

**TITRE DU PROJET : Exploration moléculaire de la signalisation non-apoptotique de TRAIL**

**1) Renseignements administratifs sur la direction de thèse<sup>1</sup> (1 page maximum) :**

Directeur de thèse HDR :

Nom : Micheau

Prénom : Olivier

**2) Descriptif du projet de thèse (devra inclure les rubriques suivantes) :**

- nom et label de l'unité de recherche : **CTM U1231**
- localisation : **7 Bd Jeanne d'Arc**
- nom du directeur de thèse et du co-directeur s'il y a lieu : **F Ghiringhelli**
- adresse courriel du contact scientifique : **omicheau@u-bourgogne.fr**
- description du projet (2 pages maximum)

**Introduction :** Le ligand induisant l'apoptose lié au TNF (TRAIL ou Apo2 ou TNFSF10) appartient à la superfamille du TNF. Lorsqu'il se lie à ses récepteurs agonistes, TRAIL peut induire l'apoptose des cellules tumorales, tout en épargnant les cellules saines. Cette sélectivité tumorale a suscité, ces dernières décennies, de nombreuses études visant à évaluer le potentiel antitumoral de TRAIL ou de ses dérivés. Bien que la plupart de ces tentatives aient échouées, de nouvelles formulations sont toujours en cours d'évaluation. Cependant, des données s'accumulent indiquant que TRAIL peut également déclencher, d'autre part, une voie de transduction du signal non-canonique qui est susceptible d'être préjudiciable à son utilisation en oncologie. Ainsi, nos travaux (Guerrache et Micheau 2024, Dufour et al. 2017, Somasekharan et al. 2013) et ceux publiés dans la littérature (Hartwig et al. 2017, von Karstedt et al. 2015, Davidovich et al. 2023) suggèrent que TRAIL peut induire, par l'intermédiaire du récepteur à domaine de mort 5 (DR5) dans certaines circonstances, la motilité des cellules tumorales, ce qui pourrait conduire et contribuer à la métastase de la tumeur. Si le mécanisme de transduction du signal pro-apoptotique de TRAIL est bien connu d'un point de vue mécanistique, celui de la voie non-canonique est moins bien compris.

**L'objectif** principal de ce travail de thèse sera d'identifier les partenaires d'interaction de DR5 par spectrométrie de masse, à l'aide de modèles cellulaires manipulés génétiquement pour exprimer un récepteur DR5 fusionné au système APEX, un système de marquage biochimique basé sur une peroxidase (APEX), permettant de biotinyler les partenaires de DR5 *in cellulo*. Ce travail de thèse, sera entouré par un consortium multidisciplinaire et multinational Européen TRAIL4LIFE, qui vise à améliorer la compréhension des voies de signalisation des récepteurs au TNF à domaine de mort, dont TRAIL (TRAIL/DR) et à traduire ces connaissances en nouveaux outils diagnostiques et thérapeutiques, en mettant l'accent sur le cancer et les maladies auto-immunes (<https://www.trail4life.eu>). Financé jusqu'en

<sup>1</sup> ATTENTION : selon l'article 16 de l'arrêté du 25 mai 2016, le total d'encadrants ne peut pas dépasser 2, sauf si l'un des encadrants appartient au monde socio-économique, qui peut venir en sus, ou en cas de co-tutelle; Le décompte des co-encadrements se fera au prorata du nombre d'encadrants : 1 pour 1 encadrant, ½ pour deux encadrants.

2027 par un financement Marie Curie MSCA dans le cadre du projet CHIRON (<https://www.trail4life.eu/chiron>), l'étudiant(e) en charge du projet aura l'occasion de se rendre chez nos partenaires pour mener à bien son projet de thèse.

**Positionnement** : La compréhension des voies de transduction du signal non-apoptotique des récepteurs de la famille du TNF, à l'exception de TNFR1 (Micheau et Tschopp 2003), et en particulier la signalisation non-apoptotique induite par TRAIL ou Fas ligand est plus que fragmentaire et est loin de faire consensus dans la communauté scientifique, contrairement à notre compréhension des mécanismes et acteurs induisant l'apoptose.

Cela est encore plus flagrant en ce qui concerne la capacité de certains de ces récepteurs à transcrire un signal de mobilité ou motilité cellulaire. Il existe bien des évidences expérimentales qui suggèrent que la signalisation pro-motile de Fas pourrait être induite par un nouveau complexe moléculaire (différent du DISC, nommé MISC pour Migration-inducing Signalling Complex), associant au récepteur Fas, la src kinase c-Yes, la NADPHox-3 et le récepteur à l'EGF (Malleter et al., 2013). Ces données expérimentales restent toutefois limitées dans la mesure où elles n'ont pour l'heure ni été reproduites de manière convaincante par des équipes indépendantes, ni étendues à d'autres récepteurs de la famille, incluant les récepteurs de TRAIL, qui pourtant, et contrairement à TNFR1, présentent des modalités de signalisation très similaires à Fas. Il en va de même pour la signalisation pro-motile induite par TRAIL qui a été associées à l'activation de kinases telles que ROCK1, RAC1 ou Src (Azijli et al., 2013; Hartwig et al., 2017; Somasekharan et al., 2013). Nous avons tenté de valider ces cibles, et d'étendre notre recherche à d'autres kinases précédemment associées à la signalisation non-apoptotique de Fas, sans grand succès. Ces dernières ne sortent ni dans les analyses de spectrométrie de masse après immunoprécipitation des récepteurs (non montré), ni après immunoblotting. Il est important de noter ici que nous avons évalué leur implication potentielle en utilisant les lignées isogéniques DR4<sup>-/-</sup> et DR5<sup>-/-</sup> en utilisant l'approche TALEN (Dufour et al. 2017) et CRISPR/Cas9 (Radoua et al. 2023), afin de tester leur sélectivité pour DR5. Or pour les éditions que nous avons réussies à maîtriser, si la perte d'expression de certaines de ces kinases entraîne effectivement une réduction de la motilité cellulaire, comme attendu, cette perte de fonction n'est en aucun cas spécifique de la signalisation pro-motile de DR5 (résultats non montré).

L'approche APEX qui sera déployée sans a priori pour ce travail de thèse est déjà bien amorcée dans l'équipe. Nos modèles isogéniques reconstitués avec nos récepteurs chimériques (DR-APEX) sont capables de transduire un signal pro-apoptotique équivalent au récepteur sauvage correspondant, indiquant que ces récepteurs chimériques sont fonctionnels, et prêts à être utilisés pour identifier les partenaires d'interaction des récepteurs DR4 et DR5. Nous avons également mis une approche de chimie-click ou opto-protéomique (Hino et Sakamaoto 2017) qui nous permettra de valider le crible que nous souhaitons mettre en place pour atteindre nos objectifs.

Azijli, K., Yuvaraj, S., Peppelenbosch, M.P., Wurdinger, T., Dekker, H., Joore, J., van Dijk, E., Quax, W.J., Peters, G.J., de Jong, S., and Kruyt, F.A. (2012). Kinome profiling of non-canonical TRAIL signaling reveals RIP1-Src-STAT3-dependent invasion in resistant non-small cell lung cancer cells. *Journal of cell science* **2012**, *125*, 4651-4661

Davidovich, P.; Higgins, C. A.; Najda, Z.; Longley, D. B.; Martin, S. J. cFLIP(L) acts as a suppressor of TRAIL- and Fas-initiated inflammation by inhibiting assembly of caspase-8/FADD/RIPK1 NF-kappaB-activating complexes. *Cell Rep* **2023**, *42* (12), 113476.

Dufour, F., Rattier, T., Constantinescu, A.A., Zischler, L., Morle, A., Ben Mabrouk, H., Humblin, E., Jacquemin, G., Szegezdi, E., Delacote, F., et al. TRAIL receptor gene editing unveils TRAIL-R1 as a master player of apoptosis induced by TRAIL and ER stress. *Oncotarget* **2017**, *8*, 9974-9985.

Guerrache, A., and Micheau, O. TRAIL-Non-Apoptotic Signalling. *Preprints* **2024**. 10.20944/preprints202402.0485.v1.

Hartwig, T.; Montinaro, A.; von Karstedt, S.; Sevko, A.; Surinova, S.; Chakravarthy, A.; Taraborrelli, L.; Draber, P.; Lafont, E.; Arce Vargas, F.; et al. The TRAIL-Induced Cancer Secretome Promotes a Tumor-Supportive Immune Microenvironment via CCR2. *Molecular cell* **2017**, *65* (4), 730-742 e735.

Hino N, Sakamoto K (2017) Covalently Capturing Protein Interactions in Living Cells by Site-Specific Incorporation of Photo-Cross-Linkable Amino Acids. In: *Photoaffinity Labeling for Structural Probing Within Protein*, Hatanaka Y., Hashimoto M. (eds.) pp. 159-181. **Springer Japan 2017**: Tokyo

Malleter, M., Tauzin, S., Bessedé, A., Castellano, R., Goubard, A., Godey, F., Leveque, J., Jezequel, P., Campion, L., Campone, M., et al. CD95L cell surface cleavage triggers a prometastatic signaling pathway in triple-negative breast cancer. *Cancer research* **2013**, *73*, 6711-6721.

Micheau, O., and Tschopp, J. Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell* **2003** *114*, 181-190.

Radoua, A., Pernon, B., Pernet, N., Jean, C., Elmallah, M., Guerrache, A., Constantinescu, A.A., Hadj Hamou, S., Devy, J., and Micheau, O. ptARgenOM-A Flexible Vector For CRISPR/CAS9 Nonviral Delivery. *Small Methods* **2023**, *7*, e2300069.

Somasekharan, S.P., Koc, M., Morizot, A., Micheau, O., Sorensen, P.H., Gaide, O., Andera, L., and Martinou, J.C. TRAIL promotes membrane blebbing, detachment and migration of cells displaying a dysfunctional intrinsic pathway of apoptosis. *Apoptosis* **2013**, *18*, 324-336.

von Karstedt, S.; Conti, A.; Nobis, M.; Montinaro, A.; Hartwig, T.; Lemke, J.; Legler, K.; Annewanter, F.; Campbell, A. D.; Taraborrelli, L.; et al. Cancer cell-autonomous TRAIL-R signaling promotes KRAS-driven cancer progression, invasion, and metastasis. *Cancer cell* **2015**, *27* (4), 561-573.

- Financement du projet – partie Recherche (montants acquis, type de contrat) Contrat Européen MSCA CHIRON EU#101130240 2024\_2027 et dotation INSERM & UB de l'équipe DesCarTes

- connaissances et compétences requises :

- connaissances en biologie cellulaire et moléculaire et biochimie
- notions des certaines techniques de base (culture de cellules, Immunoblots, cytométrie en flux par exemple...)
- des notions de génétique et de bioinformatique seraient appréciées
- anglais lu et parlé indispensable

### **Résumé en français et anglais (limité chacun à 1800 caractères)**

**Résumé :** TRAIL appartient à la superfamille du TNF. En se liant à ses récepteurs agonistes, TRAIL peut induire l'apoptose des cellules tumorales, tout en épargnant les cellules saines. Cette sélectivité tumorale a suscité, ces dernières décennies, de nombreuses études visant à évaluer le potentiel antitumoral de TRAIL ou de ses dérivés. Cependant, des données s'accumulent indiquant que TRAIL peut également déclencher, d'autre part, une voie de transduction du signal non-canonique, susceptible d'être préjudiciable à son utilisation en oncologie. Ainsi, nos travaux et ceux publiés dans la littérature suggèrent que TRAIL peut induire, par l'intermédiaire du récepteur à domaine de mort 5 (DR5) la motilité des cellules tumorales, ce qui pourrait conduire et contribuer à la métastase de la tumeur. Si le mécanisme de transduction du signal pro-apoptotique de TRAIL est bien connu d'un point de vue mécanistique, celui de la voie non-canonique est moins bien compris. **L'objectif** principal de ce travail de thèse sera d'identifier les partenaires d'interaction de DR5 par spectrométrie de masse, à l'aide de modèles cellulaires manipulés génétiquement pour exprimer un récepteur DR5 fusionné au système APEX, un système de marquage biochimique basé sur une peroxidase (APEX), permettant de biotinyler les partenaires de DR5 *in cellulo*. Ce travail de thèse, sera environné par un consortium Européen TRAIL4LIFE, financé jusqu'en 2027, qui vise à améliorer la compréhension des voies de signalisation des récepteurs au TNF à domaine de mort, en mettant l'accent sur le cancer et les maladies auto-immunes (<https://www.trail4life.eu/chiron>). L'étudiant(e) en charge du projet aura l'occasion de se rendre chez nos partenaires pour mener à bien une partie de son projet de thèse.

**Summary :** TRAIL belongs to the TNF superfamily. By binding to its agonist receptors, TRAIL can induce apoptosis in tumour cells, while sparing healthy cells. Over the last few decades,

this tumour selectivity has prompted numerous studies aimed at assessing the anti-tumour potential of TRAIL or its derivatives. However, evidence is accumulating that TRAIL may also trigger a non-canonical signal transduction pathway, which could be detrimental to its use in oncology. Our work and that published in the literature suggest that TRAIL can induce tumour cell motility via the death domain 5 (DR5) receptor, which could lead to and contribute to tumour metastasis. While the mechanism of TRAIL pro-apoptotic signal transduction is well known from a mechanistic point of view, that of the non-canonical pathway is less well understood. The main objective of this thesis work will be to identify the interaction partners of DR5 by mass spectrometry, using cell models genetically manipulated to express a DR5 receptor fused to the APEX system, a biochemical labelling system based on a peroxidase (APEX), making it possible to biotinylate DR5 partners *in cellulo*. This thesis work will be part of a European TRAIL4LIFE consortium, funded until 2027, which aims to improve understanding of TNF death domain receptor signalling pathways, with a focus on cancer and autoimmune diseases (<https://www.trail4life.eu/chiron>). The student in charge of the project will have the opportunity to visit our partners to carry out part of his/her thesis project.

**Préciser le domaine de compétence dans la liste ci-dessous (2 choix possibles maximum – ne pas modifier les intitulés : ils sont imposés par certains sites web) :**

Biochimie  
Biologie

**Mots clés :** TNFRSF ; Signalisation non-apoptotique ; Motilité cellulaire ; Cancer