inhiber l'apoptose, telles les protéines IAP (inhibitor of apoptosis protein) induites par NF κ B. Un modèle hypothétique des voies de signalisation de l'apoptose médiée par TRAIL à travers ses récepteurs de mort, DR4 et DR5, tel que suggéré par plusieurs références, est illustré dans la figure 2.

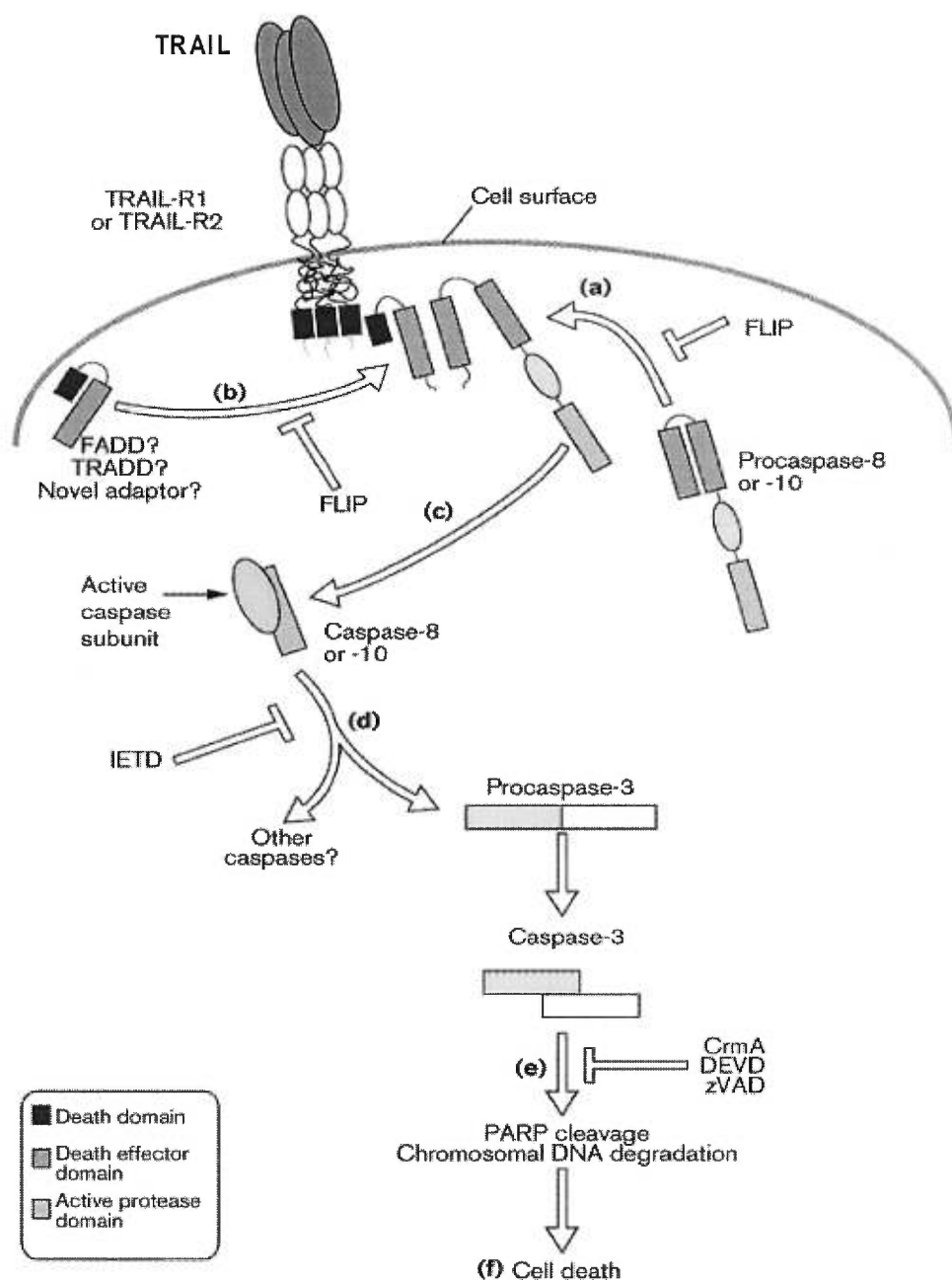


Figure 2: La voie de signalisation de l'apoptose à travers TRAIL-R1 ou DR4 et TRAIL-R2 ou DR5 telle que suggérée par différents groupes. Suite à l'activation de DR4 ou DR5, en présence ou en absence de leur ligand, (a) les pro-caspases-8 ou -10 sont recrutées (b) avec des molécules adaptatrices (FADD, TRADD ou un nouveau adaptateur). FLIP peut inhiber l'une ou l'autre étape. (c) formation des caspases-8 ou -10 activées qui (d) activent la pro-caspase-3 et probablement d'autres caspases, qui peuvent être inhibées par l'IETD (chaque lettre correspondant à un acide aminé). (e) la caspase-3 induit le clivage de PARP et la fragmentation de l'ADN, cette étape peut être bloquée par CrmA, DEVD ou zVAD. (f) finalement la mort cellulaire peut avoir lieu. (Griffith, T.S. et al. 1998. *Current opinion in immunology* 10).

TRAIL est également capable d'activer le facteur de transcription NF κ B et la NH₂-terminal kinase c-Jun (JNK) (35;46;47). L'activation de JNK induite par TRAIL est spécifique au type cellulaire. Ainsi, TRAIL est capable d'induire l'activation de JNK par deux voies différentes, une dépendante et une autre indépendante des caspases. De plus, utilisant un dominant négatif de FADD et un inhibiteur des caspases, le zVAD-fmk, il a été démontré qu'à la différence de l'induction de l'apoptose, la voie d'activation de JNK dépendante des caspases, est indépendante de FADD. Ces résultats montrent que TRAIL est capable d'engager au moins trois voies de signalisation : deux voies indépendantes mais impliquant les caspases, qui mènent soit à l'apoptose soit à l'activation de JNK, et une voie indépendante des caspases qui mène aussi à l'activation de JNK (47). Au cours de l'étude des voies de signalisation de TRAIL dans les cellules lymphoïdes, telles les cellules Jurkat, CEM et BJAB, Jeremias et al. ont montré que l'activation de NF κ B par TRAIL est indépendante de FADD et des caspases. De plus, l'inhibition de NF κ B dans ces cellules, augmente la sensibilité et diminue la résistance à l'apoptose induite par TRAIL (46).

Plus récemment, une étude caractérisant les voies de signalisation à travers les récepteurs de TRAIL, DR4, DR5 et DcR2, montre un résultat contradictoire à ceux déjà décrits plus haut. Dans leur système, l'inhibition de l'activation de NF κ B dans les cellules résistantes à TRAIL, telles les cellules MCF7, ne les rend pas sensibles à l'apoptose par TRAIL. De même, l'activation de NF κ B n'est pas capable de protéger les cellules contre l'apoptose induite par DR4. Les résultats de la caractérisation des différentes voies de signalisation montrent que les récepteurs de TRAIL induisent l'apoptose, l'activation de NF κ B et l'activation de JNK par des voies de signalisation distinctes (35).

En conclusion, bien que les études de signalisation à travers le système TRAIL/TRAIL-R soient assez nombreuses, elles montrent des résultats contradictoires et beaucoup de lacunes, ceci est probablement dû à la complexité du système. Ainsi, des études supplémentaires sur la régulation de l'expression des récepteurs de TRAIL et de la voie de signalisation de l'apoptose par TRAIL, sont nécessaires pour pouvoir utiliser TRAIL en thérapie anti-cancéreuse.

3.6. Rôle de TRAIL dans l'apoptose des cellules T

3.6.1. Expression de TRAIL dans les cellules T

L'analyse des transcrits de TRAIL montre que son expression est constitutive dans plusieurs tissus, y compris les lymphocytes des PBL, la rate et le thymus (17;18). Quant à l'expression de la protéine, des analyses par western blot montrent que TRAIL s'exprime d'une façon constitutive, sous forme de protéine cellulaire, dans les cellules des lignées T humaines (Jurkat) et murines (EL4) (48;49), et dans les PBMC de donneurs sains, mais à des niveaux d'expression différents d'un donneur à l'autre (49). L'expression de TRAIL à la surface cellulaire est détectée dans la majorité des lignées de cellules T, mais à des degrés variables selon la lignée (48).

3.6.2. Modulation de l'expression de TRAIL membranaire

Il a été montré que FasL est exprimé sous forme de protéine transmembranaire, à la surface cellulaire, et ensuite retrouvé sous sa forme soluble après clivage par une métalloprotéase. Des inhibiteurs spécifiques capables de bloquer ce clivage, entraînent une augmentation du niveau d'expression de la forme membranaire de FasL. Des observations similaires ont été décrites pour TNF- α . Par contre, l'expression de TRAIL membranaire n'a pas été affectée par les inhibiteurs de métalloprotéases. Néanmoins, le traitement des cellules Jurkat avec l'inhibiteur des cystéine protéases E64, a entraîné une augmentation du niveau d'expression de TRAIL à la surface de 80% (48), ce qui suggère un rôle fonctionnel de cette classe d'enzymes dans le clivage de TRAIL membranaire.

3.6.3. Régulation de l'expression de TRAIL dans les cellules T

Dans le but de définir le profil d'expression de TRAIL à la surface des cellules T, Mariani et al. ont isolé les splénocytes de souris, et les ont activés avec la concavaline A, un mitogène puissant des cellules T, en présence de l'IL-2 (ConA/IL-2). L'analyse par cytofluorométrie de ces cellules, avec ou sans deuxième stimulation, montre que seules les cellules CD3⁺ activées et non les cellules naïves, expriment TRAIL à leur

surface. Une restimulation avec la PMA et l'ionomycine ou avec un anticorps monoclonal anti-CD3, induit une augmentation significative de l'expression de TRAIL à la surface des cellules CD3⁺ exprimant le TCR $\alpha\beta$, aussi bien dans la population CD4⁺ que dans la population CD8⁺. Cette augmentation de l'expression de TRAIL est sensible à la cyclosporine A et est dépendante de la synthèse protéique, puisqu'elle est inhibée par la cycloheximide (50).

Un résultat similaire est rapporté dans une autre étude analysant la voie d'induction du gène TRAIL dans les cellules T de souris. Dans cette étude, une stimulation des cellules avec l'anti-CD3 induit une augmentation de l'expression de TRAIL aussi bien au niveau des transcrits qu'au niveau des protéines (51). L'augmentation de l'expression des ARNm de TRAIL a été aussi observée dans les cellules T humaines suite à leur activation par l'anti-CD3, la combinaison PMA/ionomycine ou l'entérotoxine B de staphylocoque (SEB) (40). La stimulation avec la PHA ou l'IL-2 n'a pas affecté l'expression de TRAIL à la surface des cellules T humaines même après 48 heures. Par contre, la stimulation avec l'anti-CD3 a augmenté cette expression d'une façon marginale (52). La combinaison de l'anti-CD3 avec l'IFN- α a induit une forte augmentation de l'expression de TRAIL qui a été observée après 6 heures à la surface des cellules T des 2 phénotypes, CD4⁺ et CD8⁺ (52).

L'activation des cellules Jurkat par la PHA induit une diminution du niveau d'expression de TRAIL cellulaire après 1 heure d'activation, ce qui suggère une sécrétion possible de TRAIL, comme dans le cas de FasL. Sept heures après stimulation avec la PHA, le niveau de TRAIL est similaire à celui des cellules Jurkat non stimulés (49). Dans les PBMC traités avec la PHA et cultivés en présence d'IL-2 pendant 6 jours, le niveau cellulaire de TRAIL augmente progressivement et proportionnellement au nombre de blastes générés (49).

Pour étudier la voie de signalisation impliquée dans l'induction du gène codant pour TRAIL suite à l'activation des cellules T via le TCR, une série d'inhibiteurs pharmacologiques a été testée. Les résultats des analyses par RT-PCR, confirmés par des western blot, montrent une implication des PTK (protéine tyrosine kinase) de la famille *src*, de la PKC (protéine kinase C) et de la PI3-K (phosphatidylinositol 3-kinase) dans l'induction du gène codant pour TRAIL suite à l'activation des cellules.

Cette induction est bloquée par la cyclosporine A et la Rapamycine. Ces résultats montrent que l'induction du gène codant pour TRAIL est initiée par une voie de signalisation associée au TCR (51).

En conclusion, le profil d'expression de TRAIL dans les cellules T, et son augmentation suite à l'activation, suggèrent un rôle de cette cytokine dans la cytotoxicité médiée par les cellules T et dans la régulation de la réponse immune.

3.6.4. Rôle de TRAIL dans l'apoptose des cellules T

A la fin d'une réponse immune cellulaire, la plupart des cellules T activées sont éliminées par un processus appelé AICD (activation induced cell death) pour prévenir tout dommage auto-immun potentiel (53-56). Ce processus implique une mort par apoptose des cellules cibles. L'interaction de Fas avec son ligand naturel FasL induit l'AICD d'hybridomes de cellules T, et des lymphocytes T matures normaux, jouant ainsi un rôle important dans la régulation de la tolérance périphérique et dans l'homéostasie des lymphocytes. Le système TNF/TNFR a été impliqué dans l'AICD des cellules T CD8⁺ matures (53). TRAIL pouvait activer l'apoptose dans les cultures de PBL enrichies en cellules T, stimulés avec l'IL-2 (36) ou PHA plus IL-2 (57), mais n'avait aucun effet sur les cellules non activées. Ceci suggère que TRAIL, comme FasL, joue un rôle dans la régulation de l'apoptose des lymphocytes activés. Une observation contradictoire est rapportée par Jeremias et al. qui montraient que différentes lignées cellulaires lymphoïdes humaines ainsi que les cellules T du sang périphérique diffèrent dans leur sensibilité à l'apoptose induite par TRAIL et par FasL. En effet, les cellules T qui sont devenues très sensibles à l'apoptose induite par FasL après une activation prolongée *in vitro*, (stimulation avec la PHA et maintien en culture en présence d'IL-2 pendant 7 jours) sont restées complètement résistantes à l'apoptose induite par TRAIL (40).

Les surnageants des cellules Jurkats ou des PBMC préstimulés avec la PHA induisent une cytotoxicité sur des cellules Jurkat non stimulés. Un anticorps monoclonal anti-TRAIL neutralisant est capable de bloquer partiellement cette cytotoxicité, suggérant que TRAIL est sécrété par ces cellules et par la suite contribue à l'AICD. Une combinaison d'anticorps neutralisants anti-TRAIL et anti-FasL bloque

environ 60 % de la toxicité des surnageants des PBMC stimulés avec la PHA. Ces résultats montrent que TRAIL et FasL sont responsables de la majorité de l'activité cytotoxique au cours de l'AICD, et suggèrent la participation d'autres facteurs, non caractérisés, à ce processus de mort (49). Récemment, le même groupe a démontré des évidences sur la sécrétion de TRAIL et de FasL, dans le surnageant, sous leur forme intacte non protéolysée, associée à des microvésicules. Ces microvésicules sont sécrétées par les cellules Jurkat et des blastes de cellules T humaines normales, moins d'une heure après la stimulation avec la PHA et bien avant que la cellule initie le processus apoptotique (58).

L'AICD des cellules T purifiées ou des PBMC des individus infectés par le VIH (virus de l'immunodéficience humaine) a été proposée comme étant un mécanisme important dans la pathogenèse du SIDA (syndrome de l'immunodéficience acquise), impliqué dans l'altération des fonctions et la déplétion des cellules T CD4⁺ (59). Il a déjà été démontré que les cellules T du sang périphérique des patients infectés par le VIH (VIH⁺) peuvent mourir par un processus d'AICD. Celle-ci peut être inhibée par le zVAD-fmk, et est indépendante de Fas, puisqu'elle n'a pas été bloquée par un anticorps monoclonal bloquant spécifique de FasL (60). Dans une deuxième étude, le même groupe a montré que TRAIL peut médier l'AICD des cellules T chez les patients VIH⁺, puisqu'un anticorps monoclonal bloquant anti-TRAIL était capable de bloquer cette AICD (61). De plus, l'étude qui comparait la sensibilité des cellules T vis à vis de l'apoptose médiée par TRAIL et par FasL, a montré que les cellules T de patients VIH⁺ connues pour leur forte sensibilité à FasL, sont encore plus susceptibles à l'apoptose induite par TRAIL (40).

3.7. TRAIL dans les tumeurs

3.7.1. Effet anti-tumoral de TRAIL *in vitro*

Bien que le rôle biologique de TRAIL n'a pas encore été bien élucidé, son activité anti-tumorale a été décrite par différents groupes de chercheurs. TRAIL recombinant est capable d'induire l'apoptose dans les cellules cancéreuses de différentes origines alors qu'il montre une cytotoxicité minimale ou négligeable sur les cellules normales

(tableaux 1 et 2) (62;63). L'effet tumoricidal du TRAIL soluble a été montré dans environ deux tiers de plus de trente lignées de cellules tumorales d'origine hématopoïétique (tableau 1) ou non (tableau 2) testées *in vitro* (17;18;39).

Walczak et ses collaborateurs étaient les premiers chercheurs qui ont identifié le ligand TRAIL (17). Dans leur système, le TRAIL soluble produit était monomérique, et donc son activité pro-apoptotique était relativement faible (63). Afin de produire la molécule sous une forme plus active, ce même groupe a fusionné le domaine extracellulaire de TRAIL -la région essentielle à l'interaction avec ses récepteurs- avec un motif «leucine zipper» (LZ) qui favorise la trimérisation. Les trimères LZ-TRAIL tuaient d'une façon efficace les cellules de l'adénocarcinome mammaire humain MDA-231 mais pas les cellules épithéliales mammaires normales, nontransformées ou les cellules de différents tissus humains normaux (tableau 2) (64). Le deuxième groupe qui a identifié TRAIL (18), a voulu générer une molécule biologiquement active et dépourvue de toutes séquences étrangères afin de diminuer son immunogénicité lors des injections répétées *in vivo*. En effet, une telle molécule a pu être exprimée et produite dans la bactérie. Après la purification, le TRAIL soluble se trouvait sous forme d'homotrimères, et par conséquent était fonctionnel (65). Le TRAIL soluble ainsi produit n'était pas toxique pour les cellules normales testées, y compris les astrocytes qui étaient sensibles à LZ-TRAIL. Par contre, la même molécule avait un effet cytostatique ou cytotoxique sur 32 de 39 lignées cellulaires testées, provenant soit de cancers du colon, des poumons, du sein, de rein, du cerveau ou de la peau. Ces résultats montrent que TRAIL est capable d'inhiber la prolifération ou d'induire la mort *in vitro* dans la majorité des lignées cellulaires dérivées des types de cancers humains les plus fréquents (65).

Les cellules de mélanomes (de lignées déjà établies ou primaires à partir de biopsies fraîchement isolés des patients) ont fait l'objet d'études plus détaillées puisqu'elles ont montré une sensibilité à TRAIL, alors qu'elles étaient résistantes à FasL, TNF α et CD40L (39;44;45;66).

Types cellulaires	Sensibilité/Résistance	Références
Lignées cellulaires		
- Myéloïdes		
OCI-AML2	Résistante	(57)
HL-60	Sensible	(17;57)
HL-60 DOX	Sensible	(57)
K562	Résistante	(17;57)
MO7e	Résistante	(57)
NB4	Résistante	(57)
RC2a	Résistante	(57)
KG1a	Résistante	(57)
THP-1	Résistante	(57)
OCI-AML3	Sensible	(57)
- Erythroïdes		
TF-1	Résistante	(57)
- Lymphoïdes		
Myélome 8226	Sensible	(57)
Myélome 8226-DOX6	Sensible	(57)
Lymphome HH	Résistante	(57)
Lymphome DHL	Résistante	(57)
Lymphome V.N	Résistante	(57)
Lymphome SUP-M2	Résistante	(57)
Lymphome SU-DHL-1	Résistante	(57)
Lymphome IM-9	Résistante	(57)
Lymphome U937	Résistante	(17;18;57)
Lymphome BJAB	Sensible	(17)
Lymphome RAMOS	Sensible	(17)
Lymphome DAUDI	Résistante	(17)
Lymphome RAJI	Résistante	(17;18)
Jurkat	Sensible	(17;18;40;46;57)
Jurkat BAX	Sensible	(57)
CEM	Sensible	(40;46)
Ganglion lymphatique normal	Résistante	(57)

Tableau 1 : Sensibilité des cellules d'origine hématopoïétique à l'apoptose induite par TRAIL. (Les cellules sont considérées sensibles si l'apoptose observée est supérieure à 35%).

Types cellulaires	Sensibilité/Résistance	Références
Mélanomes		
- WM 9	Sensible	(39;45)
- WM 35	Sensible	(39;45)
- WM 793	Sensible	(39;45)
- WM 852	Résistante	(39;45)
- WM 902	Résistante	(39;45)
- WM 1158	Sensible	(39;45)
- WM 1205	Sensible	(39;45)
Mélanocytes	Résistante	(39;44;45;64)
Carcinomes du colon		
- HT 29	Résistante	(1)
- SW620	Résistante	(1)
- HCT 15	Sensible	(64;65)
- COLO 205	Sensible	(64;65)
Adénocarcinomes du sein		
- MDA 231	Sensible	(64)
- MCF7	Sensible	(1)
Adénocarcinome des poumons		
- NCI-H460	Sensible	(65)
- H2126	Sensible	(1)
Carcinomes des reins		
- RCC	Sensible	(52)
Lignées de kératinocytes		
- HaCaT	Sensible	(75;76;79)
- KB	Sensible	(75;76)
Cancers du cerveau		
- gliomes	Sensible	(68)
- U251	Sensible	(65)
Cellules normales		
- Cellules endothéliales des veines ombilicales humaines	Résistante	(65)
- Fibroblastes des poumons	Résistante	(64;65)
- cellules musculaires du colon	Résistante	(65)
- cellules épithéliales rénales, mammaires et prostatiques	Résistante	(64;65)

Tableau 2 : Sensibilité des cellules d'origine non hématopoïétique à l'apoptose induite par TRAIL. (Les cellules sont considérées sensibles si l'apoptose observée est supérieure à 35%).

Au niveau du cerveau, l'expression des ARNm et de la protéine TRAIL est détectée, *in vitro* dans les lignées de cellules gliales, et *in vivo* dans les tumeurs primaires astrocytaires. A l'exception des astrocytes, les cellules gliales et les neurones normaux n'exprimaient pas TRAIL (67). Ce profil d'expression de TRAIL suggère que le système TRAIL/TRAIL-R, comme le système FasL/Fas peut jouer un rôle dans la régulation de la susceptibilité à l'apoptose des néoplasies gliales humaines. En effet, Rieger et al. ont examiné l'expression des récepteurs de TRAIL dans les lignées des cellules gliales, et la susceptibilité de ces cellules vis à vis de l'apoptose induite par TRAIL. Les résultats de leur étude montrent une expression préférentielle des récepteurs agonistes de mort, DR4 et DR5, sur les cellules gliales des lignées, plutôt que des récepteurs inhibiteurs de mort, DcR1 et DcR2. Des douze lignées de cellules gliales testées, dix montraient une sensibilité à l'apoptose induite par TRAIL (68).

Un rôle de TRAIL dans l'induction d'apoptose spécifique de cellules tumorales a également été décrit dans certaines hémopathies malignes (57;69). D'une part, les receveurs de moelle osseuse allogénique développent souvent une réaction GVHD (graft versus host disease) médiée par les lymphocytes du donneur, d'autre part, les rémissions cliniques observées chez les patients leucémiques suite à l'infusion de lymphocytes allogéniques, confirment l'effet GVT (graft versus tumor) de ces derniers. De plus, des études récentes ont montré que la transplantation de lymphocytes déficients en FasL et en perforines n'induisait aucune réaction GVHD dans les souris ; pourtant ces mêmes lymphocytes maintenaient leur activité cytolytique (70). Il semblait donc, que la GVHD et la GVT sont deux phénomènes séparés, et que d'autres médiateurs de la cytotoxicité des cellules T, tels que TRAIL, pourraient médier la GVT en l'absence de FasL et de perforine. En se basant sur cette hypothèse, Snell et al. ont testé le spectre d'activité de TRAIL dans les hémopathies malignes, sur des lignées établies ou des échantillons de tumeurs fraîchement isolées chez des patients. Leurs résultats montrent que malgré la capacité de TRAIL d'induire l'apoptose dans plusieurs types de tumeurs lymphoïdes (phénotype T et B) et myéloïdes malignes, correspondant à différents stades de différenciation, son activité

n'était pas très efficace. Globalement, seulement 27% des échantillons de tumeurs testés, montraient une sensibilité à TRAIL (57).

Des résultats plus intéressants sont apportés dans l'étude testant l'effet de TRAIL sur les cellules de myélomes. Dans cette étude, Gazitt montre que TRAIL peut induire l'apoptose dans les lignées de myélomes multiples (MM), et cette apoptose ne peut pas être bloquée par la molécule anti-apoptotique bcl-2. De plus, TRAIL pouvait induire l'apoptose des cellules de myélomes fraîchement isolées de patients atteints de MM, puis triées par cytofluorométrie. L'induction de l'apoptose était indépendante de bcl-2 puisque les cellules testées exprimaient des niveaux variables de bcl-2. Finalement, cette même étude a pu montrer que TRAIL n'est pas cytotoxique pour les cellules souches hématopoïétiques, et par la suite, peut être utilisé, seul ou en combinaison avec d'autres drogues, dans le traitement des MM (69).

3.7.2. Modulation de l'effet anti-tumoral de TRAIL

L'activité pro-apoptotique de TRAIL peut être modulée négativement ou positivement. Une modulation positive qui rend les cellules naturellement résistantes, sensibles à l'apoptose induite par TRAIL, peut être conférée par des inhibiteurs de synthèse protéique ou par une combinaison de drogues anti-cancéreuses.

L'addition d'Actinomycine D (Act D), un inhibiteur de la transcription, sur les cellules de mélanomes résistantes entraînait une diminution des concentrations intracellulaires de l'inhibiteur de la caspase-8, FLIP, qui corrélait avec leur acquisition de la sensibilité à TRAIL (39).

De même, une combinaison de TRAIL et d'Act D pouvait induire l'apoptose dans les cellules de neuf sarcomes de Kaposi associé au SIDA sur dix testés. Ces cellules étaient relativement résistantes à l'apoptose médiée par TRAIL seul. La sensibilisation observée était due à la diminution sélective du niveau d'expression de la molécule anti-apoptotique bcl-x_L, suite au traitement avec l'Act D, alors que l'expression de DcR1, DcR2, Bax, FLIP, FADD, procaspase-8 et p53, n'a pas été affectée. De plus, l'Act D n'a pas sensibilisé les PBMC ou les fibroblastes à l'apoptose induite par TRAIL, suggérant une valeur thérapeutique de la combinaison TRAIL/Act D dans les sarcomes de Kaposi (71).

Quant aux drogues anti-cancer, l'intérêt de leur utilisation est mis en évidence dans une étude faite par Keane et al. qui démontre que les lignées de cellules mammaires sensibles à l'apoptose médiée par TRAIL sont peu nombreuses ; de plus aucune différence dans la sensibilité entre les cellules normales et les cellules malignes n'est détectée. Toutefois, le traitement des cellules avec des agents chimiothérapeutiques tels la doxorubicine ou le 5-fluorouracil, augmente d'une façon significative l'apoptose induite par TRAIL, dans la plupart des lignées de cellules mammaires (72).

Il existe aussi d'autres systèmes capables de sensibiliser les cellules cancéreuses vis à vis de l'apoptose médiée par TRAIL. Parmi ces systèmes, il y a le traitement anticancéreux par le transfert de gène suicide tel la thymidine kinase du virus Herpès simplex associée au ganciclovir (73) ou alors l'administration de TRAIL en combinaison avec l'étoposide, un inhibiteur de la topoisomérase II, qui induit une augmentation de l'expression de DR4 et DR5, et par la suite sensibilise les cellules à l'apoptose induite par TRAIL (74).

La modulation négative de l'effet anti-tumoral de TRAIL peut être conférée par la cytokine pro-inflammatoire interleukine-1 (IL-1), comme il a été montré dans deux études analysant le rôle de TRAIL dans l'apoptose des kératinocytes. Les résultats de ces études ont montré que les lignées de kératinocytes transformés, HaCaT et KB, sont sensibles à l'apoptose par TRAIL, alors que les kératinocytes normaux y sont résistants. Un traitement des cellules HaCaT et KB avec l'IL-1, les rend résistants à l'apoptose induite par TRAIL. Cet effet est dû à l'activation du facteur de transcription NF κ B, induit par l'IL-1, puisqu'un inhibiteur de cette activation, le MG132, est capable de bloquer complètement cet effet (75;76).

3.7.3. Expression et fonctions de TRAIL dans différentes composantes cellulaires du système immunitaire

3.7.3.1. Expression et fonctions de TRAIL dans les lymphocytes T

Il a été montré que les lymphocytes T cytotoxiques (CTL) tuent les cellules cibles par deux mécanismes effecteurs majeurs, médiés par FasL et perforine, et que ces molécules effectrices sont requises pour l'élimination des cellules infectées par les

virus et de certaines cellules tumorales (77). En plus de ces deux voies, les études précédentes ont suggéré la présence possible d'autres mécanismes effecteurs pour la cytotoxicité des CTL (70;78).

Dans une étude préliminaire, Kayagaki et al. ont démontré que les clones HK12 et 4HM1 de cellules T CD4+, lysaient, d'une façon spontanée, certaines cellules cibles telles les cellules Jurkat et la lignée HaCaT de kératinocytes, par une voie indépendante de FasL et de perforine. Afin d'élucider la fonction de TRAIL dans le système immunitaire, ce même groupe a étudié l'expression de cette cytokine, et a vérifié si une voie médiée par TRAIL est impliquée dans la cytotoxicité médiée par les cellules T. Les résultats de cette étude montrent que TRAIL est exprimé de manière constitutive à la surface des clones de cellules T CD4+ humaines ; de plus il est responsable de la cytotoxicité spontanée des clones HK12 et 4HM1, sur certaines cellules cibles tumorales qui sont susceptibles à l'apoptose médiée par TRAIL. Cette cytotoxicité a pu être bloquée par un anticorps monoclonal anti-TRAIL mais pas par un anticorps monoclonal anti-FasL, alors que l'activité cytotoxique, dite "effet bystander", des clones HK12 et 4HM1 stimulés avec un anti-CD3, était médiée par les deux molécules, TRAIL et FasL. Ces résultats montrent que TRAIL constitue une nouvelle voie de la cytotoxicité médiée par les cellules T (79).

Dans une étude plus récente, le même groupe a démontré que les cellules T fraîchement isolées du sang périphérique (PBT), n'expriment pas des niveaux détectables de TRAIL à leur surface. Une stimulation de ces cellules avec un anticorps anti-CD3 et l'interféron (IFN) de type I (IFN- α et IFN- β), induit rapidement une expression remarquable de TRAIL à la surface des cellules T CD4+ et CD8+. Cette induction n'a pas été observée lors du traitement des PBT, stimulés par l'anti-CD3, avec l'IFN de type II ou autre cytokine telle l'IL-2. Les lignées de carcinomes de cellules rénales (RCC), traités cliniquement par l'IFN de type I, montrent une sensibilité à l'apoptose médiée par TRAIL. En effet, le traitement des PBT, stimulés par l'anti-CD3, avec l'IFN de type I, augmentait leur cytotoxicité sur les lignées RCC d'une manière TRAIL-dépendante (52). Ces résultats suggèrent que l'IFN de type I est capable de réguler la cytotoxicité des cellules T médiée par TRAIL. Ceci pourrait expliquer les effets anti-tumoraux de l'IFN de type I sur une variété de tumeurs.

Une autre évidence sur l'importance de TRAIL dans la cytotoxicité induite par les cellules T, est signalée dans une étude qui montre que l'apoptose des cellules de mélanomes induite par les cellules CD4⁺ est médiée par TRAIL. FasL n'était pas impliqué dans cette cytotoxicité qui pouvait être bloquée par un anticorps monoclonal anti-TRAIL. Il faut noter que cet anticorps pouvait inhiber la cytotoxicité des cellules CD4⁺ aussi bien sur les cellules autologues que sur les cellules allogéniques de mélanomes. Le degré de cette inhibition variait entre les différents clones CD4 et suivant la susceptibilité des cellules cibles à l'apoptose induite par TRAIL (66).

3.7.3.2. Expression et fonctions de TRAIL dans les cellules "Natural Killer"

Les cellules Natural Killer (NK) jouent un rôle important dans la défense de l'organisme contre les infections virales et les tumeurs. Ils induisent l'apoptose des cellules cibles d'une façon non restreinte au complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Les cellules NK matures utilisent l'exocytose, calcium-dépendante, des granules et la sécrétion de protéines toxiques (perforines et granzymes), FasL et des cytokines membranaires ou sécrétées (comme TNF α) pour induire l'apoptose des cellules cibles (80). Dans le but de déterminer si TRAIL est impliqué dans la cytotoxicité des cellules NK, trois groupes de chercheurs ont analysé l'expression de TRAIL et sa fonction dans les cellules NK.

Zamai et al. ont montré que TRAIL produit ou exprimé par les différentes populations des cellules NK primaires humaines, est fonctionnel, et représente un marqueur de différenciation ou d'activation de ces cellules. Il semble donc, qu'au cours de leur différenciation, les cellules NK utilisent d'une façon séquentielle et différentielle, des membres distincts de la famille du TNF ou l'exocytose des granules pour médier l'apoptose de la cellule cible. En effet, les cellules NK immatures CD161⁺/CD56⁻, médient une cytotoxicité TRAIL-dépendante mais FasL⁻ ou granules-indépendante, alors que les cellules NK matures CD56⁺ médient une cytotoxicité FasL⁻ et granules-dépendante (81).

Les deux autres groupes ont étudié l'effet de l'activation, avec les cytokines, sur l'expression et la fonction de TRAIL dans les cellules NK matures, dans le système murin (82) et humain (83). Leurs études ont montré que l'expression de TRAIL à la

surface des cellules NK CD56+/CD3- n'est pas détectable, mais elle est induite suite à l'activation avec l'IL-2 (82;83) ou l'IL-15 (82). Par contre, l'activation avec l'IL-18 n'a pas affecté l'expression de TRAIL membranaire (82). De plus, les résultats des tests de cytotoxicité sur les cellules du fibrosarcome murin L929 (82) et sur les cellules Jurkat (83), montrent l'implication de TRAIL dans l'activité des cellules NK activées, appelées lymphokine-activated killer (LAK), puisqu'un anticorps monoclonal anti-TRAIL (82) ainsi qu'un récepteur de TRAIL soluble, DcR1-Fc (83), sont capables d'inhiber cette activité.

3.7.3.3. Expression et fonctions de TRAIL dans les monocytes

Les monocytes sont capables non seulement d'influencer les activités des autres cellules de l'organisme, mais aussi d'agir comme des cellules effectrices dans différentes conditions (84). Un prérequis crucial pour leurs fonctions est l'activation cellulaire. Deux médiateurs puissants de l'activation des monocytes, l'IFN- γ et l'IFN- α induisent fortement leur potentiel cytolytique (85). Les monocytes activés exercent une activité tumoricidale sur plusieurs types différents de cellules tumorales (86). Les mécanismes responsables de cette activité anti-tumorale ne sont pas bien définis.

Dans une étude analysant l'expression et le rôle de TRAIL dans ce type cellulaire, Griffith et al. ont pu démontrer que l'expression de TRAIL constitue un des mécanismes par lesquels les monocytes tuent les cellules tumorales. En effet, la stimulation des monocytes avec l'IFN- γ ou l'IFN- α induit l'expression rapide de TRAIL à la surface cellulaire, mais pas celle de FasL et TNF. Les monocytes ainsi activés, acquièrent la capacité de tuer les cellules tumorales. L'apoptose des cellules cancéreuses médiée par les monocytes était spécifique de TRAIL, puisqu'elle pouvait être inhibée par un récepteur de TRAIL soluble, DR5-Fc. De plus, une observation intéressante est à noter, il s'agit de la perte de l'expression de DR5 suite à la stimulation avec l'IFN coïncidant avec l'acquisition de résistance à l'apoptose médiée par TRAIL (87). Ces résultats suggèrent que TRAIL est une molécule effectrice essentielle pour l'activité anti-tumorale des monocytes-macrophages *in vivo*.

3.7.3.4. Expression et fonctions de TRAIL dans les cellules dendritiques (DC)

Les cellules dendritiques sont des cellules qui dérivent de la moelle osseuse et qui sont spécialisées dans la phagocytose, la dégradation et la présentation des antigènes du soi et du non soi (88). Des études récentes ont montré que les DC humaines peuvent présenter, d'une façon efficace, des antigènes dérivés des cellules apoptotiques, comme elles peuvent présenter des antigènes tumoraux, viraux, de transplantation et du soi, aux cellules T CD8+ *in vitro* (89;90). Mais, il n'est toujours pas clair si les DC sont capables d'induire l'apoptose cellulaire et par la suite, présenter les antigènes des corps apoptotiques, d'une façon sélective, *in vivo*.

Dans le but de déterminer si les DC sont capables de médier l'apoptose via TRAIL, Fanger et al. ont effectué une étude dans laquelle, ils ont montré que les DC CD11c+ humaines du sang, expriment TRAIL après stimulation avec l'IFN- γ ou l'IFN- α , et acquièrent la capacité de tuer les cellules tumorales sensibles à TRAIL mais non pas celles qui sont résistantes à TRAIL, ni celles qui sont normales. L'apoptose médiée par les DC sur les cellules cibles pouvait être inhibée par DR5-Fc, et donc était spécifique de TRAIL. De plus, les précurseurs des DC (pré-DC) IL-3R α + montraient une cytotoxicité minimale sur les mêmes cellules cibles, suite à leur stimulation avec l'IFN, démontrant ainsi, une claire différence fonctionnelle entre les populations des DC CD11c+ et pré-DC IL-3R α + (91). Ces résultats indiquent que TRAIL peut servir de molécule effectrice sur les cellules dendritiques pour l'élimination des tumeurs spontanées, et suggèrent un moyen par lequel, les DC exprimant TRAIL peuvent réguler la réponse immune par l'élimination des cellules T spécifiques de l'antigène présenté par les DC.

3.7.4. Rôle anti-tumoral de TRAIL *in vivo* et son potentiel thérapeutique

L'idée de cibler les récepteurs de mort dans une approche thérapeutique pour initier l'apoptose des cellules tumorales est mystérieuse. Pourtant, l'utilité clinique de cibler Fas ou TNF-R1 dans le cancer a été contrariée par des effets secondaires de toxicité

sévère accompagnant l'activation de ces récepteurs. L'injection d'anticorps agonistes anti-Fas dans les souris, induit la mort, dans un délai très court de l'ordre d'un jour, due essentiellement à une destruction du foie causée par l'apoptose des hépatocytes qui expriment des niveaux élevés de Fas. L'injection du TNF initie le syndrome d'une réaction inflammatoire systémique létale qui ressemble au choc septique (8). Cette réponse inflammatoire est médiée par l'activation par le TNF du facteur de transcription NF κ B qui contrôle l'expression de plusieurs gènes pro-inflammatoires dans les cellules de l'endothélium vasculaire et dans les macrophages.

Pour évaluer l'utilité de TRAIL dans le traitement contre le cancer, Walczak et al. ont généré le TRAIL humain (hu) et murin (mu) sous forme de fusions avec un motif leucine zipper (LZ) pour favoriser et stabiliser la formation de trimères. Dans un test *in vitro*, ces deux molécules étaient biologiquement actives et pouvaient induire l'apoptose dans les cellules cibles humaines et murines, avec des activités spécifiques similaires. Suite à leur injection *in vivo*, LZ-TRAILhu et LZ-TRAILmu ne semblaient pas être toxiques pour les tissus normaux des souris. Enfin, des traitements répétés avec LZ-TRAIL hu, ont inhibé la croissance de la lignée d'adénocarcinome mammaire MDA-231, sensible à TRAIL, dans les souris (SCID) CB.17. L'examen histologique des tumeurs des souris traitées avec LZ-TRAIL hu a démontré la présence de régions apoptotiques environ douze heures après l'injection (64).

Le potentiel de TRAIL comme agent thérapeutique a été aussi testé par un autre groupe de chercheurs : Ashkenazi et al. ont produit du TRAIL recombinant soluble, homotrimérique en solution sans aucune fusion et ont comparé sa capacité d'activer NF κ B avec celle du TNF. TRAIL induisait une légère activation de NF κ B par rapport au TNF. De plus, cette activation nécessitait des concentrations de TRAIL, trois à quatre fois plus élevées que celles du TNF (65). Ces résultats suggèrent que TRAIL n'a pas de forte activité pro-inflammatoire.

En préparation aux études *in vivo*, une série de lignées tumorales a été testée pour la sensibilité à l'apoptose médiée par TRAIL. Une grande variété de cellules tumorales d'origine lymphoïde ou non lymphoïde, y compris des lignées dérivées de types de cancers les plus fréquents (carcinome des poumons, du colon, de la prostate, des seins etc...), montrait une sensibilité à TRAIL (65). Il n'y avait pas de

corrélation entre le statut de p53 dans ces lignées tumorales et leur susceptibilité à l'apoptose médiée par TRAIL. Ceci implique que le ligand TRAIL induit l'apoptose indépendamment de p53. Vu que la plupart des agents chimiothérapeutiques contre le cancer requièrent un p53 fonctionnel pour activer l'apoptose dans les cellules tumorales, et comme TRAIL est capable d'induire l'apoptose par une voie de signalisation indépendante de p53, une combinaison de TRAIL avec des drogues chimiothérapeutiques pourrait augmenter la cytotoxicité sur les cellules tumorales. En effet, le résultat d'une telle combinaison montre une augmentation de l'apoptose des cellules d'un cancer du colon, exposées au 5-fluorouracil (5-FU) et à TRAIL en même temps et un effet similaire sur l'apoptose des cellules d'un cancer du sein, traité avec la doxorubicin et TRAIL (65).

Pour tester l'activité tumorale de TRAIL *in vivo*, des modèles de xénogreffes sous-cutanées de cellules tumorales humaines dans des souris athymiques ont été établis. Dans un premier temps, l'établissement de nouvelles tumeurs a été examiné. Le traitement avec des injections de TRAIL à tous les jours, commencé un jour après l'injection des cellules tumorales entraîne une réduction de la fréquence de formation de tumeurs chez les souris (65).

Dans un deuxième temps, l'effet sur la croissance des tumeurs déjà établies a été examiné. Le traitement par TRAIL entraîne une régression tumorale significative alors que les tumeurs contrôles montraient une croissance rapide. Des études supplémentaires dans les souris montrent que TRAIL peut coopérer avec des drogues telles que le 5-FU pour prévenir la croissance tumorale. Ces résultats suggèrent la possibilité d'utiliser TRAIL, comme un seul agent pour traiter les tumeurs ayant un p53 muté et qui sont donc résistantes à la chimiothérapie et la radiothérapie ou en combinaison avec les thérapies conventionnelles pour les cancers qui ont un p53 partiellement ou complètement fonctionnel (65).

Enfin, l'injection de TRAIL dans la souris n'a montré aucune évidence de toxicité (65) suggérant que TRAIL n'est pas toxique, et peut être utilisé sans aucun danger, dans les autres espèces et chez l'homme.

BUT DU PROJET ET INTRODUCTION AU TRAVAIL

Différentes molécules naturelles à potentialité anti-tumorale directe ont par le passé suscité l'enthousiasme de la communauté scientifique. Le TNF fut l'une de celles qui a suscité de grands espoirs pendant une longue période. Malheureusement, sa toxicité systémique aux doses thérapeutiques a mis fin aux tentatives d'utilisation clinique de cette molécule. FasL a également certaines caractéristiques qui auraient pu la rendre intéressante pour une utilisation clinique si sa toxicité systémique n'était pas aussi importante, au moins sous sa forme naturelle. De nombreux auteurs ont en effet envisagé de délivrer cette molécule au niveau du site tumoral, par exemple à l'aide de vecteurs recombinants.

Depuis le clonage récent de TRAIL (17), un autre membre de la famille du TNF qui présente plusieurs caractéristiques qui le rendent potentiellement intéressant, différentes équipes explorent son utilisation en cancérologie clinique. En effet, Les formes solubles recombinantes de TRAIL sont des médiateurs puissants de l'apoptose des cellules tumorales, alors qu'elles montrent un effet cytotoxique minime ou négligeable sur les cellules normales aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*. TRAIL soluble est cytotoxique pour un grand nombre de lignées de cellules tumorales d'origine hématopoïétique et non hématopoïétique testées *in vitro*, suggérant que TRAIL peut être une molécule anti-tumorale à large spectre *in vivo*.

Toutes les fonctions biologiques normales de TRAIL ne sont pas encore totalement caractérisées. Parmi ces fonctions potentielles, il a été suggéré que TRAIL joue un rôle important dans l'AICD des cellules T au cours de l'infection par le VIH. De plus, les cellules T humaines du sang périphérique expriment TRAIL après la stimulation par un anticorps anti-CD3 en présence d'IFN de type I. Ceci suggère une contribution de TRAIL à l'AICD des cellules T. Ainsi TRAIL pourrait jouer un rôle important dans la régulation de l'activation des lymphocytes T au cours de différentes situations physiologiques. D'autre part, les monocytes humains (87) ainsi que les cellules dendritiques (CD11c+) humaines (91) expriment TRAIL suite à leur stimulation par l'IFN, ce qui les rend des effecteurs à forte capacité tumoricide. Suite à leur activation avec l'IL-2 ou l'IL-15, les cellules NK matures expriment le TRAIL membranaire, qui

est alors impliqué dans l'activité cytotoxique des LAK (82;83). Des études préliminaires chez la souris montrent que TRAIL est capable d'inhiber la croissance des tumeurs *in vivo* par un mécanisme direct et spécifique sans affecter les tissus normaux. L'administration de TRAIL par voie systémique, induit une activité anti-tumorale efficace, sans aucun effet secondaire.

Un des meilleurs moyens pour étudier les fonctions d'un gène est l'investigation des effets biologiques résultants de sa surexpression (modèle transgénique) ou de son inactivation (modèle "Knock out") *in vivo*.

Dans le but de mieux élucider le rôle biologique de TRAIL *in vivo*, nous avons choisi de générer un adénovirus recombinant codant pour TRAIL. L'administration par voie systémique de ce vecteur devrait permettre la surexpression de TRAIL dans plusieurs types cellulaires et ainsi d'étudier son rôle dans la tolérance, l'activation et l'apoptose des cellules T. D'autre part, l'adénovirus recombinant codant pour TRAIL pourra être testé dans des modèles tumoraux *in vivo* afin d'évaluer son potentiel thérapeutique comme agent anti-tumoral.

Dans un premier temps, nous avons produit du TRAIL recombinant qui nous servira comme contrôle, aussi bien au niveau moléculaire qu'au niveau fonctionnel, lors de la vérification du virus recombinant. Ensuite, nous avons essayé de produire l'adénovirus recombinant codant pour TRAIL par la méthode de recombinaison homologue *in vitro* dans les cellules 293, mais une toxicité induite par TRAIL sur les cellules a empêché la formation du virus. Pour résoudre ce problème nous avons élaboré une stratégie qui consiste à exprimer un inhibiteur d'apoptose dans les cellules 293, la protéine p35 du baculovirus. Dans le but de vérifier la spécificité des effets observés suite à l'injection de l'adénovirus recombinant codant pour TRAIL, nous avons généré des récepteurs solubles, les protéines de fusion DR5-Fc, DR3-Fc et Fas-Fc. Ces derniers étant capables de bloquer l'effet de leurs ligands respectifs. Enfin, Nous avons voulu tester l'efficacité de transduction des cellules T par les adénovirus recombinants, dans l'intérêt de délivrer des gènes pro-apoptotiques tels que TRAIL, et d'étudier leurs fonctions dans cette composante immunitaire.

CONSTRUCTION D'ADENOVIRUS RECOMBINANTS

1. Le vecteur adénoviral pour le transfert de gènes

L'adénovirus (Ad) est un des vecteurs les plus développés actuellement, car il possède certaines caractéristiques intéressantes pour le transfert de gènes, en particulier pour le traitement des cancers où une expression prolongée de certains transgènes n'est pas nécessaire.

Les adénovirus des mammifères appartiennent à la famille des mastadénovirus. Chez l'homme 49 sérotypes différents ont été identifiés. Ils sont classés en six groupes : A, B, C, D, E et F.

Les adénovirus sont des virus à ADN double brin non enveloppé, leur capsid est formée de pentons (une base penton et des fibres monomères) et d'hexons. Le cycle viral commence avec l'attachement de la fibre sur un récepteur cellulaire appelé CAR (coxsackievirus et adénovirus receptor) (92), suivi par l'interaction de la base penton avec les protéines $\alpha v\beta 3$ et $\alpha v\beta 5$ appartenant à la famille des intégrines. Suite à l'internalisation, le virus se libère des endosomes et se retrouve dans le cytoplasme puis migre dans le noyau où la réplication et la transcription virales commencent. A la dernière étape du cycle viral, des protéines du virus induisent l'apoptose de la cellule infectée et par la suite le relâchement des virions produits (93).

Les infections à adénovirus sont le plus souvent asymptomatiques. Elles sont responsables de pathologies bénignes touchant essentiellement l'enfant. Ces manifestations sont à type de pharyngites, bronchites, pneumopathies, kératoconjonctivite, gastro-entérites, hépatites et cystites hémorragiques. Des formes sévères telles que des méningoencéphalites ou des pneumopathies graves sont quelquefois observées chez des sujets immunodéprimés.

Chez l'homme, aucune pathologie néoplasique n'a été associée à l'infection par l'adénovirus. Les sérotypes 2 et 5 du groupe C sont le plus utilisés en transfert de gènes, et ils sont peu pathogènes chez l'adulte.

2. Construction des vecteurs adénoviraux

Les deux sérotypes les plus utilisés pour le transfert de gènes sont les sérotypes 2 et 5; ce sont les sérotypes les mieux caractérisés et les séquences d'ADN génomique de ces deux virus ont été déterminées (94). La plupart des adultes possédant des anticorps neutralisants contre au moins l'un des deux sérotypes, il est de plus en plus envisagé d'utiliser d'autres sérotypes.

L'approche la plus utilisée jusqu'à présent pour la construction de vecteurs recombinants consiste à remplacer les régions précoces E1a et E1b par le transgène d'intérêt ($\Delta E1$). Des délétions supplémentaires dans la région E3 ont été effectuées pour augmenter la capacité de clonage. La délétion de E1, qui joue un rôle important dans la réplication, doit être complétée en trans dans des lignées de complémentation. L'existence d'une lignée de rein embryonnaire humaine transformée par la région E1 d'Ad5 (lignée 293) a permis le développement des premiers vecteurs recombinants (95). La région E3 non essentielle pour la propagation *in vitro*, n'est donc pas complétée. Par contre les séquences adjacentes de la protéine IX, importantes dans la structure du virion, sont conservées car elles participent à l'empaquetage du génome dans les virions (96). Les capsides d'adénovirus ont la capacité d'empaqueter jusqu'à 105% de la taille du génome sauvage. La capacité du clonage des Ad recombinants ainsi délétés est de 7,5 kb (97).

La construction des Ad recombinants se fait par cotransfection dans les cellules 293 :

- du génome d'un Ad délété pour E1 et E3 digéré par l'enzyme de restriction *ClaI*, pour en éliminer l'extrémité gauche ;
- et d'un plasmide comportant les séquences de l'extrémité gauche de l'Ad, c'est à dire l'ITR et la séquence d'encapsidation, des séquences permettant la recombinaison homologue avec l'ADN viral, ainsi que les séquences exogènes que l'on désire introduire.

Les virus recombinants sont produits par recombinaison homologue *in vitro*. Après apparition de plages de lyse, les virus obtenus sont amplifiés sur les cellules 293, analysés puis purifiés par dilution limite, et enfin réamplifiés pour l'obtention d'un virus recombinant pur (figure 3).

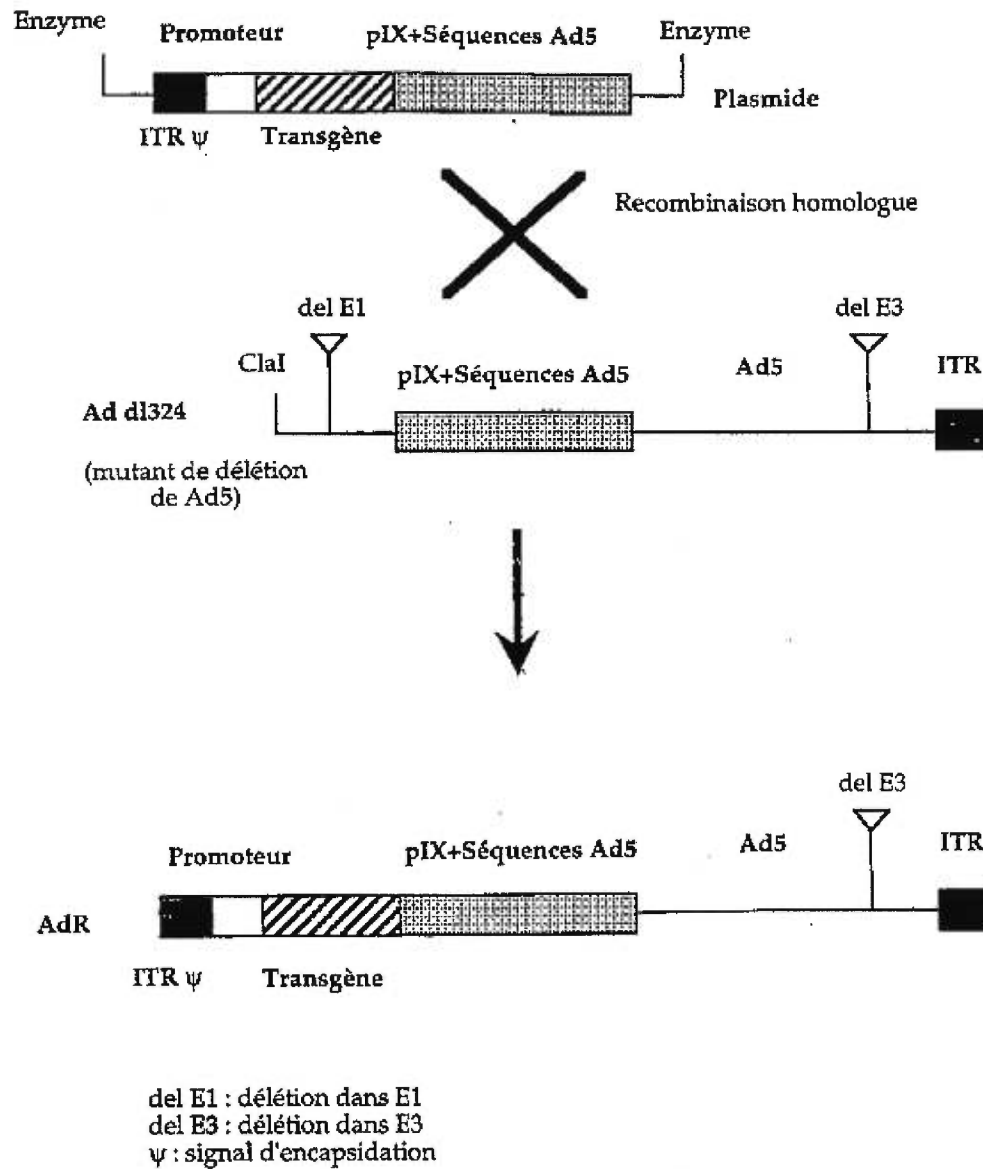


Figure 3: Construction d'Adénovirus recombinants par la technique de recombinaison homologue *in vitro*.

3. Avantages

Les sérotypes utilisés pour la construction de vecteurs recombinants ne sont pas oncogéniques, leur biologie ainsi que la réponse immune qu'ils induisent sont assez bien étudiées.

Les hauts titres viraux obtenus, ainsi que la facilité de purification et de stockage, en font un bon outil pour les études *in vitro* et *in vivo* (98).

D'autre part, ils sont capables d'infecter des cellules en division ainsi que des cellules quiescentes. De nombreuses études ont démontré l'efficacité de transfert *in vivo* dans différents tissus tels que le foie, le poumon, le cœur, le cerveau, le muscle ainsi que dans de nombreux modèles de tumeurs murines ou des xénogreffes de tumeurs humaines dans des souris immunodéficientes.

L'adénovirus est naturellement non intégratif, son matériel génétique est délivré dans le noyau des cellules qu'il infecte et reste en situation extra-chromosomale.

Pour la thérapie génique du cancer par immunomodulation à l'aide de vecteurs codant pour des cytokines, l'adénovirus a fait la preuve de son efficacité dans différents modèles expérimentaux (99).

4. Inconvénients

L'adénovirus permet une grande efficacité de transfert *in vivo* mais l'expression du transgène est transitoire lors d'injection à des animaux adultes immunocompétents.

Les essais précliniques et cliniques ont montré que l'injection *in vivo* des vecteurs de première génération induit une réponse inflammatoire qui semble être dépendante de la dose de virus; ceci a été démontré lors d'injections d'adénovirus dans les poumons de malades atteints de mucoviscidose (100) ou dans le cerveau de babouins sains (101). Par ailleurs, la génération de particules virales compétentes pour la réplication est possible lors de la production des stocks viraux. Elle peut représenter jusqu'à 2% des particules virales après des passages successifs sur la lignée 293 (102). Ceci impose le contrôle de tous les stocks utilisés pour les essais cliniques chez l'homme. D'autre part, la possibilité de complémentation *in vivo* avec des séquences cellulaires ou virales existe.

Ces problèmes de contamination par des particules sauvages et de complémentation *in vivo* par des séquences E1 ou homologues à E1, semblent être résolus grâce aux délétions supplémentaires de la région E4 (103) ou de tout le génome viral (104).

MATERIELS ET METHODES

Cellules

Les lignées cellulaires de lymphomes T humains Jurkat et CEM proviennent de l'ATCC, elles ont été cultivées dans du RPMI additionné de sérum de veau foetal (FCS) à 10%, de gentamicine à 10 µg/ml et du tampon HEPES à 10 mM. Les cellules de rein embryonnaire humain HEK 293 (ATCC) ont été cultivées dans du MEM alpha additionné de FCS à 10%, de penicilline et streptomycine à 100 µg/ml et du tampon HEPES à 20 mM et d'acides aminés non essentiels (1X). Les cellules 293 T transformées avec l'antigène T du virus SV40 (M. Tremblay) ont été cultivées dans du DMEM (high glucose) additionné de FCS à 10%, de gentamicine à 10 µg/ml. Les cellules ovariennes du hamster chinois (CHO) déficientes en enzyme déhydrofolate réductase (DHFR) (CHO-DHFR-) (ATCC), ont été cultivées dans du milieu F12 additionné de FCS à 10%, de gentamicine à 10 µg/ml et d'un mélange d'hypoxanthine (1 mM) , d'aminoptérine (4 µM) et de thymidine (0,16 mM) (milieu HAT, Sigma). Les cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) sont isolées, à partir des prélèvements sanguins de donneurs sains par gradient de densité (Ficoll) et cultivées dans du RPMI additionné de FCS à 10%, de gentamicine à 10 µg/ml et de tampon HEPES à 10 mM. Les lymphocytes du sang périphérique (PBL) sont ensuite isolés par un premier cycle d'adhérence pendant 2 heures à 37°C et un deuxième cycle pendant 16 heures à 37°C permettant d'éliminer les cellules de la lignée monomacrophagiques. Les PBL ainsi obtenus sont stimulés par la PHA à 1 µg/ml, et la PMA à 10 ng/ml en présence d'IL-2 à 200 U/ml. Les cellules adhérentes ont été recoltées par trypsinisation à la suite d'un lavage avec du PBS (phosphate buffer saline). Toutes ces cellules ont été incubées à 37°C avec 5% de CO₂.

Génération d'une banque d'ADNc de PBMC

Les PBMC de donneurs sains, stimulés 3 jours avec un anti-CD3 (OKT3 50 µg/ml), ont servi à la génération d'une banque d'ADNc. Brièvement, l'ARN a été

extrait à partir de 10 millions de cellules. Ensuite, une transcription reverse effectuée sur l'ARN extrait, a résulté en une banque d'ADNc. (Les méthodes d'extraction de l'ARN et de transcription reverse sont décrites plus loin dans le paragraphe « Transcription reverse et PCR »).

Clonage d'ADNc de TRAIL, DR5, DR3, Fas et p35

Les différents ADNc des molécules TRAIL, DR5, Fas et DR3 ont été amplifiés par des amorces spécifiques à partir de la banque d'ADNc de PBMC générée tel que décrit plus haut. Les produits d'amplification sont ensuite clonés dans le plasmide Bluescript II KS+ (pBS KS) (Stratagene) ou le pGEMT (Promega) pour être séquencés. Le séquençage a été effectué par la méthode des dideoxynucléotides, à l'aide du kit « T7 sequencing » (Pharmacia), utilisant les amorces universel et reverse et suivant la procédure fournie par le fabricant. Comme dNTP radiomarqués nous avons utilisé le [³⁵S] dATP. Les séquences obtenues ont confirmé l'intégrité des molécules amplifiées par PCR. A partir du pBS KS ou du pGEMT, les ADNc sont clonés dans les différents vecteurs d'expression. Les ADNc codant pour les domaines extracellulaires de TRAIL et DR5 ont été clonés dans le vecteur pGEX-2T (Pharmacia) au niveau des sites de restriction *Bam*HI et *Eco*RI présents dans les amorces qui ont servi à leur amplification (voir plus loin). Les plasmides résultant sont nommés pGEX/TRAIL et pGEX/DR5. L'ADNc complet de TRAIL a été digéré par les enzymes de restriction *Eco*RI et *Xba*I puis cloné dans les vecteurs pTG6600 (Transgène) au niveau des sites *Eco*RI et *Nhe*I pour générer le plasmide pTG6600/TRAIL. Ce même ADNc a été digéré par les enzymes de restriction *Not*I et *Hinc*II puis cloné dans le vecteur pTigc au niveau des sites *Not*I et *Stu*I pour générer le plasmide pTigc/TRAIL. Le pTigc dérive du pTG6600 que nous avons modifié par l'insertion de la séquence IRES-EGFP. L'ADNc complet de DR5 a été cloné dans le vecteur MSCV qui exprime la GFP (fourni par Dr. B. Hawley, Université de Toronto), au niveau du site *Eco*RI. Ce clonage a été vérifié par différentes digestions enzymatiques, le plasmide résultant est nommé MSCV-DR5. Les ADNc des domaines extracellulaires avec les peptides signaux de Fas, DR3 et DR5 ont été clonés dans le vecteur CosFclink (fourni par Dr Young) au niveau des sites *Eco*RI et *Kpn*I. Ceci permet de positionner ces domaines extracellulaires en N-terminale et dans le même

cadre de lecture de l'ADNc codant pour la portion Fc de l'IgG humaine. Les plasmides ainsi générés, sont nommés CosFcFas, CosFcDR3 et CosFcDR5. L'ADNc complet du p35 (fourni par Dr Freizen) a été cloné dans le vecteur pCdn (Smith Kline Beecham) au niveau du site *EcoRI*; la bonne orientation de l'insert a été vérifiée par différentes digestions enzymatiques, le plasmide résultant est nommé pCdn/p35.

Transfections et Sélections

Pour les transfections, les différents plasmides ont été purifiés à l'aide du kit « Qiagen plasmid purification, Maxi » à partir de cultures bactériennes de 500 ml. Les cellules 293 ont été transfectées avec 10 µg du plasmide pCdn/p35 ou du vecteur vide pCdn par la méthode de lipofection utilisant la lipofectamine (Gibco) suivant les instructions de la compagnie. Quarante huit heures après la transfection, l'agent de sélection, G418, est ajouté au milieu de culture à la concentration de 0,6 mg/ml. Par la même méthode, cinq cent mille cellules CHO-DHFR- ont été cotransfectées avec 0,2 µg d'un vecteur exprimant le gène de résistance à la néomycine (G418) et 1,8 µg des plasmides CosFcFas, CosFcDR3 et CosFcDR5 dans les plaques de 6 puits. Quarante huit heures plus tard, les transfectants ont été cultivés dans du milieu F12 (Gibco) additionné de 5% de FCS, de G418 à la concentration de 1,2 mg/ml et du méthotrexate (Calbiochem) à 50 nM. Une augmentation progressive de la concentration du méthotrexate (MTX) de 25 nM (la concentration allant de 50 nM et arrivant jusqu'à 2,2 µM) en même temps que la sélection avec le G418, a été effectuée afin de sélectionner les clones qui expriment les niveaux les plus élevés de DHFR et par conséquent des protéines codées par les gènes d'intérêts. Le surnageant des cellules non transfectées ainsi que celui des cellules transfectées avec CosFcFas, sélectionnées en présence de 2 µM de MTX, sont récoltés, concentrés dans des centricon 30 (Amicon) et utilisés dans le test d'inhibition de l'apoptose des cellules Jurkat médiée par Fas. Les surnageants utilisés dans le test fonctionnel ne contenaient aucun antibiotique. Par la même méthode de transfection, les cellules CHO-DHFR- ont été transfectées avec 2 µg du plasmide MSCV-DR5. La sélection des cellules qui ont incorporé le plasmide a été effectuée en cytométrie de flux sur la base de la

positivité GFP (Green fluorescent protein). Les transfectants ont été cultivés dans le même milieu des cellules non transfectées. Les cellules 293T, à 75% de confluence environ, ont été transfectées avec 50 µg de chacun des plasmides CosFcFas, CosFcDR3 et CosFcDR5 ou avec le vecteur vide CosFclink par la méthode du phosphate de calcium dans les boîtes de pétri de 10 cm (P10). Brièvement, le milieu de culture est remplacé par du milieu frais (environ 4ml) 3 heures avant la transfection. L'ADN est combiné avec le CaCl_2 0,5 M dans un volume final de 500 µl, ensuite, le mélange ADN/ CaCl_2 est ajouté, en barbotant, sur une solution contenant 500 µl HeBS 2X (KCl 10 mM, NaCl 0,275 M, dextrose 10 mM, HEPES 42 mM, le pH est ajusté à 7,08 avec la NaOH) et 5 µl de PO_4^{3-} (Na_2HPO_4 , $2\text{H}_2\text{O}$ 150 mM). Le mélange résultant (1 ml) est incubé 10 minutes environ à température ambiante, puis ajouté aux cellules goutte à goutte. Seize heures plus tard, le milieu de culture DMEM 10% FCS est remplacé par l'Opti-MEM 0% FCS. Soixante douze heures plus tard, les surnageants sont récoltés, concentrés dans des centricon 30 (Amicon) puis testés par western blot pour la présence des protéines de fusion correspondantes.

Expression et production de protéines recombinantes dans la bactérie

L'expression et la purification des protéines recombinantes a été effectuée à l'aide du kit « Bulk and RediPack GST Purification Modules » (Pharmacia). La souche bactérienne DH5α (*E.coli*) a été transformée avec le plasmide pGEX/TRAIL ou le plasmide pGEX/DR5. A partir d'une colonie isolée, une préculture de 20 ml de milieu 2XYTA (Tryptone 16 g/l, Yeast extract 10 g/l, NaCl 5 g/l, le pH est ajusté à 7,0 avec la NaOH) a été inoculée, et incubée toute la nuit à 37°C. Cette préculture a servi à l'inoculation d'une culture de 500 ml. Lorsque la densité optique à 595 nm de cette dernière atteint la valeur de 0,7, l'induction de l'expression protéique est alors réalisée en ajoutant de l'IPTG (0,1 mM) pendant 3 heures. Les bactéries sont alors récoltées par centrifugation, resuspendues dans 50 ml de PBS, puis lysées par sonication (20 fois 30 secondes). Les deux fractions de lyse bactérienne soit le surnageant et le culot ou corps d'inclusions, ont été séparées par une centrifugation à grande vitesse (12000g). La procédure de purification des protéines de fusion avec la GST (valable

pour GST-DR5 seulement puisque GST-TRAIL se trouvait en majorité dans les corps d'inclusions), consistait à incuber les surnageants de lyse bactériennes avec 500 µl de billes de glutathione sépharose-4B (GS4B) (Pharmacia) pendant 45 minutes à température ambiante, puis laver les billes 3 fois avec du PBS. Il faut noter que les billes GS4B ont été lavées et diluées au demi avec du PBS avant d'être utilisées. Pour le clivage avec la thrombine, 100 µg de la protéine de fusion a été incubé avec 1U de l'enzyme (Pharmacia) dans du PBS, pendant 24 heures à température ambiante.

Les autres souches bactériennes utilisées dans les essais de purification de TRAIL sont la souche BL21(DE3) (Novagen) et la souche M15 pREP4 (Qiagen).

Immunsation du lapin

Un lapin a été immunisé par une première injection de 500 µg de DR5 recombinante dans de l'adjuvant complet de Freund (Gibco) suivie de 5 réimmunisations (l'intervalle entre chaque immunisation était de 3 semaines) par injection de 300 µg de la protéine dans l'adjuvant incomplet de Freund (Gibco) à chaque réimmunisation. Le lapin est saigné le huitième jour après chaque immunisation. Les anti-sérums ont été récupérés après centrifugation du sang, aliquotés et congelés à -80°C. Un aliquot de chaque immunisation a été gardé à 4°C pour être testé en western blot.

Transcription reverse et PCR

Les amorces qui ont servi à amplifier l'ADNc du domaine extracellulaire de TRAIL sont TRAIL ECD et TRAIL F, et celles pour amplifier l'ADNc du TRAIL complet sont TRAIL D et TRAIL F:

TRAIL ECD : 5' GggatccCTCGAGCTGAAGCAGATGCAGGACAAG 3'

TRAIL F : 5' GCgaattcTTTCCAGTGTCAGTTAGCCAAC 3'

TRAIL D : 5'GggatccAGGATCATGGCTATGATGGAGGTC 3'.

Les amorces qui ont été utilisées pour amplifier l'ADNc du domaine extracellulaire de DR5 (DR5_{EC}) sont DR5 D et DR5 F. Nous avons utilisé les amorces DR5 DD et DR5

F pour amplifier l'ADNc codant pour le domaine extracellulaire plus le peptide signal de DR5 (DR5^{EC+pp}) et les amorces DR5 DD et DR5 FF pour amplifier l'ADNc du DR5 complet (DR5c).

DR5 DD : 5' ATgaattcCCTACCGCCATGGAACAACGGGGACAGAAC 3'

DR5 D : 5' GgatccCTGCAGGAGTCTGCTCTGATCACCCAACAAG 3'

DR5 F : 5' ATgaattcTCaggtaccTGATTCTTTGTGGACACATTC 3'

DR5 FF : 5' ATgaattcTTAGGACATGGCAGAGTCTGCATTAC 3'

Les amorces utilisées pour amplifier l'ADNc du domaine extracellulaire plus le peptide signal de DR3 et de Fas sont respectivement DR3 DD et DR3 F, Fas DD et Fas F.

DR3 DD : 5' ATgaattcACAACCATGGAGCAGCGGCCCGCGGGGC 3'

DR3 F : 5' ATgaattcTAaggtaccGAACATCTGCCTCCAGCCACAG 3'

Fas DD : 5' ATgaattcACAACCATGCTGGGCATCTGGAC 3'

Fas F : 5' ATgaattcTCaggtaccGTTAGATCTCGATCCTTCCTCTTTG 3'

Les lettres en minuscules représentent les sites de restriction qui sont rajoutés pour faciliter le clonage.

Les conditions des PCR étaient les suivantes : 30 cycles d'une minute à 94°C, 1 minute à 55°C et 1 minute à 72°C. La Taq ADN polymérase de haute fidélité a été utilisée pour éviter les erreurs lors des différents cycles d'amplification (ExpandTM High Fidelity PCR System, Boehringer Mannheim). Le tampon d'amplification (10X) utilisé était celui fourni avec l'enzyme et contenant du MgCl₂ (15 mM). Les dNTP ont été utilisés à la concentration finale de 0,1 mM et les différentes amorces à la concentration de 1 ng/μl. La PCR a été effectuée dans un appareil DNA Thermal Cycler 480 (Perkin Elmer).

Pour la préparation des différents ADNc, provenant des cellules CHO transfectées et non transfectées, des cellules 293 transfectées et des PBMC, l'ARN a été isolé à l'aide du réactif RNAwiz (Ambion), selon la procédure fournie par le fabricant, à partir de 10 millions de cellules. Les échantillons d'ARN ont été traités par la suite avec l'enzyme DNase I (RNase free DNase I, Pharmacia) afin d'éliminer toute contamination possible avec de l'ADN. La transcription reverse (RT) a été effectuée sur 5 μg d'ARN, en présence de DTT (50 mM) et de dNTP (0.5 mM), pendant une

heure et demi à 42°C, à l'aide de l'enzyme transcriptase reverse du M-MLV (Gibco) et d'une amorce de oligo-dT. Le 1/20^è du produit de la RT a été utilisé pour la PCR. Les amorces utilisées pour vérifier la présence d'ARNm de Fas et de DR5 dans les cellules CHO transfectées sont respectivement Fas DD, Fas F et DR5 DD, DR5 F. Celles utilisées pour vérifier la présence d'ARNm du p35 dans les cellules 293 transfectées sont p35Fint et p35Rint. p35Fint : 5' GTCAGGTGGACAAACAA 3', p35Rint : 5' TACTTTTCGGATTTGCC 3'. Les conditions de PCR utilisant ces dernières amorces étaient les suivantes : 1 cycle de 10 minutes à 94°C et 35 cycles de 30 secondes à 94°C, 30 secondes à 50°C et 2 minutes à 72°C.

Western blot

Les cellules 293 infectées ou non, les cellules CHO transfectées ou non avec MSCV-DR5 ainsi que les cellules Jurkat, CEM et les PBMC ont été lavées 2 fois avec du PBS puis resuspendues dans un tampon de chargement 2X (125 mM tris-Cl pH 6,8, 4% SDS, 20% glycérol, 10% β-mercaptoethanol, 5% bleu de bromophénol). Le SDS et le béta mercaptoethanol sont inclus dans ce tampon afin de permettre une lyse protéique. Ce même tampon a été ajouté aux échantillons des fractions bactériennes des différentes étapes de production et purification de TRAIL ainsi qu'aux surnageants de 72 h des cellules 293T transfectées. Les protéines sont déposées sur un gel de polyacrylamide (14%), puis transférées sur une membrane de nitrocellulose (Amersham). Le blocage a été fait par incubation des membranes avec du PBST (PBS contenant 0,05% du détergent Tween 20) contenant 5% de lait. L'incubation des membranes avec les différents anticorps primaires dans le PBST-lait, a été effectuée pendant 16 heures à 4°C, l'Ac anti-GST de chèvre (Pharmacia) a été utilisé à la dilution 1/2000^è, l'Ac polyclonal de chèvre K-18 anti-TRAIL (Santa Cruz) a été utilisé à la dilution 1/200^è, l'Ac polyclonal de chèvre anti-DR5 (Santa Cruz) a été utilisé à la dilution 1/500^è dans le western blot sur le surnageant contenant DR5-Fc. L'Ac de chèvre anti-Ig humaines (Sigma) a été utilisé à la dilution 1/200^è et l'antisérum du lapin (provenant de la cinquième immunisation avec la protéine recombinante DR5EC) a été utilisé à la dilution 1/200^è dans le western blot sur les

PBMC, Jurkat et CEM, et à la dilution 1/1000^e dans le western blot sur les cellules CHO transfectées avec le MSCV-DR5. Ensuite, les membranes ont été lavées 3 fois (10 minutes) avec du PBST, puis incubées avec les différents anticorps secondaires couplés à la peroxydase (Horse-radish peroxydase) pendant 1 heure à température ambiante. Les seconds anticorps, ont été utilisés à la dilution 1/1000^e pour l'Ac anti-chèvre (Santa Cruz) et au 1/2500^e pour l'Ac anti-lapin (Pharmingen). Les membranes sont lavées 3 fois au PBST pendant 10 minutes puis révélées à l'aide du réactif luminol (NEN Life Science).

Coloration au bleu de Coomassie

Suite à leur migration sur un gel de polyacrylamide, les différents échantillons de lysats et de fractions bactériens ont été révélés par une coloration au bleu de Coomassie. Pour la coloration, le gel a été trempé pendant 30 minutes sous agitation modérée, dans une solution filtrée de méthanol (45%)/H₂O (45%)/acide acétique glacial (10%) contenant 0,25g de « Coomassie Brilliant Blue » (ICN co). Ensuite la décoloration du gel a été effectuée dans une solution de méthanol (30%)/H₂O (60%)/acide acétique glacial (10%).

Cytométrie en flux

Dans les tests d'apoptose, 1 million de cellules Jurkat ont été lavées avec du PBS puis resuspendues dans 500 µl de tampon «Annexin binding buffer» contenant 1 µg d'Annexine couplée à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC révélé en FL1) (Pharmingen) et 1 µg d'iodure de propidium (PI-tricolor révélé en FL3).

Pour l'analyse des marqueurs d'activation des PBL, après une étape de saturation avec des Ig humaines, 250.000 cellules sont incubées 30 minutes à 4°C avec les différents Ac dans 50 µl de PBS contenant 2% de FCS. Ensuite 2 lavages avec du PBS 2% FCS sont effectués, et les cellules resuspendues dans 100 µl du même tampon. Les Ac monoclonaux utilisés sont directement couplés aux fluorochromes. Les Ac utilisés sont les suivants: l'Ac contrôle isotypique γ 1/FITC et γ 1/PE (pour

phycoérythrine révélée en FL2), l'anti-CD4/FITC, l'anti-CD8/PE, l'anti-HLA-DR/FITC, l'anti-CD25/PE et l'anti-CD69/FITC (Becton Dickinson).

Les cellules infectées par les adénovirus recombinants codant pour la GFP, ont été fixées par la paraformaldéhyde 4% pendant 10 minutes puis lavées et analysées pour l'expression de la GFP révélée en FL1.

Les acquisitions et les analyses ont été effectuées sur un cytofluorimètre FACScan (Becton Dickinson) utilisant le programme Cell Quest.

Infections avec les adénovirus recombinants

Les cellules Jurkat ou les PBL ont été infectés avec 3 différentes multiplicités d'infections (MOI) 100, 200 et 500 particules infectieuses par cellule. Trois adénovirus recombinants différents ont été utilisés, l'Ad-CMV-GFP, l'Ad-RSV- β gal et l'Ad-SR α - β gal. Ces adénovirus recombinants proviennent du laboratoire de Vectorologie et Transfert de gènes de l'institut Gustave Roussy (France), ils nous ont été fournis par l'intermédiaire du Dr. Amine Abina. Les titres des stocks de virus ont été déterminés par dilution limite sur les boîtes d'infection (phase solide, voir plus bas) utilisant les cellules 293. Les titres sont exprimés en nombre de particules infectieuses par ml (le nombre de particules infectieuses étant calculé en multipliant le nombre de plages de lyse par le facteur de dilution). Les infections ont été effectuées par l'incubation de 0,5 million de cellules en présence des virus dans un volume de 50 μ l de RPMI sans sérum, pendant une période d'une heure à 37°C, avec agitation toutes les 10 minutes. Les cellules sont ensuite transférées dans des plaques de 24 puits et cultivés dans du RPMI 5% FCS pendant deux jours. Les cellules sont récoltées 48 heures après l'infection et fixées par du paraformaldéhyde 4% pendant 10 minutes puis lavées avec du PBS et analysées pour l'expression de la GFP au FACS lorsque l'Ad-CMV-GFP est utilisé. Dans le cas où l'Ad-RSV- β gal ou l'Ad-SR α - β gal sont utilisés, les cellules sont incubées avec un mélange de 1 mg/ml de 4-Cl-5-Br-3-indolyl- β -galactose (Xgal), 5 mM ferricyanure de potassium, 5 mM ferrocyanure de potassium et 2 mM MgCl₂ dans du PBS, pendant 18 heures à 37°C, puis analysées par microscopie optique pour l'expression de la β -galactosidase.

Génération du virus recombinant codant pour TRAIL

La recombinaison homologue est réalisée entre les plasmides adénoviraux de transfert pTG6600/TRAIL ou pTigc/TRAIL linéarisés par digestion par l'enzyme de restriction PvuI qui se trouvent après les séquences adénovirales (codant pour la protéine structurale pIX utilisé ici pour la recombinaison homologue proprement dite), et l'ADN du génome viral dl324 (délété des régions E1 et E3) digéré par l'enzyme *Clal* afin d'éliminer la partie gauche (ITR + enhancer + séquence d'encapsidation de l'adénovirus) du génome issue du plasmide de transfert (pTG6600/TRAIL ou pTigc/TRAIL). La bande de haut poids moléculaire (~35 kb) correspondant au génome viral est électro-éluée puis purifiée par une à deux extractions au phénol (25%)/chloroforme (24%)/isoamylalcool (1%). Le dl324 ainsi préparé (5 µg) est cotransfecté dans les cellules 293 avec chacun des deux plasmides adénoviraux de transfert linéarisés (5 µg), dans les boîtes de Pétri de 6 cm (P6) par la méthode du phosphate de calcium. Une heure après l'addition du précipité ADN- phosphate de calcium, 4 ml du milieu de culture ont été ajoutés aux boîtes de transfection. Le milieu est renouvelé 24 heures plus tard (phase liquide) ou remplacé par une couche d'agar nutritive (phase solide). La couche d'agar est constituée de 2,5 ml du milieu MEM 2X, additionné d'acides aminés non essentiels (AANE), et de 2,5 ml d'agar 2%. Tous les quatre jours une couche d'agar est ajoutée en phase solide. Les cellules en milieu liquide sont semi-déprivées toutes les semaines. Les boîtes de transfection ont été surveillées régulièrement pour l'apparition de signes d'infection virale (cellules qui s'arrondissent et se décollent en phase liquide et de plages de lyse en phase solide). Suite à l'apparition du virus en phase liquide, les cellules et les surnageants ont été récoltés. 3 à 4 cycles de congélation et de décongélation ont été effectués afin de libérer les virus dans le surnageant, ce dernier a été utilisé pour l'amplification par infection d'autres cellules 293 dans des P10. Le produit de l'amplification a été utilisé pour infecter des cellules 293 dans 3 boîtes P6, dont une a servi pour le western blot, une deuxième a servi pour l'extraction de l'ADN extra-chromosomal correspondant à l'ADN adénoviral (HIRT) et une troisième a servi pour des infections en phase solide.

Par la suite, des plages isolées ont été récoltées, amplifiées sur des plaques de 24 puits, puis sur des P6 et enfin sur des P10.

Technique de HIRT : extraction de l'ADN adénoviral

Les cellules ont été récoltées 48 heures après l'infection, centrifugées 10 minutes à 1500 rpm à 4°C, lavées avec 1 ml de PBS puis resuspendues dans 200 µl de TE (tris EDTA) pH 8 contenant du SDS à 0,6%, de l'EDTA à 10 mM et de la protéinase K à 200 µg/ml, et incubées à 37°C pendant 2 heures. Ensuite, du NaCl 5 M (1/5^e du volume final) est ajouté et le mélange est incubé à 0°C pendant au moins 4 heures. Une centrifugation à 13000 rpm (rotor F 45-18-11 de la centrifugeuse 5415 C, eppendorf) pendant 30 minutes à 4°C a permis l'élimination de l'ADN génomique et des protéines. Par la suite, l'ADN extra-chromosomal contenu dans le surnageant résultant, a été extrait par un phénol (50%) et un chloroforme (48%)/ isoamylalcool (2%), précipité avec deux volumes d'éthanol pur puis rincé avec de l'éthanol 70%. Enfin le culot est repris dans du TE (pH 8) puis traité à la RNase A à 20 µg/ml pendant 1 heure à 37°C.

Les méthodes expérimentales de production (construction, purification, amplification et titration) d'adénovirus recombinants et d'infection virale ne sont pas référencées puisqu'elles font partie d'un protocole déjà établi et adopté dans le laboratoire de Vectorologie et Transfert de gènes à l'institut Gustave Roussy (France). Ce protocole nous a été communiqué par l'intermédiaire du Dr. Amine Abina.

RESULTATS

1. Clonage de l'ADNc, expression de la protéine, et test de l'activité biologique de TRAIL

1.1. Clonage de TRAIL

L'ADNc complet codant pour la protéine TRAIL (nucléotides 1-846) a été amplifié par PCR à partir d'une banque d'ADNc de PBMC stimulés pendant trois jours par un anticorps anti-CD3 (OKT3). Les amorces TRAIL D et TRAIL F qui ont servi à l'amplification ont été choisies à partir de la séquence publiée de TRAIL (18) en y ajoutant deux sites de restriction, le site *Bam*HI en 5' de TRAIL D et le site *Eco*RI en 3' de TRAIL F (voir les séquences des oligonucléotides dans matériels et méthodes). Le produit de PCR a été cloné dans le plasmide Bluescript II KS+(pBS KS) au niveau des sites *Bam*HI et *Eco*RI, puis vérifié par séquençage. Cet ADNc servira par la suite pour la construction des plasmides adénoviraux codant pour TRAIL. De la même façon, l'ADNc codant pour la région extracellulaire (nucléotides 120-846) a été amplifié par PCR à partir du plasmide pBS/TRAIL, utilisant les amorces TRAIL ECD et TRAIL F (voir matériels et méthodes). Le produit de l'amplification a été cloné dans le vecteur pGEM-T (Promega) puis séquencé.

1.2. Expression de la partie extracellulaire de la protéine TRAIL dans la bactérie

En se basant sur les données démontrant que la région extracellulaire carboxy-terminale conservée entre les différents ligands de la famille TNF est suffisante pour l'activité biologique, et que la délétion des résidus en N-terminal augmente cette activité (17), il semblait probable que le domaine extracellulaire homologue de TRAIL serait suffisant pour produire une protéine biologiquement active.

L'expression dans la bactérie, de la protéine de fusion entre la région extracellulaire de TRAIL et l'enzyme glutathione-S-transférase (GST), qui permet une purification rapide à l'aide de billes liées à son substrat a été choisie comme système pour produire du TRAIL recombinant. La protéine de fusion ainsi produite, contient un site de clivage par la thrombine, une endoprotéase de type sérine, précisément à la

jonction entre les deux protéines. Le clivage au niveau de ce site permet la libération de la protéine d'intérêt. La région codante pour le domaine extracellulaire de TRAIL a été clonée, à partir du pGEMT/TRAIL, dans le vecteur d'expression procaryote pGEX-2T dans le cadre de lecture de la GST (voir matériels et méthodes). Les clones positifs ont été vérifiés par différentes digestions enzymatiques doubles (*EcoRI/BamHI*, *EcoRI/EcoRV*, *PstI/EcoRI*, *PstI/AflIII* et *EcoRI/SapI*). L'amplification de huit clones dans la souche bactérienne DH5 α (*E.coli*) a été suivie d'une induction par l'IPTG (0,1 mM) pendant 3 heures. Par la suite les protéines des lysats bactériens ont été révélées par coloration au bleu de coomassie après électrophorèse sur gel de polyacrylamide. Le résultat de l'induction suite à l'amplification était reproductible. Nous avons ainsi pu sélectionner le clone qui exprimait le niveau le plus élevé de la protéine d'intérêt. Une culture de 500 ml de ce clone a été préparée afin d'exprimer et purifier la protéine de fusion. Après induction par l'IPTG (0,1 mM), les cultures sont centrifugées et le culot de bactéries est resuspendu dans du PBS (phosphate Buffer Saline). Ensuite les bactéries sont lysées par sonication puis centrifugées à 12000g. La protéine de fusion GST-TRAIL est purifiée en incubant le surnageant de lyse bactérienne avec les billes de glutathione sépharose 4B (GS4B). Le clivage par la thrombine permet alors de séparer la protéine TRAIL de la GST.

Des échantillons prélevés à toutes les étapes ont été déposés sur un gel de polyacrylamide, migrés et révélés par une coloration au bleu de coomassie (voir matériels et méthodes). Les résultats de la figure 4.A. montrent un faible rendement de purification par adsorption sur sépharose 4B-glutathione. Le clivage par la thrombine (également peu efficace) montre une bande à 54 Kda environ dans l'échantillon des billes (ligne 4), correspondant à la protéine de fusion GST-TRAIL. En revanche la bande de 27 Kda environ correspondant à TRAIL clivé n'apparaît pas à la coloration dans le produit de clivage (ligne 5), probablement à cause du clivage inefficace. Les bandes révélées dans les puits de migration du surnageant et du culot de lyse bactérienne (corps d'inclusion), peuvent s'expliquer par le faible rendement d'adsorption sur les billes GS4B. La bande correspondant à la fusion GST-TRAIL apparaît très faible voire même inexistante dans le surnageant alors qu'elle est fortement exprimée dans le culot. Ce résultat s'explique par le caractère insoluble de

la protéine et donc sa rétention dans les corps d'inclusions. Pour confirmer cette hypothèse nous avons réalisé un western blot avec un anticorps anti-GST sur les mêmes échantillons. La figure 4.B. montre que la protéine de fusion GST-TRAIL est reconnue par l'anticorps anti-GST, car elle est détectée dans tous les puits à l'exception de celui concernant le produit de clivage par la thrombine. Un très faible signal est détecté dans le lysat de bactéries non induites, et une nette différence dans l'intensité du signal entre le surnageant et le culot de lyse bactérienne est observée. Ce résultat confirme que la bande majoritairement présente dans les corps d'inclusions représente la protéine de fusion GST-TRAIL. Afin de confirmer ces résultats nous avons effectué un western blot avec un anticorps anti-TRAIL (Ac K-18), sur les échantillons de surnageant et de culot de lyse bactérienne, du western blot effectué avec l'anticorps anti-GST. L'Ac K-18 est un anticorps polyclonal reconnaissant la région extracellulaire de TRAIL (voir matériels et méthodes), la figure 4.C. montre qu'il reconnaît fortement la bande d'environ 54 Kda présente dans les deux fractions de lyse bactérienne. Une exposition plus longue du film était nécessaire pour pouvoir détecter la bande d'environ 32-34 Kda, correspondant à la taille de TRAIL dans les lysats de cellules Jurkat (figure 4.D.). Les cellules Jurkat ont été choisies comme contrôle positif pour la détection de TRAIL à l'aide de cet anticorps. En effet l'expression de TRAIL, au moins sous sa forme cytoplasmique a été décrite dans ces cellules.

Les essais d'expression et de production de TRAIL ont été répétés plusieurs fois. Différents temps d'induction allant de 45 minutes à 3 heures, ainsi que différentes concentrations d'IPTG allant de 0,1 jusqu'à 1mM ont été testés. D'autre part nous avons également testé différentes souches bactériennes. Un premier essai avec la souche BL21(DE3) n'a pas eu d'effet notable sur la solubilisation de la protéine.

Nous avons également testé mais sans succès la souche M15[pREP4]. Cette souche M15 d'*E.coli* qui est transformée avec le répresseur REP4 est habituellement recommandée pour l'expression de protéines très hydrophobes ou toxiques pour la bactérie. En dernier recours nous avons opté pour l'extraction de la protéine à partir des corps d'inclusions. Tel qu'il est recommandé dans le manuel de purification des protéines de fusion avec la GST (Pharmacia), la dénaturation de la protéine s'est faite

dans un tampon constitué de PBS plus la guanidine HCl 6 M, et la rénaturation de la protéine est effectuée par une dilution rapide de 100 fois avec du PBS. Pour éliminer la guanidine HCl, nous avons effectué une dialyse dans du PBS au cours de laquelle, un précipité blanc se formait. L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide démontre que ce précipité est un concentré de protéine de fusion GST-TRAIL (résultats non présentés).

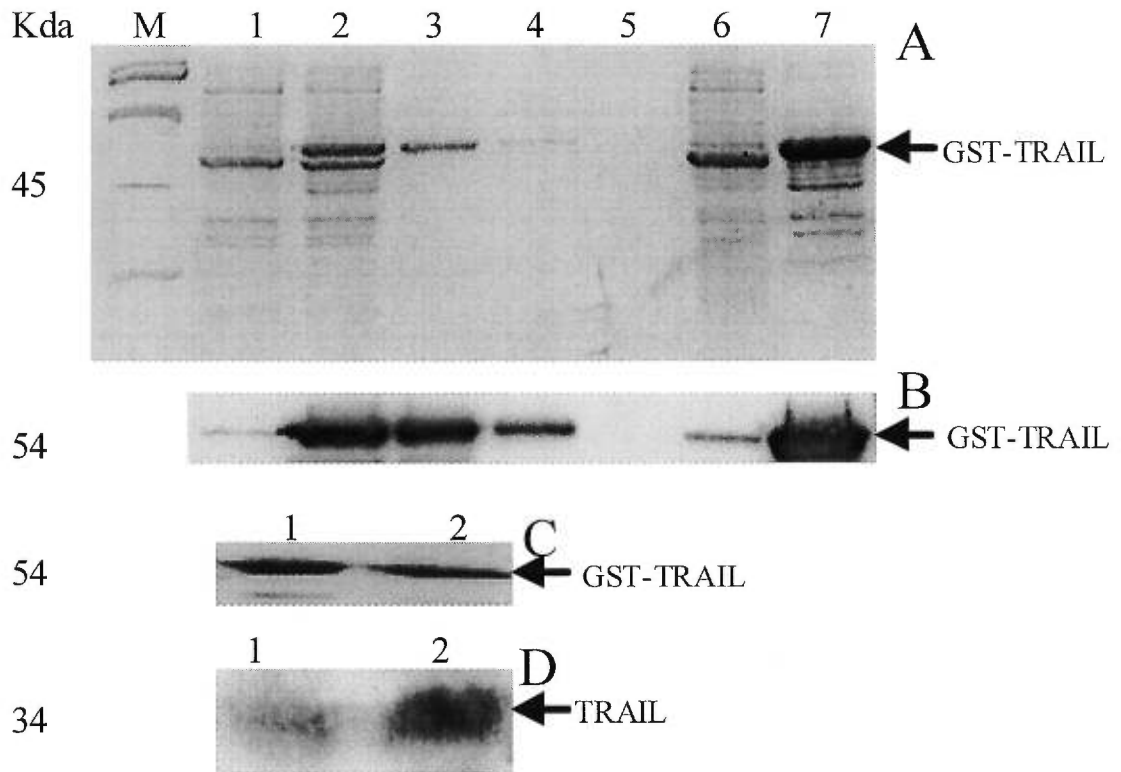


Figure 4: Production du TRAIL recombinant dans la bactérie. (A) coloration au bleu de coomassie de 1: lysat de bactéries non induites, 2: lysat de bactéries induites avec l'IPTG, 3: couplage de la GST-TRAIL aux billes de sépharose, 4: billes après clivage avec la thrombine, 5: produit de clivage, 6: surnageant de lyse bactérienne, 7: culot de lyse bactérienne ou corps d'inclusions. (B) Western blot sur les mêmes échantillons que précédemment révélé par un anticorps anti-GST. (C et D) western blot avec un anticorps anti-TRAIL, sur C1: corps d'inclusions bactériens et C2: surnageant de lyse bactérienne, et sur lysat de cellules Jurkat, D1: 1 million et 2: 2 millions de cellules. M désigne le marqueur de taille des protéines (SDS-PAGE broad range standards, BioRad).

1.3. Test de l'activité biologique de TRAIL

Le premier groupe de chercheurs qui a identifié TRAIL comme membre de la famille du TNF, a démontré son caractère pro-apoptotique (17). Cette dernière observation étant faite sur les cellules Jurkat, nous avons voulu tester sur cette lignée la fonctionnalité de la protéine de fusion GST-TRAIL, présente en faible quantité dans le surnageant et en majeure partie dans le culot des préparations bactériennes. Dans un test préliminaire, nous avons traité les cellules Jurkat avec 100 μ l de surnageant ou de culot de lyse bactérienne contenant la GST-TRAIL. Vingt heures plus tard, l'observation au microscope optique des cellules traitées avec GST-TRAIL ne démontrait que des débris cellulaires, alors qu'aucun effet n'était observé sur les cellules Jurkat non traitées. Par la suite, nous avons traité les cellules Jurkat, pendant 6 heures, avec différentes concentrations (25, 50 et 75 μ l) de surnageant ou de culot bactériens exprimant la protéine de fusion GST-TRAIL. Le traitement de ces mêmes cellules avec la plus forte concentration utilisée (75 μ l) de surnageant ou de culot de bactéries transformées avec le vecteur pGEX vide et donc exprimant seulement la GST, a été pris comme contrôle de toxicité éventuelle due aux différentes protéines bactériennes. La viabilité des cellules cibles analysée par la coloration au bleu de trypan démontre une grande cytotoxicité sur les cellules, induite aussi bien par la fusion GST-TRAIL présente dans le culot que par celle présente dans le surnageant (résultats non montrés).

Afin de vérifier si cette toxicité est due au processus d'apoptose ou à de la nécrose, un test d'exposition de la phosphatidylsérine à la surface cellulaire, caractéristique des cellules apoptotiques (3) est effectué 6 heures après le traitement avec les différentes fractions bactériennes (figure 5). Les cellules cibles (Jurkat) ont été sujettes à un double marquage associant l'annexine V une protéine qui reconnaît la phosphatidylsérine à l'iodure de propidium (PI) qui a lui la capacité de pénétrer dans les cellules mortes et de s'intercaler dans l'ADN. Les deux paramètres ont été analysés par cytométrie en flux, sur la population cellulaire totale. Les résultats des analyses (figure 5) montrent une nette cytotoxicité due à la protéine de fusion GST-TRAIL confirmant les résultats du test de viabilité au bleu de trypan. La viabilité des

cellules Jurkat sans aucun traitement est de 92.68% (figure 5.A.). Dans les tests contrôles, le traitement avec 75 μ l de surnageant ou de culot, la viabilité se maintient aux alentours de 89% et 80% (figure 5.B. et 5.C.). En revanche le traitement avec le surnageant ou le culot (75 μ l) contenant la GST-TRAIL entraîne une importante réduction de la viabilité qui passe alors à 20 et 11% respectivement (figure 5.F. et 5.I.). De plus, la cytotoxicité observée est dépendante de la dose de la protéine GST-TRAIL additionnée, ce qui souligne la spécificité de l'effet observé (figure 5. D-I).

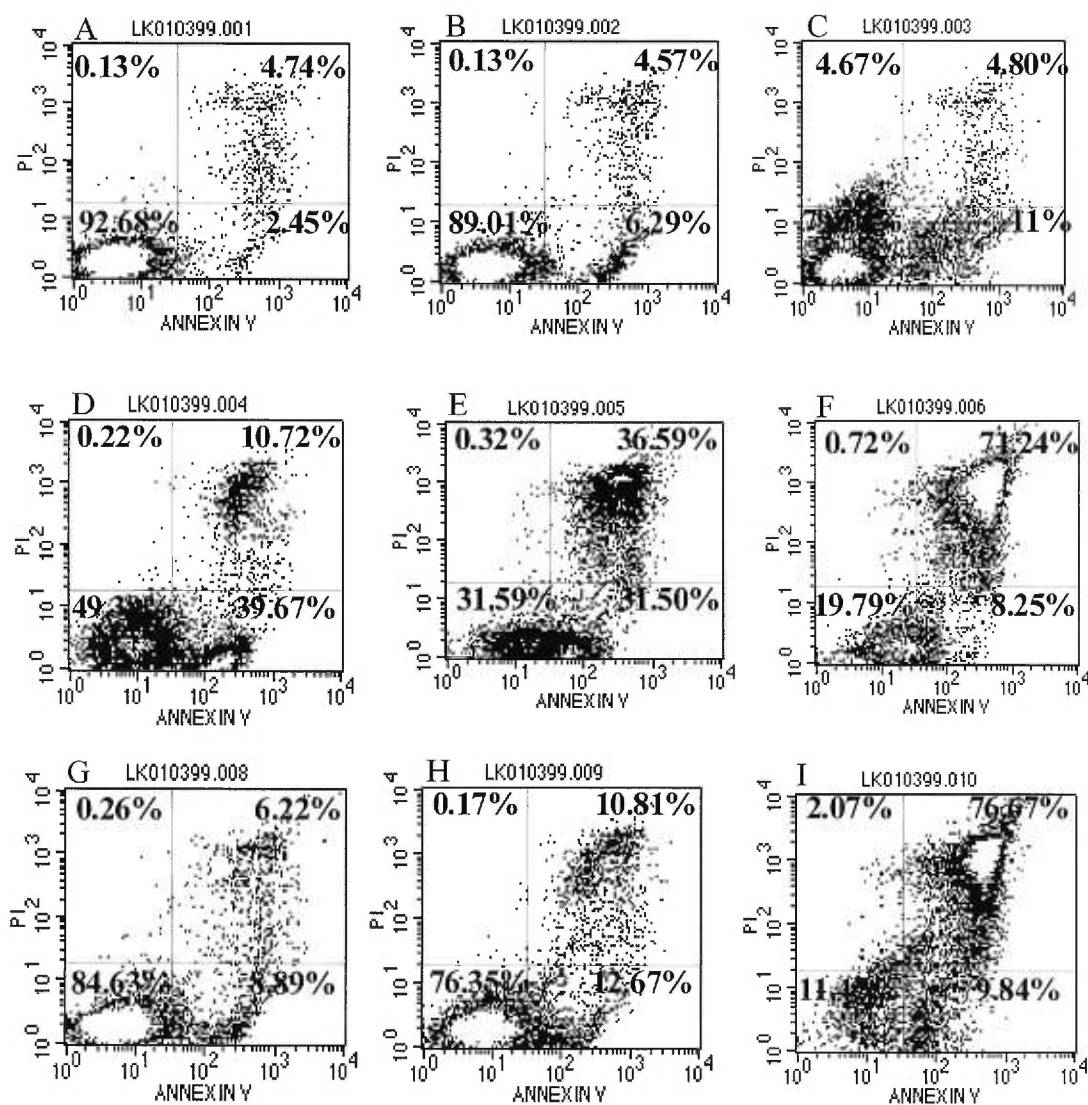


Figure 5 : Cytotoxicité de la GST-TRAIL sur les cellules Jurkat. Analyse par cytométrie en flux de l'annexine V et du PI des cellules Jurkat non traités (A), traités avec 75 μ l de surnageant de bactéries contrôles (B) ou de culot de bactéries contrôles (C), 25, 50 et 75 μ l de surnageant de bactéries exprimant la GST-TRAIL, respectivement (D, E et F), ou 25, 50 et 75 μ l de culot de bactéries exprimant la GST-TRAIL, respectivement (G, H et I). Les pourcentages des cellules sont inscrits dans les cadrants correspondants.

2. Génération d'un adénovirus recombinant codant pour TRAIL

2.1. Clonage de TRAIL dans les plasmides adénoviraux

Les vecteurs adénoviraux utilisés sont le pTG6600 et le pTigc. Ce dernier dérive du pTG6600 auquel une séquence IRES-GFP est ajoutée en amont du promoteur (voir matériels et méthodes). L'ADNc de TRAIL pleine longueur a été excisé du pBS KS/TRAIL, pour être cloné dans les vecteurs pTG6600 et pTigc sous le contrôle du promoteur du cytomégalovirus (CMV), (voir matériels et méthodes pour les sites de clonage). Les plasmides adénoviraux de transfert codant pour TRAIL, sont dénommés pTG6600/TRAIL et le pTigc/TRAIL. Le vecteur adénoviral d'origine, pTG6600, contient dans sa séquence des régions homologues à des séquences présentes dans le génome viral de l'adénovirus du type 5. Plus précisément, il contient la séquence des nucléotides de l'adéno5, 1 à 458 en aval du promoteur et 3328 à 5788 en amont du promoteur, de l'insert, et de la GFP dans le vecteur ptigc. Ces séquences sont essentielles à la recombinaison homologue, lors de la production d'adénovirus recombinants. La construction des plasmides adénoviraux de transfert pTG6600/TRAIL et pTigc/TRAIL a été vérifiée par différentes digestions enzymatiques. Le pTG6600/TRAIL a été digéré avec les enzymes *BglII/NotI*, *KpnI/PacI* et *HindIII/XbaI*. Le pTigc/TRAIL a été digéré avec les enzymes *BglII/PvuI*, *XhoI/PacI* et *BamHI/NgOMI*.

2.2. Cotransfection dans les cellules HEK 293

Les cellules de rein embryonnaire humain 293, sont utilisées comme une lignée de transcomplémentation pour la génération d'adénovirus recombinants, puisqu'elles contiennent la région E1 essentielle à la réplication de l'adénovirus.

L'ADN du génome viral délété pour les régions E1 et E3, dl324, ainsi que les plasmides adénoviraux de transfert, pTG6600/TRAIL et pTigc/TRAIL, sont préparés tel que décrit dans la section matériels et méthodes, puis cotransfectés dans les cellules 293 par la méthode de précipitation au phosphate de calcium. La présence de

séquences homologues de part et d'autres de TRAIL, va initier le processus de recombinaison homologue entre l'ADN viral et le plasmide de transfert codant pour TRAIL. Le virus résultant d'une telle recombinaison est un virus portant le transgène dans son génome à la place de la région E1 qui est elle déléetée. La région E3 non essentielle à la réplication virale est également déléetée. Ces virus défectifs pour la réplication sont amplifiés dans les cellules 293 qui contiennent elles la région E1 qui est essentielle pour la réplication. Les cellules cotransfectées dans les boîtes de 6 cm de diamètre (P6) sont observées au microscope tous les jours pendant une durée d'environ un mois. La présence d'un aspect d'infection virale se manifeste par l'arrondissement et le décollement des cellules infectées en phase liquide, et par les plages de lyse visibles sous la couche d'agar déposée sur les cellules pour limiter la dissémination virale (phase solide). Malheureusement, la morphologie cellulaire associée à l'infection virale n'est jamais apparue dans nos cotransfections. Par contre, les cellules cotransfectées montraient un aspect de cytotoxicité par rapport à un contrôle où les cellules n'étaient pas transfectées mais mises en contact avec les mêmes solutions que les cellules transfectées (figure 6). Les cotransfections ont été reproduites plusieurs fois sans résultats. Cette observation suggère une toxicité liée à la surexpression de la molécule pro-apoptotique TRAIL et qui nous empêche donc de générer des lignées produisant TRAIL. Pour essayer de résoudre ce problème de toxicité, nous avons décidé d'exprimer un inhibiteur d'apoptose à large spectre dans les cellules 293.

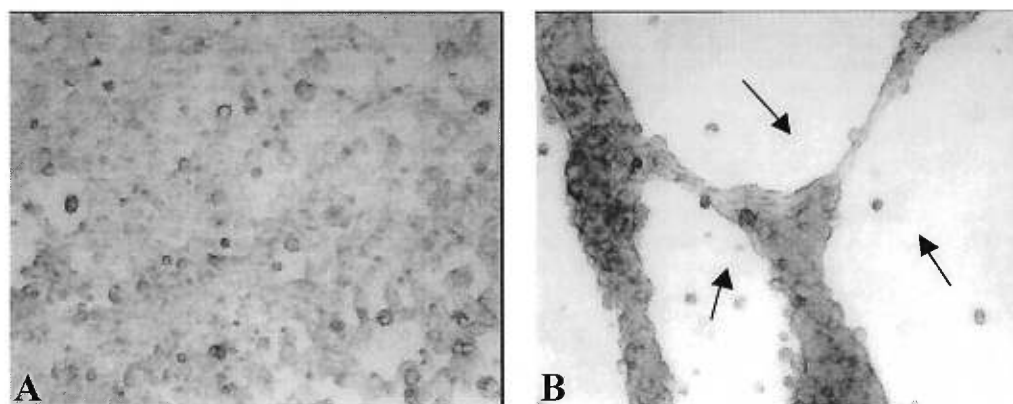


Figure 6: Toxicité de TRAIL sur les cellules 293. Microscopie optique de (A) contrôle de cellules non transfectées, (B) cellules 293 trois semaines après la cotransfection avec les plasmides codant pour TRAIL et le génome viral (voir matériels et méthodes). Les régions de cytotoxicité où il ne reste plus de cellules vivantes sont indiquées par des flèches.

3. Génération d'une lignée de cellules 293 qui expriment le p35

Le baculovirus code pour une protéine de 35 Kda (p35) capable d'inhiber l'apoptose dans les cellules d'insecte infectées par ce virus. Cette protéine inhibe les voies conduisant à l'apoptose lors d'une stimulation par le TNF ou par le ligand de Fas (FasL). Elle est ainsi capable de bloquer le clivage de PARP, un substrat de la caspase-3, classiquement clivé lors des processus apoptotiques (105). De plus, au cours de l'identification et la caractérisation de DR5, le deuxième récepteur de TRAIL, le p35 a été montré comme étant capable d'inhiber l'apoptose induite par la surexpression de DR5 (22). Pour toutes ces différentes raisons cette molécule nous a semblé idéale pour contrecarrer les effets liés à la surexpression de TRAIL lors de la génération de virus.

La région codante complète du p35 a été clonée dans le vecteur d'expression eucaryote pCdn (matériels et méthodes). Le plasmide pCdn/p35 résultant, a été transfecté dans les cellules 293. Après 48 heures, la néomycine (G418) est ajoutée au milieu de culture à la concentration de 0,6 mg/ml. Deux à trois semaines plus tard les cellules exprimant le p35 ont ainsi été sélectionnées. Une RT-PCR utilisant des amorces désignées à l'intérieur de la région codante du p35 (voir matériels et méthodes) a été effectuée sur les transfectants sélectionnés. Les résultats de la RT-PCR, présentés dans la figure 7, montrent l'expression des messagers du p35 dans les transfectants. Le plasmide pCdn/p35 utilisé pour les transfections a servi de contrôle positif pour les RT-PCR. La bande révélée à 730 bp sur le gel d'agarose, correspond à l'amplification de l'ADNc du p35 par les 2 amorces utilisées. La figure 7 montre la présence de cette bande aussi bien dans le contrôle positif (lignes 5 et 6) que dans les transfectants (lignes 3 et 4), et son absence dans les cellules 293 transfectées avec le vecteur pCdn vide (lignes 1 et 2). D'autre part, la bande détectée dans les transfectants (lignes 3 et 4) ne peut pas correspondre à de l'ADN intégré mais non transcrit vu que la RT-PCR a été effectuée sur de l'ARNm (ARN messenger) traité à la DNase I (voir matériels et méthodes). Par conséquent, un contrôle sans la transcriptase reverse ne semblait pas nécessaire.

Au cours de la génération de la lignée 293 exprimant la molécule anti-apoptotique p35, des cotransfections en phase liquide ont été reproduites, mais cette fois, dans des

cellules 293 provenant d'un autre laboratoire. D'une façon surprenante, un aspect d'infection virale a commencé à apparaître le douzième jour après la cotransfection de l'un ou l'autre des plasmides adénoviraux de transfert, pTG6600/TRAIL et pTigc/TRAIL, avec l'ADN viral (dl324). Une fois que toutes les cellules se sont décollées (signe d'une infection virale), le contenu de chacune des boîtes P6 d'infection a été récolté et les cellules ont été lysées pour libérer les virus dans le surnageant. Pour pouvoir confirmer production de virus recombinants, une étape d'amplification virale était nécessaire. A cette étape, la lignée des cellules 293/p35 était prête à être utilisée pour l'amplification des virus. Ainsi, les cellules 293/p35 ont été infectées par les surnageants des cotransfections (cotr-6600TRAIL et cotr-cTRAIL) dans les boîtes de 10 cm (P10). Les surnageants résultant de cette infection et collectés après 48 heures, ont servi à infecter des cellules 293/p35. Celles ci sont collectées 24h après l'infection, pour les tests de vérification de la présence de virus recombinants dans les cellules.

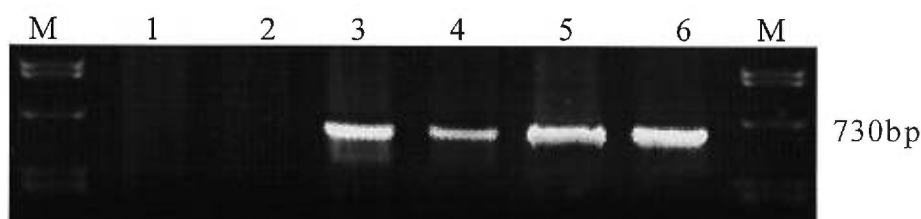


Figure 7: Expression des messagers de l'inhibiteur d'apoptose p35, dans les cellules 293 transfectées. RT-PCR sur les cellules 293 (1 à 4) environ un mois après transfection du pCdn (1 et 2) et du pCdn/p35 (3 et 4), et sur le plasmide pCdn/p35 (5 et 6) comme contrôle positif. Les amorces utilisées pour la PCR sont p35Fint et p35Rint. M représente le marqueur de taille pour l'ADN, il s'agit de l'ADN du phage λ (Pharmacia) digéré avec l'enzyme *Pst*I.

4. Vérification de la présence de virus recombinants codant pour TRAIL

Une partie des cellules 293/p35 infectées avec les virus obtenus de l'étape d'amplification décrite ci dessus, a servi pour l'extraction de l'ADN extra-chromosomal (voir matériels et méthodes pour la technique HIRT), et pour confirmer la présence de l'ADNc de TRAIL. D'autre part, un western-blot a été réalisé sur les cellules 293 infectées en utilisant l'Ac polyclonal K-18 capable de détecter la protéine TRAIL.

Dans une première expérience, une PCR a été effectuée sur l'ADN extra-chromosomal extrait à partir des cellules infectées, en utilisant les mêmes amorces TRAIL D et TRAIL F, qui ont servi à l'amplification de l'ADNc complet de TRAIL utilisé au début de ce travail. Le résultat de la PCR, présenté dans la figure 8, révèle une bande de 850 bp dans les cellules infectées. Le plasmide pTG6600/TRAIL est ici utilisé comme contrôle positif, la réaction de PCR amplifie la bande attendue de 850 bp. En revanche aucune amplification n'est obtenue dans le contrôle négatif. Ces résultats démontrent que les préparations virales contiennent bien des virus recombinants.

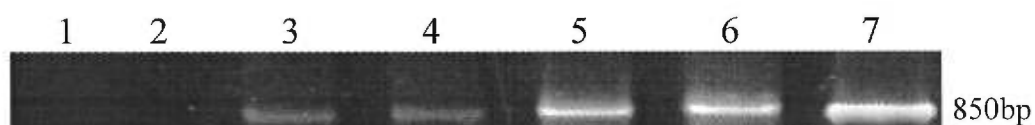


Figure 8: Présence de l'ADNc de TRAIL dans l'ADN adénoviral extrait des cellules 293 infectées. PCR sur l'eau (1 et 2), sur l'ADN adénoviral extrait des cellules 293 infectées avec les virus de la cotransfection du pTG6600/TRAIL (3 et 4), ou avec les virus de la cotransfection du pTigc/TRAIL (5 et 6) et sur le plasmide pTG6600/TRAIL comme contrôle positif (7). Les amorces utilisées sont TRAIL D et TRAIL F.

Dans une deuxième expérience, les lysats de cellules infectées avec les surnageants de cotr-6600TRAIL et cotr-cTRAIL, sont déposés sur un gel de polyacrylamide. Un western blot avec l'anticorps K-18, effectué sur ces échantillons (figure 9), révèle une bande à 35 Kda, présente dans les lysats de cellules infectées, mais absente dans le lysat des cellules non infectées. La protéine de fusion GST-TRAIL présente dans les corps d'inclusions bactériens, a été utilisée comme contrôle positif. La bande révélée est comme attendu à 54 Kda (figure 9).

Les résultats de ces deux expériences montrent que les virus recombinants générés contiennent l'ADNc de TRAIL et codent pour la protéine. Nous sommes actuellement dans le processus de purification des virus recombinants à partir de plages isolées. Les tests pour vérifier la fonctionnalité de la protéine codée par les virus recombinants, seront effectués à la suite de ces étapes de purification.

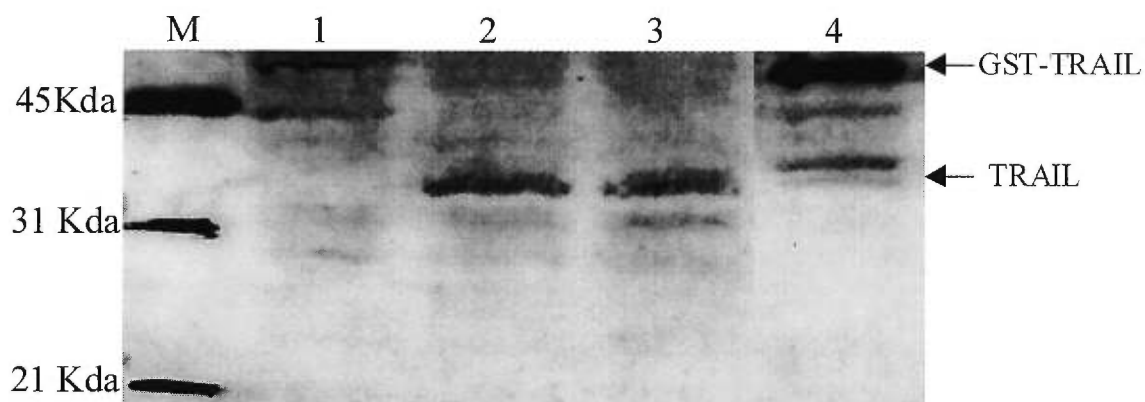


Figure 9: Expression de la protéine TRAIL dans les cellules infectées avec les virus recombinants. Western blot avec l'anticorps K-18 anti-TRAIL, sur les cellules 293 non infectées (1), ou infectées avec les virus résultant de la cotransfection du pTG6600/TRAIL (2) ou du pTigc/TRAIL (3), ou sur la protéine de fusion GST-TRAIL comme contrôle positif. M représente le marqueur de taille pour les protéines.

5. Génération de récepteurs solubles

Dans le cadre de l'étude de la fonction de TRAIL dans le processus apoptotique et dans la costimulation des cellules T, nous avons développé des systèmes capables de bloquer la signalisation à travers TRAIL et/ou les autres membres de la famille du TNF. Les protéines de fusion des membres de la famille des TNF-R ont été le système de choix utilisé pour bloquer l'activité de leur ligand respectif, aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* (22). On parle de protéines de fusion, puisque les récepteurs solubles sont produits en fusionnant leur domaine extracellulaire avec la portion Fc des Immunoglobulines humaines (Ig). Bien que la génération de la protéine de fusion DR5-Fc soit indispensable à la caractérisation des fonctions de TRAIL, la production d'au moins un récepteur soluble, de la famille des TNF-R, qui n'interagit pas avec TRAIL est nécessaire ; et ceci, afin de démontrer la spécificité de l'effet biologique observé lors du traitement avec la molécule TRAIL. Pour cela, nous avons choisi de générer les protéines de fusion suivantes : DR5-Fc, Fas-Fc et DR3-Fc. Cependant, une fonction biologique spécifique du ligand TRAIL est supposée être inhibée par la protéine DR5-Fc mais pas par les protéines Fas-Fc et DR3-Fc.

5.1. Clonage de l'ADNc de DR5, Fas et DR3

L'ADNc codant pour la région extracellulaire et pour le peptide signal de chacun des récepteurs DR5 (résidus 1 à 183), Fas et DR3, a été amplifié par PCR à partir d'une banque d'ADNc de PBMC stimulés trois jours par l'OKT3. Les produits de PCR ont été clonés dans le vecteur pBS II KS+, puis séquencés. Par la suite les différents ADNc ont été clonés dans le vecteur d'expression eucaryote CosFc-link, dans le même cadre de lecture que le Fc. Ce dernier se trouve alors dans la région C-terminale de la protéine de fusion (voir matériels et méthodes). Ces trois constructions ont été vérifiées par séquençage en utilisant une amorce présente dans le vecteur en aval de l'ATG de chacun des inserts. Ces constructions sont nommées par la suite, CosFcDR5, CosFcFas et CosFcDR3.

5.2. Production des protéines de fusion

Deux systèmes cellulaires pour l'expression de protéines ont été utilisés.

5.2.1. Les cellules CHO déficientes en DHFR (CHO DHFR-)

Les cellules ovariennes de hamster chinois déficientes en enzyme déhydrofolate réductase (DHFR), ont été utilisées avec un grand succès pour la production de protéines biologiquement actives. La DHFR est une enzyme essentielle à la croissance cellulaire puisqu'elle est nécessaire à la synthèse du tétrahydrofolate. En effet, les cellules CHO DHFR- sont incapables de synthétiser le tétrahydrofolate. L'introduction de l'enzyme DHFR dans ces cellules peut se faire par l'intermédiaire du vecteur d'expression codant pour la protéine d'intérêt. La DHFR peut être inhibée par le méthotrexate, un analogue du folate. Par la suite, la sélection progressive de cellules résistantes à des concentrations croissantes de méthotrexate entraînera l'amplification du gène de la DHFR avec une amplification concomitante des régions d'ADN qui se situent de part et d'autres de la séquence du gène de la DHFR. Par conséquent, le gène codant pour la protéine d'intérêt sera amplifié, permettant ainsi, des niveaux d'expression protéiques relativement élevés.

Pour la production des protéines de fusion dans ce système, chacune des trois constructions a été cotransfectée avec un vecteur exprimant le gène de résistance à la néomycine (G418) à des rapports respectifs de 9/10 et 1/10. Les cellules ont ensuite été sélectionnées par l'addition de néomycine. Les gènes d'intérêt sont amplifiés par le système DHFR/méthotrexate en utilisant des concentrations croissantes de méthotrexate. Nous avons ainsi obtenu des lignées exprimant d'une manière stable les gènes des protéines étudiées.

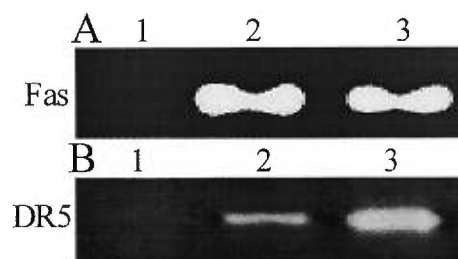
Pour vérifier l'expression des protéines de fusion dans les cellules transfectées, une RT-PCR a été effectuée environ 2 mois après les transfections (figure 10). Les résultats montrent un bon niveau d'expression des messagers de Fas par rapport au signal détecté dans le contrôle positif qui est le plasmide ayant servi à la transfection (figure 10.A.). Aucune bande n'a été détectée dans le contrôle négatif. Ceci montre que la bande détectée dans les cellules transfectées est spécifique à l'ADNc de Fas.

Par contre, la bande détectée dans les cellules transfectées avec le plasmide codant pour DR5 était faible (figure 10.B.). Un contrôle sans la transcriptase reverse n'a pas été effectué puisque la RT-PCR a été faite sur de l'ARNm préalablement traité à la DNase I (voir matériels et méthodes).

En ce qui concerne DR3, nous n'avons toujours pas pu détecter par les amorces choisies le signal positif, aussi bien pour les cellules transfectées que pour le plasmide utilisé comme contrôle positif. Ceci est probablement dû à la séquence de l'amorce DR3 DD (voir matériels et méthodes) très riche en bases G et C (environ 80%) ; ces dernières pouvant former des dimères et par la suite empêcher l'hybridation entre l'amorce et la matrice.

Ce système ne s'étant pas révélé efficace pour la production à des niveaux suffisants des protéines qui nous intéressent, nous avons opté pour un autre système que nous décrivons dans le chapitre ci-dessous.

Figure 10 : Expression des messagers de Fas (A) et de DR5 (B) dans les cellules CHO transfectées avec les plasmides codant pour les protéines de fusion Fas-Fc et DR5-Fc. RT-PCR sur les cellules CHO non transfectées (1), transfectées avec Fas-Fc (A.2.) et DR5-Fc (B.2.) ou sur les plasmides utilisés pour les transfections (3).



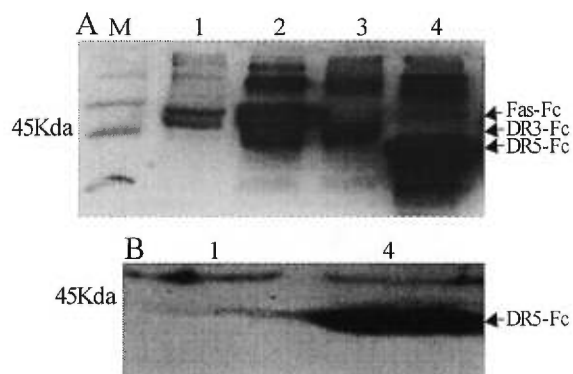
5.2.2. Système de production de protéine utilisant le couple Ori SV40/ antigène grand T de SV40

Les cellules 293T sont des cellules 293 qui ont été transformées avec l'antigène grand T du virus SV40. Elles permettent une répllication massive des plasmides contenant l'origine de répllication de ce virus. Nous avons utilisé ce système pour produire nos protéines de fusion, vu que le vecteur CosFclink contient l'origine de répllication de SV40. Des transfections transitoires ont été effectuées avec chaque construction et avec le vecteur vide comme contrôle négatif. Soixante douze heures après transfection, les surnageants des cellules sont collectés, concentrés dix fois, puis testés pour la présence de protéines par western blot.

Ces résultats sont présentés dans la figure 11. L'anticorps anti-Ig humaines (Sigma), révèle la présence d'une bande majeure dans chacun des surnageants des cellules transfectées (figure 11.A.). La taille de la bande diffère d'un surnageant à l'autre, ce qui est probablement dû aux différents sites de glycosylation plutôt qu'à la différence du nombre d'acides aminés entre les différentes protéines de fusion. Le surnageant des cellules 293T transfectées avec le vecteur vide est utilisé comme contrôle négatif. Ces résultats suggèrent que les bandes détectées sont spécifiques des protéines de fusion produites.

Un western blot utilisant un anticorps polyclonal anti-DR5 (Santa Cruz), a permis de confirmer la spécificité de la protéine produite et sécrétée dans le surnageant des cellules transfectées avec le plasmide CosFcDR5. La bande correspondant à DR5-Fc est détectée à 44 Kda environ, alors qu'aucune bande de cette taille n'est détectée dans le surnageant contrôle (figure 11.B.).

Figure 11: Les récepteurs solubles dans les surnageants concentrés de 72h des cellules 293T transfectées avec les différentes fusions Fc. A: Western blot avec un anticorps anti-Ig humaines sur le surnageant des cellules 293T transfectées avec le vecteur vide (1), la construction Fas-Fc (2), la construction DR3-Fc (3) ou la construction DR5-Fc (4). B: western blot avec un anticorps anti-DR5 sur 1 et 4 de A. L'anticorps secondaire utilisé dans A et dans B est l'Ac anti-chèvre (voir matériels et méthodes).



5.3. Vérification de la fonctionnalité des protéines de fusion

La détection des protéines de fusion par western blot dans les surnageants des cellules transfectées ne confirme pas leur fonctionnalité. Pour cela, des tests fonctionnels devraient être effectués afin de vérifier si ces protéines sont fonctionnelles ou non.

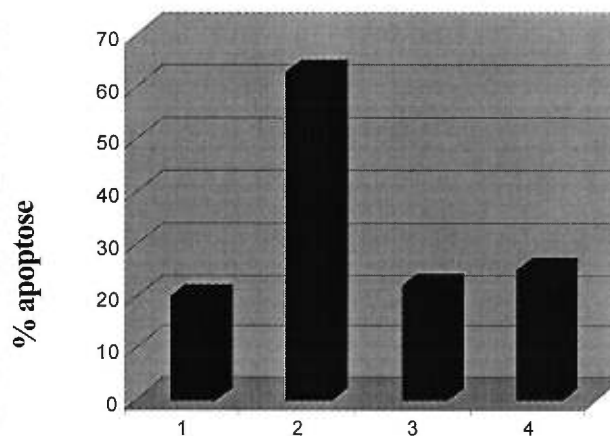
Dans un test préliminaire visant à vérifier la fonctionnalité de DR5-Fc, l'apoptose induite par la protéine GST-TRAIL (décrite dans les paragraphes 1.2 et 1.3.) sur les cellules Jurkat n'a pas été inhibée d'une façon significative en présence d'un surnageant contenant du DR5-Fc (résultats non montrés). Cependant, un tel résultat n'élimine pas la possibilité que cette protéine soit fonctionnelle ; et ceci pour plusieurs raisons. Premièrement, la protéine GST-TRAIL utilisée pour l'induction de l'apoptose n'était pas une protéine purifiée ; par contre, elle était présente dans un mélange de protéines bactériennes, ces dernières pouvant éventuellement interférer dans la réaction d'inhibition de l'apoptose. D'autre part, du TRAIL recombinant purifié, nécessaire à la réalisation d'un tel test fonctionnel, n'était pas disponible dans notre laboratoire. De plus, une optimisation des conditions expérimentales semble être nécessaire à la réussite du test d'inhibition de l'apoptose. Pour cela, différentes concentrations du surnageant contenant de DR5-Fc, ainsi que différents temps d'incubation préalable du ligand TRAIL avec le récepteur soluble DR5-Fc seront testés.

La vérification de la fonctionnalité de la protéine de fusion DR3-Fc n'était pas réalisable à cause de la non-disponibilité, dans notre laboratoire, d'une molécule recombinante capable d'activer la voie de signalisation de l'apoptose via le récepteur DR3. Quant à la protéine de fusion Fas-Fc, la vérification de sa fonctionnalité a été réalisée en induisant l'apoptose sur les cellules Jurkat à l'aide d'un anticorps anti-Fas (CH11, Upstate Biotechnology). Ce test est décrit dans le chapitre suivant.

5.3.1. Inhibition de l'apoptose médiée par Fas sur les cellules Jurkat par la protéine de fusion Fas-Fc

Pour tester la fonctionnalité de la protéine produite dans le surnageant des cellules CHO transfectées avec le plasmide CosFcFas, un anticorps pentamérique anti-Fas, le CH11 (Upstate Biotechnology), a été utilisé pour induire l'apoptose des cellules Jurkat, et le surnageant des cellules CHO-Fas-Fc, ainsi que celui des cellules CHO utilisé comme contrôle, ont été testés pour l'effet d'inhibition de l'apoptose. Les résultats démontrent que le surnageant des cellules CHO en lui-même présente une certaine cytotoxicité sur les Jurkat, puisque environ 20% des cellules rentrent en apoptose après incubation avec soit le surnageant des CHO soit le surnageant des CHO-Fas-Fc. L'addition de l'anti-Fas augmente cette apoptose pour atteindre environ 60% (figure 12). Cette apoptose spécifique à Fas est presque entièrement abolie en présence du surnageant des cellules CHO-Fas-Fc. Ces résultats suggèrent fortement que les cellules CHO transfectées avec le pCosFcFas, produisent du Fas soluble, qui peut être reconnu en solution par le CH11 et qui neutralise l'action de ce dernier sur les Jurkat.

Figure 12: Inhibition de l'apoptose médiée par Fas des Jurkat par la protéine de fusion Fas-Fc. Les cellules (1 million) ont été incubées 16 heures en présence (2 et 4) ou en absence (1 et 3) de 1 μ g/ml d'anticorps anti-Fas (CH11) et en présence de 50 μ l de surnageant concentré de cellules CHO (1 et 2) ou de cellules CHO-Fas-Fc (3 et 4). L'apoptose a été mesurée par cytométrie en flux utilisant l'iodure de propidium.



6. Infection des cellules T

Les lymphocytes T constituent des effecteurs majeurs de la réponse immune. Dans cette partie du travail, nous avons voulu tester la possibilité d'infecter des cellules T primaires, activées ou transformées, par des adénovirus recombinants. Ceci est effectué dans le but de délivrer des gènes pro-apoptotiques ou encore des gènes anti-apoptotiques dans des lignées ou des cellules lymphoïdes pour étudier leurs fonctions et leur rôle dans la réponse immune.

6.1. Infection des cellules Jurkat

Les cellules Jurkat constituent un des modèles les plus utilisés pour étudier les fonctions des cellules T. Nous les avons donc choisis pour tester la possibilité de les infecter avec des adénovirus recombinants (Adr), et par la suite d'évaluer l'efficacité de la transduction des gènes marqueurs codés par les virus recombinants, sous le contrôle de différents promoteurs.

Une infection des cellules Jurkat avec trois virus recombinants différents a été effectuée. Les virus recombinants testés sont, l'Ad-CMV-GFP codant pour la GFP sous le contrôle du promoteur du cytomégalovirus (CMV), l'Ad-RSV- β gal qui code pour l'enzyme β galactosidase sous le contrôle du promoteur du virus du sarcome de Rous (RSV), et l'Ad-SR α - β gal qui code pour l'enzyme β galactosidase sous le contrôle du promoteur SR α . 48 heures après l'infection, les cellules ont été testées pour l'expression des gènes marqueurs. L'expression de la GFP a été analysée par cytométrie en flux, et l'expression de la β -gal par microscopie optique après la coloration X gal (voir matériels et méthodes). Les résultats des infections présentés dans la figure 13 montrent une efficacité de transduction avec l'Ad-RSV- β gal. 25%, 36% et 43% de cellules transduites respectivement avec des MOI 100, 200 et 500 (figure 13). La transduction des cellules avec l'Ad-SR α - β gal est très faible, 5% de cellules transduites avec une MOI de 500 (figure 13), alors que la transduction avec l'Ad-CMV-GFP est nulle, de l'ordre de 0.5 % de cellules transduites avec une MOI de 500 (vu ce faible pourcentage, ce résultat n'est pas présenté sur le diagramme de la

figure 13). Des cellules Jurkat non infectées ont été utilisées comme contrôle négatif de transduction (figure 13). Ces résultats montrent que l'adénovirus est capable d'infecter la lignée lymphoïde Jurkat, mais l'efficacité d'expression des gènes, suite à l'entrée du virus, varie en fonction du promoteur utilisé. La figure 14 représente deux photos de microscopie optique, qui montrent une nette différence dans l'intensité d'expression de la β gal entre les cellules transduites avec l'Ad-SR α - β gal et celles transduites avec l'Ad-RSV- β gal.

Figure 13: Infection des cellules Jurkat avec des adénovirus recombinants codant pour un gène marqueur, la β galactosidase, sous le contrôle de différents promoteurs, soit le promoteur RSV, et le promoteur SR α . Trois MOI ont été testées, soit 100, 200 et 500 particules infectieuses par cellule. Des cellules Jurkat non infectées ont servi de contrôle négatif de transduction.

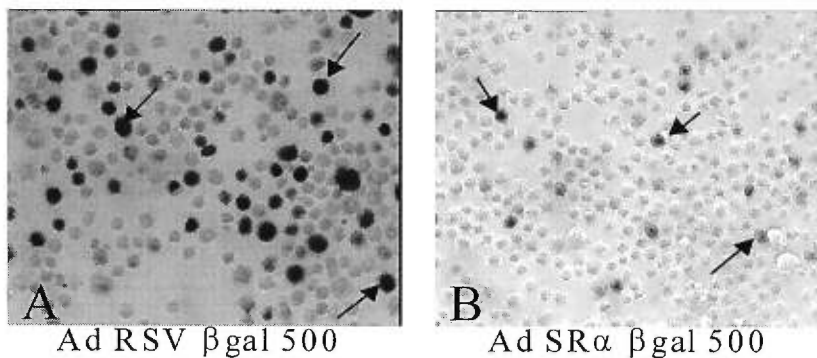
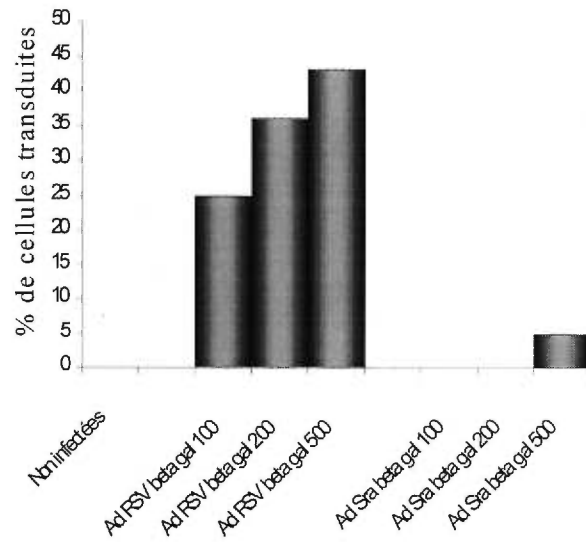


Figure 14: Microscopie optique (objectif 20x) de cellules Jurkat infectées par un adénovirus recombinant codant pour la b β ta galactosidase (β gal) sous le contrôle du promoteur RSV(A) ou SRalpha (B). La multiplicité d' infection est de 500 particules infectieuses par cellule.

6.2. Infection des PBL

Plusieurs groupes de chercheurs ont essayé d'infecter les PBL dans le but d'y délivrer des gènes pour étudier leurs fonctions. Ces essais ont été vains, et pourraient être expliqués par les faibles niveaux d'expression du récepteur CAR. Par contre, la possibilité d'infecter les PBL a été décrite par un seul groupe, qui a montré que l'activation des cellules T induit l'expression des intégrines alpha v qui favorisent l'internalisation de l'adénovirus dans la cellule cible, et par la suite augmente l'efficacité de transduction des gènes par l'adénovirus (113). La vérification d'une telle observation, dans les conditions de notre laboratoire, était nécessaire. Pour cela, deux cycles d'adhérence sur boîte de pétri ont été effectués sur des PBMC obtenus à partir de donneurs sains, ont permis de séparer les monocytes des PBL. Les PBL ont ensuite été activés avec la PHA et la PMA en présence de l'IL-2. L'état d'activation a été mis en évidence par l'analyse en cytofluorométrie des marqueurs d'activation tels l'antigène HLA-DR, le CD25 et le CD69 (voir matériels et méthodes). Les mêmes virus recombinants utilisés dans les infections des cellules Jurkat ont été testés dans les infections des PBL. Les résultats de notre expérience ont montré l'absence de transduction des PBL quel que soit leur état d'activation ce qui contredit les résultats de l'étude décrite dans la référence 113. Il est intéressant de noter, que cette dernière est la seule étude montrant un tel résultat.

En conclusion, les méthodes d'infection avec les adénovirus recombinants classiques ne semblent pas être efficaces pour le transfert de gènes dans les cellules T primaires ou activées.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Etant donnée la complexité du système TRAIL/TRAIL-R, les nombreuses études effectuées *in vitro*, n'ont pas encore réussi à définir un rôle biologique de TRAIL. C'est pourquoi, l'objectif initial de notre travail était de générer un outil qui nous permettrait de mieux caractériser la fonction de TRAIL *in vivo*, aussi bien dans la régulation de la réponse immune que dans son activité anti-tumorale. Nous avons donc choisi de générer un adénovirus recombinant codant pour TRAIL (Adr-TRAIL). Notre choix se basait sur des données montrant que l'adénovirus recombinant est l'un des vecteurs les plus efficaces pour transférer des gènes dans différents types cellulaires aussi bien *in vivo* qu'*in vitro*.

Les premiers essais de production du virus Adr-TRAIL ont été vains et ont été attribués à la toxicité de TRAIL sur les cellules servant à produire ces virus recombinants (figure 6). Des observations similaires ont été déjà rapportées par différents groupes de chercheurs lors de la génération de virus recombinants codant pour des molécules proapoptotiques, notamment au cours de la production d'Adr-FasL (106;107). Nous avons décidé de générer ces virus dans ces cellules sur la base de travaux montrant leur résistance à l'apoptose induite par TRAIL (18;21). De plus avant de procéder à la génération du virus, nous avons testé l'effet de notre protéine recombinante GST-TRAIL, contenue dans le surnageant de lyse bactérienne et capable d'induire l'apoptose dans les cellules Jurkat, sur les cellules 293. Les résultats de ce test montraient la présence d'une certaine toxicité se manifestant par le détachement des cellules qui était due aux protéines bactériennes plutôt qu'à la fusion GST-TRAIL puisque aucune différence, dans le nombre de cellules apoptotiques, par rapport au contrôle n'a été détectée (résultats non montrés).

Ces résultats nous ont donc amenés à suggérer que la toxicité observée sur les cellules 293 lors de la génération du virus recombinant pourrait être due aux niveaux élevés de TRAIL ainsi produit. Pour éviter les effets cytotoxiques des molécules proapoptotiques lors de la génération de virus recombinants, différents groupes ont exprimé l'inhibiteur d'apoptose CrmA dans les cellules 293. Dans notre cas, nous avons choisi de générer une lignée de cellules 293 exprimant de manière stable

l'inhibiteur d'apoptose p35. En parallèle, nous avons essayé de produire le virus dans des cellules 293 provenant d'un autre laboratoire. Ces derniers essais ont finalement abouti à la production de virus. Pour prévenir une toxicité qui pourrait être liée aux niveaux élevés de la protéine TRAIL produite lors de l'amplification virale, nous avons utilisé les cellules 293 qui expriment le p35. La présence d'ADNc de TRAIL dans l'ADN adénoviral d'une part, et l'expression de la protéine TRAIL d'autre part, démontrent la présence de virus recombinants codant pour TRAIL dans les cellules infectées. Une explication possible au fait qu'il n'y ait pas eu de toxicité sur les cellules dans ces derniers essais peut être les différents degrés de résistance des lignées 293 (de différentes provenances) à l'apoptose induite par TRAIL. La validité d'une telle explication est supportée par les travaux des chercheurs qui ont sélectionné des clones de cellules 293 résistantes à l'apoptose induite par FasL, dans lesquels ils ont réussi à produire un adénovirus recombinant codant pour FasL (106).

Le virus recombinant est actuellement en cours de purification à partir de plages isolées. Des tests de cytotoxicité seront ensuite effectués pour vérifier la fonctionnalité du virus produit. L'étape d'après, consistera à utiliser ce virus recombinant *in vivo*, dans différents modèles animaux.

Pour pouvoir clairement déterminer le rôle de TRAIL dans les différentes expériences envisagées, nous avons généré des récepteurs solubles sous forme de protéines de fusion avec le fragment Fc des immunoglobulines humaines capables de bloquer les fonctions de la molécule d'intérêt mais également d'autres molécules de la même famille potentiellement capables d'interférer ou d'avoir des homologies de fonction avec elle. C'est ainsi que nous avons décidé de générer, DR5-Fc, DR3-Fc et Fas-Fc, qui nous seront nécessaires à la démonstration de la spécificité des effets observés suite à la surexpression de TRAIL. Nous envisageons également de bloquer les effets liés à la surexpression de TRAIL *in vivo* par un adénovirus recombinant codant pour DR5-Fc. L'Adr codant pour Fas-Fc servira alors comme contrôle.

Perspectives

L'expression d'un transgène codé par un adénovirus recombinant est souvent transitoire. Ceci est dû d'une part, au transfert épisomal du matériel génétique, ce qui va entraîner la dilution du virus au cours des divisions cellulaires et l'atténuation de l'expression du transgène; d'autre part, à l'immunogénicité des vecteurs adénoviraux se traduisant par l'induction d'une réponse immunitaire humorale et cellulaire initialement décrite comme étant seule capable d'éliminer les cellules transduites (93). Les observations d'études récentes suggèrent que le caractère transitoire de l'expression du transgène est la conséquence de la réponse humorale dirigée contre le produit du transgène plus que celle dirigée contre les protéines adénovirales (108;109).

Dans le cadre de notre travail, l'administration de l'Adr-TRAIL à des souris immunocompétentes entraînera donc une surexpression du transgène TRAIL. En fonction de l'immunogénicité de TRAIL, la durée de cette surexpression pourra donc varier de 3 semaines à plusieurs mois. Par contre, la surexpression de TRAIL, suite à l'administration de l'Adr-TRAIL à des souris immunodéficientes, durera plusieurs mois.

Dans les deux cas, et quelle que soit la durée de surexpression de TRAIL, cette phase nous permettra de répondre à plusieurs questions quant aux fonctions de TRAIL dans le système immunitaire. Est-ce que TRAIL est impliqué dans l'induction de la tolérance immunitaire ? Joue-t-il un rôle au niveau des sites immuno-privilégiés ? Si TRAIL est capable d'induire l'apoptose des cellules T activées, ne serait-il pas un agent potentiel dans la prévention du rejet de greffe ? D'autre part, est ce que TRAIL est capable de fournir un signal de survie qui costimule les lymphocytes T ? Une fonction biologique claire de TRAIL est son effet anti-tumoral mis en évidence aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*. Mais, il reste à déterminer si l'administration du vecteur Adr-TRAIL *in vivo* peut constituer une nouvelle approche thérapeutique puissante contre le cancer, sans avoir des effets secondaires de toxicité sur les tissus normaux.

La tolérance immunitaire est un phénomène important pour prévenir l'auto-immunité. Elle peut survenir dans le thymus lors de la sélection négative comme elle

peut survenir en périphérie. La tolérance périphérique peut survenir lorsque des antigènes du soi sont présentés aux lymphocytes T. L'AICD peut également constituer un mécanisme de tolérance périphérique. D'autre part, il a été suggéré que TRAIL contribue au processus d'AICD (49) et peut être impliqué dans l'induction de la tolérance (91). Des études récentes montrent que les DC sont capables de tuer les cellules T CD4+ par l'intermédiaire de FasL qui est exprimé à leur surface (110), ceci suggère que l'expression de TRAIL et/ou de FasL sur les DC peut constituer un mécanisme de déletion des cellules T *in vivo*. Dans ce contexte, l'Adr-TRAIL pourrait servir à transduire les cellules dendritiques. Ces dernières exprimant ainsi la molécule pro-apoptotique TRAIL à leur surface, seront testées pour leur effet sur les cellules T activées ou non activées comme contrôle, dans une coculture. Dans le cas où une cytotoxicité sur les cellules T CD4+ et/ou les cellules T CD8+ activées est démontrée, une implication de TRAIL dans la tolérance pourra être discutée. A l'inverse, une prolifération des cellules T CD4+ suggérera une implication de TRAIL dans la costimulation des cellules T.

Par ailleurs, on peut s'attendre à ce que TRAIL, comme c'est le cas pour FasL, joue un rôle dans l'immuno-privilege. Pour vérifier cette hypothèse, nous envisageons de créer un site immunoprivilégié artificiel en injectant l'Adr-TRAIL dans un tissu donné qui ne contient pas de TRAIL endogène, tel que le foie par exemple. Suite à l'injection du virus, la réponse immune contre les antigènes viraux sera testée *in vitro*: notamment, les cellules T CD4+ seront testées pour leur prolifération et les cellules T CD8+ pour leur cytotoxicité. De même, des coupes histologiques pourront être testées pour l'infiltration des cellules T (CD4+ et/ou CD8+) par immuno-histochimie.

La transplantation allogénique constitue une autre situation au cours de laquelle la tolérance immunologique est essentielle. La possibilité d'induire une tolérance de la greffe suite à la transduction, *in vitro*, des cellules du greffon par l'Adr-TRAIL pourra être évaluée. En effet, une étude récente montre que des cellules d'adénocarcinome mammaire modifiées de façon à exprimer constitutivement TRAIL sont capables d'échapper à la réponse immune lorsqu'elles sont implantées dans des souris allogéniques, et ceci en induisant la mort des cellules T alloréactives par l'intermédiaire de TRAIL (111).

L'activation cellulaire est une étape primordiale au cours d'une réponse immunitaire. En général, elle survient suite à la reconnaissance de l'antigène par les composantes effectrices du système immunitaire telles que les cellules T. Toutefois cette activation nécessite la présence de signaux de costimulation pour atteindre une réponse optimale. D'autre part, TRAIL, comme FasL et TNF, est capable de fournir un signal de survie suite à l'activation de NF κ B dans différentes lignées de cellules lymphoïdes (Jurkat , CEM et autres) ou non lymphoïdes (Hela, HEK 293) à travers trois de ses récepteurs (112). Il nous semble donc important de déterminer le rôle de TRAIL dans l'activation des cellules T. Une approche qui permet de répondre à cette question serait l'analyse des effets de la surexpression de TRAIL dans les cellules présentatrices d'antigène (les cellules dendritiques, les cellules épithéliales thymiques, les macrophages), *in vivo*, sur les cellules T. Ainsi, suite à l'injection de l'Adr-TRAIL dans les souris par voie systémique, les différentes populations de cellules T présentes dans les organes lymphoïdes, soit le thymus, la rate et les ganglions, pourront être analysées pour la production de cytokines (i.e. IL-2) ainsi que pour l'incorporation de thymidine dans un test de prolifération. Par exemple, une coinjection d'un antigène donné (i.e. β -gal) peut être envisagée, et la réponse immune médiée par les cellules T contre cet antigène, pourra être évaluée.

Comme nous l'avons déjà décrit dans l'introduction, TRAIL est doué de plusieurs caractéristiques lui conférant un potentiel thérapeutique contre le cancer. De plus, du TRAIL recombinant soluble n'a montré aucune toxicité sur les tissus normaux *in vivo* (64;65). Mais, vu que le transfert de gène par un adénovirus recombinant entraîne des niveaux d'expression du transgène qui sont très élevés, il reste à considérer les effets potentiels de toxicité de TRAIL, sur les tissus normaux *in vivo*, suite à l'injection de l'Adr-TRAIL par voie systémique. Des analyses histologiques pour la présence de régions nécrotiques dans les différents tissus ainsi que des analyses des paramètres biochimiques dans les différents organes et dans le sérum, devront être effectuées, à la suite de l'injection de l'Adr-TRAIL. Dans le cas où les résultats des analyses montrent l'absence de toxicité *in vivo*, l'Adr-TRAIL sera testé pour son potentiel thérapeutique dans des modèles de tumeurs chez la souris. Suite à l'implantation sous cutanée ou intrapéritonéale de tumeurs syngéniques, des injections locales ou par voie systémique

d'Adr-TRAIL seront effectuées. Leurs effets seront évalués aussi bien chez les souris immunodéficientes que chez les souris immunocompétentes afin de déterminer si la cytotoxicité induite sur les cellules tumorales est uniquement liée à l'effet apoptotique de TRAIL ou si elle est aussi liée à une composante immunitaire.

En conclusion, notre travail a abouti à la construction d'un adénovirus recombinant codant pour TRAIL et à la génération de récepteurs solubles. Ces outils pourront être utilisés dans plusieurs applications. Ils permettront de répondre aux questions posées concernant le rôle biologique de TRAIL dans le système immunitaire, comme ils pourront servir à l'évaluation du potentiel thérapeutique de TRAIL contre le cancer.

Enfin, nos résultats des expériences d'infection des lymphocytes T montrent l'absence de transduction des PBL quel que soit leur état d'activation ce qui contredit les résultats de l'étude faite par Huang et al. (113). Il est intéressant de noter, que cette dernière est la seule étude montrant un tel résultat. En conclusion, les méthodes d'infection avec les adénovirus recombinants classiques ne semblent pas être efficaces pour le transfert de gènes dans les cellules T. En revanche une bonne efficacité de transduction a été obtenue dans le modèle des cellules Jurkat. En outre nos résultats démontrent l'importance du choix du promoteur pour obtenir des niveaux élevés de produit de transgène dans ces cellules.

Récemment, une nouvelle stratégie qui vise à augmenter l'efficacité de transduction des cellules T a été élaborée (114). Cette stratégie consiste à cibler spécifiquement les cellules T par des anticorps bi-spécifiques, dirigés contre le CD3 humain d'une part, et contre une protéine codée par l'adénovirus recombinant d'autre part. L'utilisation de tels anticorps a montré une très bonne efficacité de transduction (90%) des cellules T, à de faibles MOI (100 particules infectieuses par cellule). Différentes stratégies peuvent donc être envisagées pour délivrer des protéines d'intérêt dans les cellules T.

BIBLIOGRAPHIE

1. **Griffith, T.S. and D.H. Lynch.** 1998. TRAIL: a molecule with multiple receptors and control mechanisms. *Curr.Opin.Immunol* 10:559.
2. **Marsters, S.A., R.A. Pitti, J.P. Sheridan, and A. Ashkenazi.** 1999. Control of apoptosis signaling by Apo2 ligand. *Recent.Prog.Horm.Res.* 54:225-34:225.
3. **Schulze-Osthoff, K., D. Ferrari, M. Los, S. Wesselborg, and M.E. Peter.** 1998. Apoptosis signaling by death receptors. *Eur.J Biochem.* 254:439.
4. **Ashkenazi, A. and V.M. Dixit.** 1998. Death receptors: signaling and modulation. *Science* 281:1305.
5. **Baker, S.J. and E.P. Reddy.** 1996. Transducers of life and death: TNF receptor superfamily and associated proteins. *Oncogene* 12:1.
6. **Malinin, N.L., M.P. Boldin, A.V. Kovalenko, and D. Wallach.** 1997. MAP3K-related kinase involved in NF-kappaB induction by TNF, CD95 and IL-1. *Nature* 385:540.
7. **Gruss, H.J. and S.K. Dower.** 1995. Tumor necrosis factor ligand superfamily: involvement in the pathology of malignant lymphomas. *Blood* 85:3378.
8. **Nagata, S.** 1997. Apoptosis by death factor. *Cell* 88:355.
9. **Itoh, N. and S. Nagata.** 1993. A novel protein domain required for apoptosis. Mutational analysis of human Fas antigen. *J.Biol.Chem.* 268:10932.
10. **Tartaglia, L.A., T.M. Ayres, G.H. Wong, and D.V. Goeddel.** 1993. A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death. *Cell* 74:845.
11. **Pitti, R.M., S.A. Marsters, D.A. Lawrence, M. Roy, F.C. Kischkel, P. Dowd, A. Huang, C.J. Donahue, S.W. Sherwood, D.T. Baldwin, P.J. Godowski, W.I. Wood, A.L. Gurney, K.J. Hillan, R.L. Cohen, A.D. Goddard, D. Botstein, and A. Ashkenazi.** 1998. Genomic amplification of a decoy receptor for Fas ligand in lung and colon cancer. *Nature* 396:699.
12. **Pan, G., J. Ni, Y.F. Wei, G. Yu, R. Gentz, and V.M. Dixit.** 1997. An antagonist decoy receptor and a death domain-containing receptor for TRAIL. *Science* 277:815.
13. **Pan, G., K. O'Rourke, A.M. Chinnaiyan, R. Gentz, R. Ebner, J. Ni, and V.M. Dixit.** 1997. The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *Science* 276:111.

14. **Sheridan, J.P., S.A. Marsters, R.M. Pitti, A. Gurney, M. Skubatch, D. Baldwin, L. Ramakrishnan, C.L. Gray, K. Baker, W.I. Wood, A.D. Goddard, P. Godowski, and A. Ashkenazi.** 1997. Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors. *Science* 277:818.
15. **Gravestien, L.A. and J. Borst.** 1998. Tumor necrosis factor receptor family members in the immune system. *Semin.Immunol.* 10:423.
16. **Ashkenazi, A. and V.M. Dixit.** 1999. Apoptosis control by death and decoy receptors. *Curr.Opin.Cell Biol* 11:255.
17. **Wiley, S.R., K. Schooley, P.J. Smolak, W.S. Din, C.P. Huang, J.K. Nicholl, G.R. Sutherland, T.D. Smith, C. Rauch, and C.A. Smith.** 1995. Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity* 3:673.
18. **Pitti, R.M., S.A. Marsters, S. Ruppert, C.J. Donahue, A. Moore, and A. Ashkenazi.** 1996. Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family. *J.Biol.Chem.* 271:12687.
19. **Frank, S., U. Kohler, G. Schackert, and H.K. Schackert.** 1999. Expression of TRAIL and its receptors in human brain tumors. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 257:454.
20. **Degli-Esposti, M.A., P.J. Smolak, H. Walczak, J. Waugh, C.P. Huang, R.F. DuBose, R.G. Goodwin, and C.A. Smith.** 1997. Cloning and characterization of TRAIL-R3, a novel member of the emerging TRAIL receptor family. *J Exp.Med.* 186:1165.
21. **Schneider, P., M. Thome, K. Burns, J.L. Bodmer, K. Hofmann, T. Kataoka, N. Holler, and J. Tschopp.** 1997. TRAIL receptors 1 (DR4) and 2 (DR5) signal FADD-dependent apoptosis and activate NF-kappaB. *Immunity.* 7:831.
22. **Walczak, H., M.A. Degli-Esposti, R.S. Johnson, P.J. Smolak, J.Y. Waugh, N. Boiani, M.S. Timour, M.J. Gerhart, K.A. Schooley, C.A. Smith, R.G. Goodwin, and C.T. Rauch.** 1997. TRAIL-R2: a novel apoptosis-mediating receptor for TRAIL. *EMBO J* 16:5386.
23. **MacFarlane, M., M. Ahmad, S.M. Srinivasula, T. Fernandes-Alnemri, G.M. Cohen, and E.S. Alnemri.** 1997. Identification and molecular cloning of two novel receptors for the cytotoxic ligand TRAIL. *J.Biol.Chem.* 272:25417.
24. **Schneider, P., J.L. Bodmer, M. Thome, K. Hofmann, N. Holler, and J. Tschopp.** 1997. Characterization of two receptors for TRAIL. *FEBS Lett.* 416:329.

25. **Screaton, G.R., J. Mongkolsapaya, X.N. Xu, A.E. Cowper, A.J. McMichael, and J.I. Bell.** 1997. TRICK2, a new alternatively spliced receptor that transduces the cytotoxic signal from TRAIL. *Curr.Biol* 7:693.
26. **Wu, G.S., T.F. Burns, E.R. McDonald, W. Jiang, R. Meng, I.D. Krantz, G. Kao, D.D. Gan, J.Y. Zhou, R. Muschel, S.R. Hamilton, N.B. Spinner, S. Markowitz, G. Wu, and W.S. El-Deiry.** 1997. KILLER/DR5 is a DNA damage-inducible p53-regulated death receptor gene. *Nat.Genet.* 17:141.
27. **Chaudhary, P.M., M. Eby, A. Jasmin, A. Bookwalter, J. Murray, and L. Hood.** 1997. Death receptor 5, a new member of the TNFR family, and DR4 induce FADD- dependent apoptosis and activate the NF-kappaB pathway. *Immunity* 7:821.
28. **Mongkolsapaya, J., A.E. Cowper, X.N. Xu, G. Morris, A.J. McMichael, J.I. Bell, and G.R. Screaton.** 1998. Lymphocyte inhibitor of TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand): a new receptor protecting lymphocytes from the death ligand TRAIL. *J Immunol* 160:3.
29. **Degli-Esposti, M.A., W.C. Dougall, P.J. Smolak, J.Y. Waugh, C.A. Smith, and R.G. Goodwin.** 1997. The novel receptor TRAIL-R4 induces NF-kappaB and protects against TRAIL-mediated apoptosis, yet retains an incomplete death domain. *Immunity* 7:813.
30. **Marsters, S.A., J.P. Sheridan, R.M. Pitti, A. Huang, M. Skubatch, D. Baldwin, J. Yuan, A. Gurney, A.D. Goddard, P. Godowski, and A. Ashkenazi.** 1997. A novel receptor for Apo2L/TRAIL contains a truncated death domain. *Curr.Biol* 7:1003.
31. **Pan, G., J. Ni, G. Yu, Y.F. Wei, and V.M. Dixit.** 1998. TRUNDD, a new member of the TRAIL receptor family that antagonizes TRAIL signalling. *FEBS Lett.* 424:41.
32. **Simonet, W.S., D.L. Lacey, C.R. Dunstan, M. Kelley, M.S. Chang, R. Luthy, H.Q. Nguyen, S. Wooden, L. Bennett, T. Boone, G. Shimamoto, M. DeRose, R. Elliott, A. Colombero, H.L. Tan, G. Trail, J. Sullivan, E. Davy, N. Bucay, L. Renshaw-Gegg, T.M. Hughes, D. Hill, W. Pattison, P. Campbell, and W.J. Boyle.** 1997. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 89:309.
33. **Emery, J.G., P. McDonnell, M.B. Burke, K.C. Deen, S. Lyn, C. Silverman, E. Dul, E.R. Appelbaum, C. Eichman, R. DiPrinzio, R.A. Dodds, I.E. James, M. Rosenberg, J.C. Lee, and P.R. Young.** 1998. Osteoprotegerin is a receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *J Biol Chem* 273:14363.
34. **Degli-Esposti, M.** 1999. To die or not to die--the quest of the TRAIL receptors. *J Leukoc.Biol* 65:535.

35. **Hu, W.H., H. Johnson, and H.B. Shu.** 1999. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptors signal NF-kappaB and JNK activation and apoptosis through distinct pathways. *J Biol Chem* 274:30603.
36. **Marsters, S.A., R.M. Pitti, C.J. Donahue, S. Ruppert, K.D. Bauer, and A. Ashkenazi.** 1996. Activation of apoptosis by Apo-2 ligand is independent of FADD but blocked by CrmA. *Curr.Biol* 6:750.
37. **Wajant, H., F.J. Johannes, E. Haas, K. Sieminski, R. Schwenzer, G. Schubert, T. Weiss, M. Grell, and P. Scheurich.** 1998. Dominant-negative FADD inhibits TNFR60-, Fas/Apo1- and TRAIL-R/Apo2- mediated cell death but not gene induction. *Curr.Biol* 8:113.
38. **Yeh, W.C., J.L. Pompa, M.E. McCurrach, H.B. Shu, A.J. Elia, A. Shahinian, M. Ng, A. Wakeham, W. Khoo, K. Mitchell, W.S. El-Deiry, S.W. Lowe, D.V. Goeddel, and T.W. Mak.** 1998. FADD: essential for embryo development and signaling from some, but not all, inducers of apoptosis. *Science* 279:1954.
39. **Griffith, T.S., W.A. Chin, G.C. Jackson, D.H. Lynch, and M.Z. Kubin.** 1998. Intracellular regulation of TRAIL-induced apoptosis in human melanoma cells. *J Immunol* 161:2833.
40. **Jeremias, I., I. Herr, T. Boehler, and K.M. Debatin.** 1998. TRAIL/Apo-2-ligand-induced apoptosis in human T cells. *Eur.J Immunol* 28:143.
41. **Mariani, S.M., B. Matiba, E.A. Armandola, and P.H. Krammer.** 1997. Interleukin 1 beta-converting enzyme related proteases/caspases are involved in TRAIL-induced apoptosis of myeloma and leukemia cells. *J Cell Biol* 137:221.
42. **Wen, L.P., J.A. Fahrni, S. Troie, J.L. Guan, K. Orth, and G.D. Rosen.** 1997. Cleavage of focal adhesion kinase by caspases during apoptosis. *J Biol Chem* 272:26056.
43. **Yamada, H., S. Tada-Oikawa, A. Uchida, and S. Kawanishi.** 1999. TRAIL causes cleavage of bid by caspase-8 and loss of mitochondrial membrane potential resulting in apoptosis in BJAB cells. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 265:130.
44. **Zhang, X.D., A. Franco, K. Myers, C. Gray, T. Nguyen, and P. Hersey.** 1999. Relation of TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) receptor and FLICE-inhibitory protein expression to TRAIL-induced apoptosis of melanoma. *Cancer Res.* 59:2747.
45. **Griffith, T.S., C.T. Rauch, P.J. Smolak, J.Y. Waugh, N. Boiani, D.H. Lynch, C.A. Smith, R.G. Goodwin, and M.Z. Kubin.** 1999. Functional

- analysis of TRAIL receptors using monoclonal antibodies. *J Immunol* 162:2597.
46. **Jeremias, I., C. Kupatt, B. Baumann, I. Herr, T. Wirth, and K.M. Debatin.** 1998. Inhibition of nuclear factor kappaB activation attenuates apoptosis resistance in lymphoid cells. *Blood* 91:4624.
 47. **Muhlenbeck, F., E. Haas, R. Schwenzler, G. Schubert, M. Grell, C. Smith, P. Scheurich, and H. Wajant.** 1998. TRAIL/Apo2L activates c-Jun NH2-terminal kinase (JNK) via caspase-dependent and caspase-independent pathways. *J Biol Chem* 273:33091.
 48. **Mariani, S.M. and P.H. Krammer.** 1998. Differential regulation of TRAIL and CD95 ligand in transformed cells of the T and B lymphocyte lineage. *Eur.J Immunol* 28:973.
 49. **Martinez-Lorenzo, M.J., M.A. Alava, S. Gamen, K.J. Kim, A. Chuntharapai, A. Pineiro, J. Naval, and A. Anel.** 1998. Involvement of APO2 ligand/TRAIL in activation-induced death of Jurkat and human peripheral blood T cells. *Eur.J Immunol* 28:2714.
 50. **Mariani, S.M. and P.H. Krammer.** 1998. Surface expression of TRAIL/Apo-2 ligand in activated mouse T and B cells. *Eur.J Immunol* 28:1492.
 51. **Musgrave, B.L., T. Phu, J.J. Butler, A.P. Makrigiannis, and D.W. Hoskin.** 1999. Murine TRAIL (TNF-related apoptosis inducing ligand) expression induced by T cell activation is blocked by rapamycin, cyclosporin A, and inhibitors of phosphatidylinositol 3-kinase, protein kinase C, and protein tyrosine kinases: evidence for TRAIL induction via the T cell receptor signaling pathway. *Exp.Cell Res.* 252:96.
 52. **Kayagaki, N., N. Yamaguchi, M. Nakayama, H. Eto, K. Okumura, and H. Yagita.** 1999. Type I interferons (IFNs) regulate tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) expression on human T cells: A novel mechanism for the antitumor effects of type I IFNs. *J Exp.Med.* 189:1451.
 53. **Zheng, L., G. Fisher, R.E. Miller, J. Peschon, D.H. Lynch, and M.J. Lenardo.** 1995. Induction of apoptosis in mature T cells by tumour necrosis factor. *Nature* 377:348.
 54. **Ju, S.T., D.J. Panka, H. Cui, R. Ettinger, M. el-Khatib, D.H. Sherr, B.Z. Stanger, and A. Marshak-Rothstein.** 1995. Fas(CD95)/FasL interactions required for programmed cell death after T- cell activation. *Nature* 373:444.
 55. **Brunner, T., R.J. Mogil, D. LaFace, N.J. Yoo, A. Mahboubi, F. Echeverri, S.J. Martin, W.R. Force, D.H. Lynch, and C.F. Ware.** 1995. Cell-

autonomous Fas (CD95)/Fas-ligand interaction mediates activation- induced apoptosis in T-cell hybridomas. *Nature* 373:441.

56. **Dhein, J., H. Walczak, C. Baumler, K.M. Debatin, and P.H. Krammer.** 1995. Autocrine T-cell suicide mediated by APO-1/(Fas/CD95). *Nature* 373:438.
57. **Snell, V., K. Clodi, S. Zhao, R. Goodwin, E.K. Thomas, S.W. Morris, M.E. Kadin, F. Cabanillas, M. Andreeff, and A. Younes.** 1997. Activity of TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) in haematological malignancies. *Br.J Haematol.* 99:618.
58. **Martinez-Lorenzo, M.J., A. Anel, S. Gamen, Monle, P. Lasierra, L. Larrad, A. Pineiro, M.A. Alava, and J. Naval.** 1999. Activated human T cells release bioactive Fas ligand and APO2 ligand in microvesicles. *J Immunol* 163:1274.
59. **Fauci, A.S.** 1993. Multifactorial nature of human immunodeficiency virus disease: implications for therapy. *Science* 262:1011.
60. **Katsikis, P.D., M.E. Garcia-Ojeda, E.S. Wunderlich, C.A. Smith, H. Yagita, K. Okumura, N. Kayagaki, M. Alderson, and L.A. Herzenberg.** 1996. Activation-induced peripheral blood T cell apoptosis is Fas independent in HIV-infected individuals. *Int.Immunol.* 8:1311.
61. **Katsikis, P.D., M.E. Garcia-Ojeda, J.F. Torres-Roca, I.M. Tijoe, C.A. Smith, and L.A. Herzenberg.** 1997. Interleukin-1 beta converting enzyme-like protease involvement in Fas- induced and activation-induced peripheral blood T cell apoptosis in HIV infection. TNF-related apoptosis-inducing ligand can mediate activation- induced T cell death in HIV infection. *J Exp.Med.* 186:1365.
62. **Gura, T.** 1997. How TRAIL kills cancer cells, but not normal cells. *Science* 277:768.
63. **French, L.E. and J. Tschopp.** 1999. The TRAIL to selective tumor death. *Nat.Med.* 5:146.
64. **Walczak, H., R.E. Miller, K. Ariail, B. Gliniak, T.S. Griffith, M. Kubin, W. Chin, J. Jones, A. Woodward, T. Le, C. Smith, P. Smolak, R.G. Goodwin, C.T. Rauch, J.C. Schuh, and D.H. Lynch.** 1999. Tumoricidal activity of tumor necrosis factor-related apoptosis- inducing ligand in vivo. *Nat.Med.* 5:157.
65. **Ashkenazi, A., R.C. Pai, S. Fong, S. Leung, D.A. Lawrence, S.A. Marsters, C. Blackie, L. Chang, A.E. McMurtrey, A. Hebert, L. DeForge, I.L. Koumenis, D. Lewis, L. Harris, J. Bussiere, H. Koeppen, Z. Shahrokh,**

- and R.H. Schwall.** 1999. Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand. *J Clin. Invest.* 104:155.
66. **Thomas, W.D. and P. Hersey.** 1998. TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) induces apoptosis in Fas ligand-resistant melanoma cells and mediates CD4 T cell killing of target cells. *J Immunol* 161:2195.
 67. **Rieger, J., H. Ohgaki, P. Kleihues, and M. Weller.** 1999. Human astrocytic brain tumors express AP02L/TRAIL. *Acta Neuropathol.(Berl.)* 97:1.
 68. **Rieger, J., U. Naumann, T. Glaser, A. Ashkenazi, and M. Weller.** 1998. APO2 ligand: a novel lethal weapon against malignant glioma? *FEBS Lett.* 427:124.
 69. **Gazitt, Y.** 1999. TRAIL is a potent inducer of apoptosis in myeloma cells derived from multiple myeloma patients and is not cytotoxic to hematopoietic stem cells. *Leukemia* 13:1817.
 70. **Braun, M.Y., B. Lowin, L. French, H. Acha-Orbea, and J. Tschopp.** 1996. Cytotoxic T cells deficient in both functional fas ligand and perforin show residual cytolytic activity yet lose their capacity to induce lethal acute graft-versus-host disease. *J.Exp.Med.* 183:657.
 71. **Mori, S., K. Murakami-Mori, S. Nakamura, A. Ashkenazi, and B. Bonavida.** 1999. Sensitization of AIDS-Kaposi's sarcoma cells to Apo-2 ligand-induced apoptosis by actinomycin D. *J.Immunol.* 162:5616.
 72. **Keane, M.M., S.A. Ettenberg, M.M. Nau, E.K. Russell, and S. Lipkowitz.** 1999. Chemotherapy augments TRAIL-induced apoptosis in breast cell lines. *Cancer Res.* 59:734.
 73. **Beltinger, C., S. Fulda, T. Kammertoens, E. Meyer, W. Uckert, and K.M. Debatin.** 1999. Herpes simplex virus thymidine kinase/ganciclovir-induced apoptosis involves ligand-independent death receptor aggregation and activation of caspases. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 96:8699.
 74. **Gibson, S.B., R. Oyer, A.C. Spalding, S.M. Anderson, and G.L. Johnson.** Increased expression of death receptors 4 and 5 synergizes the apoptosis response to combined treatment with etoposide and TRAIL [In Process Citation]. *Mol.Cell Biol* 2000.Jan.;20.(1.):205.-12. 20:205.
 75. **Kothny-Wilkes, G., D. Kulms, B. Poppelmann, T.A. Luger, M. Kubin, and T. Schwarz.** 1998. Interleukin-1 protects transformed keratinocytes from tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *J Biol Chem* 273:29247.
 76. **Kothny-Wilkes, G., D. Kulms, T.A. Luger, M. Kubin, and T. Schwarz.** 1999. Interleukin-1 protects transformed keratinocytes from tumor necrosis

- factor-related apoptosis-inducing ligand- and CD95-induced apoptosis but not from ultraviolet radiation-induced apoptosis. *J Biol Chem* 274:28916.
77. **Kagi, D., B. Ledermann, K. Burki, R.M. Zinkernagel, and H. Hengartner.** 1996. Molecular mechanisms of lymphocyte-mediated cytotoxicity and their role in immunological protection and pathogenesis in vivo. *Annu.Rev.Immunol.* 14:207-32:207.
 78. **van den Broek, M.E., D. Kagi, F. Ossendorp, R. Toes, S. Vamvakas, W.K. Lutz, C.J. Melief, R.M. Zinkernagel, and H. Hengartner.** 1996. Decreased tumor surveillance in perforin-deficient mice. *J.Exp.Med.* 184:1781.
 79. **Kayagaki, N., N. Yamaguchi, M. Nakayama, A. Kawasaki, H. Akiba, K. Okumura, and H. Yagita.** 1999. Involvement of TNF-related apoptosis-inducing ligand in human CD4+ T cell-mediated cytotoxicity. *J Immunol* 162:2639.
 80. **Berke, G.** 1994. The binding and lysis of target cells by cytotoxic lymphocytes: molecular and cellular aspects. *Annu.Rev.Immunol.* 12:735-73:735.
 81. **Zamai, L., M. Ahmad, I.M. Bennett, L. Azzoni, E.S. Alnemri, and B. Perussia.** 1998. Natural killer (NK) cell-mediated cytotoxicity: differential use of TRAIL and Fas ligand by immature and mature primary human NK cells. *J Exp.Med.* 188:2375.
 82. **Kayagaki, N., N. Yamaguchi, M. Nakayama, K. Takeda, H. Akiba, H. Tsutsui, H. Okamura, K. Nakanishi, K. Okumura, and H. Yagita.** 1999. Expression and function of TNF-related apoptosis-inducing ligand on murine activated NK cells. *J Immunol* 163:1906.
 83. **Johnsen, A.C., J. Haux, B. Steinkjer, U. Nonstad, K. Egeberg, A. Sundan, A. Ashkenazi, and T. Espevik.** 1999. Regulation of APO-2 ligand/trail expression in NK cells-involvement in NK cell-mediated cytotoxicity. *Cytokine.* 11:664.
 84. **Adams, D.O. and T.A. Hamilton.** 1984. The cell biology of macrophage activation. *Annu.Rev.Immunol.* 2:283-318:283.
 85. **Boehm, U., T. Klamp, M. Groot, and J.C. Howard.** 1997. Cellular responses to interferon-gamma. *Annu.Rev.Immunol.* 15:749-95:749.
 86. **Adams, D.O.** 1989. Molecular interactions in macrophage activation. *Immunol.Today* 10:33.
 87. **Griffith, T.S., S.R. Wiley, M.Z. Kubin, L.M. Sedger, C.R. Maliszewski, and N.A. Fanger.** 1999. Monocyte-mediated tumoricidal activity via the tumor necrosis factor- related cytokine, TRAIL. *J Exp.Med.* 189:1343.

88. **Steinman, R.M.** 1991. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu.Rev.Immunol.* 9:271-96:271.
89. **Albert, M.L., S.F. Pearce, L.M. Francisco, B. Sauter, P. Roy, R.L. Silverstein, and N. Bhardwaj.** 1998. Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via alphavbeta5 and CD36, and cross-present antigens to cytotoxic T lymphocytes. *J.Exp.Med.* 188:1359.
90. **Albert, M.L., B. Sauter, and N. Bhardwaj.** 1998. Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I- restricted CTLs. *Nature* 392:86.
91. **Fanger, N.A., C.R. Maliszewski, K. Schooley, and T.S. Griffith.** 1999. Human dendritic cells mediate cellular apoptosis via tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). *J Exp.Med.* 190:1155.
92. **Bergelson, J.M., J.A. Cunningham, G. Droguett, E.A. Kurt-Jones, A. Krithivas, J.S. Hong, M.S. Horwitz, R.L. Crowell, and R.W. Finberg.** 1997. Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science* 275:1320.
93. **Benihoud, K., P. Yeh, and M. Perricaudet.** 1999. Adenovirus vectors for gene delivery. *Curr.Opin.Biotechnol.* 10:440.
94. **Chroboczek, J., F. Bieber, and B. Jacrot.** 1992. The sequence of the genome of adenovirus type 5 and its comparison with the genome of adenovirus type 2. *Virology* 186:280.
95. **Graham, F.L., J. Smiley, W.C. Russell, and R. Nairn.** 1977. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J.Gen.Virol.* 36:59.
96. **Ghosh-Choudhury, G., Y. Haj-Ahmad, and F.L. Graham.** 1987. Protein IX, a minor component of the human adenovirus capsid, is essential for the packaging of full length genomes. *EMBO J.* 6:1733.
97. **Bett, A.J., L. Prevec, and F.L. Graham.** 1993. Packaging capacity and stability of human adenovirus type 5 vectors. *J.Virol.* 67:5911.
98. **Kozarsky, K.F. and J.M. Wilson.** 1993. Gene therapy: adenovirus vectors. *Curr.Opin.Genet.Dev.* 3:499.
99. **Descamps, V., M.T. Duffour, M.C. Mathieu, N. Fernandez, L. Cordier, M.A. Abina, E. Kremer, M. Perricaudet, and H. Haddada.** 1996. Strategies for cancer gene therapy using adenoviral vectors. *J.Mol.Med.* 74:183.
100. **McElvaney, N.G. and R.G. Crystal.** 1995. IL-6 release and airway administration of human CFR cDNA adenovirus vector. *Nat.Med.* 1:182.

101. **Goodman, J.C., T.W. Trask, S.H. Chen, S.L. Woo, R.G. Grossman, K.D. Carey, G.B. Hubbard, D.A. Carrier, S. Rajagopalan, E. Aguilar-Cordova, and H.D. Shine.** 1996. Adenoviral-mediated thymidine kinase gene transfer into the primate brain followed by systemic ganciclovir: pathologic, radiologic, and molecular studies. *Hum. Gene Ther.* 7:1241.
102. **Lochmuller, H., B.J. Petrof, G. Pari, N. Larochele, V. Dodelet, Q. Wang, C. Allen, S. Prescott, B. Massie, J. Nalbantoglu, and G. Karpati.** 1996. Transient immunosuppression by FK506 permits a sustained high-level dystrophin expression after adenovirus-mediated dystrophin minigene transfer to skeletal muscles of adult dystrophic (mdx) mice. *Gene Ther.* 3:706.
103. **Yeh, P., J.F. Dedieu, C. Orsini, E. Vigne, P. Deneffe, and M. Perricaudet.** 1996. Efficient dual transcomplementation of adenovirus E1 and E4 regions from a 293-derived cell line expressing a minimal E4 functional unit. *J. Virol.* 70:559.
104. **Chen, H.H., L.M. Mack, R. Kelly, M. Ontell, S. Kochanek, and P.R. Clemens.** 1997. Persistence in muscle of an adenoviral vector that lacks all viral genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94:1645.
105. **Beidler, D.R., M. Tewari, P.D. Friesen, G. Poirier, and V.M. Dixit.** 1995. The baculovirus p35 protein inhibits Fas- and tumor necrosis factor- induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 270:16526.
106. **Arai, H., D. Gordon, E.G. Nabel, and G.J. Nabel.** 1997. Gene transfer of Fas ligand induces tumor regression in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94:13862.
107. **Shinoura, N., M. Ohashi, Y. Yoshida, A. Asai, T. Kirino, I. Saito, and H. Hamada.** 1998. Construction, propagation, and titer estimation of recombinant adenoviruses carrying proapoptotic genes. *Hum. Gene Ther.* 9:2683.
108. **Abina, M.A., M. Tulliez, M.T. Duffour, N. Debili, C. Lacout, J.L. Villeval, F. Wendling, W. Vainchenker, and H. Haddada.** 1998. Thrombopoietin (TPO) knockout phenotype induced by cross-reactive antibodies against TPO following injection of mice with recombinant adenovirus encoding human TPO. *J. Immunol.* 160:4481.
109. **Abina, M.A., M. Tulliez, C. Lacout, N. Debili, J.L. Villeval, F. Pflumio, F. Wendling, W. Vainchenker, and H. Haddada.** 1998. Major effects of TPO delivered by a single injection of a recombinant adenovirus on prevention of septicemia and anemia associated with myelosuppression in mice: risk of sustained expression inducing myelofibrosis due to immunosuppression. *Gene Ther.* 5:497.
110. **Suss, G. and K. Shortman.** 1996. A subclass of dendritic cells kills CD4 T cells via Fas/Fas-ligand- induced apoptosis. *J. Exp. Med.* 183:1789.

111. **Giovarelli, M., P. Musiani, G. Garotta, R. Ebner, E. Di Carlo, Y. Kim, P. Cappello, L. Rigamonti, P. Bernabei, F. Novelli, A. Modesti, A. Coletti, A.K. Ferrie, P.L. Lollini, S. Ruben, T. Salcedo, and G. Forni.** 1999. A "stealth effect": adenocarcinoma cells engineered to express TRAIL elude tumor-specific and allogeneic T cell reactions. *J Immunol* 163:4886.
112. **Jeremias, I. and K.M. Debatin.** 1998. TRAIL induces apoptosis and activation of NFkappaB. *Eur.Cytokine.Netw.* 9:687.
113. **Huang, S., R.I. Endo, and G.R. Nemerow.** 1995. Upregulation of integrins alpha v beta 3 and alpha v beta 5 on human monocytes and T lymphocytes facilitates adenovirus-mediated gene delivery. *J.Virol.* 69:2257.
114. **Wickham, T.J., G.M. Lee, J.A. Titus, G. Sconocchia, T. Bakacs, I. Kovesdi, and D.M. Segal.** 1997. Targeted adenovirus-mediated gene delivery to T cells via CD3. *J.Virol.* 71:7663.

ANNEXE I

1. Génération d'un anticorps polyclonal anti-DR5

Nous avons décidé au début de ce projet de générer un anticorps anti-DR5 qui n'était pas disponible à ce moment.

Le domaine extracellulaire de DR5 (résidus 51 à 183) a été produit en fusion avec la GST dans la bactérie, utilisant le même système que celui utilisé pour la production de TRAIL. La protéine de fusion produite a été retrouvée sous forme soluble dans le surnageant de lyse bactérienne, et donc pouvait être facilement purifiée par adsorption sur billes GS4B. Un bon rendement de purification a été obtenu, de plus le clivage par la thrombine permettait de libérer la protéine recombinante, DR5 extracellulaire (DR5_{EC}) de la GST (figure 15). Cette protéine a ensuite été utilisée pour immuniser un lapin.

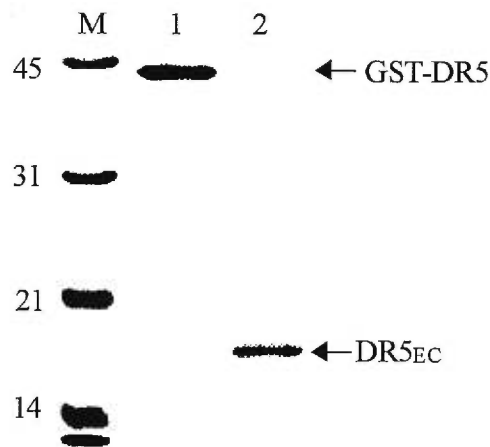


Figure 15: Expression et purification du domaine extracellulaire de DR5 (DR5_{EC}) dans la bactérie. Coloration au bleu de coumassie de la protéine de fusion GST-DR5 (1) et de la protéine recombinante DR5 après clivage avec la thrombine (2). M représente le marqueur de taille des protéines.

A partir de la troisième immunisation, les sérums du lapin, prélevés 8 jours après immunisation, sont testés en western blot pour la reconnaissance de la protéine recombinante ayant servi à l'immunisation du lapin, et de la protéine DR5 normalement exprimée dans les cellules ou après transfection de lignées par DR5. En effet, l'anti-sérum du lapin reconnaissait fortement la protéine recombinante après la troisième immunisation. L'anti-sérum de la cinquième immunisation a été testé pour la

reconnaissance de DR5 dans les cellules lymphoïdes primaires, stimulées ou transformées. Les transcrits de DR5 ont été détectés dans une grande variété de types cellulaires, parmi lesquelles les PBL (12;14;24;27) et la lignée des cellules Jurkat (21). En se basant sur ces observations, et sur le fait que les lignées des cellules Jurkat et CEM sont très sensibles à l'apoptose induite par TRAIL (40;46), nous avons choisies les PBMC non stimulés ou stimulés avec OKT3 ainsi que les cellules Jurkats et CEM pour tester notre anti-sérum. Le résultat du western blot montré dans la figure 16 révèle une bande à 45 Kda dans les lysats de PBMC, PBMC stimulés 3 jours avec l'OKT3, cellules Jurkat et cellules CEM. Cette bande correspond exactement à la taille de DR5 pleine longueur. Il est intéressant de noter la légère augmentation du niveau d'expression de DR5, observée dans les PBMC suite à leur activation (figure 16). Une telle observation pourra aider à mieux caractériser le rôle de TRAIL dans l'apoptose des cellules T.

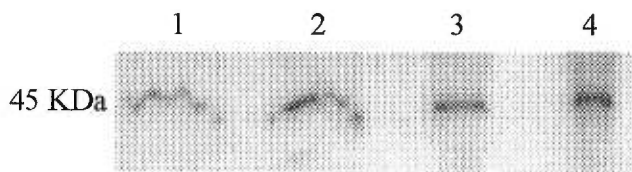


Figure 16: Reconnaissance de DR5 par l'anti-sérum de lapin immunisé avec la protéine recombinante DR5_{EC}. Western blot sur 1: PBMC, 2: PBMC stimulés 3 jours avec OKT3, 3: cellules Jurkat et 4: cellules CEM. 2 millions de cellules de chaque condition ont été utilisées.

2. Génération d'une lignée stable de cellules CHO qui expriment DR5

Nous avons prévu de générer une lignée cellulaire qui exprime DR5 dans le but de tester le virus recombinant en cours de production. Pour cela, la région codante de DR5 a été amplifiée, séquencée puis clonée dans un vecteur d'expression eucaryote codant aussi pour la GFP (MSCV) (voir matériels et méthodes). La construction obtenue, nommée MSCV-DR5, a été transfectée dans les cellules CHO. Le tri des cellules GFP positives, a permis d'établir une lignée de cellules CHO qui expriment DR5 d'une manière stable. Un western blot avec l'anti-sérum de lapin, effectué sur ces cellules, révèle une bande à 45 Kda correspondant à DR5, cette bande n'a pas été

détectée dans le lysat des cellules CHO non transfectées utilisées comme contrôle négatif (figure 17).

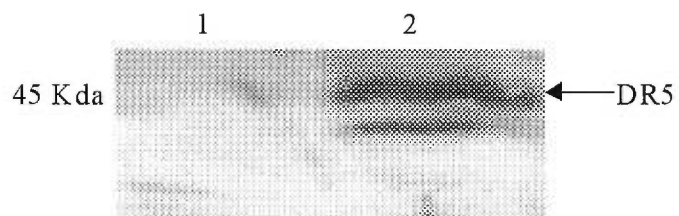


Figure 17: Reconnaissance de DR5 dans les cellules CHO transfectées par l'anti-sérum de lapin immunisé avec la protéine recombinante DR5_{EC}. Western blot sur des lysats de cellules CHO non transfectées (1) ou transfectées avec un plasmide codant pour DR5 pleine longueur (2)