UNIVERSITE DE NANTES
Faculté de MEDECINE
Ecole doctorale Biologie-Santé

Année 2013 N° 024

Optimisation de la radiovirothérapie en associant un traitement radio-isotopique vectorisé par un virus de la rougeole oncolytique, une radiothérapie externe et une inhibition de checkpoint kinase-1.

THESE DE DOCTORAT

Discipline : Sciences de la vie et de la santé
Spécialité : Biomolécules, pharmacologie, thérapeutique
Présentée
et soutenue publiquement par

Yann TOUCHEFEU

Le 17 avril 2013, devant le jury ci-dessous

Président
Rapporteurs Monsieur Pierre CORDELIER, DR INSERM, Université de Toulouse
Monsieur Philippe ROUGIER, PU-PH, Université de Paris
Examinateurs Madame Françoise KRAEBER-BODERE , PU-PH, Université de Nantes
Monsieur Philippe FRANKEN , MCU-PH, Université de Nice

Directeurs de thèse
Monsieur Georges VASSAUX, DR INSERM, Université de Nice
Monsieur Kevin J HARRINGTON, Professeur, Université de Londres

ED :……

Remerciements

Je tiens à remercier les membres du jury, madame le professeur Françoise Kraeber-Bodéré, monsieur le docteur Pierre Cordelier, monsieur le professeur Philippe Franken, et monsieur le professeur Philippe Rougier qui me font l'honneur de juger ce travail.

Je remercie Georges Vassaux, mon codirecteur de thèse. Merci donc, Georges, d'avoir dirigé cette thèse, mais aussi d'avoir permis cette expérience scientifique, mais aussi personnelle et familiale.

Kevin, or Professor Harrington. Thank you for codirecting this thesis. Thanks for your outstanding medical, research, and teaching skills. I am also very grateful for all your help in our English life. It has been a fantastic experience and privilege to be part of your team, both in the Institute of Cancer Research and in the Royal Marsden Hospital.

Je remercie tous ceux qui ont accompagné mon travail scientifique. Patrick Baril, à Nantes, qui m'a appris les premiers pas de la recherche sur les virus oncolytiques. Victoria Roulstone, David Mansfield, Aadil Khan, Timothy Pencavel, Martin MacLaughlin, Joan Kyula, Eleni Karapinagiotou, Shane Zaidi, Gerben Borst, avec qui j'ai partagé les paillasses et qui m'ont beaucoup apporté, bien au delà de la recherche scientifique.

Je remercie aussi l'équipe médicale de l'Institut des Maladies de l'Appareil Digestif, et la fondation d'entreprise SanTDige. Je remercie tout particulièrement le professeur Jean-Paul Galmiche qui m'a accompagné et aidé pour ce projet.

Cette expérience a aussi été celle de deux ans à l'étranger, en famille avec 2 puis 3 enfants. Merci Caroline! Rien n'aurait été possible sans toi.

Et merci la famille, les parents, les beaux-parents pour votre soutien.

Table des matières

RESUME **4**

ABSTRACT **5**

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE **6**

CHAPITRE 1. LA RADIOVIROTHERAPIE : PRINCIPES ET PERSPECTIVES. **6**
INTRODUCTION 6
LE SYMPORTEUR SODIUM/IODURE (NIS) 6
VECTORISATION DU NIS PAR DES VIRUS : APPLICATIONS EN IMAGERIE ET THERAPIE 9
QUELLES PERSPECTIVES POUR AMELIORER CETTE STRATEGIE ? 14
CONCLUSION 18
CHAPITRE 2. POURQUOI SELECTIONNER LE VIRUS DE LA ROUGEOLE DANS DES STRATEGIES DE THERAPIE VIRALE ET DE RADIOVIROTHERAPIE ? **20**
INTRODUCTION 20
BASES BIOLOGIQUES 20
RATIONNEL POUR L'UTILISATION DU VIRUS DE LA ROUGEOLE EN CANCEROLOGIE 23
LES ENJEUX 24
CONCLUSION 31
CHAPITRE 3. POURQUOI ASSOCIER UNE THERAPIE VIRALE AVEC UNE RADIOTHERAPIE EXTERNE ET DES INHIBITEURS DE LA REPARATION DE L'ADN ? **32**
INTRODUCTION 32
ASSOCIATION DE VIRUS ONCOLYTIQUES ET DE RADIOTHERAPIE DANS LES ETUDES CLINIQUES ET PRECLINIQUES 32
INTERACTIONS ENTRE LES VIRUS ET LA REPONSE AUX LESIONS DE L'ADN INDUITES PAR LES RADIATIONS 42
CONCLUSION 48

OBJECTIFS DU TRAVAIL **50**

MATERIEL ET METHODES **53**

RESULTATS **60**

DISCUSSION **82**

REFERENCES **86**

RESUME

La radiovirothérapie est définie comme étant l'utilisation de virus infectant les cellules cancéreuses pour guider un traitement radio-isotopique. Les virus oncolytiques sont des virus capables de se répliquer sélectivement dans les cellules cancéreuses, et de tuer ces cellules. Associer une radiovirothérapie à une radiothérapie externe est une méthode innovante pour augmenter la dose totale d'irradiation sélectivement dans la tumeur. L'objectif de ce travail a été d'évaluer une approche de radiovirothérapie avec un virus de la rougeole oncolytique codant le symporteur sodium/iodure NIS (MV-NIS). MV-NIS a été associé à un traitement par ^{131}I, à une radiothérapie externe, et à un traitement par SAR-020106, un nouvel agent radiosensibilisant inhibiteur de Checkpoint-1. Cette approche a été testée dans des modèles de cancer ORL et colorectal (HCT-116). *In vitro*, l'association de MV-NIS et de radiothérapie externe a eu des effets antitumoraux synergiques. La radiothérapie a augmenté l'expression fonctionnelle du NIS dans les cellules infectées. SAR-020106 a eu des effets synergiques avec la radiothérapie externe et avec MV-NIS. MV-NIS a permis de guider un traitement par ^{131}I dans les cellules infectées. Dans les cellules HCT-116, cet effet a été augmenté par SAR-020106. Dans un modèle murin de xénogreffe tumorale sous-cutanée HCT-116, MV-NIS et une radiothérapie externe ont eu des effets synergiques. La quadrithérapie a eu une activité antitumorale significative, avec amélioration de la survie des animaux. Ces résultats supportent fortement de futures recherches translationnelles et cliniques sur l'association de MV-NIS, de radiothérapie et d'agents radiosensibilisants.

ABSTRACT

Radiovirotherapy is defined as the use of viruses to deliver radioisotopic treatment into infected cells. Oncolytic viruses are able to selectively target and kill cancer cells. Combining external beam radiation therapy (EBRT) with radiovirotherapy is an innovative method to increase the total radiation dose selectively within tumour cells. Our aim was to evaluate a radiovirotherapy approach using Edmonston strain measles virus engineered to express the sodium/iodide symporter NIS (MV-NIS). We evaluated the therapeutic efficacy of a combination of MV-NIS, NIS-guided radioiodide, EBRT and a specific checkpoint-1 inhibitor (SAR-020106). This approach was investigated in head and neck and colorectal (HCT-116) cancer cells lines. We show that EBRT and MV-NIS exerted synergistic *in vitro* anti-tumour effects. EBRT increased NIS expression in infected cells. SAR-020106 had synergistic antitumour effect both with EBRT and with MV-NIS. We have demonstrated that MV-NIS mediated ^{131}I toxicity. In HCT-116 cells, this effect was enhanced by SAR-020106. *In vivo*, we have demonstrated that MV-NIS and EBRT had synergistic effects in an HCT-116 subcutaneous tumour model. The combination of MV-NIS, virally-directed ^{131}I, EBRT and SAR-020106 was evaluated *in vivo* in the same HCT-116 tumour model. This quadruplet regimen had significant antitumour activity, associated with an increased survival of animals. Our study strongly supports further translational and clinical research on MV-NIS in combination with radiation therapy and radiosensitising agents.

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre 1. La radiovirothérapie : principes et perspectives.

Introduction

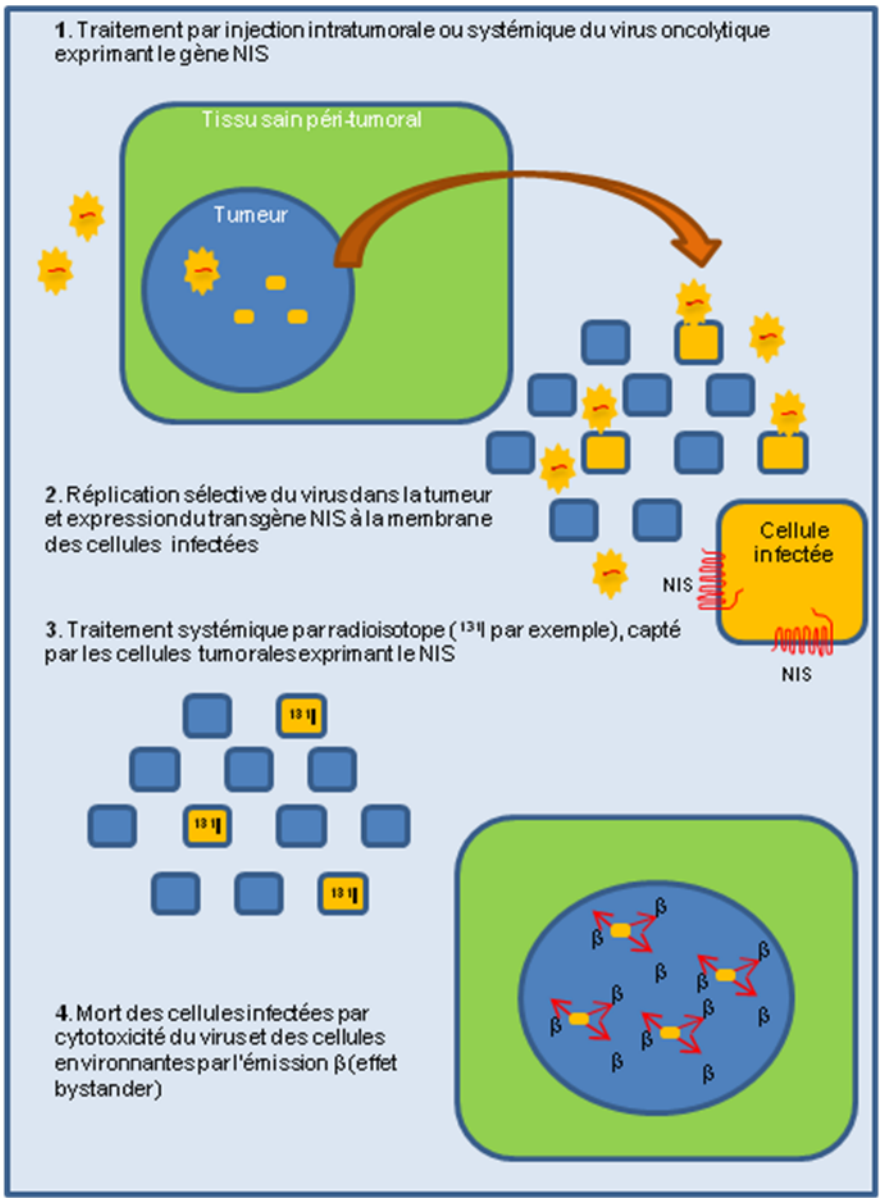
La radiovirothérapie est définie par l'utilisation de virus infectant sélectivement les cellules cancéreuses pour guider et améliorer un traitement radio-isotopique. Les virus peuvent également être utilisés comme agents thérapeutiques sans nécessité de transgène thérapeutique (virothérapie). La majeure partie des études en radiovirothérapie publiées rapporte l'utilisation du transgène du symporteur Sodium/Iodure (NIS) pour incorporer l'élément radioactif dans les cellules. Cette stratégie s'inspire du traitement par iode-131 (^{131}I) prescrit dans la prise en charge du cancer de la thyroïde. Le but du traitement d'éliminer grâce aux radiations émises lors de la désintégration de 131I les cellules qui n'ont pas été affectées par le virus (effet bystander) (**figure 1**). Cette approche, ses limites actuelles et ses perspectives sont détaillées dans ce chapitre.

Le symporteur Sodium/Iodure (NIS)

NIS est un membre de la famille des symporteurs sodium/solutés. Les symporteurs de cette famille sont présents chez les procaryotes et les eucaryotes. Ils catalysent l'entrée, dans le cytoplasme de la cellule, de solutés chargés négativement, en utilisant le gradient électrochimique Na+/K+. Ce gradient obtenu grâce à l'action de la pompe NA+/K+ ATPase [1]. NIS catalyse l'entrée et la concentration d'ion iodure dans la cellule. Il est principalement exprimé au pole basolatéral des cellules folliculaires de la thyroïde et permet le transport actif

d'iodure dans ces cellules. Les ions iodure sont ensuite transportés dans la lumière folliculaire et oxydés sous l'action de la thyroperoxydase puis organifiés sur les résidus tyrosyles de la

Figure 1. Principe de la radiovirothérapie. Le symporteur Sodium/Iodure (NIS) s'exprime à la surface des cellules infectées par le virus. Dans le cas d'un traitement avec iode-131, le radio-isotope est capté par les cellules exprimant le NIS. Le rayonnement β ayant une pénétration dans l'eau voisine de 0.4 mm, les cellules environnantes n'exprimant pas le NIS sont irradiées (effet bystander).



thyroglobuline, générant des iodotyrosines. Le couplage de ces iodotyrosines aboutit à la formation des hormones thyroïdiennes T3 et T4 [2]. NIS est également exprimé dans d'autres tissus extra-thyroïdiens : muqueuse gastrique, glandes salivaires, tube digestif, glande mammaire en période de lactation [3] [4]. Des études de RT-PCR du gène NIS ont également retrouvé une transcription du gène dans l'hypophyse, le pancréas, les testicules, les ovaires, le thymus, les poumons, la prostate, le cœur, les reins et les glandes surrénales [5, 6]. L'expression de NIS dans ces tissus est bien moindre que dans la thyroïde, et le rôle de NIS y est méconnu.

Le gène humain du NIS (hNIS) a été cloné en 1996 [7]. Il partage 83 % d'homologie avec le gène du NIS du rat (rNIS) cloné un peu plus tôt la même année [8]. Le gène hNIS code pour une protéine de 643 acides amines, ayant 13 domaines trans-membranaires avec une extrémité C-terminale intracellulaire et une extrémité N-terminale extracellulaire. La localisation de NIS à la membrane est essentielle à sa fonction. La transcription du gène dans la thyroïde est principalement régulée par la TSH. La TSH stimule la transcription du gène en stimulant l'activité du promoteur human NIS upstream enhancer (hNUE) [9]. La TSH module la phosphorylation de NIS et participe à la régulation post-transcriptionnelle de NIS [10, 11]. En l'absence de TSH, NIS est redistribué de la membrane vers le compartiment intracellulaire [10]. D'autres facteurs sont impliqués dans la régulation de NIS. Le pituitary tumor transforming gene (PTGG), proto-oncogene surexprimé dans les cancers folliculaires de la thyroïde, et le PTGG-binding factor (PBF) inhibent la transcription du gène NIS, en inhibant l'activité de hNUE [12]. PBF délocalise NIS vers le compartiment intracellulaire [13]. La surexpression de ces inhibiteurs de NIS dans les cancers thyroïdiens pourrait avoir un impact négatif sur le pronostic et l'efficacité du traitement par iode-131 de ces tumeurs [12, 14]. D'autres régulateurs de NIS sont identifiés. La stimulation de NIS induite par TSH est inhibée par l'interleukine-1, le TNF-α, l'interféron α, l'interféron β et l'interféron γ dans les cellules thyroïdiennes [15, 16]. L'acide tout-trans rétinoïque (atRA) stimule l'expression de NIS dans les cellules prostatiques

et mammaires [17]. Cette stimulation est majorée par un traitement par dexaméthasone [18, 19] ou par la carbamazépine dans les cellules mammaires [20]. De plus, la dexaméthasone augmente l'expression de NIS et l'efficacité d'un traitement par iode-131 dans un modèle de cancer de prostate [21]. La prolactine, l'insulin growth factor (IGF-I et IGF-II), les œstrogènes stimulent l'expression de NIS dans des cellules de cancer du sein [22, 23]. Dans des cellules de cancer papillaire de la thyroïde, l'inhibition des voies de signalisation MEK/ERK, SAPK/JNK et PI3K stimulent l'expression de NIS [24, 25]. Cependant, l'inhibition des voies de la PI3K et de la p38 MAPK inhibe l'expression de NIS induite par l'acide tout-trans rétinoïque dans des cellules de cancers du sein [26]. La connaissance de ces mécanismes de régulation est essentielle pour optimiser les actuels et futurs traitements utilisant l'expression de NIS afin de guider un traitement radio-isotopique.

L'iode radioactif est utilisé depuis plus de 60 ans dans le traitement de pathologies thyroïdiennes. L'iode-131 est utilisé dans le traitement de la maladie de Basedow [27]. L'iode-131 a également plusieurs indications dans le traitement du cancer bien différencié de la thyroïde. Il peut être recommandé en traitement adjuvant après thyroïdectomie en cas de métastases à distance connues, de tumeur primitive de plus de 4 cm ou de tumeur avec large extension extra-thyroïdienne. Il peut être peut être recommandé en cas de tumeur entre 1 et 4 cm, avec extension ganglionnaire ou autres facteurs de risque. Il peut aussi être recommandé dans le traitement des métastases diagnostiquées dans le suivi de la maladie [28].

Vectorisation du NIS par des virus : applications en imagerie et thérapie

Applications en imagerie *in vivo*

Avant d'envisager un traitement radio-isotopique dans un modèle tumoral, il convient de s'assurer de l'expression fonctionnelle du NIS dans les cellules cancéreuses infectées par le

virus. *In vitro*, il est possible d'évaluer la captation d'iode par les cellules. En utilisant des inhibiteurs compétitifs du NIS comme le perchlorate de potassium, on peut s'assurer que la captation d'iode observée est bien liée à l'expression de NIS. NIS peut guider l'entrée de nombreux radio-isotopes dans la cellule (Iode-123, Iode-124, Iode-125, Iode-131, Technétium-99m, Rhénium-186, Rhénium-188, Astate-211), multipliant les possibilités de son utilisation en thérapie métabolique ou en imagerie [29] (**tableau 1**). *In vivo*, l'expression de NIS peut être visualisée avec différentes techniques d'imagerie et en utilisant différents traceurs. La scintigraphie planaire est une technique relativement peu couteuse et accessible, mais offre une résolution moindre que les autre techniques et ne permet pas de reconstruction en 3 dimensions de l'image. La tomographie par émission de positons (TEP) nécessite l'utilisation d'isotopes émetteurs de positons comme le ^{18}F, le ^{11}C et le ^{124}I. Ces positons rentrent en collision avec des électrons de la matière environnante, cette annihilation émettant des photons γ partant dans la même direction mais en sens opposé, détectés par des capteurs disposés en anneau autour de l'animal ou du patient. La technique permet une reconstruction en 3 dimensions. La Tomographie d'émission monophotonique (TEMP) (ou Single Photon Emission Computed Tomography) nécessite l'utilisation de radio-isotopes émetteurs de photons γ comme le ^{99m}Tc et le ^{123}I. [29, 30]. Ces techniques ont été évaluées pour le suivi de la distribution du NIS délivré par un virus [31-33]. Il existe des appareils de TEP et TEMP destinés à la recherche sur petits animaux. Le TEP et le TEMP peuvent de plus être couplés à une imagerie par tomodensitométrie (TDM). Une étude a évalué l'injection intra-tumorale de virus de la rougeole recombinant codant le gène NIS dans des tumeurs pancréatiques implantées dans le tissu sous-cutané de souris nude. Un micro-TEMP couplé à la TDM a donné une estimation plus précise de la capture d'^{123}I dans la tumeur que le

Tableau 1. Utilisation potentielle en oncologie des radio-isotopes transportés dans la cellule par le symporteur Sodium/Iodure

Radio-isotope	Utilisation	Commentaire
Technétium-99m	Imagerie	Scintigraphie et tomographie d'émission monophotonique
Iode-123	Imagerie	Scintigraphie et tomographie d'émission monophotonique
Iode-124	Imagerie	Tomographie par émission de positons
Iode-125	Imagerie et thérapie	Emetteur β– et γ de faible énergie. Demi-vie longue (60 jours)
Iode-131	Imagerie et thérapie	Emetteur β– et γ de haute énergie Utilisation courante dans le traitement du cancer de la thyroïde Demi-vie d'activité = 8 jours
Rhénium-188	Thérapie	Emetteur β– Demi-vie d'activité = 17h Energie délivrée sur plusieurs millimètres Intérêt pour le traitement de grosses tumeurs
Astate-211	Thérapie	Emetteur de particules α Energie délivrée sur quelques dizaines de micromètres. Intérêt pour le traitement de petites tumeurs.

microTEMP seul [34]. Ces techniques d'imagerie permettent d'étudier *in vivo* la biodistribution spatiale et temporelle du NIS. Le temps séparant l'injection du virus du pic d'expression de NIS dépend du virus utilisé, de la voie d'administration (intratumorale, intrapéritonéale, intraportale, intraveineuse) et de la tumeur elle-même. Par exemple, le pic d'expression a été obtenu 9 jours après injection intraveineuse d'un virus de la rougeole dans un modèle murin de myélome [35], et 2 jours après injection intratumoral d'adénovirus dans un modèle de cancer colorectal [33]. Pour un même modèle tumoral, un même virus de la rougeole et une voie d'administration identique, le temps du pic d'expression peut également varier. Pour 8 animaux traités dans un modèle sous-cutané de cancer pancréatique, 5 ont eu un pic d'expression voisin du sixième jour post-infection, 3 ont eu ce pic proche du troisième jour [36]. L'intérêt de l'imagerie *in vivo* de l'expression du NIS dans les études précliniques est donc double : elle permet de s'assurer de la sélectivité de l'expression du NIS dans les tissus cancéreux ainsi que de déterminer le moment où le pic d'expression de NIS est atteint, pour décider ensuite du temps optimum pour le traitement avec le radio-isotope thérapeutique. Une étude de phase 1 a montré la faisabilité des injections intratumorales d'adénovirus codant le NIS dans des cancers de prostate, et de l'imagerie *in vivo* de l'expression du NIS [37]. Le virus de la rougeole codant le NIS (MV-NIS) est en évaluation dans un essai clinique de phase I de traitement du myélome, en association ou non avec le cyclophosphamide, avec étude de biodistribution en imagerie par ^{123}I [38].

Adénovirus, virus de la rougeole, de la stomatite vésiculaire (VSV) et de la vaccine, baculovirus ont été modifiés pour coder le gène NIS. Différentes études ont évalué un traitement associant l'injection de virus suivi d'un traitement par ^{131}I, en mesurant la croissance tumorale et la survie des animaux. *In vivo*, l'association d'un traitement par injection d'adénovirus codant le gène NIS suivi d'un traitement par ^{131}I a montré un effet antitumoral supérieur au traitement par virus seul dans des modèles de cancer colorectal [39], du

pancréas [40, 41], d'hépatocarcinome [42, 43], de prostate [44], de cancer médullaire de la thyroïde [45], du sein [46], de l'ovaire [47]. Cette stratégie a aussi montre une efficacité avec le virus de la rougeole dans des modèles de cancer du pancréas [36], de cancer de prostate [48] et de myélome [35], ainsi qu'avec le VSV dans modèle de myélome [49].

Utilisation du radio-isotope a visée thérapeutique

L'^{131}I est le radio-isotope le plus communément utilisé dans les études précliniques. D'autres radio-isotopes sont cependant candidats à une utilisation en radiovirothérapie. Le rhénium-188 est également un émetteur β– de haute énergie. Sa demi-vie d'activité est de 17 heures (celle du ^{131}I est de 8 jours), permettant de délivrer de fortes sur une courte période. Dans un modèle de gliome exprimant le NIS, un traitement par rhénium-188 a été plus efficace sur la survie qu'un traitement par ^{131}I [50]. Dans un modèle *in vivo* de tumeur prostatique (cellules LNCaP modifiées pour exprimer le NIS), le traitement par rhénium-188 a montré une efficacité anti-tumorale identique à celle du ^{131}I pour les petites tumeurs, mais a été supérieur pour les tumeurs plus volumineuses (plus de 200 mm^3) [51]. L'astate-211 (^{211}At) est un émetteur de particules α. Les particules α délivrent dans un tissu biologique une très forte énergie (6.8 MeV) sur un trajet très court (de l'ordre de quelques dizaines de micromètres) [52]. Leur utilisation serait donc intéressante, notamment pour le traitement de petites tumeurs. Dans un modèle *in vivo* de tumeur sous-cutanée K1-NIS (cellules thyroïdiennes exprimant le NIS), un traitement par injections intra-péritonéales d'^{211}At a permis une régression complète des tumeurs [53]. Un effet antitumoral a également été observé dans un modèle de cancer de prostate exprimant le NIS [54]. L'utilisation du ^{211}At est actuellement limitée par sa faible disponibilité.

Plusieurs facteurs peuvent cependant limiter l'efficacité de ce traitement. La distribution de l'infection virale et de l'expression du NIS peut être insuffisante dans la

tumeur, ou insuffisamment homogène. La séquence thérapeutique peut être inadéquate, avec injection du radio-isotope en dehors du pic d'expression du NIS. La tumeur peut être résistante aux radiations. En raison de mécanismes d'efflux, le temps de présence de radio-isotope dans les cellules peut être insuffisant. Différentes approches sont donc étudiées pour optimiser cette stratégie thérapeutique.

Quelles perspectives pour améliorer cette stratégie ?

Inhiber l'efflux d'iode dans les cellules infectées

L'efflux d'iode dans les cellules transfectées est une limite importante à l'efficacité du traitement utilisant NIS. En effet, il n'y pas d'organification de l'iode dans les cellules non thyroïdiennes, ce qui limite la rétention de l'iode dans les cellules. La co-infection de cellules non thyroïdiennes par un adénovirus codant le NIS et un adénovirus codant la TPO a permis d'augmenter l'organification de l'iode dans les cellules, sans augmenter son temps de rétention [55]. Cependant, dans une autre étude, la transfection de cellules de cancer pulmonaire par des plasmides codant le NIS et la TPO a augmenté l'organification, la rétention de l'iode et l'apoptose radio-induite [56]. Les données sont donc discordantes. Des dérivés de l'imidazothiazole peuvent inhiber l'efflux d'anions ou promouvoir sa relocalisation intracellulaire. Ces dérivés peuvent augmenter la rétention d'iode dans des modèles animaux [57, 58].

Améliorer le vecteur viral

Une autre limite du traitement peut être l'insuffisance de l'infection de la tumeur par le virus et de l'expression du NIS. Les stratégies développant des virus dits « oncolytiques »

sont en développement. Ces virus « oncolytiques » sont des virus 1) capables de se répliquer dans les cellules cancéreuses et 2) d'avoir une activité cytotoxique spécifiquement contre les cellules cancéreuses. Certains virus comme les réovirus ont une propriété oncolytique naturelle. D'autres virus doivent être génétiquement modifiés. Un certain nombre de stratégies peuvent être utilisées dont les principes sont:

1) Des gènes viraux nécessaires à la réplication du virus dans les cellules normales, mais pas dans les cellules cancéreuse, peuvent être supprimés.

2) Des gènes viraux peuvent être placés sous le contrôle de promoteurs spécifiques des cellules cancéreuses.

3) Les virus peuvent être modifiés pour devoir se fixer à des récepteurs cellulaires spécifiques des cellules cancéreuses [59, 60].

Des virus oncolytiques peuvent être utilisés comme vecteurs de thérapie génique permettant une double approche thérapeutique (effet antitumoral du virus lui-même, et activité thérapeutique du transgène). Il existe de nombreux exemples de virus modifiés par manipulation génétique pour améliorer leurs propriétés thérapeutiques. Ainsi, le virus Herpes Simplex 1 peut-être modifié pour lui conférer des propriétés oncolytiques. Le gène codant pour le GM-CSF (Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor) peut aussi lui être inséré dans le but de stimuler la réponse immunitaire contre les antigènes tumoraux libérés après destruction des cellules cancéreuses par le virus. Un traitement par injections intratumorales de ce virus a été évalué dans un essai de phase 2, chez 50 patients ayant un mélanome stade IIIc ou IV. Le taux de réponse évalué selon les critères RECIST a été de 26 % (8 réponses complètes, 5 réponses partielles) [61]. Un essai de phase 3 est en cours. Un essai de phase I, incluant 14 patients avec tumeurs hépatiques primitives ou métastatiques, a évalué la dose maximale tolérée d'injection intratumorale de JX-594. JX-594 est un poxvirus oncolytique (virus de la vaccine) modifié par une modification du gène thymidine kinase et

par l'insertion du gène du GM-CSF. Les patients ont reçu une moyenne de 3,4 cycles d'injections d'intratumorales. Parmi les 10 patients analysés, trois ont montré une réponse partielle et six ont eu une stabilisation tumorale [62]. Ces essais cliniques ont montré des résultats prometteurs qui doivent bien sur être confirmés. D'autres virus oncolytiques sont actuellement évalués dans des essais dont des essais de phase III, dans de nombreuses localisations dont les mélanomes, les cancers ORL, digestifs, de prostate et du système nerveux central.

Contourner l'immunité anti-virale

Le système immunitaire peut être bénéfique et participer à l'effet anti-tumoral quand la destruction de la cellule infectée par les virus permet la présentation d'antigènes et leur reconnaissance par les cellules immunitaires. Il peut aussi cependant avoir une action antivirale et limiter l'impact du traitement. Il existe pour certains vecteurs et pour certains patients une possible immunité pré-existante contre le virus, ou une immunité acquise après des premiers traitements limitant la possibilité de traitements répétés. Plusieurs stratégies ont été développées pour limiter cette immunité anti-virale. L'utilisation de transporteurs cellulaires du virus a pour but de délivrer le virus jusque dans la tumeur sans l'exposer au système immunitaire. Cette approche est développée pour plusieurs vecteurs viraux : adénovirus, VSV, vaccine, virus de la rougeole, rétrovirus, réovirus, virus de la maladie de Newcastle [63, 64]. Une autre stratégie consiste à associer le traitement viral à un traitement immunosuppresseur. Ces approches sont particulièrement détaillées dans le prochain chapitre consacré au virus de la rougeole.

Associer la radiovirothérapie aux traitements anticancéreux standards

L'association aux traitements anticancéreux standards pourrait également permettre d'améliorer l'efficacité de la radiovirothérapie, en plus de leur activité antitumorale propre. Des combinaisons de radiothérapie et de thérapie virale ont été testées dans plusieurs essais cliniques publiés [65]. De nombreuses études ont rapporté que la radiothérapie externe associée à la virothérapie peut avoir une action antitumorale synergique. La thérapie virale pourrait potentialiser l'efficacité de la radiothérapie. En fonction des virus et des modèles tumoraux, la radiothérapie peut majorer l'expression des récepteurs de virus à la surface des cellules, peut majorer la réplication virale, et peut majorer l'expression des gènes viraux [65]. Ainsi, la radiothérapie externe permet la majoration de l'expression du NIS dans différentes lignées cellulaire infectées par un adénovirus non réplicatif codant le NIS [66]. La radiovirothérapie peut par ailleurs trouver une place importante dans la prise en charge des cancers traités par radiothérapie. De nombreuses études rapportent qu'une augmentation de la dose de radiothérapie permet d'augmenter le taux de réponse locale. Cependant, cette augmentation de dose est limitée par la toxicité aux tissus sains. Par exemple, dans le traitement du cancer de prostate, une augmentation de la dose de radiothérapie de 64 à 74 Gy a permis une augmentation significative du contrôle de la maladie en termes de survie sans progression biologique (concentrations de Prostate Specific Antigen), au prix d'une augmentation de la toxicité du traitement [67, 68]. Récemment, un essai clinique a évalué par TEMP l'expression du NIS après injection intratumorale dans des cancers de prostate d'un adénovirus réplicatif codant le NIS (une séance d'injection en douze points dans la prostate). Il a été estimé qu'en cas de traitement par ^{131}I (200 mCi), la dose délivrée aurait été de 7.2 ± 4.8 Gy, dose insuffisante à elle seule pour être efficace [69]. L'optimisation de la radiovirothérapie et son association à la radiothérapie externe pourraient donc permettre d'aboutir à une majoration de la dose totale d'irradiation aux cancers en limitant la toxicité aux tissus sains. L'utilisation de traitements radiosensibilisants innovants comme les inhibiteurs de réparation de l'ADN

pourraient s'ajouter efficacement à cette combinaison thérapeutique [66, 70]. Des associations de thérapies virales à des chimiothérapies standards ont été testées en association à de nombreux virus oncolytiques *in vitro, in vivo* et en cours d'essais cliniques. Des agents alkylants (cyclophosphamide, cisplatine, témozolomide), stabilisants du fuseau (paclitaxel et docétaxel), intercalants (doxorubicine), la mitomycine C ont montré des effets antitumoraux synergiques avec des thérapies virales dans de multiples modèles tumoraux [71]. Ainsi, la radiovirothérapie pourrait s'associer aux thérapies anticancéreuses actuelles, celles-ci pourraient ajouter leur activité antitumorale propre mais aussi potentialiser la radiovirothérapie.

Radiovirothérapie autrement que par l'utilisation du NIS

Si les stratégies de radiovirothérapie reposent principalement sur l'utilisation du NIS, d'autres approches peuvent se développer. Ainsi, un virus de la vaccine a été modifié pour coder le gène du récepteur de type 2 à la somatostatine (SSTR2). Les cellules infectées exprimant le SSTR2 ont été capables de fixer le pentétréotide marqué à l'indium-111 (^{111}In-pentetreotide, Octroscan®). En imagerie *in vivo*, il a été possible de suivre la biodistribution du traceur et donc de l'expression des gènes viraux [72]. En thérapie *in vitro*, un traitement combinant le virus à faibles doses et DOTATOC (DOTA-d-Phe(1)-Tyr(3)-octreotide) marqué à l'indium-111 ou au lutétium-177 a montré sa capacité antiprolifération [73]. Des études comparant cette stratégie avec celle basée sur le NIS sont nécessaires.

Conclusion

La radiovirothérapie est une technique innovante ayant pour but de délivrer un traitement radio-isotopique sélectivement dans la tumeur. Des essais cliniques ont montré la faisabilité de l'imagerie de l'expression du NIS après transduction virale du gène. L'utilisation de l'iode-131 mais aussi d'autres radio-isotopes (rhénium-188, astate-211), le développement d'inhibiteurs de l'efflux de l'iode radioactif l'amélioration des vecteurs viraux avec les virus oncolytiques, les techniques de contournement de l'immunité antivirale, l'association de la radiovirothérapie avec la chimiothérapie ou la radiothérapie externe devraient permettre d'améliorer cette stratégie. Ces nombreux travaux précliniques montrent les pistes permettant d'envisager la radiovirothérapie dans de futurs essais cliniques.

Chapitre 2. Pourquoi sélectionner le virus de la rougeole dans des stratégies de thérapie virale et de radiovirothérapie ?

Introduction

La rougeole est une maladie potentiellement mortelle justifiant une large campagne de vaccination. Récemment, des souches atténuées ont montré des propriétés oncolytiques, c'est-à-dire qu'elles sont capables d'infecter sélectivement des cellules cancéreuses, de s'y répliquer, et de tuer ces cellules. Ces propriétés ont stimulé de nombreuses recherches sur l'utilisation du virus de la rougeole comme traitement anticancéreux. L'objectif de cette revue est de présenter les avancées ayant conduit à la réalisation d'essais cliniques évaluant l'utilisation du virus de la rougeole en cancérologie, de souligner les obstacles à surmonter et de préciser les dernières recherches qui permettent d'envisager les futurs essais cliniques.

Bases biologiques

La rougeole est une maladie le plus souvent bénigne mais dont les complications peuvent être mortelles. Sont particulièrement redoutées l'encéphalite post-virale et les complications infectieuses liées à l'immunosuppression induite par le virus. Ces complications justifient une stratégie vaccinale visant à l'éradication du virus. Grâce aux programmes mondiaux de vaccination de l'OMS et de l'UNICEF, le nombre estimé de décès attribués au virus de la rougeole a diminué de 733000 en 2000 à 164000 en 2008. Ces décès surviennent très majoritairement dans les pays pauvres à faible couverture vaccinale [74]. La

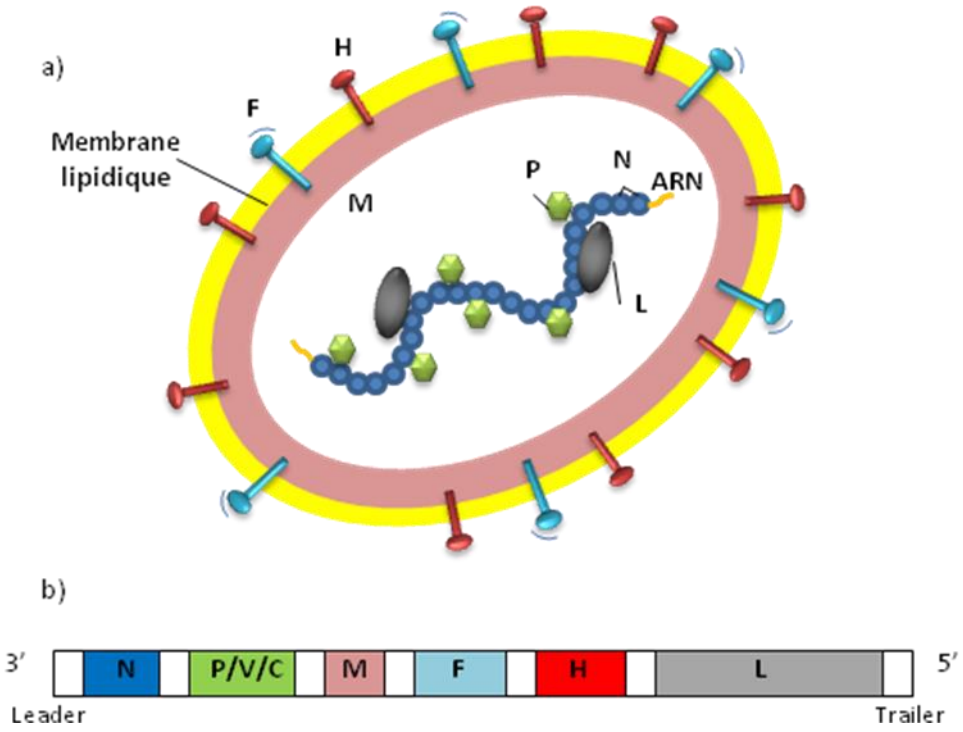
résurgence d'épidémies de rougeole depuis 2008 souligne la nécessité d'une couverture vaccinale optimale pour protéger l'ensemble de la population. Le premier isolat viral a été identifié en 1954 chez un patient, David Edmonston [75]. Plusieurs passages en culture de ce virus d'Edmonston dans différentes lignées cellulaires ont entraîné un glissement génétique du virus permettant d'isoler des souches à pouvoir pathogène atténué, utilisées en vaccination. Les vaccins utilisés depuis les années 1960 contre la rougeole sont des vaccins vivants atténués. Le vaccin est sûr, efficace et très peu couteux.

Le virus de la rougeole est un morbillivirus de la famille des paramyxoviridae. C'est un virus enveloppé à ARN simple brin de polarité négative, de diamètre compris entre 150 et 350 nm. Le génome contient 15894 nucléotides, 6 gènes (N, P, M, F, H, L) codant 8 protéines (N, P, M, F, H, L, V, C). Le gène P code la phosphoprotéine P et deux autres protéines non structurelles (V et C) par édition de l'ARN et cadre de lecture alternatif. L'organisation du virus est illustrée dans la figure 2. Les protéines H, F et M sont les protéines membranaires. Les protéines H et F sont enchâssées dans la membrane lipidique. La glycoprotéine H (hémagglutinine) est transmembranaire, elle est responsable de l'attachement du virus à l'un des trois récepteurs cellulaires connus, les clusters de différenciation CD150, CD46 et la Nectin-4 [76, 77]. Après fixation de la protéine H à son récepteur, la protéine de fusion F change de conformation et permet la fusion à pH neutre de la membrane virale avec la membrane cellulaire. La membrane est tapissée à sa face interne par une matrice faite de protéine M. Les protéines N, P et L sont les protéines de la nucléocapside. L'ARN est complexé à la nucléoprotéine N. Pour être fonctionnelle, la polymérase virale L a besoin d'être intégrée dans un complexe de transcription formé par les protéines N, P et L. Les protéines non structurales V et C jouent un rôle dans l'immunosuppression induite par le virus.

Figure 2

a) Représentation du virus de la rougeole. L'enveloppe est constituée par la membrane lipidique tapissée par la matrice (protéine de la matrice M), les glycoprotéines H se liant aux récepteurs cellulaires du virus et les protéines de fusion F. La nucléocapside est constituée de l'ARN virale entouré des nucléoprotéines N, de phosphoprotéines P et de polymérases virales L.

b) Représentation du génome viral. Les 6 gènes N, P, M, M, H et L sont représentés. Le gène P code pour la protéine P mais aussi les protéines non structurales V et C.



Rationnel pour l'utilisation du virus de la rougeole en cancérologie

L'infection par le virus de la rougeole entraîne la fusion de la cellule infectée avec des cellules voisines pour former des cellules géantes multinucléées (syncytium) pouvant contenir une centaine de noyaux. (**figure 2**). Les cellules infectées meurent ensuite par apoptose. Dans les années 1970, plusieurs cas de régressions de lymphomes après infection rougeoleuse ont été publiés [78-81], suscitant un intérêt pour l'utilisation du virus dans un but thérapeutique. Une étude clinique de phase 1 a inclus 5 patients atteints d'un lymphome cutané T et traités par injections intratumorales de virus de la rougeole (souche Edmonston-Zagreb) après un prétraitement systémique par interféron-α. Un patient a eu une réponse mineure au traitement, 3 patients ont eu une réponse partielle et un dernier a eu une réponse complète [82]. Ces résultats ont été obtenus avec de faibles doses de virus et un traitement par interféron visant à limiter la propagation virale. Malgré le faible effectif de patients et le traitement par interféron ayant pu biaiser les conclusions, cette étude a stimulé l'intérêt pour l'utilisation du virus de la rougeole en cancérologie. Plus récemment, l'utilisation du virus de la rougeole codant l'antigène carcino-embryonnaire (MV-CEA) a été testée cliniquement. Une étude de phase 1 avec escalade de dose a inclus 21 patientes ayant un cancer de l'ovaire progressif, persistant ou récurrent après chimiothérapie par paclitaxel et sels de platine. Les patientes ont été traitées par injections intrapéritonéales répétées de MV-CEA. L'ACE a été détectable dans le liquide péritonéal chez 3 patientes et une élévation de la concentration d'ACE a été détectable dans le sang chez les 3 patientes traitées avec les plus fortes doses. Aucune toxicité limitante n'a été observée et la survie médiane a été de 12 mois, avec un effet bénéfique variable selon la dose virale. Il y a eu 9 stabilisations tumorales pour 9 patientes traitées avec les plus fortes doses, contre 5 pour 12 patientes traitées avec les faibles doses [83].

Ces données cliniques soulignent la bonne tolérance du traitement et encouragent la poursuite des recherches sur l'utilisation du virus.

La sélectivité de l'infection virale pour les cellules cancéreuses est primordiale pour son utilisation comme agent thérapeutique. Le virus sauvage de la rougeole se lie au récepteur cellulaire CD150 ou SLAM (signaling lymphocyte activation molecule), sélectivement exprimé à la surface de certaines cellules B et T et expliquant le lymphotropisme primaire du virus [84]. En 2011, un autre récepteur cellulaire du virus sauvage a été identifié. La protéine de jonction intercellulaire PVLR4 (poliovirus-receptor-like-4), aussi nommée nectin-4, peut en effet lier le virus et est exprimée à la surface des cellules épithéliales, notamment trachéales, et expliquant l'épithéliotropisme secondaire du virus. Elle est aussi surexprimée à la surface de cellules cancéreuses pulmonaires, mammaires, coliques et ovariennes. Cette surexpression peut donc en partie expliquer la sélectivité tumorale de l'infection par le virus de la rougeole [76, 77]. Les souches vaccinales du virus de la rougeole dérivées de la souche d'Edmonston se lient préférentiellement au récepteur cellulaire CD46 [85]. CD46 est exprimé à la surface de toutes les cellules nucléés mais est surexprimé à la surface des cellules cancéreuses par rapport aux cellules normales, pouvant expliquer la sélectivité du virus pour les cellules cancéreuses et l'intérêt de cette surexpression pour l'utilisation thérapeutique des souches vaccinales en cancérologie [86].

Des souches du virus de la rougeole peuvent donc avoir un effet cytotoxique avec une sélectivité pour les cellules tumorales. Pour envisager une utilisation en pratique clinique, plusieurs difficultés doivent cependant être surmontées. Ces enjeux sont discutés ci-dessous.

Les enjeux

Améliorer la sélectivité antitumorale

La capacité de liaison de la protéine virale H avec les récepteurs cellulaires est fondamentale dans la sélectivité de l'infection. Des modifications de cette protéine H peuvent donc améliorer la spécificité de liaison du virus en la redirigeant vers des cellules exprimant un récepteur spécifique, avec ou sans perte d'utilisation des récepteurs SLAM, CD46 et PVLR4 (figure 3). Ainsi, la protéine H a pu être modifiée pour se lier au récepteur PSCA (prostate stem cell antigen) exprimé sur les cellules cancéreuses prostatiques et pancréatiques [87], à l'antigène carcinoembryonnaire exprimé sur les cellules cancéreuses coliques [88], au CD20 exprimé par les cellules lymphomateuses [89], à l'EGFRvIII ou au récepteur de l'interleukine-13 surexprimés sur les cellules de gliome [90, 91], ou encore au prostate-specific membrane antigene (PSMA) surexprimé sur les cellules prostatiques [92]. Cette redirection de la liaison virale doit permettre d'augmenter la sécurité du traitement. Par exemple, dans un modèle de souris transgénique exprimant CD46, un traitement par injection intracérébrale du virus sans mutation de H a entraîné une neurotoxicité majeure. Les animaux traités avec le virus exprimant l'interleukine 13 à l'extrémité C-terminale de la protéine H n'ont présenté aucun de signe de toxicité [91]. Il faut noter que le virus utilise exclusivement des récepteurs humains, les études de toxicité du virus chez l'animal sont donc difficiles. Des souris transgéniques exprimant CD46 ou CD150 humain ont alors été créées. De plus, la réponse immunitaire innée de la souris empêche l'infection, d'où l'utilisation de souris incapables de répondre au médiateur de l'immunité inné, l'interféron (souris sans récepteur à l'interféron). La réponse innée étant cruciale pour le contrôle des infections virales, l'interprétation des résultats *in vivo* obtenus avec ces souches de souris est cependant rendue difficile.

D'autres méthodes d'amélioration de la sélectivité ont été évaluées. Les cancers sécrètent des métalloprotéases de la matrice extracellulaire. Un virus a été modifié pour que l'activation de sa protéine F soit dépendante de métalloprotéases de cellules cancéreuses. Comme précédemment, ce virus a une efficacité antitumorale comparable à un virus non

modifié dans un modèle de fibrosarcome, mais sans neurotoxicité dans les souris codant CD46 et ne codant pas le récepteur à l'interféron [93]. Une autre approche pour majorer la sélectivité du virus a été décrite dans un modèle de glioblastome. L'ARN interférent microRNA-7 est régulé négativement dans les cellules de gliome, mais non dans le tissu cérébral normal. Un virus de la rougeole dont l'expression des gènes viraux et la réplication sont particulièrement sensibles au microRNA-7 a donc été créé. L'effet du virus est très atténué dans des cellules normales, mais reste intact dans des xénogreffes de glioblastome [94].

Les manipulations du virus peuvent permettre d'améliorer la sélectivité antitumorale pour épargner les cellules saines, mais doit aussi permettre de limiter la propagation virale à l'entourage du patient traité. L'excrétion dans les voies respiratoires de virus infectieux a été rapportée au moins une fois après vaccination [95], d'où un risque potentiel de contagion. Si le risque pour un entourage sain est dérisoire en cas de vaccination, l'administration de virus à haute dose à visée thérapeutique présente un risque que l'on ne peut ignorer en milieu hospitalier à cause d'un contact toujours possible avec des malades en état d'immunodépression. Pour empêcher l'excrétion du virus, des mutations délétères pour la liaison du virus au récepteur Nectin-4 ont été introduites dans la glycoprotéine H. Le virus muté étant incapable d'infecter les cellules épithéliales prévient ainsi tout risque de contagion, comme cela a été démontré chez le singe [96].

Contourner l'immunité antivirale

S'immuniser contre le virus de la rougeole (par vaccination, par maladie, ou par injections répétées du virus dans un protocole thérapeutique) pourrait limiter l'efficacité du traitement viral. Trouver des moyens d'échapper à cette immunité est donc essentiel pour développer à l'avenir cette stratégie.

Incorporer le virus dans une cellule elle-même capable de cibler les cellules cancéreuses est une approche en évaluation. Ainsi des monocytes ou des cellules endothéliales infectées par le virus de la rougeole peuvent délivrer le virus dans les cellules tumorales par hétérofusion. Pour évaluer l'efficacité du traitement viral en cas d'immunisation préexistante, des souris peuvent être passivement immunisées par injection de sérum ou d'anticorps neutralisants contre le virus avant traitement. Dans un modèle murin de tumeur péritonéale disséminée (cellules HUH7 de carcinome hépatocellulaire) et de traitement par injections intra-péritonéales du virus, la pré-incubation du virus avec des anticorps neutralisants a aboli l'infection des tumeurs. En revanche, quand le virus a été introduit dans des monocytes (U-9370) ou dans des cellules endothéliales, l'infection a été efficace, même en présence d'anticorps neutralisants [97] Dans un autre modèle de tumeur péritonéale (cellules ovariennes SKOV3ip.1) chez des souris athymiques mais passivement immunisées par injection de sérum anti-virus de la rougeole, l'injection intrapéritonéale de cellules souches mésenchymateuses infectées par le virus a permis d'augmenter la survie des souris, contrairement au traitement par virus seul ou cellules souches mésenchymateuses seules [98]. Plus récemment, des cellules myélomateuses mortellement irradiées ont cependant pu être infectées par un virus de la rougeole et ont ensuite pu délivrer le vecteur viral dans des cellules de myélome malgré la présence de sérum immun contre le virus de la rougeole. *In vivo*, dans un modèle de myélome, l'injection intraveineuse du virus n'a eu d'efficacité anti-tumorale que chez les souris non immunisées. En revanche, le traitement par cellules myélomateuses irradiées infectées par le virus a démontré une activité antitumorale chez les souris immunisées et non immunisées [99].

Une autre stratégie consiste à associer le traitement viral à un traitement immunosuppresseur. Le cyclophosphamide a montré sa capacité à prolonger l'expression de gènes viraux [100]. Dans un modèle murin d'adénocarcinome colique, l'association de

cyclophosphamide au traitement par un virus de la rougeole armé d'un gène suicide a permis de retarder l'apparition d'anticorps neutralisants le virus, et d'augmenter la réponse tumorale avec 90% de réponse complète [88]. Une stratégie combinant virus de la rougeole et cyclophosphamide a été évaluée dans une étude préclinique du traitement du myélome [101], et un essai clinique de phase I est en cours à la Mayo Clinic. Cependant, un cas d'encéphalite aiguë à inclusion a été décrit chez un enfant immunodéprimé ayant reçu une dose vaccinale de virus la rougeole [102]. Il faudra donc assurer la sécurité de cette stratégie, en augmentant par exemple la sélectivité virale.

Une autre méthode innovante d'échappement au système immunitaire a été récemment décrite. L'enveloppe du virus a pu être modifiée en remplaçant la glycoprotéine originelle par une glycoprotéine d'un paramyxovirus du chien, le virus de la maladie de Carré. Ce virus pouvait échapper à la neutralisation par des anticorps dirigés contre le virus de rougeole [103].

Quelle place dans la stratégie thérapeutique ?

Les modalités optimales du traitement restent à définir. Les injections peuvent être locales intratumorales, intrapéritonéales, ou systémiques intraveineuses. Pour leur facilité de réalisation, les injections intratumorales sont fréquemment utilisées dans les études précliniques. En clinique, ces injections peuvent être difficiles ou impossibles en raison de leur localisation, et des injections répétées peuvent être limitées en cas de procédure sous anesthésie générale. Les injections intratumorales peuvent cependant être particulièrement intéressantes en cas de tumeur facilement injectable. De plus, des effets antitumoraux à distance des tumeurs injectées ont été démontrés dans des essais cliniques avec des virus oncolytiques herpès ou de la vaccine [61, 62]. Des injections intratumorales pourraient donc rester intéressantes même en cas de maladie disséminée. L'utilisation d'injections

systémiques de virus a montré une bonne sécurité d'emploi avec différents virus oncolytiques. Cette voie d'administration est donc prometteuse, notamment pour les tumeurs non injectables ou disséminées. La place du traitement viral dans la stratégie thérapeutique reste également à préciser, pouvant s'intégrer dans des stratégies adjuvantes ou néo-adjuvantes d'une chirurgie, ou dans le cas de maladies non opérables.

De nombreuses études précliniques ont démontré l'intérêt d'associer une thérapie virale à une chimiothérapie ou une radiothérapie. La chimiothérapie, en plus de l'effet immunosuppresseur discuté précédemment, peut avoir un effet synergique avec les thérapies virales [71]. Cette synergie peut par ailleurs être utilisée dans des stratégies de gène suicide. Cette stratégie implique l'insertion dans le génome viral d'un gène codant une protéine convertissant une prodrogue inactive en métabolite actif dans la cellule infectée. Ainsi, dans un modèle de gliome, un virus de la rougeole a été doublement modifié, codant le gène de la purine nucléoside phosphorylase, une enzyme convertissant la fludarabine en médicament actif, et ciblant spécifiquement les cellules exprimant l'antigène CD20. Dans un modèle de lymphome du manteau, l'effet oncolytique a été augmenté chez les souris prétraitées par le cyclophosphamide, et la réponse tumorale a été complète chez tous les animaux recevant ce protocole suivi d'un troisième traitment par fludarabine [104]. Dans une autre étude, un virus de la rougeole a été doublement modifié : d'une part pour coder le gène de la purine nucléoside phosphorylase, et d'autre part pour se lier spécifiquement à un antigène de cellules souches de prostate (PSCA), exprimé à la surface des cellules de cancer de prostate mais également à la surface des cellules d'adénocarcinome pancréatique. Ce virus peut infecter sélectivement les cellules cancéreuses pancréatiques, que leur expression de PSCA soit faible ou élevée. *In vivo*, le traitement avec la fludarabine potentialise l'effet thérapeutique du virus, y compris dans des cellules résistantes à la gemcitabine. Ce virus a donc été modifié pour augmenter sa

sélectivité pour les cellules cancéreuses pancréatiques, et armé d'un gène suicide pour en augmenter la toxicité [105].

La radiothérapie peut également avoir un effet synergique en accroissant l'entrée des virus dans les cellules, la réplication virale et l'expression des gènes viraux. Réciproquement, les virus peuvent radiosensibiliser les tumeurs [106]. Un virus de la rougeole exprimant l'antigène carcino-embryonnaire (ACE) a été étudié en association avec une irradiation dans un modèle de glioblastome. Le virus et l'irradiation ont eu un effet anti-tumoral synergique. Une irradiation de 12 Gy associée à des injections intraveineuses du virus a permis d'obtenir des régressions tumorales, contrairement au traitement viral seul ou à la radiothérapie seule. Une rémission complète à long terme a été observée chez 5 souris sur 10, et la survie était meilleure en cas de combinaison thérapeutique. L'irradiation a majoré l'expression de protéines virales (protéines M et H) et d'ACE, ainsi que la réplication virale [97]. Les mécanismes de ces interactions restent actuellement mal connus.

Un virus de la rougeole codant le gène du symporteur sodium/iodure (NIS) a aussi été créé (MeV-NIS). NIS est une protéine membranaire permettant la rentrée d'anions monovalents dans la cellule. En plus de permettre l'entrée d'ions iodure dans les cellules comme dans la thyroïde, il permet d'une part l'entrée de radioisotopes pouvant être utilisée en imagerie *in vivo* (Iode-123, Iode-124, Iode-125, Iode-131, Technétium-99m) et d'autre part l'entrée de radioisotopes pouvant être utilisés dans un but thérapeutique (Iode-131, Rhénium-186, Rhénium-188, Astate-211) (figure 3). En fonction de l'isotope, l'imagerie peut-être réalisée par scintigraphie ou mieux, par tomographie par émission de positons (TEP) ou par tomographie d'émission monophotonique (TEMP). La stratégie thérapeutique associant thérapie par MeV-NIS et traitement radio-isotopique (iode-131) vectorisé par le NIS a montré un effet synergique *in vivo* dans des modèles de myélome [107] et de cancer de prostate [48]. A l'inverse, dans un modèle de cancer du pancréas, cette synergie n'a pu être observée,

probablement en raison d'une distribution insuffisamment homogène de l'infection et de la réplication virale dans les tumeurs, et en raison de la radiorésistance des cellules cancéreuses pancréatiques [36].

Conclusion

L'utilisation du virus de la rougeole comme traitement anticancéreux est prometteuse. L'utilisation de souches atténuées en vaccination a permis de s'assurer de leur bonne tolérance et sécurité d'utilisation, atout primordial dans le domaine de la thérapie virale ou génique. La sélectivité tumorale est essentielle pour l'efficacité et la sécurité de certaines souches atténuées, et cette sélectivité peut encore être améliorée en contrôlant les capacités de liaison du virus avec les récepteurs cellulaires. L'immunité antivirale est un des principaux obstacles à surmonter. L'association à un traitement immunosuppresseur est une voie prometteuse et un essai clinique est en cours. La sécurité de cette approche devra être assurée. D'une manière plus générale, les virus oncolytiques pourraient être mieux utilisés en association avec d'autres traitements comme la chimiothérapie et la radiothérapie puisque ces combinaisons ont montré des effets antitumoraux synergiques. De plus, le virus de la rougeole a été modifié pour coder le gène NIS, ouvrant la voie à des associations de thérapie virale et de traitement radioisotopique sélectif. Les prochains essais cliniques devront probablement étudier ces différentes combinaisons thérapeutiques. Ces avancées permettent d'espérer des applications cliniques, difficiles cependant à envisager avant plusieurs années, compte-tenu du temps nécessaire à leur préparation.

Chapitre 3. Pourquoi associer une thérapie virale avec une radiothérapie externe et des inhibiteurs de la réparation de l'ADN ?

Introduction

Les virus oncolytiques sont de nouveaux agents thérapeutiques en cours d'évaluation en monothérapie et en association avec de traitements anticancéreux standards. Les radiations ionisantes causent des dommages à l'ADN, principalement des cassures simple-brin ou double-brin. La radiothérapie est un élément essentiel de la prise en charge curative de nombreux cancers. De nombreuses données précliniques ont montré un effet synergique de l'association de virus oncolytiques et d'une irradiation externe. Le but de ce chapitre est de préciser les interactions entre les virus oncolytiques et les dommages de l'ADN induits par les radiations, en détaillant les bénéfices attendus de l'association thérapeutique de ces agents.

Association de virus oncolytiques et de radiothérapie dans les études cliniques et précliniques

Activité antitumorale

Les activités antitumorales *in vitro* et *in vivo* de nombreux agents viraux ont été évaluées en association avec la radiothérapie dans différents modèles tumoraux. Cette combinaison a montré des effets additifs ou synergiques dans modèles de cancers de prostate, ORL, du poumon, colorectal, de la thyroïde, de mélanomes, de gliomes et de cholangiocarcinomes [97, 108-127].

Dans des modèles tumoraux sous-cutanés, des études évaluant l'effet des adénovirus en association avec la radiothérapie ont montré que le traitement ralentit la croissance ou réduit le volume tumoral. Ad5-Δ24RGD est un adénovirus porteur d'une délétion de 24 paires de bases dans le gène E1A. IL est capable de se répliquer sélectivement dans des cellules ayant un déficit de la voie de signalisation du rétinoblastome. La séquence RGD, connue pour interagir avec les récepteurs cellulaires spécifiques, a été insérée dans le virus pour majorer l'infection virale des cellules. Dans un modèle de gliome, des souris porteuses de tumeurs ont été traitées par une irradiation locale de 5 Gy et 5 jours consécutifs d'injections intratumorales du virus. Ce traitement a conduit à une régression tumorale. Cinq animaux sur 10 ont eu une réponse complète et toutes ont survécu sans nouvelle progression tumorale 4 mois après le traitement. Sur l'examen histologique final après 120 jours, les animaux considérés en réponse partielle n'ont eu aucun résidu tumoral viable histologiquement. [120]. Dans une autre étude, des souris immuno-déficientes (nu/nu) ayant une tumeur gliale sous-cutanée ont reçu une irradiation corporelle totale de 5 Gy suivie d'injections intratumorales d'ONYX-15. Ce traitement a permis 90 % de régressions tumorales, avec 50% des souris en réponse complète après 4 mois. [115]. D'autres données spectaculaires ont été rapportées dans un modèle de cancer de prostate sous-cutané, avec le virus CV709, un adénovirus oncolytique ayant une spécificité pour les cellules cancéreuses prostatiques. Dans ce cas, une seule injection intra-tumorale du virus, suivie après 24 heures d'une irradiation en une fraction de 10 Gy a permis une réduction du volume tumoral à moins de 5% du volume initial. Aucune réduction tumorale n'a été observée avec les traitements en monothérapie [111].

Les virus herpès ont également été évalués [108, 109, 117-119]. Dans un modèle de gliome, 9 souris sur 10 traitées par 3 injections d'un HSV-1 atténué et une irradiation de 45 Gy en 2 fractions ont eu une réponse complète [109]. Dans un modèle de cancer ORL et avec l'utilisation d'un virus HSV-1 avec délétions aux loci $\gamma_1$34.5 et l'insertion du gène LacZ, l'association du

virus avec une irradiation avait un effet antitumoral supérieur aux traitements en monothérapie. De manière intéressante, même les cellules radiorésistantes ont été sensibles à cette association [119]. Cependant, dans d'autres modèles de cancer de prostate, la radiothérapie n'a pas augmenté l'effet anti-tumoral des injections intraveineuses ou intra-tumorales de l'adénovirus G207 [118].

Le virus de la rougeole a été étudié en association avec une irradiation dans un modèle de gliome. L'association d'injections intraveineuses du virus et d'une irradiation de 12 Gy en 6 fractions a permis d'obtenir des régressions tumorales, contrairement aux agents en monothérapie. Une rémission complète à long terme a été observe chez 5 souris sur 10, et la survie était meilleure en cas de combinaison thérapeutique [97].

Les réovirus sont des virus à ARN aux propriétés oncolytiques naturelles. *In vitro,* des études ont démontré une cytotoxicité synergique avec la radiothérapie dans de nombreuses lignées cellulaires. Dans des modèles de mélanome et de cancer colorectal *in vivo*, l'association du réovirus avec une irradiation (12 Gy en 4 fractions ou 20 Gy en 5 fractions, en fonction de la lignée cellulaire), a permis d'augmenter la survie des animaux, par rapport aux monothérapies [125].

Jusqu'à présent, il n'y a pas eu d'essai clinique randomisé publié testant une association de virus et d'irradiation par rapport à un traitement anticancéreux standard. Cependant, des essais de phase I et II testant la combinaison on été publiés. Ces essais ont évalué des adénovirus, des virus herpès et des réovirus, et ont montré d'excellentes tolérances aux traitements, avec des résultats préliminaire d'efficacité thérapeutique. Les principaux résultats sont présentés dans le **tableau 2** [128-136].

Une difficulté repose dans le choix du modèle tumoral *in vivo*. La plupart des équipes ont utilise des modèles hétérotopiques et des injections intra-tumorales du virus. Par exemple, associer radiothérapie et injection intra-tumorales d'un adénovirus oncolytique dans un

modèle hétérotopique de gliome montrait l'intérêt de l'association thérapeutique [120]. En revanche, quand le même traitement a été utilisé dans un modèle orthotopique, il n'y a pas eu d'intérêt démontré de l'association [137]. Les modèles sous-cutanés ont l'avantage de la simplicité de l'implantation tumorale, des injections intra-tumorales, de l'irradiation et du suivi de la tumeur. Cependant, les tumeurs orthotopiques ont l'intérêt d'être plus en rapport avec des études cliniques ultérieures.

Effet de l'irradiation sur l'expression des récepteurs cellulaires pour les virus, sur la réplication virale et sur l'expression des gènes viraux.

Combiner les virus oncolytiques et la radiothérapie externe offre la possibilité de majorer l'activité oncolytique du virus, par l'effet d'une augmentation de l'infectivité du virus, d'une majoration de la réplication virale ou de l'expression des gènes et transgènes viraux (**Figure 3**).

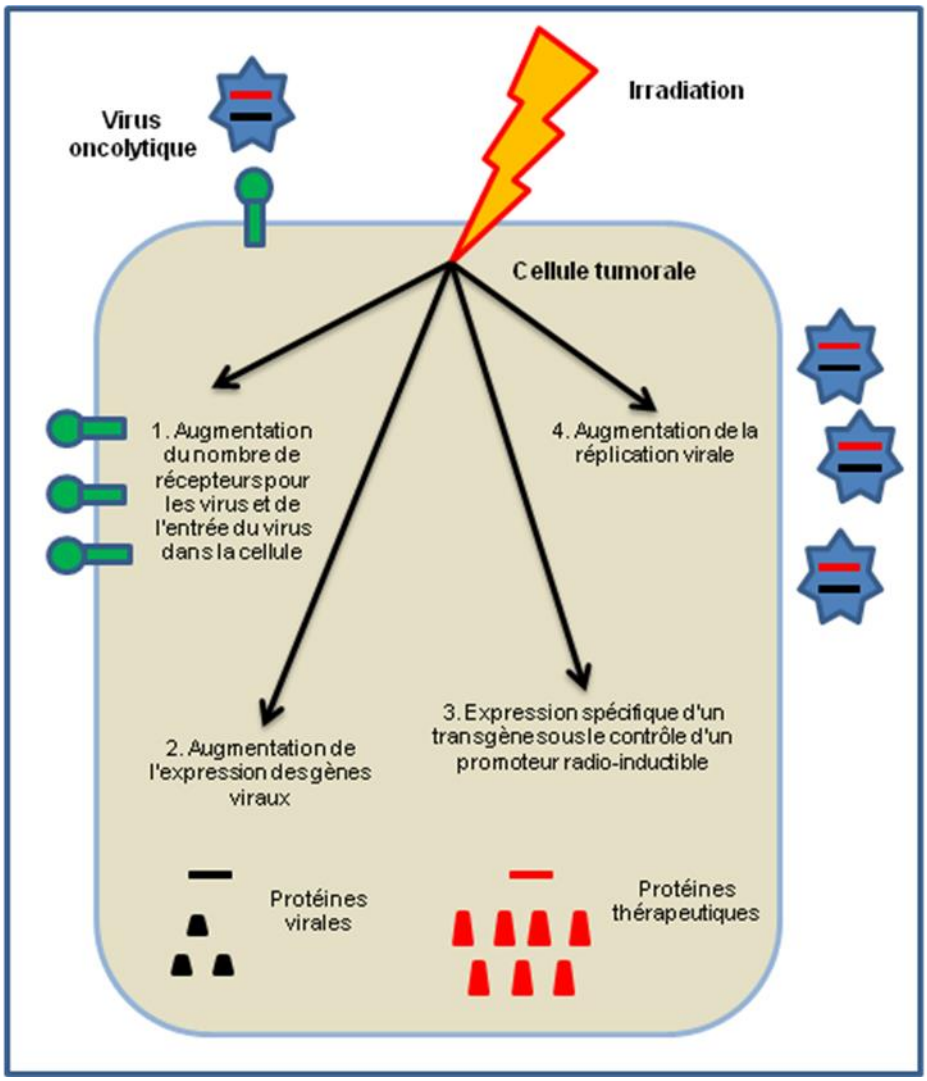
Expression des récepteurs cellulaires pour le virus

La possible augmentation de l'expression des récepteurs cellulaires des virus a été étudiée. Dans des cellules de gliome, l'irradiation n'a pas augmenté l'expression du récepteur cellulaire du virus de la rougeole, CD46 [97]. La plupart des données concernent l'effet de l'irradiation sur l'expression du récepteur CAR (coxsackie-adenoviral receptor), mais les

Tableau 2. Essais cliniques publiés évaluant l'association de thérapies virales et de radiothérapie externe. CR : réponse complète, PR : Réponse partielle, SD : Stabilisation tumorale, PD : Progression tumorale, HSV-TK : thymidine kinase du virus herpes simplex.

Auteur/ Phase clinique	Patients	Traitement	Commentaires
Freytag *et al*, 2003 Phase I [129]	15 patients avec adénocarcinome prostatique non métastatique, 1ère ligne thérapeutique.	Injections intraprostatiques d'un adénovirus codant les gene de la cytosine déaminase et de l'HSV-tk. Combinaison avec les promédicaments 5-fluorocytosine et valganciclovir, et irradiation conformationnelle (70-74 Gy)	Pas de dose toxique limitante Expression intratumorale du transgène retrouvée jusqu'à 3 semaines avec l'injection virale. Abaissement du taux de PSA plus rapide chez les patients recevant les prodrogues plus d'une semaine par rapport à ceux ne les recevant qu'une semaine
Swisher *et al*, 2003 Phase II [135]	19 patients avec cancer pulmonaire non à petites cellules non métastatique mais non éligible pour chirurgie ou radio-chimiothérapie	3 injections intratumorales d'un adénovirus non réplicatif codant le gène p53, association avec une irradiation (60 Gy).	Efficacité antitumorale à 3 mois, évaluée par examen Clinique, tomodensitométrie (16 patients) et biopsies (15 patients) CR, PR, SD and PD chez respectivement 1, 5, 2 et 11 patients. Evaluation de la réponse de la tumeur injectée chez 17 patients: CR, PR, SD et PD chez respectivement 1, 11, 3 et 2 patients.
Immonem *et al*, 2004 Phase II/III [132]	36 patients avec gliome opérable	Patients randomises pour recevoir le traitement standard seul (chirurgie puis radiothérapie, 19 patients) ou son association avec un traitement local dans la cavité post-résection par un adénovirus codant le gène de la HSV-tk, suivi par un traitement intraveineux par ganciclovir pendant 14 jours (17 patients).	Traitement bien toléré Augmentation significative du temps moyen de survie dans le bras expérimental (39.0 +/- 19.7 vs 70.6 +/- 52.9 semaines, P = 0.0095), survie médiane (62.4 vs 37.7 semaines).
Mundt *et al*, 2004 Phase I [133]	14 patients avec sarcome des tissus mous	3 doses progressives de TNF-erade, un adénovirus codant le gène du TNF-α sous le contrôle d'un promoteur radio-inductible. Association avec une irradiation (36-50.4 Gy).	Pas de dose toxique limitante Evaluation de la réponse chez 13 patients. CR, PR, SD et PD chez respectivement 2, 9, 1 et 1 patients. Sur les 11 patients ayant pu ensuite être opérés, 10 patients ont eu une réponse histologique (2 CR et 8 PR)
Senzer *et al*, 2004 Phase I [134]	36 patients avec tumeur solide	Injections intratumorales de TNF-erade. Association avec une irradiation (30-70 Gy).	Pas de dose toxique limitante Cinq patients avaient des lésions synchrones, permettant de comparer les lésions irradiées seulement ou traitées par irradiation et injection de virus. Quatre patients ont eu une meilleure réponse dans la tumeur injectée.
The *et al*, 2004 Phase I/II [136]	59 patients avec cancer de prostate non métastatique	Injection intratumorale d'un adénovirus codant la HSV-tk, suivie d'injections de valacyclovir. Association avec une irradiation (76 Gy). Association à un traitement hormonal pour les patients à haut risque	Tous les patients sans extension ganglionnaire avaient des biopsies négatives apes 2 ans et un contrôle biochimique (PSA) au dernier suivi. Trois des 4 patients avec extension ganglionnaire ont récidivé.
Freytag *et al*, 2007 Phase I [128]	9 patients avec cancer de prostate non métastatique	Injection intraprostatique d'un adénovirus oncolytiques codant les gènes cytosine deaminase/ HSV-TK. Association avec les promédicaments 5-fluorocytosine et valganciclovir, et irradiation avec modulation d'intensité (74 Gy)	Pas de dose toxique limitante Huit patients ont eu des biopsies post thérapeutiques, 7 avaient des biopsies négatives au dernier suivi (6 ou 12 mois)
Harrington *et al*, 2010 Phase I/II [130]	17 patients avec cancer ORL épidermoïde stade III, IVa ou IVb	Injections intratumorales de virus herpes simplex codant le gène du GM-CSF. Association avec une irradiation (70Gy) et cisplatine	Pas de dose toxique limitante CR 23.5%, PR 58.8% Survie spécifique 82.4% à un suivi médian de 29 mois (19-40 mois).
Harrington *et al*, 2010 Phase I [131]	23 patients avec tumeur solide avancée	Injections intratumorales de réovirus, association avec irradiation (20 ou 36 Gy)	Pas de dose toxique limitante Evaluation de la réponse chez 14. Dans le groupe 20 Gy, 2/7 patients ont eu une PR et 5/7 une SD. Dans le groupe 36 Gy, 5/7 patients ont eu une PR et 2/7 une SD.

Figure 3. Mécanismes potentiels de la majoration des propriétés oncolytiques des virus par une irradiation



données sont contradictoires. Georger et al [115] ont rapporté que l'irradiation n'augmente pas l'expression de CAR ou de l'intégrine α_v dans des cellules de gliome. De même, Bieler *et al* [110] n'ont pas montré d'augmentation de l'expression de CAR dans des cellules de gliome infectées par un adénovirus, même si il y a eu une augmentation de la réplication virale. L'influence de la séquence thérapeutique a été étudiée dans des hépatocytes de rat (WB) et des cellules humaines de cancer colique (LoVo). Lorsque l'irradiation a été donnée avant le virus, le nombre de cellules infectées a augmenté. Il n'y a cependant pas eu d'effet lorsque l'irradiation a été délivrée après le virus. Ces résultats suggèrent que l'irradiation peut augmenter la rentrée des virus dans les cellules. [127]. D'autres données suggèrent que l'irradiation peut exercer un effet sur l'expression cellulaire de la dynamine 2, une protéine intracellulaire impliquée dans l'internalisation des adénovirus après leur liaison avec leur récepteur CAR/intégrine [138, 139]. Une étude a montré que l'association d'un traitement avec un adénovirus non réplicatif codant la GFP à une irradiation peut majorer l'expression de CAR et d'intégrine dans des cellules colorectales (HCT116) et ORL (SIHN-5B) [66] .

Réplication virale

Les données relatives à l'effet des radiations sur la réplication virale sont variables. Certaines études rapportent une augmentation de la réplication virale induite par une irradiation, *in vitro* et *in vivo*. Ainsi, cette augmentation a été observée avec des adénovirus dans des modèles de cancer de prostate, [111, 112, 121], du poumon [108] et de glioblastome [110], avec les virus herpès dans un modèle de cholangiocarcinome [117], de cancer ORL [119] et de gliome [109] et avec le virus de la rougeole dans un modèle de glioblastome [97]. A l'inverse, un plus petit nombre d'études n'a pas rapporté de telles augmentations, avec des adénovirus dans des modèles de gliome [115, 120] et un réovirus dans un modèle de mélanome et de cancer colorectal [125]. Dans cette dernière publication, la séquence de traitement (irradiation avant ou après le

traitement viral) n'a pas eu d'influence sur la réplication virale. Il est possible que cet effet de l'irradiation sur la réplication virale soit dépendant de la lignée cellulaire. En utilisant un même modèle *in vivo*, une augmentation de la réplication d'un virus herpes simplex a été démontrée seulement pour 3 lignées de cancer ORL sur 5 testées. Cependant, la synergie thérapeutique entre le virus et l'irradiation a été observée dans les 2 lignées pour lesquelles il n'y avait pas d'augmentation de la réplication virale [119]. Ces résultats suggèrent qu'une augmentation de la réplication virale n'est pas indispensable à une augmentation de l'effet antitumoral du traitement.

Les mécanismes d'une possible augmentation de la réplication virale sont largement méconnus. La protéine GADD34 (Growth arrest and DNA damage-repair 34) est une protéine impliquée dans la réparation des dommages de l'ADN et est régulée par les signaux d'arrêt du cycle cellulaire et les agents responsables des dommages de l'ADN. Un domaine du gène $\gamma_1$34.5 de l'HSV est homologue au domaine correspondant de GADD34 [140]. Dans le virus, la protéine $\gamma_1$34.5 est un facteur de neurovirulence qui permet au virus de se répliquer et de tuer les cellules cérébrales [141]. Ainsi les vecteurs HSV en développement en clinique ont une délétion de $\gamma_1$34.5 pour réduire leur possible toxicité, même si cela peut réduire leur effet thérapeutique [142]. Dans des modèles de mésothéliome pleural et de cancers du poumon, des cellules ont été irradiées et infectées par un HSV-1 avec délétion $\gamma_1$34.5, obtenant un effet thérapeutique synergique. L'irradiation est connue pour réguler positivement GADD34, ce qui pourrait compenser l'absence de $\gamma_1$34.5. Appuyant cette hypothèse, des ARN interférents ciblant GADD34 ont aboli la synergie observée [108, 143]. Dans des modèles de cholangiocarcinome, l'effet antitumoral synergique et la régulation positive de GADD34 ont été dépendante de la lignée cellulaire [117]. Ainsi, l'irradiation serait un moyen de restaurer la réplication et la virulence de HSV-1 avec délétion $\gamma_1$34.5, sélectivement dans les cellules irradiées.

Expression des gènes viraux

L'effet de l'irradiation sur l'expression génique a été évalué en mesurant l'expression de protéines virales endogènes et de transgènes "rapporteurs". La GFP (green fluorescent protein) a été utilisée comme gène rapporteur. Zhang et al [127] ont rapporté qu'une irradiation augmente l'expression de GFP selon une relation dose-dépendante dans plusieurs lignées cellulaires traitées par un adénovirus codant la GFP, mais pas dans toutes celles étudiées. Dans certaines circonstances, les niveaux d'expression d'un transgène thérapeutique peuvent aussi être suivis. Dans une telle étude, des cellules cancéreuses pancréatiques ont été infectées par un adénovirus exprimant NK4 (un antagoniste du facteur de croissance hépatocytaire), les concentrations de NK4 ont ainsi été augmentées dans le milieu de culture des cellules irradiées par rapport aux cellules non irradiées [138]. Une autre équipe a utilisé la GFP, la β-galactosidase et NIS comme gènes rapporteurs d'un adénovirus non réplicatif, dans des modèles de cancer ORL, pulmonaire et colorectal. L'irradiation a augmenté l'expression de ces trois protéines, selon une relation temps- et dose-dépendante [66]. Dans cet exemple, l'augmentation de l'expression de NIS offre la perspective d'accroitre l'efficacité d'une stratégie de radiovirothérapie décrite dans le chapitre 1.

Pour améliorer encore cette combinaison d'irradiation et de virus, plusieurs équipes ont développé des approches utilisant des promoteurs de gènes radio-inductibles pour contrôler l'expression temporelle et spatiale d'un transgène. L'exemple le plus avancé est celui d'un adénovirus non réplicatif codant le gène du TNF-α (tumour necrosis factor-α) sous le contrôle du promoteur Egr-1 (early growth response-1). Après une injection intratumorale du virus, les concentrations de TNF-α après 7, 14 et 21 jours ont été plus élevées dans les tumeurs irradiées par rapport aux tumeurs non irradiées [144]. Dans un modèle orthotopique de glioblastome traité par un adénovirus codant la β-galactosidase sous le contrôle du promoteur

Egr-1, de faibles doses d'irradiation (2 Gy) ont été capables d'activer l'expression du transgène [145]. Un adénovirus de deuxième génération, Ad.EGR-TNF (TNFerade), a été testé dans des essais cliniques. Deux essais de phase I, incluant des patients atteints de cancers d'origines diverses, ont été publiés. Ces essais ont confirmé la très bonne tolérance du traitement associant TNFerade et radiothérapie externe [133, 134] (voir tableau 1). Un essai de phase III de cette association dans le traitement du cancer pancréatique a été stoppé en 2010 devant un une absence d'effet sur la survie à une analyse intermédiaire. Récemment, des études ont montré que le promoteur de la survivine est fortement radio-inductible, la dose optimale de radiation *in vitro* a été de 2 Gy. Un adénovirus dans lequel le promoteur de la survivine contrôle l'expression de la protéine E1 (CRAd-S-pk7 virus) a été utilisé dans des tumeurs dérivées de cellules souches CD133+ de gliome. En association à une irradiation, l'efficacité antitumorale de ce virus et sa réplication ont été supérieures par rapport à celles d'un virus sauvage [122].

Mécanismes de la synergie antitumorale

Bien que de nombreuses données démontrent l'intérêt de combiner irradiation et thérapie virale, les mécanismes sont peu connus. Dans des modèles de cancer de prostate, la radiothérapie a été combinée à un traitement adénoviral, l'analyse histologique des tumeurs traitées a montré une majoration de la nécrose, de l'apoptose et une baisse de la vascularisation tumorale [111]. D'autres études ont retrouvé une majoration de l'apoptose [123, 125, 146]. A l'inverse, l'association *in vivo* d'ONYX-015 (un adénovirus oncolytique) et d'irradiation dans un modèle de gliome n'a pas augmenté l'apoptose, mais il y a eu plus de fibrose dans les tumeurs par rapport à celles traitées par radiothérapie seule [115]. La connaissance de ces mécanismes sera une étape-clé pour l'optimisation de cette stratégie. Les interactions moléculaires entre les virus oncolytiques et les voies de signalisation de la

réponse aux lésions de l'ADN sont complexes mais peuvent permettre de mieux comprendre les mécanismes moléculaires de la synergie entre virothérapie et radiothérapie.

Interactions entre les virus et la réponse aux lésions de l'ADN induites par les radiations

Signalisation des lésions de l'ADN

Les radiations ionisantes induisent une grande variété de lésions de l'ADN, incluant des lésions d'une seule base, des cassures simple-brin et double-brin, et des pontages ADN-ADN ou ADN-protéine [147]. Les cassures double-brin sont particulièrement importantes dans la mort cellulaire induite par les radiations. Deux voies majeures de réparation ont été décrites : la recombinaison homologue et la jonction non homologue des terminaisons (non-homologous end-joining, NHEJ) [148]. Après détection de la lésion, les voies de la réparation sont activées ce qui arrête la progression du cycle cellulaire à un point de contrôle (checkpoint) approprié. Dans les cellules avec une voie p53 intacte, cet arrêt se produit généralement en G1/S pour les cellules qui étaient en G0 ou G1, ou en G2/M pour les cellules qui étaient en phase S ou G2 du cycle cellulaire. Cet arrêt donne le temps pour tenter la réparation de l'ADN. Si celui-ci est irréparable, la cellule doit induire sa propre mort par apoptose. Dans les cellules cancéreuses, de nombreux contrôles du cycle cellulaire sont perturbés et ces systèmes peuvent s'avérer inefficaces.

La détection de la lésion est très précoce. Le complexe hétéro-trimérique Mre11-Rad50-Nbs1 (MRN) est un détecteur des cassures double-brin et se localise rapidement sur le site de la lésion, se liant aux extrémités libres d'ADN [149, 150]. Le complexe MRN agit comme un lien entre systèmes de détection et systèmes de réparation et de régulation du cycle cellulaire [151]. MRN recrute la kinase de la protéine ATM (ataxia-telangiectasia mutated)

(ATM) et dissocie le dimère ATM inactif en monomères avec activité kinase catalytique [152]. La relaxation de la chromatine, augmentant l'accessibilité au site de la lésion pour les systèmes de réparation, est aussi un évènement très précoce [153-155]. Les modifications des histones sont également très importantes. La protéine H2AX (Histone 2A variant) est phosphorylée en réponse à la cassure double-brin, formant γH2AX. Les foci de γH2AX s'étendent sur des domaines de taille de l'ordre de la mégabase, et recrutent des facteurs de réponse à la lésion et les facteurs du remodelage de la chromatine [146, 156]. La décondensation de l'ADN est un des premiers évènements suivant la cassure double-brin, elle survient au site de la cassure, initialement indépendamment de H2AX ou ATM [157]. Une autre voie dépendant d'ATM et de KAP-1 (KRAB-ZFP–associated protein 1) et induisant une large vague de relaxation de la chromatine a été décrite [158].

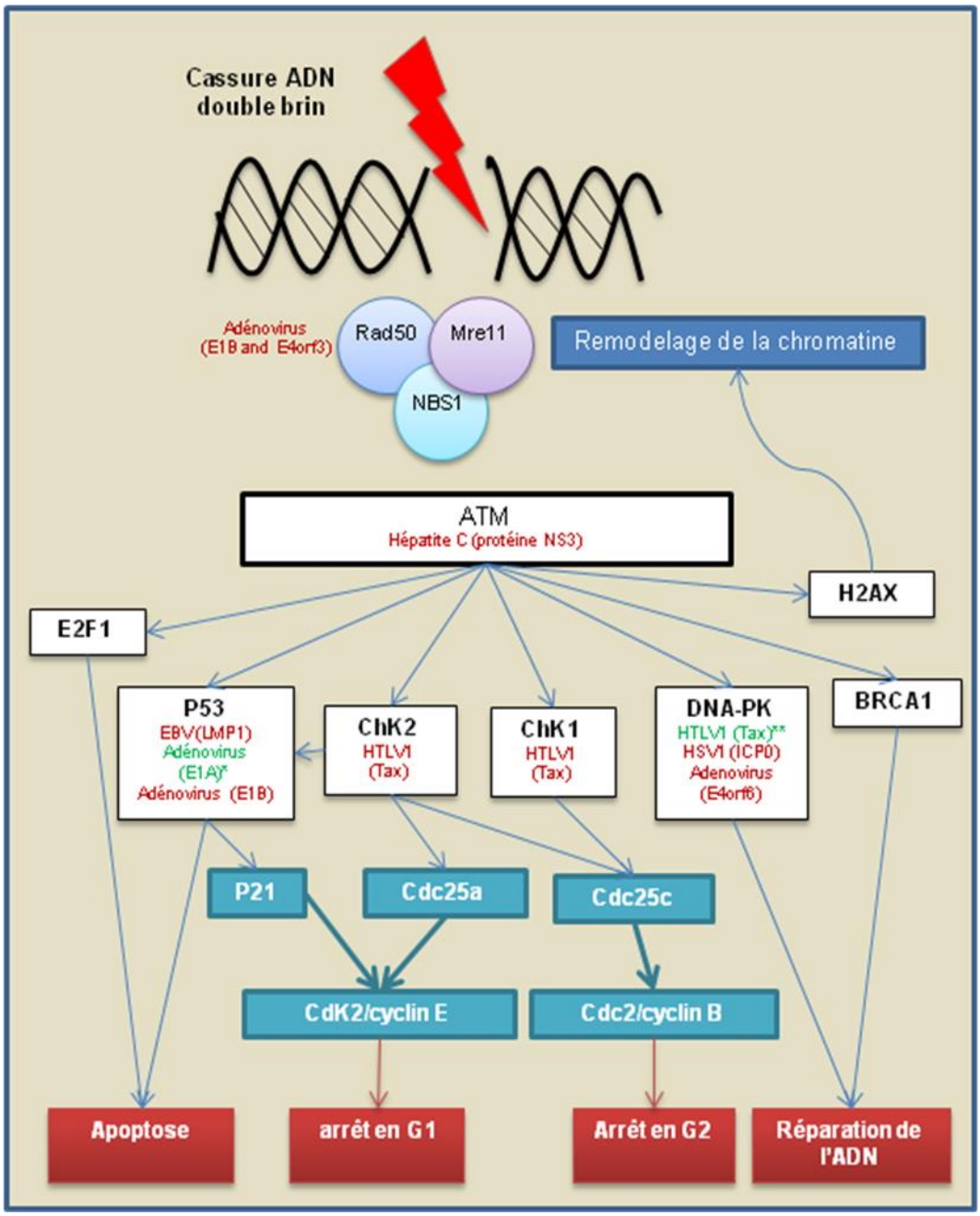
ATM joue un rôle majeur dans la réparation de l'ADN et la régulation du cycle cellulaire. ATM phosphoryle directement ou indirectement plus de 30 substrats dont p53, NBS-1, SMC-1(Structural Maintenance of Chromosomes 1), E2F1, Chk1 (Checkpoint kinase 1), Chk2, BRCA1 (Breast Cancer Susceptibility Gene 1), DNA-PK (DNA-dependent protein kinase) et H2AX [159, 160]. P53 activée peut mener à l'arrêt du cycle cellulaire en G1 par une transactivation de p21 [161], mais peut aussi activer les voies pro-apoptotiques. SMC-1 fait partie du complexe de cohésion qui retient les chromatides sœurs pendant la recombinaison homologue [162]. SMC-1 est recrutée au site de la cassure et promeut la réparation de l'ADN en G2 [163]. E2F1 induit la phosphorylation de Chk2, sous la dépendance d'ATM et de NBS-1, et stimule l'apoptose en collaboration avec p53 [164, 165]. Suite à la lésion de l'ADN, Chk1 est principalement responsable de l'arrêt en G2/M mais peut aussi induire un arrêt en phase S. Chk1 activée phosphoryle Cdc25C, inhibant l'activation de Cdk2 (cyclin-dependent kinase 2), un promoteur de la mitose [166]. L'activation de Chk2 induit la phosphorylation et la dégradation de Cdc25A, ce qui, en retour, inhibe l'activité de Cdk2 [167]. Chk2 phosphoryle et

inhibe également Cdc25C, ralentissant encore la progression du cycle cellulaire [168]. En réponse à la lésion de l'ADN, Chk2 phosphoryle de nombreux autres substrats dont p53 et BRCA1 [159]. BRCA1 joue un rôle dans la promotion de la recombinaison homologue et de la recombinaison des terminaisons non homologue [169]. Les DNA-PK jouent un rôle dans la recombinaison non homologue [170]. Cette complexe voie MRN-ATM est illustrée dans la **figure 4**.

Interactions entre les protéines virales et les voies de signalisation de la réponse aux dommages de l'ADN

De nombreuses protéines virales peuvent interagir avec des protéines cellulaires impliquées dans la réparation de l'ADN [171, 172]. Par exemple, la protéine Tax du virus HTLV-1 (Human T-cell leukaemia virus type 1) interagit avec Chk2 pour limiter l'apoptose induite par le dommage de l'ADN. Elle interagit aussi avec Chk1 pour inhiber l'activité kinase de Chk1 et l'arrêt du cycle cellulaire en G2 [173]. Tax induit également une activation permanente de la voie des DNA-PK, sature cette voie et perturbe ainsi la réponse à une nouvelle lésion [174]. Un autre rétrovirus, HIV-1, exprime la protéine Tat qui radiosensibilise les cellules, régule négativement la sous-unité catalytique de DNA-PK (DNA-PKcs) et inhibe la réparation de l'ADN [175]. La protéine LMP1 (latent membrane protein 1) du virus d'Epstein-Barr inhibe l'activation de p53, la réparation de l'ADN et radiosensibilise les cellules épithéliales humaines [176, 177]. Les facteurs de transcription FOXO (Forkhead box class O) ciblent des gènes impliqués dans la progression du cycle cellulaire, l'apoptose et la réparation de l'ADN.

Figure 4. Voies de signalisation Mre11-Rad50-NBS1 et ATM en réponse à une cassure double-brin de l'ADN. Le complexe Mre11-Rad50-NBS1 se localise à la cassure et recrute la kinase de la protéine ATM (ataxia-telangiectasia mutated). La relaxation de la chromatine est un évènement précoce, d'abord indépendant de H2AX et ATM. L'activation d'ATM provoque la phosphorylation de plus de 30 substrats incluant p53, E2F1, Checkpoint kinase 1 (Chk1), Chk2, BRCA1, DNA-dependent protein kinase (DNA-PK) et H2AX, contrôlant les voies de l'apoptose, de l'arrêt du cycle cellulaire et de la réparation de l'ADN. Des virus et des protéines virales qui inhibent leur protéine cible sont indiqués en rouge. Des virus qui activent leur cible sont indiqués en vert. *Des études ont montré que la protéine adénovirale E1A active p53, d'autres ont montré un effet inhibiteur. **Tax active et sature la voie DNA-PK, altérant la fonction DNA-PK.



LMP1 peut stimuler la voie PI3K/Akt/FOXO3a, menant à une inactivation de FOXO3a [178]. Comme dernier exemple, la protéine NS3 du virus de l'hépatite C interagit avec ATM et radiosensibilise les cellules [179].

Des virus oncolytiques peuvent également interagir avec la réponse aux lésions de l'ADN. Des analyses transcriptomiques ont démontré que le réovirus peut modifier l'expression de 14 gènes connus dans la réparation de l'ADN. Ces changements concernent par exemple une baisse de l'expression la poly(ADP-ribosyl)-transférase, de la DNA-polymérase α et de la protéine Xeroderma Pigmentosum-C (XP-C) impliquée dans la réparation par excision de nucléotide [180].

L'ADN double-brin des adénovirus peut être reconnu comme dommage de L'ADN par la cellule, et induire une réponse de recombinaison des extrémités non homologue, aboutissant à la liaison et l'agglomération de larges molécules virales (concatémères). Cette concatémèrisation nécessite l'activité de Mre11 et NBS1. Une infection par un adénovirus sauvage provoque une localisation du complexe MRN au site de la réplication virale. Ensuite, Mre11 et Rad50 sont inhibés par le virus qui induit leur redistribution et leur dégradation dépendante du protéasome. La protéine virale E4orf3 (E4 open reading frame 3) est impliquée dans cette relocalisation des complexes MRN loin des sites de réplication virale, elle peut diriger les complexes RMN vers de larges accumulations cytoplasmiques (aggrésomes). La protéine E4orf6 est impliquée dans leur dégradation. Clairement, le rôle de ces protéines est de prévenir la concatémérisation et donc l'inactivation de l'ADN viral [181, 182]. Dans des cellules de cancer colorectal et de glioblastome, l'expression de E4orf6 a provoqué une prolongation de l'autophosphorylation de DNA-PKcs, une inhibition de la réparation de l'ADN et une radiosensibilisation [183]. La protéine PP2A (protein phosphatase 2A) est impliquée dans le déphosphorylation de γH2AX après la réparation de l'ADN [184]. Dans une autre étude, E4orf6 a inhibé l'activité de PP2A. En réponse à une irradiation, la prolongation

de la phosphorylation de H2AX n'a pas altéré la ligation des brins d'ADN, mais a induit une hyperactivation de PARP (poly(ADP-ribose) polymérase) et une translocation vers le noyau de AIF (apoptosis-inducing factor), un effecteur de PARP. La radiosensibilisation induite par E4orf6 a été dépendante de cette translocation de AIF [185].

La protéine ICP0 du virus HSV-1 inhibe l'activité DNA-PK et induit une dégradation des DNA-PKcs dépendente du protéasome. La réplication du HSV est plus efficace dans les cellules déficientes en DNA-PKcs [186, 187]. Dans des cellules irradiées de glioblastome, la dégradation de DNA-PKcs par l'expression de ICP0 a conduit à une inhibition de la réparation de l'ADN, démontrée par la persistance de cassures double-brin après infection virale et irradiation [188].

Les protéines ATM et ATR (ataxia telangiectasia-mutated and Rad3-related) sont toutes deux rapidement activées après un dommage de l'ADN. ATR est activée après plusieurs variétés de lésions et phosphoryle de nombreux substrats pour inhiber la réplication de l'ADN, promouvoir la réparation de l'ADN ou l'apoptose [189, 190]. ATR interagit avec ATRIP (ATR interacting protein). Le complexe RPA (replication protein A) est un complexe qui lie les ADN simple-brin et est requis pour le recrutement d'ATR au site de la lésion de l'ADN, par stimulation de la liaison entre ATRIP et le brin d'ADN [190]. Il est démontré que le virus HSV-1 séquestre RPA loin des cassures double-brins cellulaires, dans des domaines VICE (virus-induced, chaperone-enriched). Ainsi, HSV-1 peut découpler ATRIP et ATR en redistribuant ATRIP vers les domaines VICE. Des plasmides d'expression ICP0 ont été utilisés pour transfecter des cellules Vero. ICP0 a été suffisant pour une redistribution d'ATRIP, mais non pour la redistribution de RPA [191]. Cette expression d'ICP0 a radiosensibilisé des cellules de glioblastome *in vitro* et *in vivo* [188, 192].

La voie de signalisation MAPK peut être modulée par la voie du récepteur à l'EGFR (epidermal growth factor receptor), et l'EGFR induit l'activation de facteurs de transcription à

travers différentes voies dont la voie PI3K-AKT et la voie RAS-RAF-MEK-ERK [193, 194]. Dans une étude récente, l'irradiation a augmenté l'expression génique dans des cellules colorectales HCT-116 et des cellules de cancers ORL. L'inhibition de MAPK/ERK et de PI3K (mais pas de p38MAPK) a réduit cette augmentation, suggérant un rôle important de ces voies dans l'expression des gènes viraux après irradiation. Dans cette même étude, des inhibiteurs de la réparation de l'ADN (inhibiteurs d'ATM, de DNA-PK et de PARP) ont majoré l'augmentation d'expression génique après irradiation. Cet effet a été dépendent de la voie de signalisation MAPK/ERK/Egr-1[66]. Dans une autre étude, un adénovirus contenant le gène NK4 (un antagoniste du facteur de croissance hépatocytaire) sous le contrôle du promoteur du CMV a été utilisé pour infecter des cellules cancéreuses pancréatiques. Une irradiation a induit une augmentation de l'expression génique. Des inhibiteurs de p38 ont diminué cet effet, suggérant le rôle de p38-MAPK dans la réponse aux radiations du promoteur du CMV [138]. Ces données suggèrent que différentes voies de signalisation sont impliquées dans les interactions entre virus et radiations, mais ces découvertes sont probablement dépendantes des lignées cellulaires.

Conclusion

Les thérapies virales ne seront peut-être pas largement utilisées en monothérapie. Cependant, l'association à une radiothérapie est particulièrement prometteuse. Les données précliniques montrent un avantage des combinaisons sur les monothérapies. Plusieurs mécanismes d'interactions ont été décrits. Une irradiation peut majorer l'entrée du virus dans la cellule, majorer l'expression génique et la réplication virale. Cependant, ces effets dépendent du modèle tumoral. Une vraie synergie pourrait aussi être liée à une radiosensibilisation par le virus, les virus pouvant interagir avec les voies de réponse aux

dommages de l'ADN et de leur réparation. Une meilleure connaissance de ces interactions devrait mener à des stratégies de thérapies virales innovantes impliquant des inhibiteurs de réparation de l'ADN. Des essais de phase I et II ont été publiés, des essais de phase III sont en cours. De futurs essais devront se baser sur les connaissances précliniques récentes, au mieux obtenues avec des modèles orthotopiques, et avec des virus modifiés pour optimiser les interactions avec la réponse aux dommages de l'ADN.

OBJECTIFS DU TRAVAIL

La radiothérapie externe est un traitement très efficace de nombreux cancers. La relation radiobiologique entre la dose d'irradiation et de contrôle tumoral est bien établie pour beaucoup de cancers solides, mais l'augmentation des doses d'irradiation est limitée par les toxicités aigues et tardives induites aux tissus sains. La radiovirothérapie est une méthode visant à surmonter cet obstacle en utilisant des virus comme vecteurs pour infecter les cellules cancéreuses et guider sélectivement dans les cellules infectées un traitement radioisotopique, induisant une irradiation sélective et conformationnelle. Les travaux dans ce domaine ont principalement porté sur le NIS qui peut guider l'absorption d'un certain nombre de radio-isotopes à des fins thérapeutiques et d'imagerie. La combinaison de virus et de radiothérapie peut avoir des propriétés anti-tumorales synergiques. Les rayonnements peuvent augmenter les propriétés cytotoxiques des virus, et les virus peuvent radiosensibiliser les tumeurs, par interaction avec les voies de réponse aux dommages de l'ADN [106].

En réponse aux dommages de l'ADN induits par les rayonnements ionisants, les voies de réponse à ces dommages et de réparation de l'ADN sont activées, ainsi que les points de contrôles du cycle cellulaire. L'arrêt du cycle cellulaire donne le temps à la cellule d'identifier les dommages de l'ADN et de tenter leur réparation. L'inhibition thérapeutique de ces voies de réparation est en voie de développement pour radiosensibiliser les tumeurs. L'équipe « Targeted Therapies » de l'Institute of Cancer Research a précédemment rapporté cette approche en utilisant un adénovirus non réplicatif codant le transgène NIS. L'équipe a démontré que l'irradiation externe augmente l'expression des transgènes viraux, et que cet effet dépend des dommages de l'ADN induits par l'irradiation. Il a été démontré que des inhibiteurs de la réparation de l'ADN ciblant ATM (ataxia-telangiectasia mutated), DNA-PK

(DNA-dependent protein kinase) et PARP (poly(ADP-ribose) polymerase) augmente l'expression des transgènes viraux [66]. De plus, ces inhibiteurs augmentent l'effet thérapeutique d'un traitement radioisotopique par ^{131}I guidé par l'adénovirus, associé à une radiothérapie externe *in vivo* [70]. Cependant, l'utilisation d'un virus non réplicatif n'exploite pas le potentiel thérapeutique des virus oncolytiques. Les deux caractéristiques principales des virus oncolytiques sont:1) ils sont capable de se répliquer sélectivement dans les cellules cancéreuses, et 2) ils ont une toxicité sélective pour les cellules cancéreuses. L'utilisation de ces virus est une progression logique du travail de cette équipe.

Le virus de la rougeole est un morbillivirus de la famille des paramyxoviridae. C'est un virus enveloppé à ARN simple brin de polarité négative. Des propriétés oncolytiques ont été décrites avec des souches atténuées du virus, dérivées de la souche vaccinale d'Edmonston. Les souches sauvages se lient préférentiellement au récepteur cellulaire CD150 ou SLAM (Signaling Lymphocyte-Activation Molecule), exprimé à la surface des lympocytes B, T, et des macrophages. Les souches atténuées se lient préférentiellement au récepteur CD46, qui est surexprimé à la surface des cellules cancéreuses, expliquant en partie la sélectivité du virus pour les cellules cancéreuses [86]. Récemment, la protéine PVLR4 (nectine 4) a été identifiée comme un récepteur utilisé par le virus. PVLR4 est fortement exprimé à la surface de nombreuses lignées de cellules cancéreuses, expliquant encore la sélectivité du virus pour les cellules cancéreuses [77]. MV-NIS a été évalué *in vitro* et *in vivo* en radiovirothérapie dans des modèles de gliome [195], myélome [107], cancers de prostate [48] et cancers pancréatiques [36]. MV-NIS est donc un bon candidat pour être le vecteur oncolytique d'une stratégie de radiovirothérapie associée à une radiothérapie externe et des agents radiosensibilisants. La protéine Checkpoint kinase 1 (Chk-1) est activée en réponse aux dommages de l'ADN. Chk1 est principalement responsable de l'arrêt du cycle cellulaire en

G2/M mais peut également arrêter le cycle en phase S. SAR-020106 est un nouvel inhibiteur de Chk-1, compétitif avec l'ATP. Une étude récente a démontré que SAR-020106 potentialise l'effet antitumoral de la gemcitabine et de l'irinotécan dans des modèles de cancer colorectal [196]. SAR-020106 est donc un bon candidat pour l'approche thérapeutique de ce travail.

Dans cette thèse, nous décrivons la combinaison thérapeutique de MV-NIS, d'un traitement par ^{131}I guidé par l'infection virale, d'une radiothérapie externe et d'une inhibition de Chk-1 par SAR-020106, dans des modèles de cancer ORL et colorectal.

MATERIEL ET METHODES

Lignées cellulaires

Les cellules HN-3, HN-5 et PJ-41 (toutes des lignées de cancer ORL) et les cellules HCT-116 (cancer colorectal) ont été mises en culture dans un incubateur humidifié à 37°C avec 5% de CO_2, dans du DMEM contenant 5% de sérum de veau fœtal (v/v), 1% de glutamine (v/v) et 0.5% de pénicilline /streptomycine (v/v).

Virus et inhibiteur de Chk1 (SAR-020106)

MV-NIS et MV-GFP ont été produits dans la Vector Production Facility de la Mayo Clinic (Rochester, MN), comme précédemment décrit [107]. Les titrations virales ont été déterminées par comptage de plages de lyse sur des cellules Vero (Health Protection Agency Culture Collection). SAR-020106 a été produit à l'Institute of Cancer Research (London UK), comme décrit précédemment[196].

Irradiation

Les cellules ont été irradiées par un générateur de rayons X Pantak H.F. 320 kv. La dose d'irradiation a été contrôlée par un dosimètre de rayons X de type Farmer Mk.2/S3. Le débit de dose a été de 0.6 à 0.64 Gy/min, à 240 kVp et 10 mA. Les cellules ont été irradiées dans des flasques de 25 cm3 (BD Biosciences) ou des plaques 6, 24 (BD Labware), ou 96 puits (Nunc).

Effet cytopathique et expression de GFP *in vitro*

Les cellules ont été ensemencées dans des plaques 6 puits, à une densité de 10^6 cellules par puits. Après 24 heures, les cellules ont été traitées par MV-GFP à une MOI

(multiplicity of infection) de 1. L'effet cytopathique a été observé à 48 heures. L'expression du transgène codant pour la GFP a été observée par microscopie de fluorescence.

Cytotoxicité *in vitro*

Essais 3-(4,5-Dimethyl-thiazol-2yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium (MTS)

Les cellules ont été ensemencées dans des plaques à 96 puits à une densité de 1.5×10^3 cellules par puit. Après 24 heures, les cellules ont été traitées avec des doses connues de virus et/ou d'irradiation. En cas de combinaison, les cellules ont été infectées 24 heures avant irradiation, 24 heures après irradiation, ou immédiatement après irradiation. Après différentes périodes d'incubation, la viabilité cellulaire a été quantifiée à l'aide de la solution CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay reagent 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2*H*-tetrazolium (MTS, Promega) selon les instructions du producteur. Vingt microlitres de MTS ont été ajoutés dans chaque puits. Après une incubation de 4 heures à 37 °C, le milieu de culture a été aspiré, remplacé par 200 µl de DMSO pendant 30 minutes. Ensuite, l'absorbance a été mesurée à 490 nm à l'aide d'un lecteur SPECTRAmax 384 (Molecular Devices, Downington, USA). La survie cellulaire a été calculée en pourcentage comparativement avec des cellules non traitées. Chaque expérience a été répétée au moins 5 fois.

Essais clonogéniques

Pour les expériences impliquant une infection virale ou une irradiation externe, 10^6 cellules ont été ensemencées dans des flasques de 25 cm^3, puis infectées et/ou irradiées 24 heures plus tard. En cas de combinaison d'infection virale et de radiothérapie externe, les cellules ont été infectées immédiatement après l'irradiation.. Le traitement radioisotopique

(50 µCi de $Na^{131}I$ (Perkin Elmer) dans 2 ml de Hank's buffered salt solution (HBSS)) a été réalisé 48 heures après l'infection virale. Les cellules ont été incubées à 37 °C pendant 60 minutes et ensuite lavées deux fois avec du HBSS conservé dans la glace. Pour les expériences avec inhibition de Chk-1, SAR-020106 a été ajouté au milieu de culture pour une concentration finale de 0.1µM, 1 heure avant l'irradiation externe. En cas de traitement radioisotopque, SAR-020106 a été ajouté au milieu de culture 1 heure avant le traitement par ^{131}I et dans le milieu de culture des cellules ensemencées à densités clonogéniques. Dans tous les cas, 48 heures après l'infection virale et/ou irradiation externe, immédiatement après traitement radio-isotopique le cas échéant, les cellules ont été trypsinisées et ensemencées dans des plaques 6 puits à densités clonogéniques (2500, 1000, 500, 250, 100 et 50 cellules par puits). Dix à quinze jours plus tard, les plaques ont été fixées et colorées dans une solution à 0.2% de cristal violet et 7% d'éthanol, et le nombre total de colonies a été compté. La survie cellulaire a été estimée par normalisation par rapport aux puits de cellules non traitées.

Essai de captation d' ^{125}I.

Les cellules ont été ensemencées dans des plaques 24 puits, à une densité de 10^5 cellules par puits, et infectées 24 h plus tard avec MV-NIS à une MOI de 1. Après 24 ou 48 heures, les cellules ont été traitées avec 200 µL de HBSS contenant du $Na^{125}I$ avec une activité de 1 µCi/mL. Le perchlorate de potassium ($KClO_4$) a été ajouté à une concentration de 50 µM dans des puits témoins. Les cellules ont été incubées à 37°C pendant 60 minutes et ensuite lavées deux fois avec du HBSS conservé dans la glace. L'iode capté par les cellules a été libéré après destruction des cellules incubées 20 minutes dans une solution à 1 M de NaOH. La radioactivité a été mesurée dans un compteur gamma (Beckman Coulter) La radioactivité par cellule a été estimée en comptant simultanément les cellules de plaques traitées identiquement par infection virale et /ou radiothérapie mais non traitées par ^{125}I.

Réplication virale

Les titres de MV-NIS dans les cellules infectées (avec ou sans radiothérapie externe) ont été déterminés. Les cellules ont été ensemencées dans des plaques 24 puits à une densité de 10^5 cellules par puits et infectées 24 heures plus tard par MV-NIS à une MOI de 1. Les cellules ont été récupérées avec le surnageant à 24, 48, 72 et 96 heures après l'infection. Les virus ont été libérés par deux cycles de congélation et chaleur. Les titres ont été déterminés sur des cellules Vero par méthode de dilution et détermination de la $TCID_{50}$ [197].

Cytométrie de flux pour expression de CD46

Un million de cellules ont été ensemencées dans des flasques de culture cellulaire de 25 cm^2. Après 24 heures, les cellules ont été irradiées, (0, 2, 4 ou 8 Gy). Les cellules ont été trypsinisées soit avant l'irradiation, soit 4, 24 et 48 heures après l'irradiation. Elles ont ensuite été lavées dans du PBS conservé dans la glace et contenant 1% de sérum de veau fœtal et albumine de sérum bovin. Elles ont été incubées 1 heure dans 100 μL (dilution 1:100) d'un anticorps murin anti-CD46 humain ou son isotype témoin IgG2a κ (BD Pharmingen). Les cellules ont ensuite été lavées trois fois dans le PBS contenant 1% FBS et BSA, puis incubées avec un anticorps de chèvre anti-souris marqué au FITC (dilution 1:200). Les cellules ont ensuite été lavées trois fois comme précédemment, fixées dans l'éthanol à 70%, et analysées par un cytomètre de flux BD FacsCalibur.

Activité caspasique

L'activité caspasique a été déterminée par l'essai Caspase-Glo® 3/7 (Promega), selon les modalités du manuel d'instruction. En bref, les cellules ont été ensemencées dans des plaques 96 puits, 1.5×10^3 cellules par puits, avec 100 μL de milieu de culture dans

chaque puits. Après 24 heures, les cellules ont été infectées avec MV-NIS à différentes MOI (0, 0.1, 1) et/ou traitées avec SAR-020106 à une concentration finale de 0.1 μM. En cas d'association de MV-NIS et SAR-020106, SAR-020106 a été ajouté au milieu de culture 1 heure avant l'infection virale. Soixante-douze heures après le traitement, 100 μL de réactif Caspase-Glo® ont été ajoutés dans les puits et les plaques ont été incubées 30 minutes à température ambiante. La luminescence de chaque puits a été mesurée par un luminomètre (Perkin Elmer).

L'activité caspasique a également été étudiée par western blot. Les cellules ont été ensemencées dans des boites de 6 cm à une densité de 10^6 cellules par boite. Après 24 heures, les cellules ont été traitées par MV-NIS à différentes MOI (0, 0.1 ou 1) et/ou traitées avec SAR-020106 à une concentration finale de 0.1 μM. En cas d'association de MV-NIS et SAR-020106, SAR-020106 a été ajouté au milieu de culture 1 heure avant l'infection virale. Après 48 heures, les cellules ont été lavées deux fois dans du PBS et transférées dans du tampon de lyse supplémenté en inhibiteurs de protéases (10 μg/ml TLCK, 1 mM PMSF et une dilution au 1:100 du protease inhibitor cocktail I (Sigma-Aldrich, Gillingham, UK)). Les lysats ont été chargés sur des gels NuPage Novex Bis-Tris gels (Invitrogen, Paisley, UK). Les protéines ont été transférées sur des membranes en polyfluorure de vinylidène et marquées avec des anticorps de lapin anti-caspase 3 (Cell Signalling Technology, Danvers, USA). L'incubation avec l'anticorps primaire a été suivie d'une incubation avec l'anticorps de chèvre anti-lapin (Santa Cruz Biotechnology, Santa-Cruz, USA). Les membranes ont été révélées grâce au SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce, Perbio, Aalst, Belgium), en suivant les procédures du manuel d'instruction. Des anticorps murins anti-tubuline ont été utilisés pour le témoin de protéine de structure (Sigma-Aldrich, Gillingham, UK).

Expression génique *in vivo*

Les xénogreffes tumorales ont été établies en injectant 10^6 cellules HCT-116 par voie sous-cutanée dans le flanc droit de souris femelles nude CD1 de 6 semaines. Après 2 semaines, les souris avec des tumeurs de 5 à 8 mm de diamètre ont reçu une injection intratumorale de 5×10^6 plaque-forming units (PFU) de MV-GFP. L'expression de GFP a été quantifiée en imagerie de fluorescence par IVIS system 200 series (Xenogen Biosciences) avant injection virale et à différents moments. Le logiciel Xenogen donne une imagerie de localisation de fluorescence en superposant le signal de fluorescence avec une photographie de l'animal pris immédiatement avant l'imagerie de fluorescence.

Activité antitumorale *in vivo*

Les xénogreffes tumorales HCT-116 et HN-5 ont été établies comme décrit ci-dessus. Les animaux ont été anesthésiés par injection intrapéritonéale de 100 µl d'un mélange 1:1:4 d'hypnorm (fentanyl citrate 0.315 mg/ml, fluanisone 10 mg/ml; Janssen-Cilag, High Wycombe, UK), d'hypnovel (midazolam 5 mg/ml; Roche Products, Welwyn Garden City, UK) et d'eau (Fresenius Health Care Group, Basingstoke, UK). Les souris ont été placées dans la chambre d'irradiation, sous une protection de plomb de 3 mm d'épaisseur et perforée pour n'exposer que la tumeur. Une irradiation localisée (0 or 8 Gy) a été délivrée en utilisant l'appareil Pantak H.F. 320 kV. En fonction des groupes, les souris ont été traitées par injections intratumorales de MV-NIS (1.5×10^6 $TCID_{50}$ dans 100 µL) à J1 (immédiatement après irradiation le cas-échéant) et à J4. Les injections intrapéritoneales de ^{131}I (1 mCi dans 100 µL) ou de PBS ont été réalisées à J7, et les injections intrapéritonéales de SAR-020106 ou de PBS ont été réalisées 1 heure avant la radiothérapie externe et 1 heure avant le traitement par ^{131}I. La dose de SAR-020106 a été de 30 mg/kg, dissoute dans 50 µL d'une

solution comprenant 75% de PBS et 25% de DMSO. De l'iodure de potassium a été ajouté à l'eau de boisson des animaux avant le traitement par ^{131}I, afin de réduire la captation de ^{131}I par les tissus normaux. Les tumeurs ont été mesurées avant traitement puis 2 à 3 fois par semaine. Les souris ont été sacrifiées quand les tumeurs mesuraient plus de 1.5 cm de plus grand diamètre. Les expériences ont été terminées après 10 semaines.

Statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées en utilisant le logiciel Graphpad prism (version 5.0c). Le test de student, apparié ou non, a été effectué pour les comparaisons de données paramétriques. Les analyses de variance (ANOVA) avec correction de Bonferroni ont été réalisées pour les comparaisons de multiples groupes. Les analyses de courbes de survie ont été réalisées par le test Mantel-Cox log-rank.

RESULTATS

Effet cytopathique *in vitro*, réplication virale et expression transgénique, *in vitro*

L'effet cytopathique a été observé en infectant les différentes lignées cellulaires avec le virus MV-GFP. Quarante huit heures après infection virale, l'effet cytopathique a été caractérisé par la formation de larges syncitia multinucléés. La superposition avec l'image en microscopie de fluorescence atteste de l'expression du transgène viral de la GFP dans les syncitia **(figure 5).** La capacité de MV-NIS à tuer les cellules cancéreuses a été évaluée par des tests au MTS. Les résultats de cette toxicité sont présentés en fonction de MOI utilisée avec analyse 120 heures après l'infection **(Figure 6a),** et en fonction du temps entre 24 et 120 heures **(Figure 6b)**. Les cellules HN5 ont été relativement résistantes à MV-NIS. Les courbes de réplication virale ont montré la capacité du virus à se répliquer dans toutes les lignées cellulaires testées **(Figure 6c)**. Un pic de réplication a été observé 48 heures après l'infection, indépendamment de la sensibilité de la lignée à la toxicité du virus. La réplication est restée stable entre 48 et 96 heures, sauf dans la lignée PJ41 dans laquelle la réplication chute rapidement, probablement en raison de la toxicité du virus dans cette lignée cellulaire sensible à l'infection.

L'expression du transgène NIS a été évaluée par essais de captation de ^{125}I, 24 et 48 heures après infection par MV-NIS. Les cellules HN-3, HN-5, PJ-41 et HCT-116 ont toutes été capables de concentrer le ^{125}I. Cet effet a prédominé après 48 heures, et a été partiellement aboli par l'addition de perchlorate de potassium, confirmant qu'il est lié à l'expression fonctionnelle du NIS dans les cellules **(Figure 6d).**

Figure 5. L'effet cytopathique de MV-GFP a été observé en infectant les lignées cellulaires HCT-116, HN-5, HN-3 et PJ-41. Quarante huit heures après infection virale, l'effet cytopathique a été caractérisé par la formation de larges syncitia multinucléés. La superposition avec l'image en microscopie de fluorescence atteste de l'expression du transgène viral de la GFP dans les syncitia.

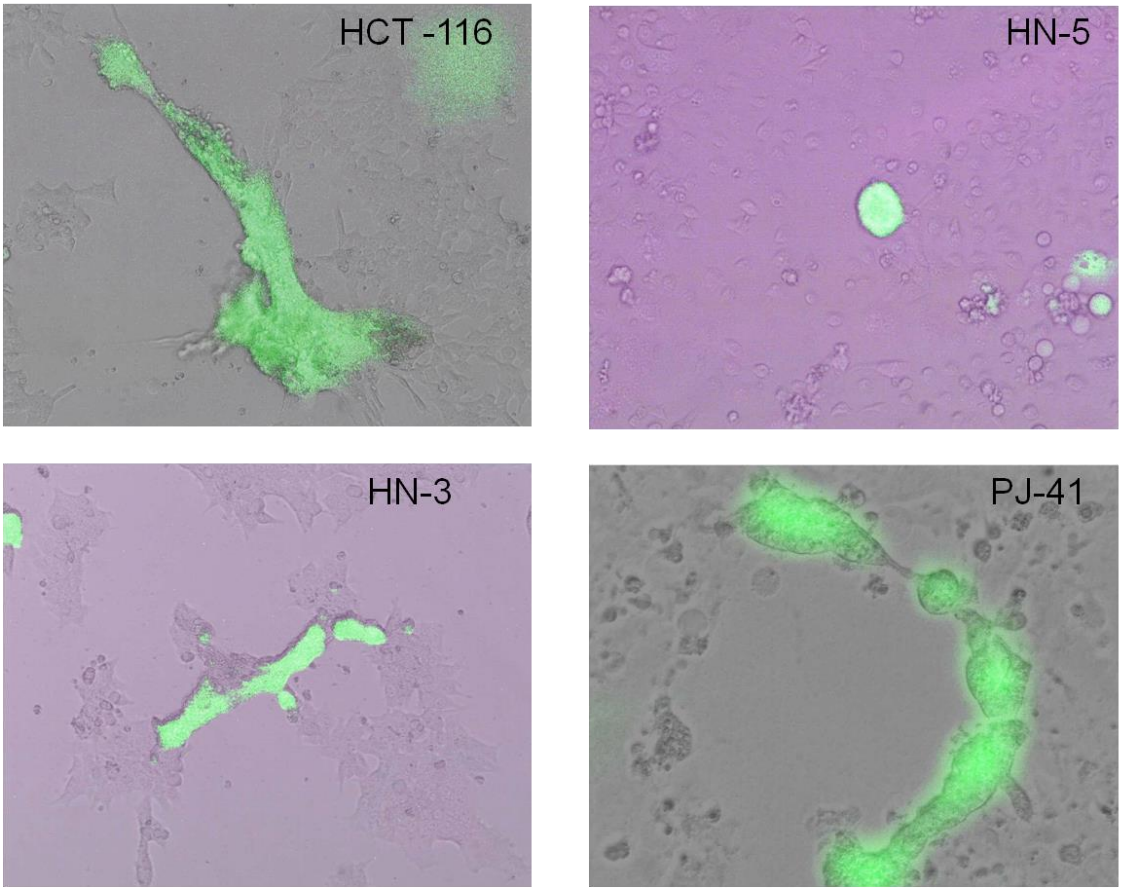
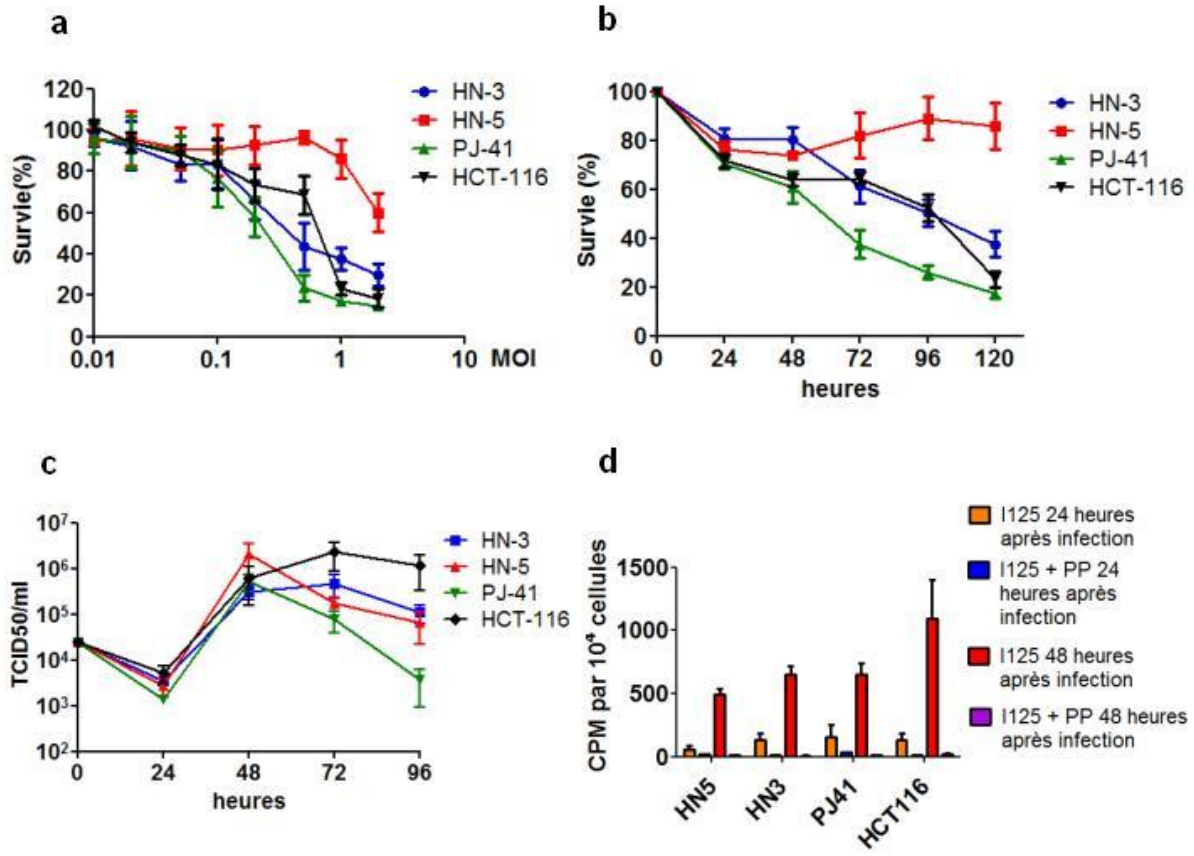


Figure 6. La capacité de MV-NIS à tuer les cellules cancéreuses a été évaluée par des tests au MTS. Les résultats de cette toxicité sont présentés en fonction de la MOI utilisée avec analyse 120 heures après l'infection **(figure 6a),** et en fonction du temps entre 24 et 120 heures **(figure 6b)**. Les courbes de réplication virale ont montré la capacité du virus à se répliquer dans toutes les lignées cellulaires testées **(figure 6c).** L'expression du transgène NIS a été évaluée par essais de captation de ^{125}I, 24 et 48 heures après infection par MV-NIS **(figure 6d).**

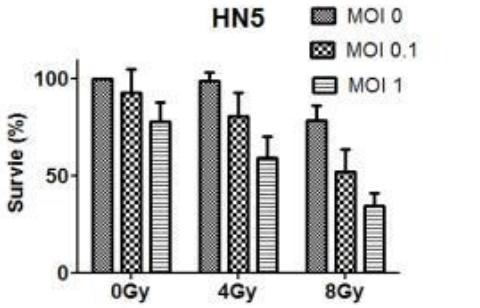


Effet thérapeutique de l'association de MV-NIS et de radiothérapie externe

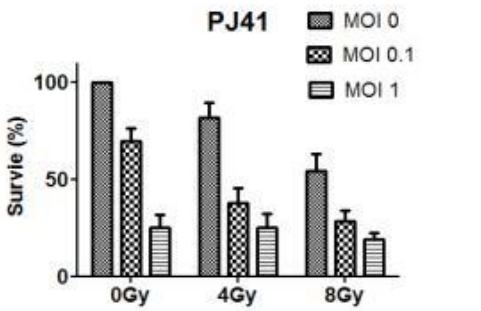
La combinaison de radiothérapie externe et de MV-NIS a d'abord été étudiée par test MTS. Les cellules ont été traitées avec 3 doses de MV-NIS (MOI 0, 0.1 ou 1) et 3 doses de radiothérapie concomitante (0, 4 ou 8 Gy). L'irradiation a eu une toxicité dose-dépendante dans toutes les lignées cellulaires, avec des niveaux variables de radiosensibilité en fonction des lignées cellulaires. Les interactions médicamenteuses ont été évaluées par le test d'indépendance de Bliss. Brièvement, ce test évalue l'effet d'une combinaison de deux traitements. Soit F1 l'effet du traitement 1, F2 l'effet du traitement 2, F1+2 l'effet de la combinaison. L'additivité des traitements est défini par F1+2=F1+F2-F1*F2. Si l'effet observé est supérieur à la valeur d'additivité attendue, l'effet est synergique. Si l'effet observé est inférieur, l'effet est antagoniste [198]. Dans la lignée HN-5, MV-NIS et l'irradiation externe ont eu des effets synergiques à 4 et 8 Gy d'irradiation, et à des MOI de 0.1 et 1. Dans la lignée HN-3, une synergie a été observée à une dose d'irradiation de 4 Gy et un effet additif a été observé à une dose de 8 GY, pour les MOIs de 0.1 et 1. Dans les cellules PJ-41, une synergie a été observée à une MOI de 0.1 et un effet additif à une MOI de 1, à 4 et 8 Gy. A l'inverse, dans la lignée HCT-116, l'interaction a été antagoniste. Cet effet est cependant probablement à la grande sensibilité de cette lignée à l'infection virale seule et à la radiothérapie seule (**Figure 7**).

L'effet thérapeutique *in vitro* a de plus été étudié par essais clonogéniques. Les cellules ont été traitées par MV-NIS (MOI 0.1) et une radiothérapie externe concomitante (0, 1, 2 ou 4 Gy en une fraction unique). La radiothérapie seule a eu une toxicité dose-dépendante. Dans la plupart des conditions, l'association de MV-NIS et de radiothérapie externe a été synergique (pour HN-5) ou additive (pour HN-3, PJ-41 et HCT-116) **(Figure 8).**

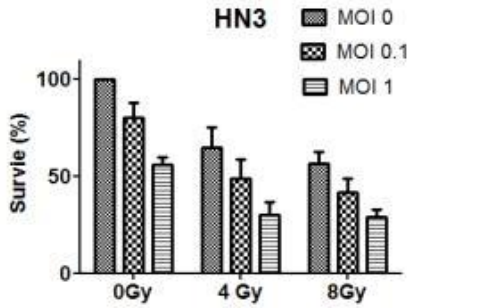
Figure 7. Association thérapeutique *in vitro* de MV-NIS et de radiothérapie externe (RE). La toxicité a été évaluée par tests au MTS. L'effet de l'association thérapeutique a été évalué par le test d'indépendance de Bliss. Si l'intervalle observé des valeurs de l'index de Bliss contient 0, l'effet est additif (jaune). Si cet intervalle est entièrement au dessus de 0, l'effet est synergique (vert). Si cet intervalle est entièrement au dessous de 0, l'effet est antagoniste (rouge).



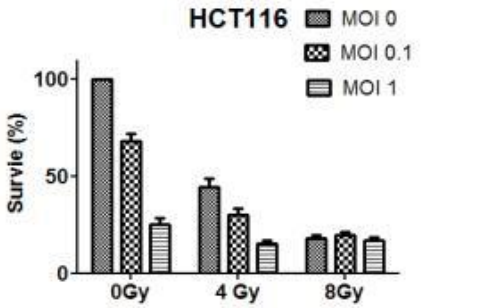
Bliss HN-5	MOI 0.1	MOI 1
RE 4 Gy	0.11 [0.05 to 0.21]	0.17 [0.13 to 0.25]
RE 8 Gy	0.21 [0.14 to 0.34]	0.26 [0.15 to 0.44]



Bliss PJ(41	MOI 0.1	MOI 1
RE 4 Gy	0.28 [0.20 to 0.41]	0.01 [-0.04 to 0.11]
RE 8 Gy	0.09 [0.03 to 0.20]	-0.05 [-0.08 to 0.01]

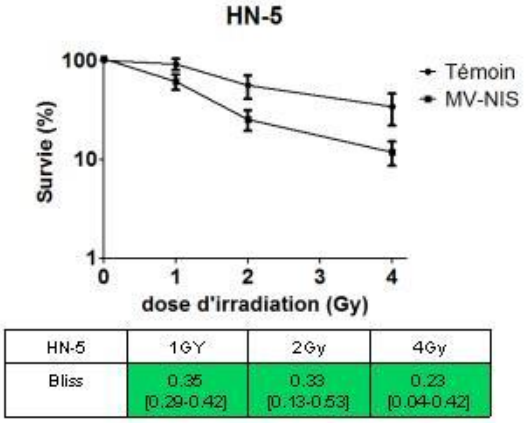


Bliss HN-3	0.1	1
RE 4 Gy	0.10 [0.01 to 0.26]	0.07 [0.004 to 0.17]
RE 8 Gy	0.03 [-0.01 to 0.10]	0.01 [-0.008 to 0.05]

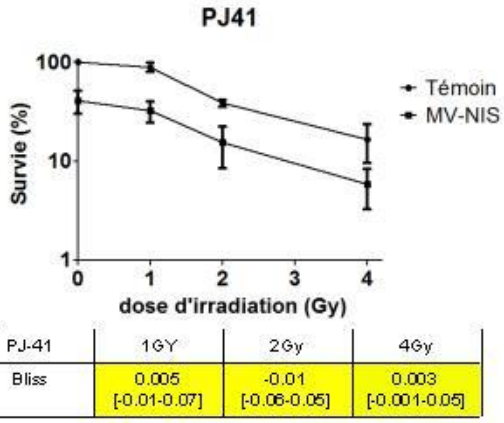


Bliss HCT-116	MOI 0.1	MOI 1
RE 4 Gy	-0.002 [-0.03 to 0.04]	-0.04 [-0.004 to -0.05]
RE 8 Gy	-0.07 [-0.09 to -0.06]	-0.12 [-0.14 to -0.11]

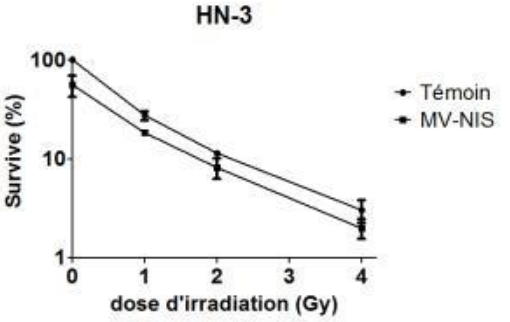
Figure 8. Association thérapeutique *in vitro* de MV-NIS et de radiothérapie externe (RE). La toxicité a été évaluée par tests clonogéniques. L'effet de l'association thérapeutique a été évalué par le test d'indépendance de Bliss. Si l'intervalle observé des valeurs de l'index de Bliss contient 0, l'effet est additif (jaune). Si cet intervalle est entièrement au dessus de 0, l'effet est synergique (vert). Si cet intervalle est entièrement au dessous de 0, l'effet est antagoniste (rouge).



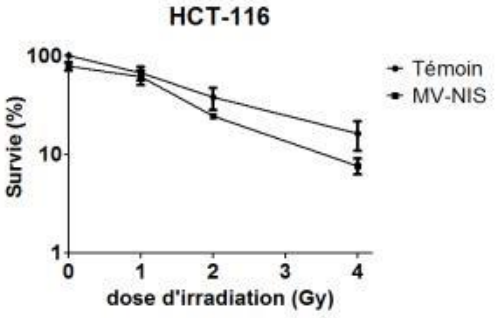
HN-5	1GY	2Gy	4Gy
Bliss	0.35 [0.29-0.42]	0.33 [0.13-0.53]	0.23 [0.04-0.42]



PJ-41	1GY	2Gy	4Gy
Bliss	0.005 [-0.01-0.07]	-0.01 [-0.06-0.05]	0.003 [-0.001-0.05]



HN-3	1GY	2Gy	4Gy
Bliss	-0.046 [-0.11-0.04]	-0.027 [-0.028 -0.021]	-0.005 [-0.007-0.003]



HCT-116	1GY	2Gy	4Gy
Bliss	-0.08 [-0.12-0.01]	0.05 [-0.09-0.25]	0.05 [-0.01-0.15]

En fonction des lignées cellulaires et des virus utilisés, il a été démontré qu'une radiothérapie externe peut augmenter l'expression des récepteurs cellulaires pour le virus, augmenter la réplication virale, ou l'expression des gènes viraux. L'effet de l'irradiation sur ces paramètres a été évalué dans les lignées cellulaires HN-3, HN-5, PJ-41 et HCT-116.

L'expression du récepteur CD46 sur les cellules cancéreuses a été évaluée en cytométrie de flux, avec la démonstration de l'expression de CD46 dans toutes ces lignées cellulaires. L'effet de l'irradiation (0, 1, 2, 4 et 8 Gy) a été étudié avant irradiation, et 4, 24 et 48 heures après irradiation. L'irradiation n'a pas eu d'effet sur l'expression de CD46. **(Figure 9).**

L'effet de l'irradiation sur la réplication a également été étudié. Les cellules ont été infectées et irradiées (0, 4 ou 8 Gy) avec 3 séquences différentes (infection 24 heures avant irradiation, infection 24 heures après irradiation, ou traitement concomitant). Quelque soit la dose d'irradiation ou la séquence thérapeutique, l'irradiation n'a pas eu d'effet significatif sur la réplication virale **(Figure 10).**

L'effet de l'irradiation sur l'expression du transgène NIS a été évalué par étude de captation d'iode. Comme précédemment, les cellules ont été infectées et irradiées (0, 4 ou 8 Gy) avec 3 séquences différentes (infection 24 heures avant irradiation, infection 24 heures après irradiation, ou traitement concomitant). La captation d'iode a été étudiée 48 heures après infection. La radiothérapie externe a permis d'augmenter significativement l'expression du NIS dans les cellules infectées de manière concomitante à la radiothérapie **(Figure 11).** Comme témoin d'un agent toxique pour l'ADN, l'irradiation a été remplacée par un traitement par cisplatine à différentes concentration (0, 1 ou 5μM), avec traitement concomitant de l'infection par MV-NIS. Dans les lignées HN-3, HN-5 et HCT-116, le traitement par cisplatine a augmenté significativement l'expression fonctionnelle du NIS (**figure 12**).

Figure 9. La radiothérapie externe n'augmente pas l'expression du récepteur cellulaire CD46. Les cellules HN-3, HN-5, PJ-41 et HCT-116 ont été irradiées à 5 doses différents (0, 1, 2, 4 et 8 Gy). L'expression de CD46 a été évaluée par cytométrie de flux 4 heures, 24 heures et 48 heures après l'irradiation.

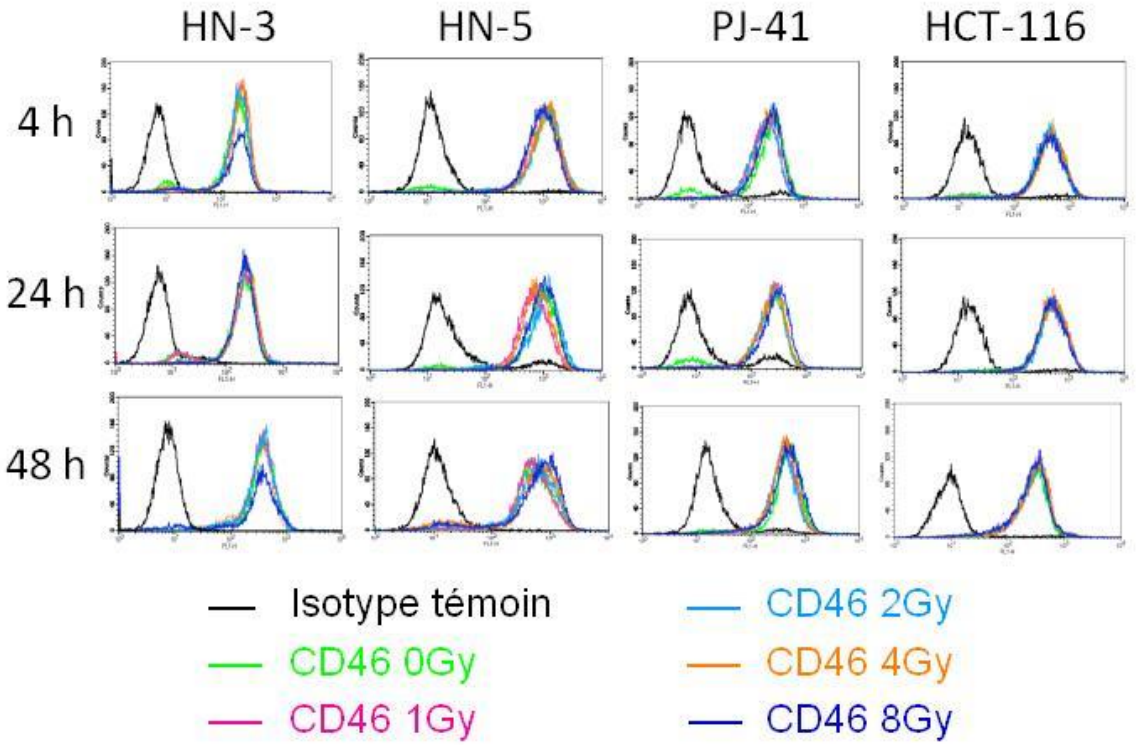


Figure 10. La radiothérapie externe (RE) n'augmente pas la réplication virale. Pour réaliser les courbes de réplication virale, les cellules HN-3, HN-5, PJ-41 et HCT-116 ont été infectées par MV-NIS à une MOI de 1, et irradiées à 3 doses différentes (0, 4 et 8 Gy), selon 3 séquences différents (traitement concomitant, MV-NIS 24 heures avant l'irradiation, ou irradiation 24 heures avant l'infection).

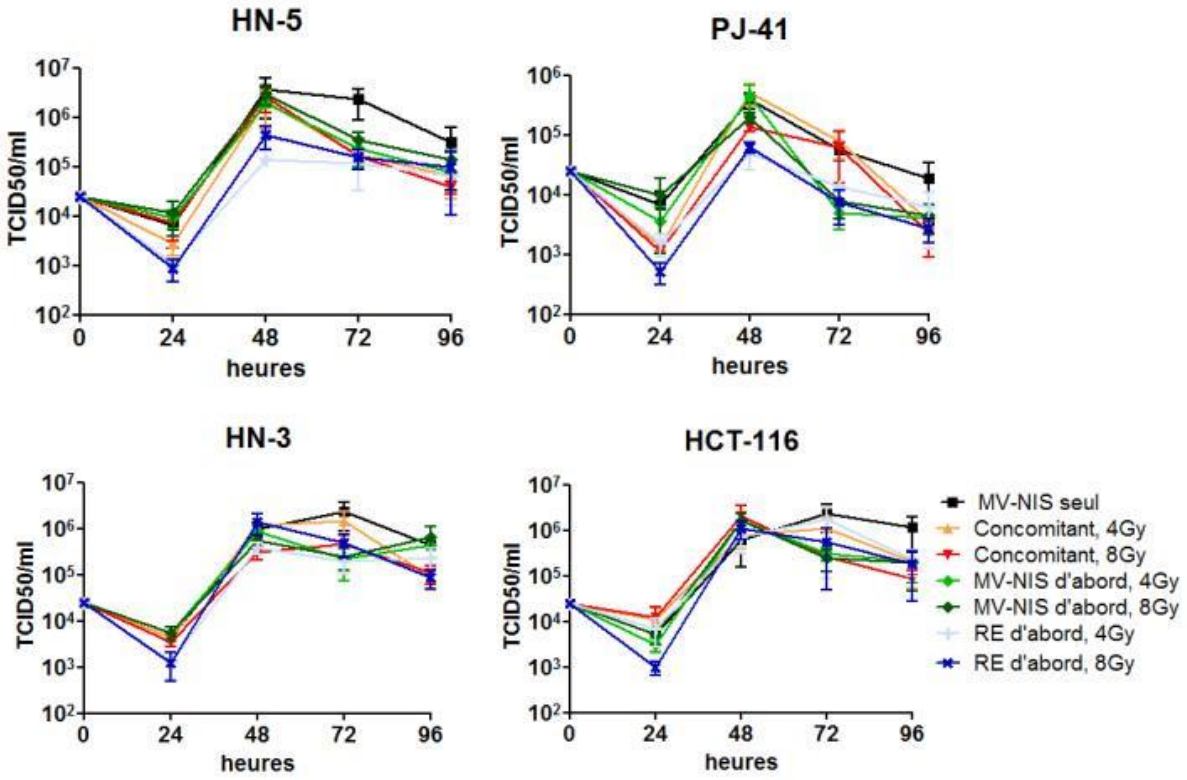


Figure 11. La radiothérapie externe (RE) augmente l'expression fonctionnelle du transgène NIS. L'expression du transgène NIS a été évaluée par essais de captation de ^{125}I, 48 heures après infection par MV-NIS. Les cellules HN-5, HN-3, PJ-41 et HCT-116 ont été infectées par MV-NIS et irradiées à 3 doses différentes (0, 4 et 8 Gy), selon 3 séquences différentes (traitement concomitant, MV-NIS 24 heures avant l'irradiation, ou irradiation 24 heures avant l'infection).
*P value <0.05

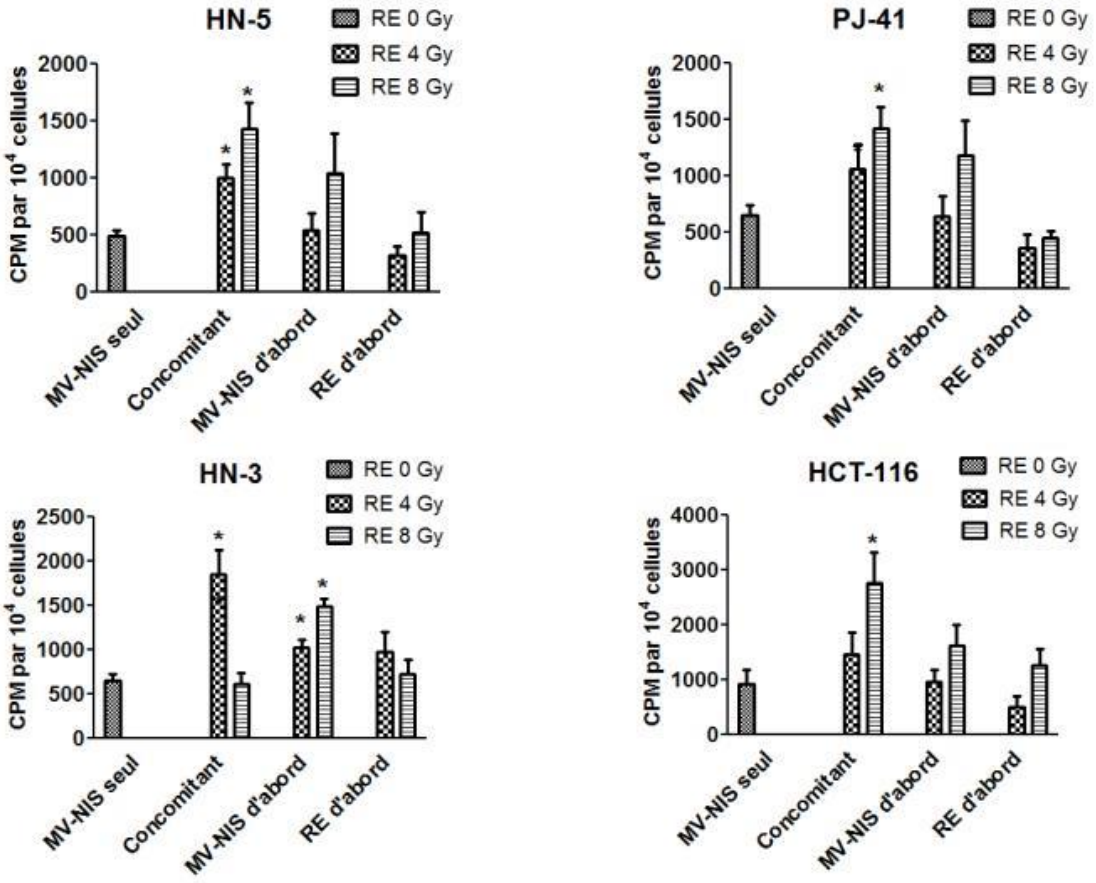
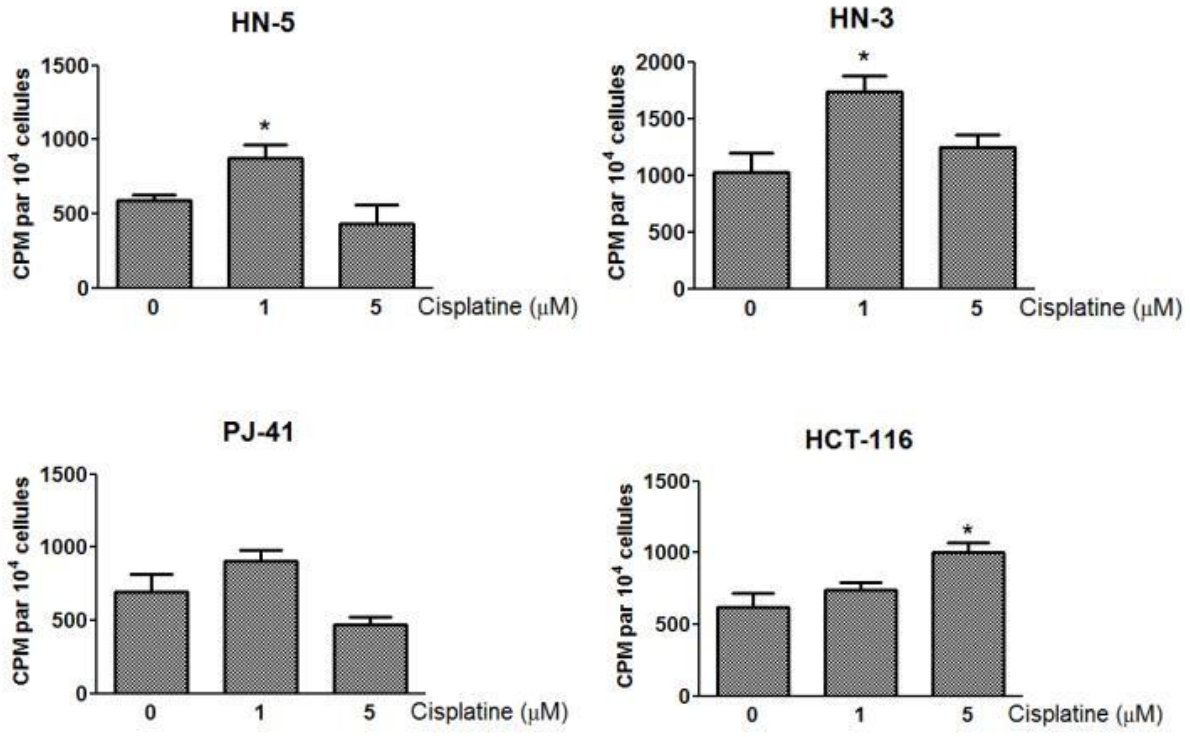


Figure 12. Un traitement par cisplatine peut augmenter l'expression fonctionnelle du transgène NIS. Les cellules HN-5, HN-3, PJ-41 et HCT-116 ont été traitées par cisplatine à différentes concentrations (0, 1 ou 5 μM), avec traitement concomitant de l'infection par MV-NIS.
*P value <0.05

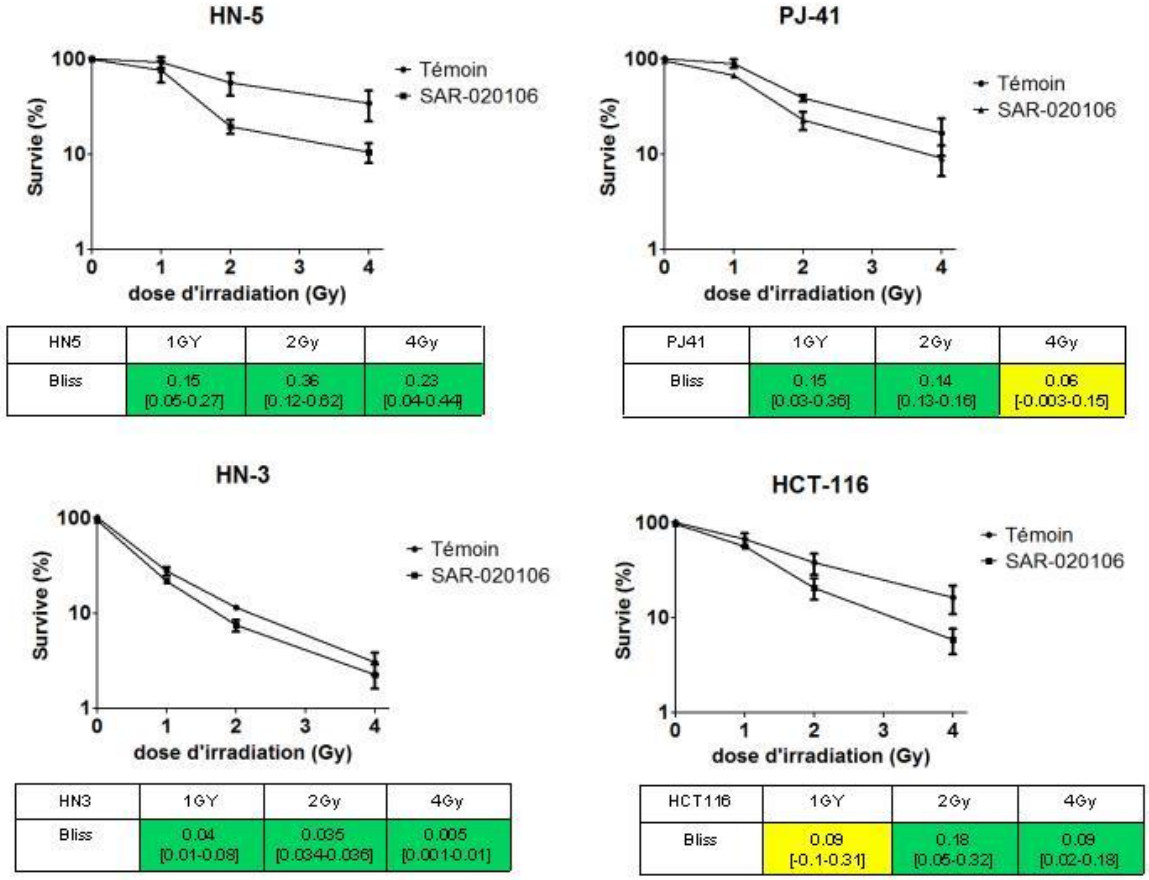


Association de SAR-020106 avec radiothérapie externe ou thérapie virale, in vitro

L'activité antitumorale de SAR-020106, inhibiteur sélectif de Chk-1, en association avec la radiothérapie externe ou MV-NIS, a été étudiée par essais clonogéniques. Les cellules ont été traitées par SAR-020106 à une concentration de 0.1 μM, en association avec 4 doses d'irradiation (0, 1, 2 ou 4 Gy). La radiothérapie externe et SAR-020106 ont eu des antitumorales synergiques dans les 4 lignées cellulaires (HN-3, HN-5, PJ-41 et HCT-116) **(Figure 13)**.

Les cellules ont également été traitées par SAR-020106 à une concentration de 0.1 μM, en association à MV-NIS à une MOI de 0.1. Dans la lignée cellulaire HN-5, MV-NIS et SAR-020106 n'ont pas eu d'effet cytotoxique en monothérapie. En revanche, l'association a eu un effet antitumoral significatif ($P<0.05$, ANOVA avec test de Bonferonni pour comparaisons multiples) **(Figure 14a)**. Dans la lignée HCT-116, MV-NIS a eu un effet antitumoral significatif, l'association avec SAR-020106 n'a pas été significativement supérieure. Pour étudier les mécanismes de l'effet antitumoral de l'association de MV-NIS et de SAR-020106, l'induction de l'apoptose a été étudiée par Caspase-Glo® 3/7 assay. SAR-020106 a significativement augmenté l'activité caspase 3/7 induite par l'infection virale, dans la lignée HN-5 pour des infections à MOI de 0.1 et 1 ($P = 0.03$ et 0.04, respectivement), et dans la lignée HCT-116 pour des infections à MOI de 1 ($P = 0.02$) **(Figure 14b)**. L'effet sur l'activité de la caspase-3 a de plus été étudié par western blot. Pour des infections à MOI de 1, il y a eu une augmentation dans l'activité de la caspase-3 en cas d'association de MV-NIS et de SAR-020106, par rapport à MV-NIS ou SAR-020106 seul **(Figure 14c)**.

Figure 13. Association thérapeutique *in vitro* de radiothérapie externe (0, 1, 2 ou 4 Gy) et de SAR-020106 (0 ou 0.1µM). La toxicité a été évaluée par tests clonogéniques. L'effet de l'association thérapeutique a été évalué par le test d'indépendance de Bliss. Si l'intervalle observé des valeurs de l'index de Bliss contient 0, l'effet est additif (jaune). Si cet intervalle est entièrement au dessus de 0, l'effet est synergique (vert). Si cet intervalle est entièrement au dessous de 0, l'effet est antagoniste.



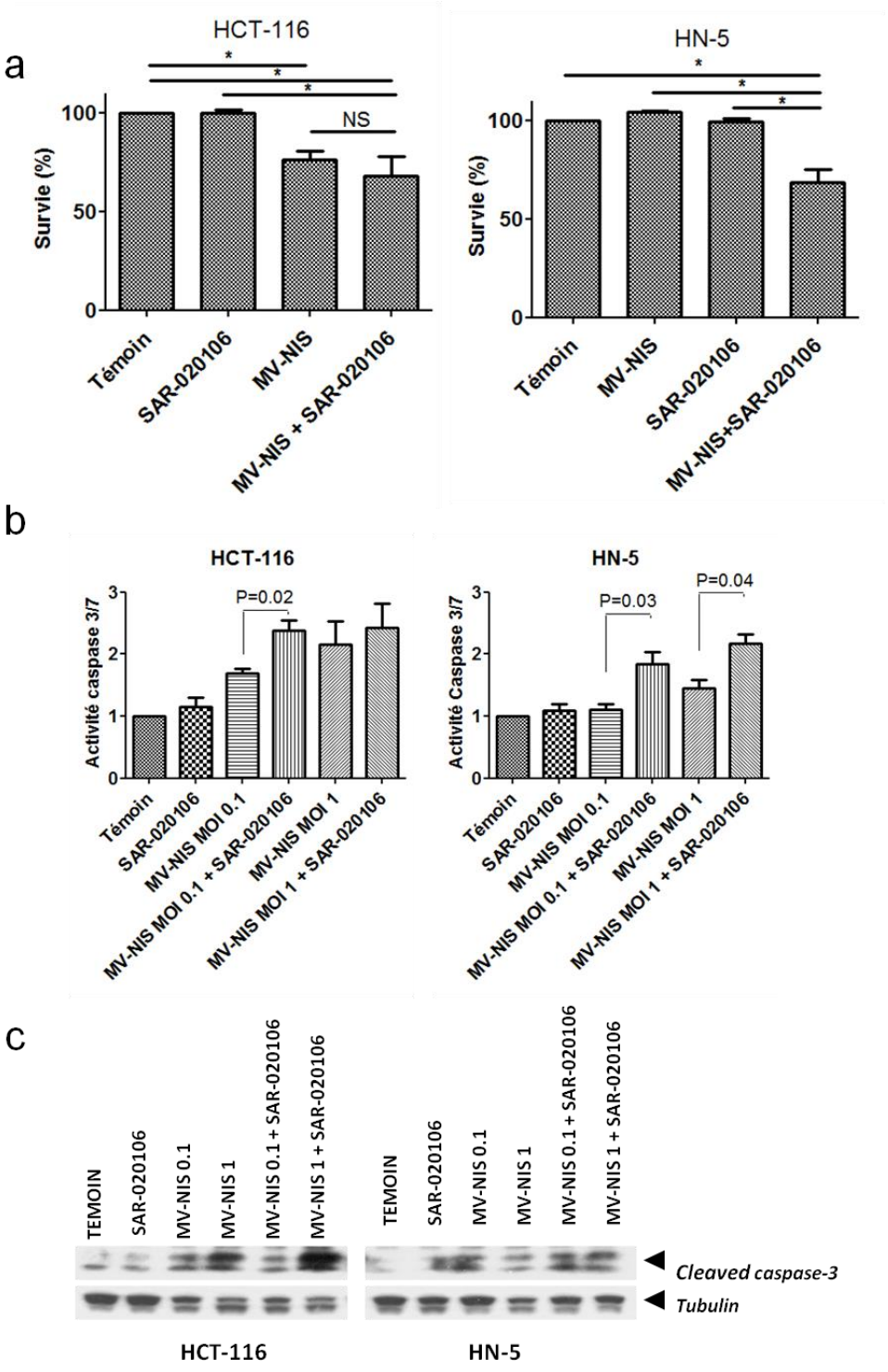
HN5	1GY	2Gy	4Gy
Bliss	0.15 [0.05-0.27]	0.36 [0.12-0.62]	0.23 [0.04-0.44]

PJ41	1GY	2Gy	4Gy
Bliss	0.15 [0.03-0.36]	0.14 [0.13-0.16]	0.06 [-0.003-0.15]

HN3	1GY	2Gy	4Gy
Bliss	0.04 [0.01-0.08]	0.035 [0.034-0.036]	0.005 [0.001-0.01]

HCT116	1GY	2Gy	4Gy
Bliss	0.09 [-0.1-0.31]	0.18 [0.05-0.32]	0.09 [0.02-0.18]

Figure 14. Effet thérapeutique *in vitro* de l'association de MV-NIS et de SAR-020106 dans les cellules HCT-116 et HN-5. L'effet thérapeutique a été évalué par tests clonogéniques (**figure 14a**). L'effet sur l'activité caspasique a été évalué à l'aide du kit Caspase-Glo assay pour détection de l'activité caspase 3/7 (**figure 14b**) et par western blot pour l'activité caspase 3 (**figure 14c**).
*P value <0.05, ANOVA avec correction de Bonferonni

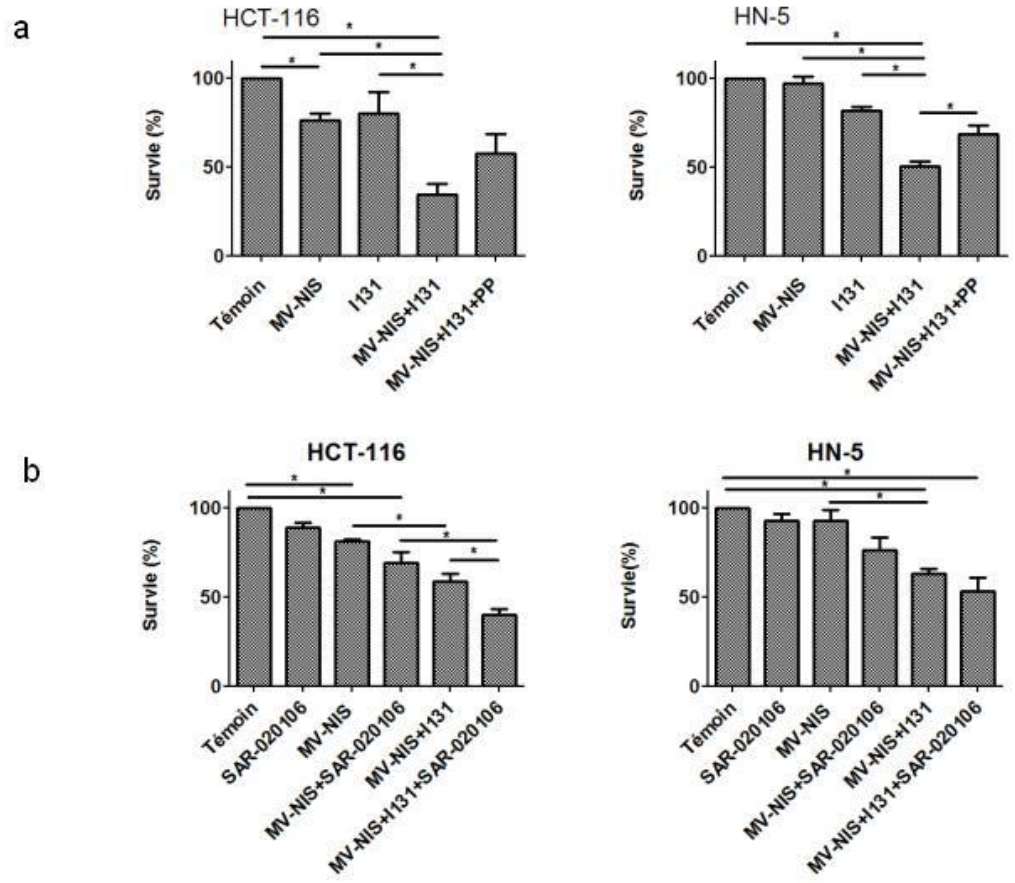


Association de MV-NIS, d'^{131}I et de SAR-020106, in vitro

La stratégie de radiovirothérapie a été étudiée *in vitro* par essais clonogéniques en associant un traitement par MV-NIS et un traitement par ^{131}I. Les cellules ont été traitées par MV-NIS à une MOI de 0.1, et par 50 μCi de ^{131}I. Dans la lignée HN-5, le traitement par MV-NIS seul ou ^{131}I seul n'avait pas d'effet antitumoral. Cependant, la combinaison thérapeutique a eu un effet antitumoral significatif, comparativement aux cellules témoins, aux cellules traitées par MV-NIS seul et aux cellules traitées par ^{131}I seul ($p<0.05$, ANOVA, test de Bonferonni pour comparaisons multiples). Cet effet a été partiellement inhibé par un cotraitement avec du perchlorate de potassium. Dans les cellules HCT-116, le traitement par MV-NIS a eu un effet antitumoral significatif, mais pas le traitement par ^{131}I seul. L'association a eu un effet antitumoral supérieur aux traitements par MV-NIS seul ($p<0.05$, ANOVA, test de Bonferonni pour comparaisons multiples). Cet effet a de nouveau été inhibé par le perchlorate de potassium **(Figure 15a)**.

L'effet de l'association de SAR-020106 à cette stratégie de radiovirothérapie a été étudié *in vitro*. SAR-020106 a été ajouté au milieu de culture 1 heure avant et 48 heures après le traitement par ^{131}I. Dans les cellules HN-5, SAR-020106 n'a pas augmenté significativement la toxicité de l'association de MV-NIS et de ^{131}I. En revanche, dans la lignée HCT-116, l'effet a été statistiquement significatif ($p<0.05$, ANOVA, test de Bonferonni pour comparaisons multiples). **(Figure 15b)**.

Figure 15. La stratégie de radiovirothérapie a été étudiée *in vitro* par essais clonogéniques en associant un traitement par MV-NIS et un traitement par ^{131}I dans les cellules HCT-116 et HN-5. Les cellules ont été traitées par MV-NIS à une MOI de 0.1, et par 50 µCi de ^{131}I (**figure 15a**). L'effet de l'addition de SAR-020106 a été étudié (**figure 15 b**)
*P value <0.05, ANOVA avec correction de Bonferonni
PP: perchlorate de potassium

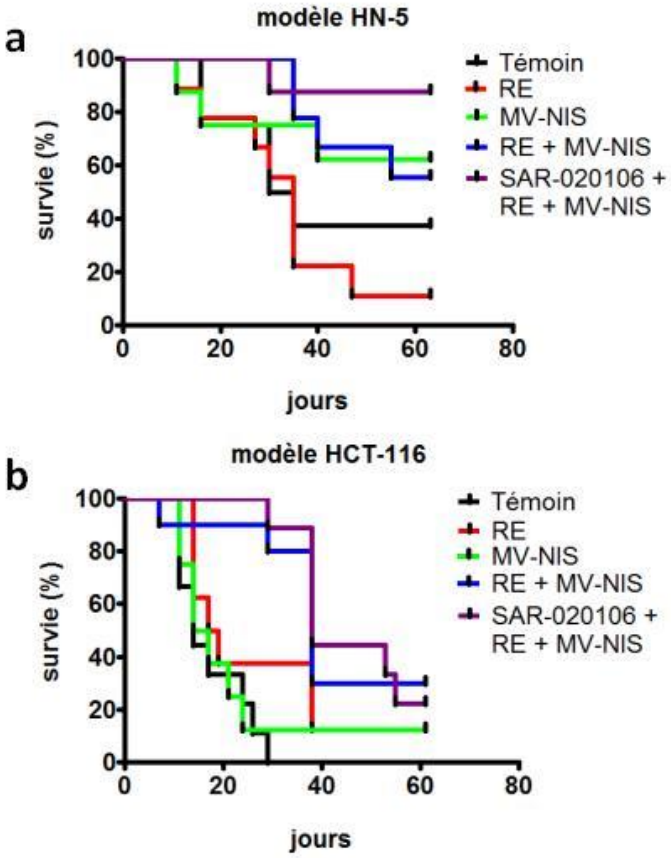


Essais thérapeutiques *in vivo*

Association de MV-NIS, radiothérapie externe et SAR-020106, in vivo

Pour évaluer l'association de MV-NIS et de radiothérapie, un modèle de xénogreffe tumoral sous-cutanée sur des souris nude CD1 a été utilisé. Les animaux ont été traités par une injection intratumorale de MV-NIS (1.5×10^6 TCID50) à J1 et J4 du traitement, et ont été traités par radiothérapie externe (8 Gy en une fraction) à J1. En cas de traitement par SAR-020106, les animaux ont eu une injection intrapéritonéale de SAR-020106 1 heure avant l'irradiation. Dans le modèle HCT-116, MV-NIS ou la radiothérapie externe n'ont pas eu d'effet significatif sur la survie. Cependant, l'association thérapeutique a significativement augmenté la survie. Les survies médianes dans le groupe témoin, le groupe MV-NIS seul, le groupe radiothérapie seule, le groupe radiothérapie + MV-NIS, et le groupe radiothérapie + MV-NIS + SAR-020106 ont été respectivement de 14, 15.5, 18, 38 et 38 jours (Log-rank (Mantel-Cox), p=0.003) **(Figure 16a)**. Dans le modèle HN-5, des différences de survie entre les groupes ont aussi été observées (Log-rank (Mantel-Cox) $X^2 = 12.8$; df=5; p=0.025). Dans le groupe témoin et le groupe radiothérapie, les survies médianes ont été de 32.5 et 35 jours, respectivement. Dans les groupes MV-NIS, radiothérapie + MV-NIS, et radiothérapie + MV-NIS + SAR-020106, les survies médianes ont été significativement augmentées, avec plus de 50% des animaux vivants après 10 semaines **(Figure 16b)**.

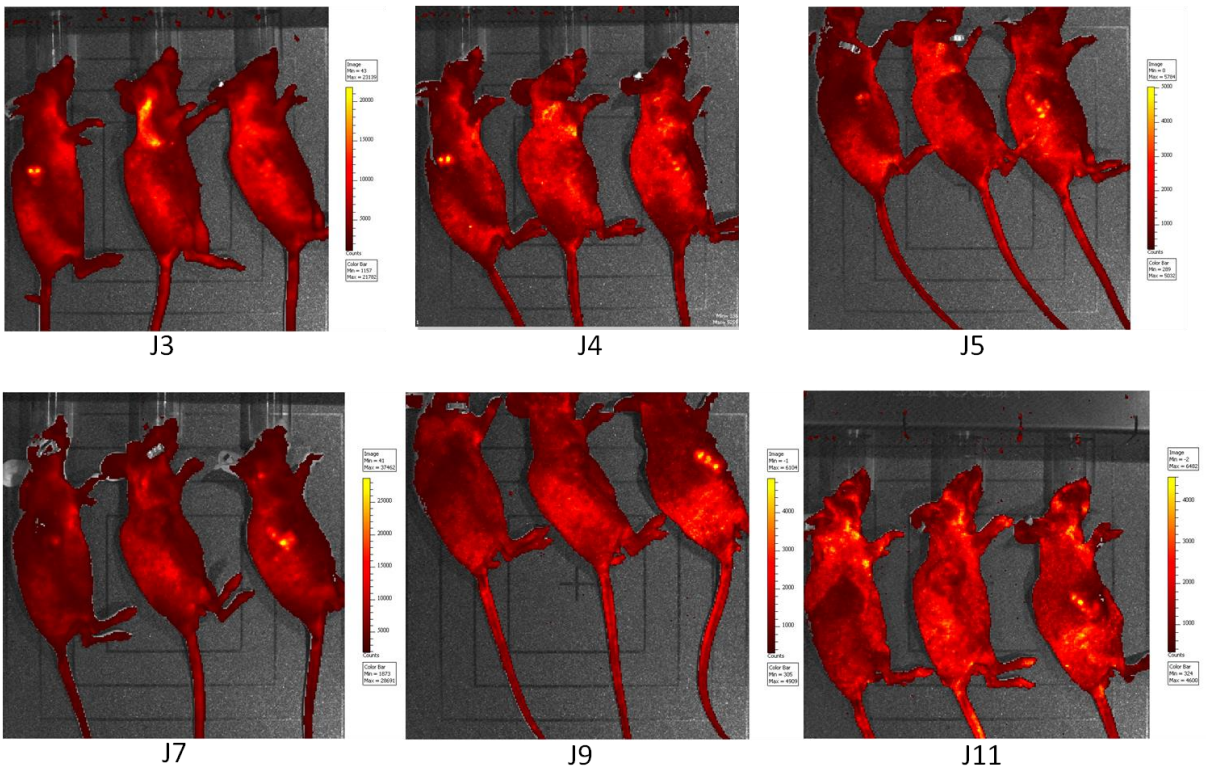
Figure 16. Essai thérapeutique *in vivo*, avec association de radiothérapie externe (RE) (0 ou 8 Gy à J1), MV-NIS (0 ou 2 injections intratumorales de 1.5 x 10^6 $TCID_{50}$ à J1 et J4), et SAR-020106 (0 ou 1 injection intrapéritonéale 1 heure avant l'irradiation), dans un modèle de xénogreffe tumorale HN-5 (**figure 16a**) ou HCT-116 (**figure 16b**).



Imagerie in vivo *de la biodistribution virale dans le modèle HCT-116*

La biodistribution a d'abord été évaluée *in vivo* par imagerie de fluorescence dans un modèle de xénogreffe tumorale HCT116, comme décrit précédemment. Trois souris ont été traitées à J1 par une injection intratumorale de MV-GFP (5×10^6 TCID50). L'imagerie a été réalisée à J1 avant traitement, puis toutes les 24 à 48 heures. Pour une souris, aucun signal spécifique n'a pu être observé. Pour les deux autres autre souris, un signal se superposant à l'image de la tumeur en microscopie standard a été observé. Pour l'une de ces souris, le signal a été visible de J3 à J5, maximal à J4. Pour l'autre souris, le signal a été visible de J5 à J11, maximal à J9. Cette souris a du être sacrifiée à J11 devant le volume tumoral élevé (**figure 17**)

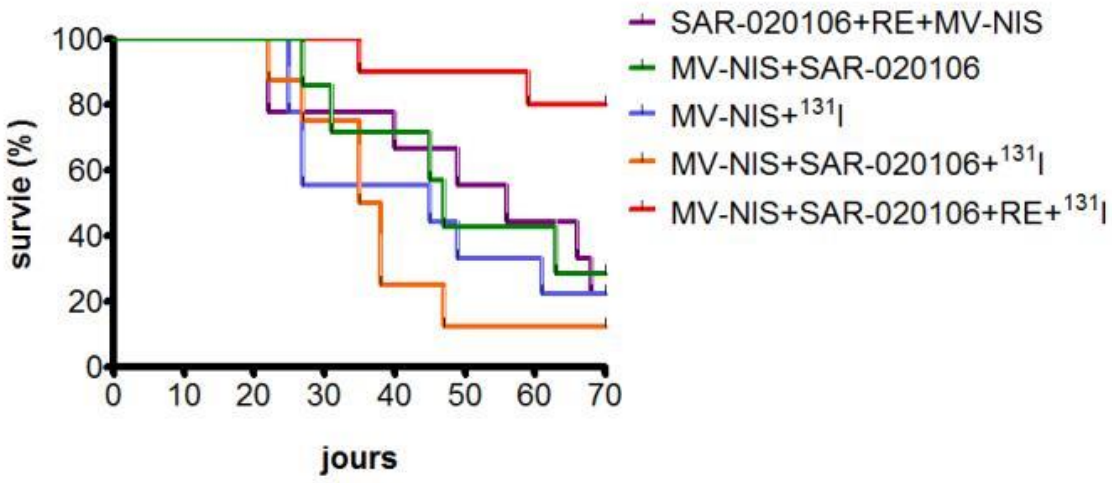
Figure 17. Dans un modèle de xénogreffe sous-cutanée HCT-116, imagerie de florescence *in vivo* après injection intratumorale de MV-GFP. Pour la souris de gauche, un signal intratumoral a été visible de J3 à J5. Pour la souris de gauche, un signal intratumoral a été visible de J5 à J11. Pour la souris du milieu, aucun signal spécifique n'a été visible.



L'association de MV-NIS, radiothérapie externe, SAR-020106 et ^{131}I a un effet antitumoral significatif in vivo.

Dans le même modèle tumoral HCT-116 que décrit précédemment, les souris ont été traitées par différentes associations de MV-NIS (1.5×10^6 TCID50 à J1 et J4, intratumoral), radiothérapie externe (8Gy en une fraction à J1), ^{131}I (1 mCi intrapéritonéal à J7) et SAR-020106 (30 mg/kg intrapéritonéal, 1 heure avant la radiothérapie et 1 heure avant le traitement par ^{131}I). Cinq groupes ont été traité comme suit : MV-NIS + SAR-020106; MV-NIS + EBRT + SAR-020106; MV-NIS + ^{131}I; MV-NIS + ^{131}I + SAR-020106; et la quadrithérapie MV-NIS + EBRT + ^{131}I + SAR-020106. Il n'y a pas eu de différence significative de survie parmi les 4 premiers groupes. Cependant, la survie a été significativement améliorée dans le groupe traité par quadrithérapie (p=0.03) (**Figure 18**).

Figure 18. Essai thérapeutique *in vivo*, avec association de radiothérapie externe (RE) (0 ou 8 Gy à J1), MV-NIS (0 ou 2 injections intratumorales de 1.5 x 10^6 $TCID_{50}$ à J1 et J4), ^{131}I (0 ou une injection intrapéritonéale de 1 mCi à J7), et SAR-020106 (0 ou 1 injection intrapéritonéale 1 heure avant la radiothérapie externe et avant le traitement par ^{131}I), dans un modèle de xénogreffe tumorale HCT-116. La quadrithérapie augmente significativement la survie des animaux (Log-rank (Mantel-Cox) p=0.03).



DISCUSSION

In vitro, nous avons démontré que MV-NIS peut tuer les cellules de cancer ORL HN-3, HN-5 et PJ-41, ainsi que les cellules de cancer colorectal HCT-116. Le virus peut s'y répliquer, et y exprimer le transgène NIS. Les modèles *in vitro* sont limités pour explorer l'association d'une thérapie virale et de radiothérapie externe. Les essais MTS peuvent sous-estimer les effets retardés de la radiothérapie. Au cours d'un essai clonogénique, une longue incubation avec un virus capable de se répliquer peut conduire à une toxicité majeure, malgré une faible dose de virus. Pour limiter cette toxicité du virus, les cellules étaient prétraitées avec le virus 48 heures avant l'ensemencement des cellules à densités clonogéniques. Cet essai en 2 phases peut cependant sous-estimer l'effet du virus. Toutefois, nous avons montré que MV-NIS et une radiothérapie externe a des effets antitumoraux synergiques, dépendant des doses thérapeutiques et des lignées cellulaires. Pour tenter d'expliquer cette synergie, plusieurs mécanismes possibles ont été explorés. Nous avons démontré que la radiothérapie externe n'augmente pas la réplication virale dans les lignées cellulaires étudiées, n'augmente pas l'expression cellulaire de CD46, mais augmente l'expression génique virale. Cette propriété est particulièrement intéressante dans notre stratégie d'association de radiothérapie externe et de radioviothérapie basée sur l'expression du transgène virale NIS. *In vitro*, nous avons de plus démontré que SAR-020106, un nouvel inhibiteur de Chk-1, a des propriétés antitumorales synergiques avec la radiothérapie externe. SAR-020106 peut également avoir un effet synergique significatif avec MV-NIS, cet effet étant lié à une majoration de l'apoptose induite par le virus. Enfin, *in vitro*, nous avons démontré que MV-NIS peut guider un traitement radio-isotopique par ^{131}I. Dans les cellules de cancer colorectal HCT-116, cet effet est augmenté par l'association avec SAR-020106.

In vivo, nous avons démontré que MV-NIS et radiothérapie externe ont des effets synergiques dans un modèle de cancer colorectal HCT-116. L'objectif primaire de notre étude a été d'évaluer l'association de MV-NIS, d'un traitement par ^{131}I guide par NIS, de radiothérapie externe et de SAR-020106. Nous avons démontré que la quadrithérapie a une activité antitumorale significative, avec augmentation de la survie des animaux.

L'équipe de l'Institute of Cancer Research a auparavant démontré que l'association d'une radiovirothérapie guidée par un adénovirus non réplicatif codant le NIS, avec une radiothérapie externe et des agents radiosensibilisants a des effets antitumoraux significatifs, comparé à chaque traitement seul. La progression logique de cette étude a donc été d'évaluer cette stratégie avec un virus oncolytique. MV-NIS est actuellement testé dans des études de phase 1, chez des patients atteints de gliome, de mésothéliome pleural, et de myélome. La radiothérapie externe est un outil majeur du traitement des cancers ORL et du rectum. Pour améliorer l'efficacité de la radiothérapie, la recherche s'est concentrée ces dernières années sur des modifications de la dose d'irradiation, sur la durée du traitement et sur les techniques d'irradiation. Cette dernière approche, impliquant la radiothérapie conformationnelle en 3 dimensions (3-DCRT) ou la radiothérapie par modulation d'intensité (IMRT), permet d'augmenter la dose d'irradiation en évitant une toxicité inacceptable aux tissus sains. De nombreux cancers ont une réponse à l'irradiation dépendante de la dose d'irradiation, de telle manière qu'une faible augmentation de la dose peut être associée à une nette amélioration du contrôle local du cancer[199]. Associer une radiothérapie externe à une radiovirothérapie est une approche innovante visant à majorer la dose totale d'irradiation, sélectivement dans la tumeur. Notre étude soutient fortement de futures recherches translationnelles et cliniques évaluant une radiothérapie avec MV-NIS et combinée avec une radiothérapie externe et de nouveaux agents radiosensibilisants.

Nous avons démontré que SAR-020106 peut avoir des effets synergiques avec la radiothérapie, le traitement radio-isotopique, mais aussi MV-NIS. L'activation de Chk-1 peut répondre aux dommages de l'ADN induits par l'irradiation. Les relations des virus avec les voies de réponse aux dommages de l'ADN sont moins connues. L'équipe de l'Institute of Cancer Research a auparavant démontré que la radiothérapie peut augmenter l'expression génique d'un adénovirus dans des cellules de cancer ORL et de cancer colorectal HCT-116. L'inhibition de MAPK/ERK et de PI3K (mais pas de p38MAPK) diminue cette régulation positive de l'expression génique induite par l'irradiation, suggérant que ces voies de signalisation ont un rôle important dans l'expression génique de l'adénovirus dans les cellules irradiées. Dans la même étude, des inhibiteurs de la réparation de l'ADN ciblant ATM, DNA-PK et PARP ont encore augmenté l'expression génique induite par l'irradiation. Cet effet a été lié à la voie de signalisation MAPK/ERK/Egr-1 [66]. Plusieurs protéines virales sont capable d'interagir avec des protéines cellulaires impliqués dans la réponse aux lésions de l'ADN [200]. Des interactions avec Chk-1 ont été décrites. La protéine Tax du virus Human T-cell leukaemia virus type 1 (HTLV-1) interagit avec Chk1, inhibant l'activité kinase de Chk1 et l'arrêt du cycle cellulaire en G2 induit par l'irradiation[201]. Les relations du virus de la rougeole avec les voies de réponse aux dommages de l'ADN doivent être étudiées. Les inhibiteurs de la réparation de l'ADN sont des agents prometteurs pour augmenter l'efficacité d'une radiovirothérapie, en association avec une radiothérapie externe, puisqu'ils pourraient majorer l'activité de tous les agents thérapeutiques de cette stratégie (virus, radio-isotope et radiothérapie externe).

Comme décrit dans l'introduction, différentes méthodes pourraient permettre d'améliorer une stratégie de radiovirothérapie basée sur MV-NIS. La sélectivité de l'infection pourrait être améliorée par des modifications de la protéine virale H, qui se lie aux récepteurs

cellulaires. Cette liaison pourrait être redirigée vers des récepteurs plus spécifiques des cellules cancéreuses, augmentant à la fois la sécurité du traitement et son efficacité [202]. Le système immunitaire peut avoir un effet positif sur l'activité antitumorale du virus, lorsque la mort cellulaire induite par le virus permet la libération d'antigènes tumoraux stimulant une réponse immunitaire antitumorale spécifique. Cependant, le système immunitaire peut aussi être dirigé contre le virus, limitant l'impact du traitement. Ainsi, une stratégie de cellules transporteuses a été développée, visant à contourner la réponse immunitaire anti-virale. Le virus peut être incorporé dans une cellule qui le transporte dans la tumeur, sans l'exposer au système immunitaire. *In vivo*, cette approche a été évaluée avec succès avec le virus de la rougeole, en utilisant des mastocytes, des cellules endothéliales, des cellules souches mésenchymateuses, et des cellules cancéreuses mortellement irradiées [97, 99, 203]. Associer la thérapie virale à un traitement immunosuppresseur est une autre méthode visant à limiter la réponse immunitaire anti-virale. Un essai clinique de phase 1 évalue actuellement l'association de MV-NIS avec du cyclophosphamide. De plus, NIS peut guider l'entrée de nombreux radio-isotopes dans la cellule (Iode-123, Iode-124, Iode-125, Iode-131, Technétium-99m, Rhénium-186, Rhénium-188, Astate-211), multipliant les possibilités de son utilisation en thérapeutique ou en imagerie métabolique [204]. Tous ces récents développements pourraient améliorer la radiovirothérapie avec MV-NIS, qui est fortement encouragée par notre étude.

REFERENCES

1. Jung H. The sodium/substrate symporter family: structural and functional features. FEBS Lett. 2002; **529**(1): 73-7.

2. Massart C, Corbineau E. Transporteurs d'iodures et fonction thyroïdienne. Immuno-analyse & Biologie Spécialisée. 2006; **21**(3): 138-43.

3. Kogai T, Taki K, Brent GA. Enhancement of sodium/iodide symporter expression in thyroid and breast cancer. Endocr Relat Cancer. 2006; **13**(3): 797-826.

4. Vayre L, Sabourin JC, Caillou B, Ducreux M, Schlumberger M, Bidart JM. Immunohistochemical analysis of Na+/I- symporter distribution in human extra-thyroidal tissues. Eur J Endocrinol. 1999; **141**(4): 382-6.

5. Spitzweg C, Joba W, Eisenmenger W, Heufelder AE. Analysis of human sodium iodide symporter gene expression in extrathyroidal tissues and cloning of its complementary deoxyribonucleic acids from salivary gland, mammary gland, and gastric mucosa. J Clin Endocrinol Metab. 1998; **83**(5): 1746-51.

6. Spitzweg C, Dutton CM, Castro MR, Bergert ER, Goellner JR, Heufelder AE, et al. Expression of the sodium iodide symporter in human kidney. Kidney international. 2001; **59**(3): 1013-23.

7. Smanik PA, Liu Q, Furminger TL, Ryu K, Xing S, Mazzaferri EL, et al. Cloning of the human sodium lodide symporter. Biochem Biophys Res Commun. 1996; **226**(2): 339-45.

8. Dai G, Levy O, Carrasco N. Cloning and characterization of the thyroid iodide transporter. Nature. 1996; **379**(6564): 458-60.

9. Taki K, Kogai T, Kanamoto Y, Hershman JM, Brent GA. A thyroid-specific far-upstream enhancer in the human sodium/iodide symporter gene requires Pax-8 binding and cyclic adenosine 3',5'-monophosphate response element-like sequence binding proteins for full activity and is differentially regulated in normal and thyroid cancer cells. Mol Endocrinol. 2002; **16**(10): 2266-82.

10. Riedel C, Levy O, Carrasco N. Post-transcriptional regulation of the sodium/iodide symporter by thyrotropin. J Biol Chem. 2001; **276**(24): 21458-63.

11. Kogai T, Curcio F, Hyman S, Cornford EM, Brent GA, Hershman JM. Induction of follicle formation in long-term cultured normal human thyroid cells treated with thyrotropin stimulates iodide uptake but not sodium/iodide symporter messenger RNA and protein expression. J Endocrinol. 2000; **167**(1): 125-35.

12. Boelaert K, Smith VE, Stratford AL, Kogai T, Tannahill LA, Watkinson JC, et al. PTTG and PBF repress the human sodium iodide symporter. Oncogene. 2007; **26**(30): 4344-56.

13. Smith VE, Read ML, Turnell AS, Watkins RJ, Watkinson JC, Lewy GD, et al. A novel mechanism of sodium iodide symporter repression in differentiated thyroid cancer. J Cell Sci. 2009; **122**(Pt 18): 3393-402.

14. Saez C, Martinez-Brocca MA, Castilla C, Soto A, Navarro E, Tortolero M, et al. Prognostic significance of human pituitary tumor-transforming gene immunohistochemical expression in differentiated thyroid cancer. J Clin Endocrinol Metab. 2006; **91**(4): 1404-9.

15. Caraccio N, Giannini R, Cuccato S, Faviana P, Berti P, Galleri D, et al. Type I interferons modulate the expression of thyroid peroxidase, sodium/iodide symporter, and thyroglobulin genes in primary human thyrocyte cultures. J Clin Endocrinol Metab. 2005; **90**(2): 1156-62.

16. Ajjan RA, Kamaruddin NA, Crisp M, Watson PF, Ludgate M, Weetman AP. Regulation and tissue distribution of the human sodium iodide symporter gene. Clin Endocrinol (Oxf). 1998; **49**(4): 517-23.

17. Spitzweg C, Scholz IV, Bergert ER, Tindall DJ, Young CY, Goke B, et al. Retinoic acid-induced stimulation of sodium iodide symporter expression and cytotoxicity of radioiodine in prostate cancer cells. Endocrinology. 2003; **144**(8): 3423-32.

18. Willhauck MJ, Sharif-Samani B, Senekowitsch-Schmidtke R, Wunderlich N, Goke B, Morris JC, et al. Functional sodium iodide symporter expression in breast cancer xenografts in vivo after systemic treatment with retinoic acid and dexamethasone. Breast Cancer Res Treat. 2008; **109**(2): 263-72.

19. Unterholzner S, Willhauck MJ, Cengic N, Schutz M, Goke B, Morris JC, et al. Dexamethasone stimulation of retinoic Acid-induced sodium iodide symporter expression and cytotoxicity of 131-I in breast cancer cells. J Clin Endocrinol Metab. 2006; **91**(1): 69-78.

20. Willhauck MJ, DJ OK, Wunderlich N, Goke B, Spitzweg C. Stimulation of retinoic acid-induced functional sodium iodide symporter (NIS) expression and cytotoxicity of (1)(3)(1)I by carbamazepine in breast cancer cells. Breast Cancer Res Treat. 2011; **125**(2): 377-86.

21. Scholz IV, Cengic N, Goke B, Morris JC, Spitzweg C. Dexamethasone enhances the cytotoxic effect of radioiodine therapy in prostate cancer cells expressing the sodium iodide symporter. J Clin Endocrinol Metab. 2004; **89**(3): 1108-16.

22. Arturi F, Ferretti E, Presta I, Mattei T, Scipioni A, Scarpelli D, et al. Regulation of iodide uptake and sodium/iodide symporter expression in the mcf-7 human breast cancer cell line. J Clin Endocrinol Metab. 2005; **90**(4): 2321-6.

23. Ryan J, Curran CE, Hennessy E, Newell J, Morris JC, Kerin MJ, et al. The sodium iodide symporter (NIS) and potential regulators in normal, benign and malignant human breast tissue. PLoS One. 2011; **6**(1): e16023.

24. Fenton MS, Marion KM, Salem AK, Hogen R, Naeim F, Hershman JM. Sunitinib inhibits MEK/ERK and SAPK/JNK pathways and increases sodium/iodide symporter expression in papillary thyroid cancer. Thyroid. 2010; **20**(9): 965-74.

25. Kogai T, Sajid-Crockett S, Newmarch LS, Liu YY, Brent GA. Phosphoinositide-3-kinase inhibition induces sodium/iodide symporter expression in rat thyroid cells and human papillary thyroid cancer cells. J Endocrinol. 2008; **199**(2): 243-52.

26. Kogai T, Ohashi E, Jacobs MS, Sajid-Crockett S, Fisher ML, Kanamoto Y, et al. Retinoic acid stimulation of the sodium/iodide symporter in MCF-7 breast cancer cells is mediated by the insulin growth factor-I/phosphatidylinositol 3-kinase and p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathways. J Clin Endocrinol Metab. 2008; **93**(5): 1884-92.

27. Ross DS. Radioiodine therapy for hyperthyroidism. N Engl J Med. 2011; **364**(6): 542-50.

28. Cooper DS, Doherty GM, Haugen BR, Kloos RT, Lee SL, Mandel SJ, et al. Revised American Thyroid Association management guidelines for patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer. Thyroid. 2009; **19**(11): 1167-214.

29. Baril P, Martin-Duque P, Vassaux G. Visualization of gene expression in the live subject using the Na/I symporter as a reporter gene: applications in biotherapy. Br J Pharmacol. 2010; **159**(4): 761-71.

30. Waerzeggers Y, Monfared P, Viel T, Winkeler A, Voges J, Jacobs AH. Methods to monitor gene therapy with molecular imaging. Methods. 2009; **48**(2): 146-60.

31. Groot-Wassink T, Aboagye EO, Glaser M, Lemoine NR, Vassaux G. Adenovirus biodistribution and noninvasive imaging of gene expression in vivo by positron emission tomography using human sodium/iodide symporter as reporter gene. Hum Gene Ther. 2002; **13**(14): 1723-35.

32. Groot-Wassink T, Aboagye EO, Wang Y, Lemoine NR, Reader AJ, Vassaux G. Quantitative imaging of Na/I symporter transgene expression using positron emission tomography in the living animal. Mol Ther. 2004; **9**(3): 436-42.

33. Merron A, Peerlinck I, Martin-Duque P, Burnet J, Quintanilla M, Mather S, et al. SPECT/CT imaging of oncolytic adenovirus propagation in tumours in vivo using the Na/I symporter as a reporter gene. Gene Ther. 2007; **14**(24): 1731-8.

34. Carlson SK, Classic KL, Hadac EM, Bender CE, Kemp BJ, Lowe VJ, et al. In vivo quantitation of intratumoral radioisotope uptake using micro-single photon emission computed tomography/computed tomography. Mol Imaging Biol. 2006; **8**(6): 324-32.

35. Dingli D. Image-guided radiovirotherapy for multiple myeloma using a recombinant measles virus expressing the thyroidal sodium iodide symporter. Blood. 2004; **103**(5): 1641-6.

36. Penheiter AR, Wegman TR, Classic KL, Dingli D, Bender CE, Russell SJ, et al. Sodium iodide symporter (NIS)-mediated radiovirotherapy for pancreatic cancer. AJR Am J Roentgenol. 2010; **195**(2): 341-9.

37. Barton KN, Stricker H, Brown SL, Elshaikh M, Aref I, Lu M, et al. Phase I study of noninvasive imaging of adenovirus-mediated gene expression in the human prostate. Mol Ther. 2008; **16**(10): 1761-9.

38. Msaouel P, Opyrchal M, Galanis E. Translational research in oncolytic measles virotherapy: early discoveries and future steps. Future Microbiol. 2011; **6**(2): 125-8.

39. Peerlinck I, Merron A, Baril P, Conchon S, Martin-Duque P, Hindorf C, et al. Targeted radionuclide therapy using a Wnt-targeted replicating adenovirus encoding the Na/I symporter. Clin Cancer Res. 2009; **15**(21): 6595-601.

40. Chen RF, Li ZH, Pan QH, Zhou JJ, Tang QB, Yu FY, et al. In vivo radioiodide imaging and treatment of pancreatic cancer xenografts after MUC1 promoter-driven expression of the human sodium-iodide symporter. Pancreatology. 2007; **7**(5-6): 505-13.

41. Dwyer RM, Bergert ER, O'Connor MK, Gendler SJ, Morris JC. Adenovirus-mediated and targeted expression of the sodium-iodide symporter permits in vivo radioiodide imaging and therapy of pancreatic tumors. Hum Gene Ther. 2006; **17**(6): 661-8.

42. Faivre J, Clerc J, Gerolami R, Herve J, Longuet M, Liu B, et al. Long-term radioiodine retention and regression of liver cancer after sodium iodide symporter gene transfer in wistar rats. Cancer Res. 2004; **64**(21): 8045-51.

43. Herve J, Cunha AS, Liu B, Valogne Y, Longuet M, Boisgard R, et al. Internal radiotherapy of liver cancer with rat hepatocarcinoma-intestine-pancreas gene as a liver tumor-specific promoter. Hum Gene Ther. 2008; **19**(9): 915-26.

44. Hakkarainen T, Rajecki M, Sarparanta M, Tenhunen M, Airaksinen AJ, Desmond RA, et al. Targeted radiotherapy for prostate cancer with an oncolytic adenovirus coding for human sodium iodide symporter. Clin Cancer Res. 2009; **15**(17): 5396-403.

45. Spitzweg C, Baker CH, Bergert ER, O'Connor MK, Morris JC. Image-guided radioiodide therapy of medullary thyroid cancer after carcinoembryonic antigen promoter-targeted sodium iodide symporter gene expression. Hum Gene Ther. 2007; **18**(10): 916-24.

46. Dwyer RM, Bergert ER, O'Connor M K, Gendler SJ, Morris JC. In vivo radioiodide imaging and treatment of breast cancer xenografts after MUC1-driven expression of the sodium iodide symporter. Clin Cancer Res. 2005; **11**(4): 1483-9.

47. Dwyer RM, Bergert ER, O'Connor MK, Gendler SJ, Morris JC. Sodium iodide symporter-mediated radioiodide imaging and therapy of ovarian tumor xenografts in mice. Gene Ther. 2006; **13**(1): 60-6.

48. Msaouel P, Iankov ID, Allen C, Aderca I, Federspiel MJ, Tindall DJ, et al. Noninvasive imaging and radiovirotherapy of prostate cancer using an oncolytic measles virus expressing the sodium iodide symporter. Mol Ther. 2009; **17**(12): 2041-8.

49. Goel A, Carlson SK, Classic KL, Greiner S, Naik S, Power AT, et al. Radioiodide imaging and radiovirotherapy of multiple myeloma using VSV(51)-NIS, an attenuated vesicular stomatitis virus encoding the sodium iodide symporter gene. Blood. 2007; **110**(7): 2342-50.

50. Shen DH, Marsee DK, Schaap J, Yang W, Cho JY, Hinkle G, et al. Effects of dose, intervention time, and radionuclide on sodium iodide symporter (NIS)-targeted radionuclide therapy. Gene Ther. 2004; **11**(2): 161-9.

51. Willhauck MJ, Sharif Samani BR, Gildehaus FJ, Wolf I, Senekowitsch-Schmidtke R, Stark HJ, et al. Application of 188rhenium as an alternative radionuclide for treatment of prostate cancer after tumor-specific sodium iodide symporter gene expression. J Clin Endocrinol Metab. 2007; **92**(11): 4451-8.

52. Supiot S, Thillays F, Rio E, Mahe MA, Barbet FJ, Kraeber-Bodere F, et al. [Alpha-radioimmunotherapy: a review of recent developments]. Cancer Radiother. 2007; **11**(5): 252-9.

53. Petrich T, Quintanilla-Martinez L, Korkmaz Z, Samson E, Helmeke HJ, Meyer GJ, et al. Effective cancer therapy with the alpha-particle emitter [211At]astatine in a mouse model of genetically modified sodium/iodide symporter-expressing tumors. Clin Cancer Res. 2006; **12**(4): 1342-8.

54. Willhauck MJ, Samani BR, Wolf I, Senekowitsch-Schmidtke R, Stark HJ, Meyer GJ, et al. The potential of 211Astatine for NIS-mediated radionuclide therapy in prostate cancer. Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2008; **35**(7): 1272-81.

55. Boland A, Magnon C, Filetti S, Bidart JM, Schlumberger M, Yeh P, et al. Transposition of the thyroid iodide uptake and organification system in nonthyroid tumor cells by adenoviral vector-mediated gene transfers. Thyroid. 2002; **12**(1): 19-26.

56. Huang M, Batra RK, Kogai T, Lin YQ, Hershman JM, Lichtenstein A, et al. Ectopic expression of the thyroperoxidase gene augments radioiodide uptake and retention mediated by the sodium iodide symporter in non-small cell lung cancer. Cancer Gene Ther. 2001; **8**(8): 612-8.

57. Lecat-Guillet N, Ambroise Y. Enhanced iodide sequestration by 3-biphenyl-5,6-dihydroimidazo[2,1-b]thiazole in sodium/iodide symporter (NIS)-expressing cells. ChemMedChem. 2008; **3**(8): 1211-6.

58. Lecat-Guillet N, Ambroise Y. Synthesis and evaluation of imidazo[2,1-b]thiazoles as iodide efflux inhibitors in thyrocytes. ChemMedChem. 2009; **4**(11): 1819-30.

59. Kirn DH, Thorne SH. Targeted and armed oncolytic poxviruses: a novel multi-mechanistic therapeutic class for cancer. Nat Rev Cancer. 2009; **9**(1): 64-71.

60. Liu TC, Kirn D. Gene therapy progress and prospects cancer: oncolytic viruses. Gene Ther. 2008; **15**(12): 877-84.

61. Senzer NN, Kaufman HL, Amatruda T, Nemunaitis M, Reid T, Daniels G, et al. Phase II clinical trial of a granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-encoding, second-generation oncolytic herpesvirus in patients with unresectable metastatic melanoma. J Clin Oncol. 2009; **27**(34): 5763-71.

62. Park BH, Hwang T, Liu TC, Sze DY, Kim JS, Kwon HC, et al. Use of a targeted oncolytic poxvirus, JX-594, in patients with refractory primary or metastatic liver cancer: a phase I trial. Lancet Oncol. 2008; **9**(6): 533-42.

63. Willmon C, Harrington K, Kottke T, Prestwich R, Melcher A, Vile R. Cell carriers for oncolytic viruses: Fed Ex for cancer therapy. Mol Ther. 2009; **17**(10): 1667-76.

64. Power AT, Bell JC. Taming the Trojan horse: optimizing dynamic carrier cell/oncolytic virus systems for cancer biotherapy. Gene Ther. 2008; **15**(10): 772-9.

65. Touchefeu Y, Vassaux G, Harrington KJ. Oncolytic viruses in radiation oncology. Radiother Oncol. 2011; **99**(3): 262-70.

66. Hingorani M, White CL, Merron A, Peerlinck I, Gore ME, Slade A, et al. Inhibition of repair of radiation-induced DNA damage enhances gene expression from replication-defective adenoviral vectors. Cancer Res. 2008; **68**(23): 9771-8.

67. Dearnaley DP, Sydes MR, Graham JD, Aird EG, Bottomley D, Cowan RA, et al. Escalated-dose versus standard-dose conformal radiotherapy in prostate cancer: first results from the MRC RT01 randomised controlled trial. Lancet Oncol. 2007; **8**(6): 475-87.

68. Syndikus I, Morgan RC, Sydes MR, Graham JD, Dearnaley DP. Late gastrointestinal toxicity after dose-escalated conformal radiotherapy for early prostate cancer: results from the UK Medical Research Council RT01 trial (ISRCTN47772397). Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2010; **77**(3): 773-83.

69. Barton KN, Stricker H, Elshaikh MA, Pegg J, Cheng J, Zhang Y, et al. Feasibility of Adenovirus-Mediated hNIS Gene Transfer and (131)I Radioiodine Therapy as a Definitive Treatment for Localized Prostate Cancer. Mol Ther. 2011.

70. Hingorani M, White CL, Zaidi S, Pandha HS, Melcher AA, Bhide SA, et al. Therapeutic effect of sodium iodide symporter gene therapy combined with external beam radiotherapy and targeted drugs that inhibit DNA repair. Mol Ther. 2010; **18**(9): 1599-605.

71. Ottolino-Perry K, Diallo JS, Lichty BD, Bell JC, McCart JA. Intelligent design: combination therapy with oncolytic viruses. Mol Ther. 2010; **18**(2): 251-63.

72. McCart JA, Mehta N, Scollard D, Reilly RM, Carrasquillo JA, Tang N, et al. Oncolytic vaccinia virus expressing the human somatostatin receptor SSTR2: molecular imaging after systemic delivery using 111In-pentetreotide. Mol Ther. 2004; **10**(3): 553-61.

73. Akinlolu O, Ottolino-Perry K, McCart JA, Reilly RM. Antiproliferative effects of 111In- or 177Lu-DOTATOC on cells exposed to low multiplicity-of-infection double-deleted vaccinia virus encoding somatostatin subtype-2 receptor. Cancer Biother Radiopharm. 2010; **25**(3): 325-33.

74. Global measles mortality, 2000-2008. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2009; **58**(47): 1321-6.

75. Enders JF, Peebles TC. Propagation in tissue cultures of cytopathogenic agents from patients with measles. Proc Soc Exp Biol Med. 1954; **86**(2): 277-86.

76. Muhlebach MD, Mateo M, Sinn PL, Prufer S, Uhlig KM, Leonard VH, et al. Adherens junction protein nectin-4 is the epithelial receptor for measles virus. Nature. 2011.

77. Noyce RS, Bondre DG, Ha MN, Lin LT, Sisson G, Tsao MS, et al. Tumor cell marker PVRL4 (nectin 4) is an epithelial cell receptor for measles virus. PLoS pathogens. 2011; **7**(8): e1002240.

78. Bluming AZ, Ziegler JL. Regression of Burkitt's lymphoma in association with measles infection. Lancet. 1971; **2**(7715): 105-6.

79. Mota HC. Infantile Hodgkin's disease: remission after measles. British medical journal. 1973; **2**(5863): 421.

80. Taqi AM, Abdurrahman MB, Yakubu AM, Fleming AF. Regression of Hodgkin's disease after measles. Lancet. 1981; **1**(8229): 1112.

81. Zygiert Z. Hodgkin's disease: remissions after measles. Lancet. 1971; **1**(7699): 593.

82. Heinzerling L, Kunzi V, Oberholzer PA, Kundig T, Naim H, Dummer R. Oncolytic measles virus in cutaneous T-cell lymphomas mounts antitumor immune responses in vivo and targets interferon-resistant tumor cells. Blood. 2005; **106**(7): 2287-94.

83. Galanis E, Hartmann LC, Cliby WA, Long HJ, Peethambaram PP, Barrette BA, et al. Phase I Trial of Intraperitoneal Administration of an Oncolytic Measles Virus Strain Engineered to Express Carcinoembryonic Antigen for Recurrent Ovarian Cancer. Cancer Research. 2010; **70**(3): 875-82.

84. Dhiman N, Jacobson RM, Poland GA. Measles virus receptors: SLAM and CD46. Reviews in medical virology. 2004; **14**(4): 217-29.

85. Dorig RE, Marcil A, Chopra A, Richardson CD. The human CD46 molecule is a receptor for measles virus (Edmonston strain). Cell. 1993; **75**(2): 295-305.

86. Anderson BD, Nakamura T, Russell SJ, Peng KW. High CD46 receptor density determines preferential killing of tumor cells by oncolytic measles virus. Cancer Res. 2004; **64**(14): 4919-26.

87. Bossow S, Grossardt C, Temme A, Leber MF, Sawall S, Rieber EP, et al. Armed and targeted measles virus for chemovirotherapy of pancreatic cancer. Cancer Gene Ther. 2011; **18**(8): 598-608.

88. Ungerechts G, Springfeld C, Frenzke ME, Lampe J, Parker WB, Sorscher EJ, et al. An immunocompetent murine model for oncolysis with an armed and targeted measles virus. Mol Ther. 2007; **15**(11): 1991-7.

89. Ungerechts G, Springfeld C, Frenzke ME, Lampe J, Johnston PB, Parker WB, et al. Lymphoma chemovirotherapy: CD20-targeted and convertase-armed measles virus can synergize with fludarabine. Cancer Res. 2007; **67**(22): 10939-47.

90. Allen C, Vongpunsawad S, Nakamura T, James CD, Schroeder M, Cattaneo R, et al. Retargeted oncolytic measles strains entering via the EGFRvIII receptor maintain significant antitumor activity against gliomas with increased tumor specificity. Cancer Res. 2006; **66**(24): 11840-50.

91. Allen C, Paraskevakou G, Liu C, Iankov ID, Msaouel P, Zollman P, et al. Oncolytic measles virus strains in the treatment of gliomas. Expert opinion on biological therapy. 2008; **8**(2): 213-20.

92. Liu C, Hasegawa K, Russell SJ, Sadelain M, Peng KW. Prostate-specific membrane antigen retargeted measles virotherapy for the treatment of prostate cancer. The Prostate. 2009; **69**(10): 1128-41.

93. Springfeld C, von Messling V, Frenzke M, Ungerechts G, Buchholz CJ, Cattaneo R. Oncolytic efficacy and enhanced safety of measles virus activated by tumor-secreted matrix metalloproteinases. Cancer Res. 2006; **66**(15): 7694-700.

94. Leber MF, Bossow S, Leonard VH, Zaoui K, Grossardt C, Frenzke M, et al. MicroRNA-sensitive Oncolytic Measles Viruses for Cancer-specific Vector Tropism. Mol Ther. 2011; **19**(6): 1097-106.

95. Morfin F, Beguin A, Lina B, Thouvenot D. Detection of measles vaccine in the throat of a vaccinated child. Vaccine. 2002; **20**(11-12): 1541-3.

96. Leonard VH, Sinn PL, Hodge G, Miest T, Devaux P, Oezguen N, et al. Measles virus blind to its epithelial cell receptor remains virulent in rhesus monkeys but cannot cross the airway epithelium and is not shed. The Journal of clinical investigation. 2008; **118**(7): 2448-58.

97. Iankov ID, Blechacz B, Liu C, Schmeckpeper JD, Tarara JE, Federspiel MJ, et al. Infected cell carriers: a new strategy for systemic delivery of oncolytic measles viruses in cancer virotherapy. Mol Ther. 2007; **15**(1): 114-22.

98. Mader EK, Maeyama Y, Lin Y, Butler GW, Russell HM, Galanis E, et al. Mesenchymal stem cell carriers protect oncolytic measles viruses from antibody neutralization in an orthotopic ovarian cancer therapy model. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research. 2009; **15**(23): 7246-55.

99. Liu C, Russell SJ, Peng KW. Systemic therapy of disseminated myeloma in passively immunized mice using measles virus-infected cell carriers. Mol Ther. 2010; **18**(6): 1155-64.

100. Lamfers ML, Fulci G, Gianni D, Tang Y, Kurozumi K, Kaur B, et al. Cyclophosphamide increases transgene expression mediated by an oncolytic adenovirus in glioma-bearing mice monitored by bioluminescence imaging. Mol Ther. 2006; **14**(6): 779-88.

101. Myers RM, Greiner SM, Harvey ME, Griesmann G, Kuffel MJ, Buhrow SA, et al. Preclinical pharmacology and toxicology of intravenous MV-NIS, an oncolytic measles virus administered with or without cyclophosphamide. Clinical pharmacology and therapeutics. 2007; **82**(6): 700-10.

102. Bitnun A, Shannon P, Durward A, Rota PA, Bellini WJ, Graham C, et al. Measles inclusion-body encephalitis caused by the vaccine strain of measles virus. Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America. 1999; **29**(4): 855-61.

103. Miest TS, Yaiw KC, Frenzke M, Lampe J, Hudacek AW, Springfeld C, et al. Envelope-chimeric Entry-targeted Measles Virus Escapes Neutralization and Achieves Oncolysis. Mol Ther. 2011.

104. Ungerechts G, Frenzke ME, Yaiw KC, Miest T, Johnston PB, Cattaneo R. Mantle cell lymphoma salvage regimen: synergy between a reprogrammed oncolytic virus and two chemotherapeutics. Gene Ther. 2010; **17**(12): 1506-16.

105. Bossow S, Grossardt C, Temme A, Leber MF, Sawall S, Rieber EP, et al. Armed and targeted measles virus for chemovirotherapy of pancreatic cancer. Cancer Gene Ther. 2011.

106. Touchefeu Y, Vassaux G, Harrington KJ. Oncolytic viruses in radiation oncology. Radiother Oncol. 2011; **99**(3): 262-70.

107. Dingli D, Peng KW, Harvey ME, Greipp PR, O'Connor MK, Cattaneo R, et al. Image-guided radiovirotherapy for multiple myeloma using a recombinant measles virus expressing the thyroidal sodium iodide symporter. Blood. 2004; **103**(5): 1641-6.

108. Adusumilli PS, Stiles BM, Chan MK, Chou TC, Wong RJ, Rusch VW, et al. Radiation therapy potentiates effective oncolytic viral therapy in the treatment of lung cancer. Ann Thorac Surg. 2005; **80**(2): 409-16; discussion 16-7.

109. Advani SJ, Sibley GS, Song PY, Hallahan DE, Kataoka Y, Roizman B, et al. Enhancement of replication of genetically engineered herpes simplex viruses by ionizing radiation: a new paradigm for destruction of therapeutically intractable tumors. Gene therapy. 1998; **5**(2): 160-5.

110. Bieler A, Mantwill K, Holzmuller R, Jurchott K, Kaszubiak A, Stark S, et al. Impact of radiation therapy on the oncolytic adenovirus dl520: implications on the treatment of glioblastoma. Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology. 2008; **86**(3): 419-27.

111. Chen Y, DeWeese T, Dilley J, Zhang Y, Li Y, Ramesh N, et al. CV706, a prostate cancer-specific adenovirus variant, in combination with radiotherapy produces synergistic antitumor efficacy without increasing toxicity. Cancer Research. 2001; **61**(14): 5453-60.

112. Dilley J, Reddy S, Ko D, Nguyen N, Rojas G, Working P, et al. Oncolytic adenovirus CG7870 in combination with radiation demonstrates synergistic enhancements of antitumor efficacy without loss of specificity. Cancer gene therapy. 2005; **12**(8): 715-22.

113. Freytag SO, Paielli D, Wing M, Rogulski K, Brown S, Kolozsvary A, et al. Efficacy and toxicity of replication-competent adenovirus-mediated double suicide gene therapy in combination with radiation therapy in an orthotopic mouse prostate cancer model. International journal of radiation oncology, biology, physics. 2002; **54**(3): 873-85.

114. Ganesh S, Gonzalez-Edick M, Gibbons D, Ge Y, VanRoey M, Robinson M, et al. Combination therapy with radiation or cisplatin enhances the potency of Ad5/35 chimeric oncolytic adenovirus in a preclinical model of head and neck cancer. Cancer gene therapy. 2009; **16**(5): 383-92.

115. Geoerger B, Grill J, Opolon P, Morizet J, Aubert G, Lecluse Y, et al. Potentiation of radiation therapy by the oncolytic adenovirus dl1520 (ONYX-015) in human malignant glioma xenografts. Br J Cancer. 2003; **89**(3): 577-84.

116. Hingorani M, White CL, Zaidi S, Pandha HS, Melcher AA, Bhide SA, et al. Therapeutic effect of sodium iodide symporter gene therapy combined with external beam radiotherapy and targeted drugs that inhibit DNA repair. Mol Ther. 2010; **18**(9): 1599-605.

117. Jarnagin WR, Zager JS, Hezel M, Stanziale SF, Adusumilli PS, Gonen M, et al. Treatment of cholangiocarcinoma with oncolytic herpes simplex virus combined with external beam radiation therapy. Cancer gene therapy. 2006; **13**(3): 326-34.

118. Jorgensen TJ, Katz S, Wittmack EK, Varghese S, Todo T, Rabkin SD, et al. Ionizing radiation does not alter the antitumor activity of herpes simplex virus vector G207 in subcutaneous tumor models of human and murine prostate cancer. Neoplasia. 2001; **3**(5): 451-6.

119. Kim SH, Wong RJ, Kooby DA, Carew JF, Adusumilli PS, Patel SG, et al. Combination of mutated herpes simplex virus type 1 (G207 virus) with radiation for the treatment of squamous cell carcinoma of the head and neck. Eur J Cancer. 2005; **41**(2): 313-22.

120. Lamfers ML, Grill J, Dirven CM, Van Beusechem VW, Geoerger B, Van Den Berg J, et al. Potential of the conditionally replicative adenovirus Ad5-Delta24RGD in the treatment of malignant gliomas and its enhanced effect with radiotherapy. Cancer Research. 2002; **62**(20): 5736-42.

121. Liu C, Zhang Y, Liu MM, Zhou H, Chowdhury W, Lupold SE, et al. Evaluation of continuous low dose rate versus acute single high dose rate radiation combined with oncolytic viral therapy for prostate cancer. Int J Radiat Biol. 2010; **86**(3): 220-9.

122. Nandi S, Ulasov IV, Tyler MA, Sugihara AQ, Molinero L, Han Y, et al. Low-dose radiation enhances survivin-mediated virotherapy against malignant glioma stem cells. Cancer Research. 2008; **68**(14): 5778-84.

123. Portella G, Pacelli R, Libertini S, Cella L, Vecchio G, Salvatore M, et al. ONYX-015 enhances radiation-induced death of human anaplastic thyroid carcinoma cells. The Journal of clinical endocrinology and metabolism. 2003; **88**(10): 5027-32.

124. Rogulski KR, Freytag SO, Zhang K, Gilbert JD, Paielli DL, Kim JH, et al. In vivo antitumor activity of ONYX-015 is influenced by p53 status and is augmented by radiotherapy. Cancer Research. 2000; **60**(5): 1193-6.

125. Twigger K, Vidal L, White CL, De Bono JS, Bhide S, Coffey M, et al. Enhanced in vitro and in vivo cytotoxicity of combined reovirus and radiotherapy. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research. 2008; **14**(3): 912-23.

126. Urano M, He F, Minami A, Ling CC, Li GC. Response to multiple radiation doses of human colorectal carcinoma cells infected with recombinant adenovirus containing dominant-negative Ku70 fragment. International journal of radiation oncology, biology, physics. 2010; **77**(3): 877-85.

127. Zhang M, Li S, Li J, Ensminger WD, Lawrence TS. Ionizing radiation increases adenovirus uptake and improves transgene expression in intrahepatic colon cancer xenografts. Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy. 2003; **8**(1): 21-8.

128. Freytag SO, Movsas B, Aref I, Stricker H, Peabody J, Pegg J, et al. Phase I trial of replication-competent adenovirus-mediated suicide gene therapy combined with IMRT for prostate cancer. Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy. 2007; **15**(5): 1016-23.

129. Freytag SO, Stricker H, Pegg J, Paielli D, Pradhan DG, Peabody J, et al. Phase I study of replication-competent adenovirus-mediated double-suicide gene therapy in combination with conventional-dose three-dimensional conformal radiation therapy for the treatment of newly diagnosed, intermediate- to high-risk prostate cancer. Cancer Research. 2003; **63**(21): 7497-506.

130. Harrington KJ, Hingorani M, Tanay MA, Hickey J, Bhide SA, Clarke PM, et al. Phase I/II study of oncolytic HSV GM-CSF in combination with radiotherapy and cisplatin in untreated stage III/IV squamous cell cancer of the head and neck. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research. 2010; **16**(15): 4005-15.

131. Harrington KJ, Karapanagiotou EM, Roulstone V, Twigger KR, White CL, Vidal L, et al. Two-stage phase I dose-escalation study of intratumoral reovirus type 3 dearing and palliative radiotherapy in patients with advanced cancers. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research. 2010; **16**(11): 3067-77.

132. Immonen A, Vapalahti M, Tyynela K, Hurskainen H, Sandmair A, Vanninen R, et al. AdvHSV-tk gene therapy with intravenous ganciclovir improves survival in human malignant glioma: a randomised, controlled study. Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy. 2004; **10**(5): 967-72.

133. Mundt AJ, Vijayakumar S, Nemunaitis J, Sandler A, Schwartz H, Hanna N, et al. A Phase I trial of TNFerade biologic in patients with soft tissue sarcoma in the extremities. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research. 2004; **10**(17): 5747-53.

134. Senzer N, Mani S, Rosemurgy A, Nemunaitis J, Cunningham C, Guha C, et al. TNFerade biologic, an adenovector with a radiation-inducible promoter, carrying the human tumor necrosis factor alpha gene: a phase I study in patients with solid tumors. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology. 2004; **22**(4): 592-601.

135. Swisher SG, Roth JA, Komaki R, Gu J, Lee JJ, Hicks M, et al. Induction of p53-regulated genes and tumor regression in lung cancer patients after intratumoral delivery of adenoviral p53 (INGN 201) and radiation therapy. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research. 2003; **9**(1): 93-101.

136. Teh BS, Ayala G, Aguilar L, Mai WY, Timme TL, Vlachaki MT, et al. Phase I-II trial evaluating combined intensity-modulated radiotherapy and in situ gene therapy with or without hormonal therapy in treatment of prostate cancer-interim report on PSA response and biopsy data. International journal of radiation oncology, biology, physics. 2004; **58**(5): 1520-9.

137. Lamfers ML, Idema S, Bosscher L, Heukelom S, Moeniralm S, van der Meulen-Muileman IH, et al. Differential effects of combined Ad5- delta 24RGD and radiation therapy in in vitro versus in vivo models of malignant glioma. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research. 2007; **13**(24): 7451-8.

138. Egami T, Ohuchida K, Mizumoto K, Onimaru M, Toma H, Nishio S, et al. Radiation enhances adenoviral gene therapy in pancreatic cancer via activation of cytomegalovirus promoter and increased adenovirus uptake. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research. 2008; **14**(6): 1859-67.

139. Qian J, Yang J, Dragovic AF, Abu-Isa E, Lawrence TS, Zhang M. Ionizing radiation-induced adenovirus infection is mediated by Dynamin 2. Cancer Research. 2005; **65**(13): 5493-7.

140. Chou J, Roizman B. Herpes simplex virus 1 gamma(1)34.5 gene function, which blocks the host response to infection, maps in the homologous domain of the genes expressed during growth arrest and DNA damage. Proc Natl Acad Sci U S A. 1994; **91**(12): 5247-51.

141. Chou J, Kern ER, Whitley RJ, Roizman B. Mapping of herpes simplex virus-1 neurovirulence to gamma 134.5, a gene nonessential for growth in culture. Science. 1990; **250**(4985): 1262-6.

142. Kramm CM, Chase M, Herrlinger U, Jacobs A, Pechan PA, Rainov NG, et al. Therapeutic efficiency and safety of a second-generation replication-conditional HSV1 vector for brain tumor gene therapy. Human gene therapy. 1997; **8**(17): 2057-68.

143. Adusumilli PS, Chan MK, Hezel M, Yu Z, Stiles BM, Chou TC, et al. Radiation-induced cellular DNA damage repair response enhances viral gene therapy efficacy in the treatment of malignant pleural mesothelioma. Ann Surg Oncol. 2007; **14**(1): 258-69.

144. Hallahan DE, Mauceri HJ, Seung LP, Dunphy EJ, Wayne JD, Hanna NN, et al. Spatial and temporal control of gene therapy using ionizing radiation. Nat Med. 1995; **1**(8): 786-91.

145. Manome Y, Kunieda T, Wen PY, Koga T, Kufe DW, Ohno T. Transgene expression in malignant glioma using a replication-defective adenoviral vector containing the Egr-1 promoter: activation by ionizing radiation or uptake of radioactive iododeoxyuridine. Human gene therapy. 1998; **9**(10): 1409-17.

146. Srivastava N, Gochhait S, de Boer P, Bamezai RN. Role of H2AX in DNA damage response and human cancers. Mutat Res. 2009; **681**(2-3): 180-8.

147. Prise KM, Schettino G, Folkard M, Held KD. New insights on cell death from radiation exposure. The lancet oncology. 2005; **6**(7): 520-8.

148. Jackson SP. Sensing and repairing DNA double-strand breaks. Carcinogenesis. 2002; **23**(5): 687-96.

149. de Jager M, van Noort J, van Gent DC, Dekker C, Kanaar R, Wyman C. Human Rad50/Mre11 is a flexible complex that can tether DNA ends. Mol Cell. 2001; **8**(5): 1129-35.

150. Lisby M, Barlow JH, Burgess RC, Rothstein R. Choreography of the DNA damage response: spatiotemporal relationships among checkpoint and repair proteins. Cell. 2004; **118**(6): 699-713.

151. Petrini JH. The mammalian Mre11-Rad50-nbs1 protein complex: integration of functions in the cellular DNA-damage response. Am J Hum Genet. 1999; **64**(5): 1264-9.

152. Lee JH, Paull TT. ATM activation by DNA double-strand breaks through the Mre11-Rad50-Nbs1 complex. Science. 2005; **308**(5721): 551-4.

153. Downs JA, Nussenzweig MC, Nussenzweig A. Chromatin dynamics and the preservation of genetic information. Nature. 2007; **447**(7147): 951-8.

154. Halicka HD, Zhao H, Podhorecka M, Traganos F, Darzynkiewicz Z. Cytometric detection of chromatin relaxation, an early reporter of DNA damage response. Cell Cycle. 2009; **8**(14): 2233-7.

155. Kim YC, Gerlitz G, Furusawa T, Catez F, Nussenzweig A, Oh KS, et al. Activation of ATM depends on chromatin interactions occurring before induction of DNA damage. Nat Cell Biol. 2009; **11**(1): 92-6.

156. van Attikum H, Gasser SM. Crosstalk between histone modifications during the DNA damage response. Trends Cell Biol. 2009; **19**(5): 207-17.

157. Kruhlak MJ, Celeste A, Dellaire G, Fernandez-Capetillo O, Muller WG, McNally JG, et al. Changes in chromatin structure and mobility in living cells at sites of DNA double-strand breaks. J Cell Biol. 2006; **172**(6): 823-34.

158. Ziv Y, Bielopolski D, Galanty Y, Lukas C, Taya Y, Schultz DC, et al. Chromatin relaxation in response to DNA double-strand breaks is modulated by a novel ATM- and KAP-1 dependent pathway. Nat Cell Biol. 2006; **8**(8): 870-6.

159. Darzynkiewicz Z, Traganos F, Wlodkowic D. Impaired DNA damage response--an Achilles' heel sensitizing cancer to chemotherapy and radiotherapy. Eur J Pharmacol. 2009; **625**(1-3): 143-50.

160. Lavin MF, Delia D, Chessa L. ATM and the DNA damage response. Workshop on ataxia-telangiectasia and related syndromes. EMBO Rep. 2006; **7**(2): 154-60.

161. Zilfou JT, Lowe SW. Tumor suppressive functions of p53. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2009; **1**(5): a001883.

162. Watrin E, Peters JM. Cohesin and DNA damage repair. Exp Cell Res. 2006; **312**(14): 2687-93.

163. Bauerschmidt C, Arrichiello C, Burdak-Rothkamm S, Woodcock M, Hill MA, Stevens DL, et al. Cohesin promotes the repair of ionizing radiation-induced DNA double-strand breaks in replicated chromatin. Nucleic Acids Res. 2010; **38**(2): 477-87.

164. Powers JT, Hong S, Mayhew CN, Rogers PM, Knudsen ES, Johnson DG. E2F1 uses the ATM signaling pathway to induce p53 and Chk2 phosphorylation and apoptosis. Mol Cancer Res. 2004; **2**(4): 203-14.

165. Zhang XP, Liu F, Wang W. Coordination between cell cycle progression and cell fate decision by the p53 and E2F1 pathways in response to DNA damage. The Journal of biological chemistry. 2010; **285**(41): 31571-80.

166. Xiao Z, Chen Z, Gunasekera AH, Sowin TJ, Rosenberg SH, Fesik S, et al. Chk1 mediates S and G2 arrests through Cdc25A degradation in response to DNA-damaging agents. The Journal of biological chemistry. 2003; **278**(24): 21767-73.

167. Falck J, Mailand N, Syljuasen RG, Bartek J, Lukas J. The ATM-Chk2-Cdc25A checkpoint pathway guards against radioresistant DNA synthesis. Nature. 2001; **410**(6830): 842-7.

168. Matsuoka S, Huang M, Elledge SJ. Linkage of ATM to cell cycle regulation by the Chk2 protein kinase. Science. 1998; **282**(5395): 1893-7.

169. Zhang J, Powell SN. The role of the BRCA1 tumor suppressor in DNA double-strand break repair. Mol Cancer Res. 2005; **3**(10): 531-9.

170. Lieber MR. The mechanism of human nonhomologous DNA end joining. The Journal of biological chemistry. 2008; **283**(1): 1-5.

171. Chaurushiya MS, Weitzman MD. Viral manipulation of DNA repair and cell cycle checkpoints. DNA Repair (Amst). 2009; **8**(9): 1166-76.

172. Zhou PK, Sun Y, An J. Interaction between viral proteins and hosts and its disturbance in the cellular responses to ionising radiation. Int J Radiat Biol. 2009; **85**(7): 587-97.

173. Park HU, Jeong SJ, Jeong JH, Chung JH, Brady JN. Human T-cell leukemia virus type 1 Tax attenuates gamma-irradiation-induced apoptosis through physical interaction with Chk2. Oncogene. 2006; **25**(3): 438-47.

174. Durkin SS, Guo X, Fryrear KA, Mihaylova VT, Gupta SK, Belgnaoui SM, et al. HTLV-1 Tax oncoprotein subverts the cellular DNA damage response via binding to DNA-dependent protein kinase. The Journal of biological chemistry. 2008; **283**(52): 36311-20.

175. Sun Y, Huang YC, Xu QZ, Wang HP, Bai B, Sui JL, et al. HIV-1 Tat depresses DNA-PK(CS) expression and DNA repair, and sensitizes cells to ionizing radiation. International journal of radiation oncology, biology, physics. 2006; **65**(3): 842-50.

176. Liu MT, Chang YT, Chen SC, Chuang YC, Chen YR, Lin CS, et al. Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 represses p53-mediated DNA repair and transcriptional activity. Oncogene. 2005; **24**(16): 2635-46.

177. Liu MT, Chen YR, Chen SC, Hu CY, Lin CS, Chang YT, et al. Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 induces micronucleus formation, represses DNA repair and enhances sensitivity to DNA-damaging agents in human epithelial cells. Oncogene. 2004; **23**(14): 2531-9.

178. Chen YR, Liu MT, Chang YT, Wu CC, Hu CY, Chen JY. Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 represses DNA repair through the PI3K/Akt/FOXO3a pathway in human epithelial cells. J Virol. 2008; **82**(16): 8124-37.

179. Lai CK, Jeng KS, Machida K, Cheng YS, Lai MM. Hepatitis C virus NS3/4A protein interacts with ATM, impairs DNA repair and enhances sensitivity to ionizing radiation. Virology. 2008; **370**(2): 295-309.

180. DeBiasi RL, Clarke P, Meintzer S, Jotte R, Kleinschmidt-Demasters BK, Johnson GL, et al. Reovirus-induced alteration in expression of apoptosis and DNA repair genes with potential roles in viral pathogenesis. J Virol. 2003; **77**(16): 8934-47.

181. Araujo FD, Stracker TH, Carson CT, Lee DV, Weitzman MD. Adenovirus type 5 E4orf3 protein targets the Mre11 complex to cytoplasmic aggresomes. J Virol. 2005; **79**(17): 11382-91.

182. Stracker TH, Carson CT, Weitzman MD. Adenovirus oncoproteins inactivate the Mre11-Rad50-NBS1 DNA repair complex. Nature. 2002; **418**(6895): 348-52.

183. Hart LS, Yannone SM, Naczki C, Orlando JS, Waters SB, Akman SA, et al. The adenovirus E4orf6 protein inhibits DNA double strand break repair and radiosensitizes human tumor cells in an E1B-55K-independent manner. The Journal of biological chemistry. 2005; **280**(2): 1474-81.

184. Chowdhury D, Keogh MC, Ishii H, Peterson CL, Buratowski S, Lieberman J. gamma-H2AX dephosphorylation by protein phosphatase 2A facilitates DNA double-strand break repair. Mol Cell. 2005; **20**(5): 801-9.

185. Hart LS, Ornelles D, Koumenis C. The adenoviral E4orf6 protein induces atypical apoptosis in response to DNA damage. The Journal of biological chemistry. 2007; **282**(9): 6061-7.

186. Lees-Miller SP, Long MC, Kilvert MA, Lam V, Rice SA, Spencer CA. Attenuation of DNA-dependent protein kinase activity and its catalytic subunit by the herpes simplex virus type 1 transactivator ICP0. J Virol. 1996; **70**(11): 7471-7.

187. Parkinson J, Lees-Miller SP, Everett RD. Herpes simplex virus type 1 immediate-early protein vmw110 induces the proteasome-dependent degradation of the catalytic subunit of DNA-dependent protein kinase. J Virol. 1999; **73**(1): 650-7.

188. Hadjipanayis CG, DeLuca NA. Inhibition of DNA repair by a herpes simplex virus vector enhances the radiosensitivity of human glioblastoma cells. Cancer Research. 2005; **65**(12): 5310-6.

189. Abraham RT. Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. Genes Dev. 2001; **15**(17): 2177-96.

190. Zou L, Elledge SJ. Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes. Science. 2003; **300**(5625): 1542-8.

191. Wilkinson DE, Weller SK. Herpes simplex virus type I disrupts the ATR-dependent DNA-damage response during lytic infection. Journal of cell science. 2006; **119**(Pt 13): 2695-703.

192. Hadjipanayis CG, Fellows-Mayle W, Deluca NA. Therapeutic efficacy of a herpes simplex virus with radiation or temozolomide for intracranial glioblastoma after convection-enhanced delivery. Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy. 2008; **16**(11): 1783-8.

193. Meyn RE, Munshi A, Haymach JV, Milas L, Ang KK. Receptor signaling as a regulatory mechanism of DNA repair. Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology. 2009; **92**(3): 316-22.

194. Valerie K, Yacoub A, Hagan MP, Curiel DT, Fisher PB, Grant S, et al. Radiation-induced cell signaling: inside-out and outside-in. Mol Cancer Ther. 2007; **6**(3): 789-801.

195. Opyrchal M, Allen C, Iankov I, Aderca I, Schroeder M, Sarkaria J, et al. Effective Radiovirotherapy for Malignant Gliomas by Using Oncolytic Measles Virus Strains Encoding the Sodium Iodide Symporter (MV-NIS). Hum Gene Ther. 2012.

196. Walton MI, Eve PD, Hayes A, Valenti M, De Haven Brandon A, Box G, et al. The preclinical pharmacology and therapeutic activity of the novel CHK1 inhibitor SAR-020106. Mol Cancer Ther. 2010; **9**(1): 89-100.

197. Grigorov B, Rabilloud J, Lawrence P, Gerlier D. Rapid titration of measles and other viruses: optimization with determination of replication cycle length. PLoS One. 2011; **6**(9): e24135.

198. CI B. The toxiciy of poisons applied jointly. Ann Appl Biol. 1939; **26**: 585-615.

199. Guerrero Urbano T, Clark CH, Hansen VN, Adams EJ, A'Hern R, Miles EA, et al. A phase I study of dose-escalated chemoradiation with accelerated intensity modulated radiotherapy in locally advanced head and neck cancer. Radiother Oncol. 2007; **85**(1): 36-41.

200. Zhou PK, Sun Y, An J. Interaction between viral proteins and hosts and its disturbance in the cellular responses to ionising radiation. International journal of radiation biology. 2009; **85**(7): 587-97.

201. Park HU, Jeong JH, Chung JH, Brady JN. Human T-cell leukemia virus type 1 Tax interacts with Chk1 and attenuates DNA-damage induced G2 arrest mediated by Chk1. Oncogene. 2004; **23**(29): 4966-74.

202. Msaouel P, Iankov ID, Allen C, Russell SJ, Galanis E. Oncolytic measles virus retargeting by ligand display. Methods Mol Biol. 2012; **797**: 141-62.

203. Mader EK, Maeyama Y, Lin Y, Butler GW, Russell HM, Galanis E, et al. Mesenchymal stem cell carriers protect oncolytic measles viruses from antibody neutralization in an orthotopic ovarian cancer therapy model. Clin Cancer Res. 2009; **15**(23): 7246-55.

204. Touchefeu Y, Franken P, Harrington KJ. Radiovirotherapy : Principles and Prospects in Oncology. Current pharmaceutical design. 2012; **18**(22):3313-20.

Optimisation de la radiovirothérapie en associant un traitement radio-isotopique vectorisé par un virus de la rougeole oncolytique, une radiothérapie externe et une inhibition de checkpoint kinase-1.

La radiovirothérapie est définie comme étant l'utilisation de virus infectant les cellules cancéreuses pour guider un traitement radio-isotopique. Les virus oncolytiques sont des virus capables de se répliquer sélectivement dans les cellules cancéreuses, et de tuer ces cellules. Associer une radiovirothérapie à une radiothérapie externe est une méthode innovante pour augmenter la dose totale d'irradiation sélectivement dans la tumeur. L'objectif de ce travail a été d'évaluer une approche de radiovirothérapie avec un virus de la rougeole oncolytique codant le symporteur sodium/iodure NIS (MV-NIS). MV-NIS a été associé à un traitement par ^{131}I, à une radiothérapie externe, et à un traitement par SAR-020106, un nouvel agent radiosensibilisant inhibiteur de Checkpoint-1. Cette approche a été testée dans des modèles de cancer ORL et colorectal (HCT-116). *In vitro*, l'association de MV-NIS et de radiothérapie externe a eu des effets antitumoraux synergiques. La radiothérapie a augmenté l'expression fonctionnelle du NIS dans les cellules infectées. SAR-020106 a eu des effets synergiques avec la radiothérapie externe et avec MV-NIS. MV-NIS a permis de guider un traitement par ^{131}I dans les cellules infectées. Dans les cellules HCT-116, cet effet a été augmenté par SAR-020106. Dans un modèle murin de xénogreffe tumorale sous-cutanée HCT-116, MV-NIS et une radiothérapie externe ont eu des effets synergiques. La quadrithérapie a eu une activité antitumorale significative, avec amélioration de la survie des animaux. Ces résultats supportent fortement de futures recherches translationnelles et cliniques sur l'association de MV-NIS, de radiothérapie et d'agents radiosensibilisants.

Mots-clés : virus de la rougeole oncolytique, radiovirothérapie, radiothérapie externe, agents radiosensibilisants

Optimising measles virus-guided radiovirotherapy with external beam radiotherapy and specific checkpoint kinase 1 inhibition

Radiovirotherapy is defined as the use of viruses to deliver radioisotopic treatment into infected cells. Oncolytic viruses are able to selectively target and kill cancer cells. Combining external beam radiation therapy (EBRT) with radiovirotherapy is an innovative method to increase the total radiation dose selectively within tumour cells. Our aim was to evaluate a radiovirotherapy approach using Edmonston strain measles virus engineered to express the sodium/iodide symporter NIS (MV-NIS). We evaluated the therapeutic efficacy of a combination of MV-NIS, NIS-guided radioiodide, EBRT and a specific checkpoint-1 inhibitor (SAR-020106). This approach was investigated in head and neck and colorectal (HCT-116) cancer cells lines. We show that EBRT and MV-NIS exerted synergistic *in vitro* anti-tumour effects. EBRT increased NIS expression in infected cells. SAR-020106 had synergistic antitumour effect both with EBRT and with MV-NIS. We have demonstrated that MV-NIS mediated ^{131}I toxicity. In HCT-116 cells, this effect was enhanced by SAR-020106. *In vivo*, we have demonstrated that MV-NIS and EBRT had synergistic effects in an HCT-116 subcutaneous tumour model. The combination of MV-NIS, virally-directed ^{131}I, EBRT and SAR-020106 was evaluated *in vivo* in the same HCT-116 tumour model. This quadruplet regimen had significant antitumour activity, associated with an increased survival of animals. Our study strongly supports further translational and clinical research on MV-NIS in combination with radiation therapy and radiosensitising agents.

Keywords : oncolytic measles virus, radiovirotherapy, external beam radiation therapy, radiation-sensitizing agents

Visa du directeur de thèse

TOUCHEFEU Yann
7 rue Nelly Roussel
44400 Rezé