

Thèse de Doctorat

Carole ACHARD

*Mémoire présenté en vue de l'obtention du
grade de Docteur de l'Université de Nantes
sous le sceau de L'Université Bretagne Loire*

École doctorale : *Biologie-Santé*

Discipline : *Biologie, Médecine et Santé*

Spécialité : *Immunologie*

Unité de recherche : *INSERM UMR892/CNRS UMR6299*

Soutenue le *18 Mars 2016*

Thèse N° : **08**

Le virus oncolytique de la rougeole : sensibilité du mésothéliome pleural malin et activation du système immunitaire

JURY

Rapporteurs :	Nolwenn JOUVENET , Chargée de Recherche, Institut Pasteur de Paris Marc DALOD , Directeur de Recherche, Centre d'Immunologie Marseille-Luminy
Examineur :	Marc GREGOIRE , Directeur de Recherche, CRCNA, Nantes
Membre invité :	Philippe ERBS , Chercheur industriel, Transgene SA, Illkirch-Graffenstaden
Directeur de thèse :	Jean-François FONTENEAU , Chargé de recherche, CRCNA, Nantes

Je dédie ma thèse à mes trois grands-parents, emportés trop tôt par le cancer,

C'est en vous que je puise toute ma motivation,

J'espère que vous auriez été fiers de moi,

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier les membres rapporteurs et examinateurs du jury, le Dr Nolwenn Jouvenet, le Dr Marc Dalod, le Dr Philippe Erbs et le Dr Marc Grégoire d'avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse.

Merci à tous les collaborateurs de l'Institut Pasteur de Paris, en particulier Frédéric Tangy et Nolwenn Jouvenet, pour leur expertise en virologie et les réunions très intéressantes que nous avons partagées.

Merci aux membres de mon comité de thèse, le Dr Franck Halary et le Dr Nathalie Heuzé-Vourc'h qui ont suivi l'évolution de mon travail pendant ces années. J'adresse un remerciement particulier à Nathalie, qui m'a donné envie de me lancer dans ces études en m'encadrant pendant des stages volontaires que j'ai effectués dans mes premières années à la fac. Nathalie, merci pour ton soutien depuis tout ce temps, pour ta confiance en moi et tes conseils.

LES P'TITS MOTS DE P'TITE CAROLE

Eh bien nous y voilà, il est temps pour moi de vous écrire quelques mots... J'ai repoussé ce moment au maximum, car cela représente la fin d'un chapitre de ma vie et j'avoue que j'ai du mal à l'accepter !

Marc, notre grand manitou, je te remercie de m'avoir accueillie dans ton équipe depuis mon stage de master 2, même si à cette époque tu avais dit "on ne prend plus de filles dans le labo"... ! J'espère que tu ne regrettes pas ! ☺ En tous cas merci de m'avoir donné cette chance de travailler sur ce sujet si passionnant. Je souhaite vraiment que ta motivation durant toutes ces années permette à OncoVita de voir le jour. Ton emploi du temps de ministre m'a toujours impressionnée et tu vas maintenant devenir directeur de l'unité mais j'espère que tu pourras toujours te dégager du temps pour endosser ta casquette de "papy gâteau" ! Je n'oublierai pas ton sourire, ta générosité, ta musique zen et tes petites lunettes rondes !

Jeff, mon directeur de thèse, je te dois un grand merci pour m'avoir encadrée toutes ces années ! J'ai énormément apprécié tous les moments que nous avons passés à échanger, j'ai beaucoup appris de toi grâce à ta motivation à me faire partager tes connaissances scientifiques et ton expérience. Merci pour ta disponibilité face à mes questions incessantes, mes doutes, mais aussi pour une dernière répétition de ma présentation pour Ottawa un samedi matin en plein mois de juillet et pour tes réponses à mes appels de panique pendant ma rédaction de thèse... ! Ce long chemin qui est celui de réaliser une thèse a été une très bonne expérience pour moi, très enrichissante, et ton enthousiasme face aux résultats a été porteur. Garde cette passion qui t'anime ! ☺ Je te remercie pour ta rigueur dans la rédaction des papiers et la réalisation des figures, cela a été très formateur pour moi.

J'ai été ravie d'aller avec toi au congrès OVC à Boston ! C'était vraiment très intéressant et motivant, et nous avons passé de bons moments avec Johann, Cécile et Philippe de Transgene. C'était en plus la première fois que je traversais l'Atlantique ! Le retour a été moins drôle, surtout pour toi avec ton siège d'avion défraîchi et les petits voisins pas très sages assis derrière toi... ! ☺ Sans oublier la course dans l'aéroport pour finalement rater notre avion pour rentrer à Nantes... !

Je me souviendrai aussi toujours lorsque tu m'as annoncé qu'on irait au congrès DC 2014... Tu as commencé par me dire que tu étais allé à ce congrès en Australie, aux USA, en

Angleterre, en Allemagne... pour finalement m'annoncer que cette fois ça serait à Tours, ma ville natale !! Grand moment qui me fait encore rire (car heureusement j'ai pu me rattraper avec Boston !☺).

J'espère très sincèrement que l'on se retrouvera autour d'un café ou d'une bière lors de mes retours en France pendant mon post-doc, pour parler de science et d'autres choses ! Mais tu seras peut-être devenu un champion de natation d'ici là ! ☺ Pour l'instant on se donne déjà rendez-vous à OVC 2016 à Vancouver !! ☺

Christophe, merci pour ton aide et tes conseils pour certaines de mes manip ! Mon seul regret est de ne pas avoir joué plus souvent au tennis avec toi. Mais je sais que tu as peur de perdre car j'ai bien vu que tu as voulu m'anéantir en jouant avec Nico et moi un jour où il faisait 40°C à l'ombre...! ☺ En tous cas j'ai été contente de pouvoir suivre les scores et débriefer des matchs de Roland-Garros avec toi ! Je te dis à bientôt et je suis libéréééééé délivréééééé... ! ☺

Daniel, je souhaite vivement que les projets de modèles animaux fonctionnent pour enfin pouvoir tester le MV dans un modèle immunocompétent, mais c'est en bonne voie ! En tous cas merci pour ta patience ! Je n'oublierai pas les blagues imprimées au café ni les supers galettes des rois que tu raménais ! ☺

Nico, dit aussi Nicoletta ou Boisgerotte, je tiens d'abord à te remercier pour l'invitation à ton pot de thèse ! hi hi hi... A ton retour dans le labo, j'ai d'abord eu peur de toi, mais ça c'était avant que tu dévoiles ta vraie personnalité ! On a bien rigolé avec Vivi et Iza aussi ! Les séances de craquage, les tirs au pistolet, les brunchs en jogging, les lancers de clémentines et les potinages, n'est-ce pas "oreille qui traîne"... ! Ce fut super agréable aussi de pouvoir discuter des manips et de profiter de ton expérience. Merci pour ta patience face à mes nombreuses questions...Tu m'as beaucoup rassurée. En tous cas j'espère vraiment que j'aurai un parcours comme le tien ! Qui sait, on se retrouvera peut-être un jour pour travailler ensemble ! Enfin pour ça, il faut que ton stage de chercheur soit validé, et ce n'est pas gagné... ! ☺ J'espère que je vais quand même un peu te manquer, même si tu m'as dit loin des yeux loin du cœur...en bon pourri que tu es ! ☺ En tous cas ça va me manquer de ne plus avoir quelqu'un qui m'embête un peu...beaucoup... ! Ah oui j'allais oublier, j'ai gagné mon pari ! J'avais fait moins de 10 fautes dans mon intro que tu as corrigée ! ☺

David, dit mon Dave, merci de m'avoir encadrée pour mon stage de master 2 ! J'ai été ravie d'être ton esclave M2 ! hi hi hi Toi aussi tu as subi mes innombrables questions...mais tu as toujours répondu avec le sourire ! Je me souviens des pauses choco, des vacances au ski à Cauterets avec Victor, Clarisse et Florent, du parc Astérix et tant d'autres bons moments que l'on a passés ensemble !! ☺ Je te remercie pour ton soutien, je sais que je peux compter sur toi ! Pendant ces 2 ans et demi où tu es parti à Toronto on s'est toujours donné des nouvelles, on papotait sur Skype régulièrement, je souhaite que ça se passe pareil pendant mon post-doc car je tiens à notre amitié ! C'était génial de te retrouver ces quelques jours à Ottawa cet été, de découvrir la ville et de faire de belles balades en vélo ! Je suis triste par contre de partir au Canada alors que tu viens de rentrer en France... ! Mon Dave, je te souhaite de décrocher ce poste de chercheur, tu as un super parcours et tu as fait un post-doc au top, tu le mérites !! ☺

JB, ou "JB de la night" comme on t'appelait avec Iza, j'ai passé de très bons moments avec toi au labo et je te remercie de m'avoir formée sur les manips avec les DC. J'ai compris à quel point travailler sur ces cellules est à la fois génial et frustrant...quand on ne récupère que quelques DC pour toute une manip qu'on avait initialement prévue... ! Je trouve ça super qu'on se soit régulièrement revus pendant ton post-doc à Paris pour un apéro ou un resto avec tout le monde. Comme je le disais, Le Labo c'est une grande famille !! Maintenant revenu sur Nantes je te souhaite de t'épanouir professionnellement, mais j'ai confiance ! Merci de nous avoir invités à partager le grand jour de ton mariage avec Stéphanie, je vous souhaite beaucoup de bonheur !! Hâte de voir la bouille des minis JB ! ☺

Camille, dit Linotte ou Linus, c'est notre pharmacien à nous. On n'a pas été dans le même bureau mais tu aimes bien venir parfois faire un petit coucou dans le box des meilleures, celui dans lequel on est avec Vivi bien sûr ! J'aimais bien être avec toi dans la salle de culture avec ta musique à fond qui donne la pêche ! ☺ Bon courage pour finir ta thèse, et j'espère que ton projet de tour du monde post-thèse avec Léa va se réaliser ! ☺

Thibaut, tu es arrivé au moment de la rédaction de ma thèse, donc je n'ai pas passé beaucoup de temps au Labo avec toi mais en tous cas tu es très sympa et très souriant et j'aurais bien aimé plus te connaître ! Je te souhaite bon courage pour ta thèse, surtout avec Christouf... hi hi hi non je rigole ! ☺

Maintenant voici les p'tits mots de p'tite Carole pour les filles du Labo. Eh oui Marc, finalement il y a toujours beaucoup de filles dans cette équipe ! ☺

Vivi, ma Vivi, tant de choses à dire !! Quelle chance j'ai eu de pouvoir venir m'installer à ce bureau après Jihane ! On a passé tellement de bons moments ensemble pendant toutes ces années ! Je te remercie pour ton soutien, tu as toujours été très présente pour moi et rassurante...Ta détermination m'impressionne, mais ça c'est la Vivi compétitrice ! J'adore ton humour et quand nous partons en fou rire c'est génial ! C'est bon pour le moral et ça va beaucoup me manquer ! Le Boisgerotte nous en a fait voir de toutes les couleurs mais on ne s'est pas laissées faire ! Bon par contre on a toujours autant de mal à le faire parler de sa vie et on n'a pas réussi à le caser non plus...mais je compte sur toi ma Vivi ! ☺ Nos discussions et nos potinages vont énormément me manquer de l'autre côté de l'Atlantique, mais je compte bien sur le fait que tu me racontes tout ! Mais n'oublions pas, attention à notre karma... ! hi hi hi ☺ Je te souhaite beaucoup de bonheur avec ton Nounours et ton petit William, bébéinou que l'on a attendu avec impatience et qui est trop chou !! Il va beaucoup manquer à tata Carole... Bon à quand la bague au doigt ? Je vais avoir une petite discussion avec Nounours avant de partir ! ☺ Merci pour tout ma Vivi, je vais être très triste de devoir boucler mes affaires, mais je me dis que j'ai eu de la chance de te rencontrer et que tu fais partie de ma petite vie ! ☺

Clarisse, ma Clamisse, on en a partagé aussi de bons moments ensemble ! Des discussions autour d'un petit café ou d'un petit thé, des sorties ciné, des déjeuners cosy à la maison de Bertille avec Vivi aussi, des ateliers perles...sans oublier les vacances au ski à Cauterets, quelques week-ends à la mer et les soirées déguisées chez toi et Mélissa ! Merci également pour ton écoute car tu as toujours été là dans les bons moments et les périodes plus difficiles...Toi et ton sourire vous allez beaucoup me manquer ! ☺ Je te souhaite de t'épanouir dans ta vie professionnelle et personnelle, pour te sentir bien ! ☺ Même si tu as dû quitter l'équipe c'est super de continuer à partager ces déjeuners au bureau toutes les 3 avec Vivi, entre copines ! ☺ Je n'arrive pas à me dire que je vais partir mais je suis confiante quant au fait que l'on va se donner des nouvelles ! De toute façon il y a intérêt car tu vas beaucoup me manquer...

Iza, ma Iza, j'entends encore ton rire si communicatif dans les bureaux de l'équipe ! Il me manque depuis que tu es partie pour l'Australie...Merci d'avoir été aussi présente pour

moi, même jusqu'à la fin où tu m'envoyais des messages encourageants depuis l'autre bout de la Terre... ! Quelle chance de t'avoir rencontrée ! On a partagé aussi beaucoup de bons moments, à embêter notre JB de la night notamment, puis Boisgerotte ensuite ! ☺ En tous cas je te remercie car je me rassurerai toujours sur la quantité de chaussures que j'ai chez moi en me disant que toi il te faudrait carrément une pièce spéciale pour loger toutes les tiennes ! ☺ hi hi hi Je ne sais pas si on arrivera à se croiser en France avant mon départ, mais on se donne rendez-vous au Canada ou en Australie, c'est obligé ! ☺

Tiphaine, je suis sûre que tu vas assurer pour ta thèse ! Tu as hérité d'un projet pas si facile avec l'étude transcriptomique mais tu m'impressionnes avec ton acharnement et ta motivation ! Tu es toujours de bonne humeur et c'est super agréable ! J'ai été ravie de travailler avec toi ! J'espère te voir à Vancouver au congrès OVC 2016 avec de supers résultats ! ☺

Joëlle, je n'ai aucun doute non plus sur le fait que tu vas faire une belle thèse ! C'est bien vous êtes arrivées en même temps dans l'équipe avec Tiphaine et vous allez pouvoir vous soutenir ! ☺ Ne te laisse pas faire avec Boisgerotte ! Ton calme et ton sourire ont toujours été rassurants ! ☺ Ce fut un plaisir de partager ces moments au Labo avec toi ! Je te confie mon bureau, tu vas voir on s'y sent bien ! ☺

Mathilde, tu as été une étudiante très agréable, curieuse et super motivée ! Que tu poursuives en thèse ou que tu décides de stopper maintenant, tu feras quelque chose de bien ! ☺ le principal c'est de s'épanouir dans ce qu'on fait ! Je te souhaite plein de belles choses pour la suite !

Sophie, notre maman du Labo toujours aux petits soins pour nous ! Ton sourire et ta grande générosité vont me manquer ! et aussi tes macarons super bons... !! Tu es toujours prête à aider et on sait que l'on peut compter sur toi ! Mais il faut aussi que tu penses à toi... alors promets-moi de profiter de moments rien qu'à toi, à jardiner ou à faire de la couture ! Tu m'enverras des photos de tes créations ! ☺

Nadège, tu es arrivée il y a peu de temps au Labo et j'ai pourtant l'impression que tu es parmi nous depuis longtemps ! ☺ Les mois partagés au Labo avec toi ont été très agréables ! Tu as toujours un mot gentil et on a bien rigolé ! La quantité de travail que tu as

fournie m'a impressionnée ! Je te souhaite vraiment de pouvoir continuer à faire ce qui te plaît, et où que tu ailles les gens ne pourront que t'apprécier ! ☺

Delphine, je te remercie pour ta disponibilité et ta rigueur, ce fut un réel plaisir de travailler avec toi ! Bon courage pour la suite, car je vois que l'agenda est toujours bien rempli, mais je libère des places... ! C'était chouette que vous soyez venues dans nos bureaux avec Anne-Claire ! ☺ on a pu profiter de vous voir un peu plus !

Anne-Claire, comme avec Delphine, ça a été super de travailler avec toi ! Merci pour toutes les élu-triations (ou pas) que je t'ai faites faire... ! On a une chance incroyable de vous avoir sur la plateforme ! On a passé de bons moments ensemble, à aller prendre un verre avec tout le monde le soir après le boulot, au parc Astérix et n'oublions pas surtout notre match de hockey sur glace mémorable !!! ☺ J'espère que tu seras toujours au Labo quand je rentrerai faire un coucou sur Nantes ! ☺

Et voilà, il y en a du monde dans cette grande famille !! Un grand merci à tous car ça a été une chance énorme de pouvoir travailler dans une telle ambiance toutes ces années, aussi bien entourée ! Je repars aussi du Labo avec des ami(e)s qui comptent beaucoup pour moi. Je pense que c'est rare de retrouver ça ailleurs. Je suis sûre que Marc a un secret bien gardé, car n'oublions pas... "**Grégoire un Jour, Grégoire Toujours**"... !

Je tiens aussi à remercier Juliette et Nadège de la plateforme de cytométrie. Vous n'allez plus me voir arriver avec mon petit calendrier pour vous réserver tous vos jeudis après-midis !! ça a été top de travailler avec vous !

Merci aussi aux membres de l'équipe 3 avec qui j'ai passé de supers moments ! Tiphaine, Nico, Sylvain, Maud, Romain, Agnès et Virginie vous allez me manquer ! Vous avez toujours un sourire accroché à vos lèvres et ça fait plaisir de vous croiser dans les couloirs ! On a aussi passé de bonnes soirées ensemble !! ☺

Un p'tit mot spécial pour Tiphaine, tu vas beaucoup me manquer... On se ressemble sur certains traits de notre caractère, et on se comprend donc très bien ! Merci beaucoup pour ton écoute et ton soutien ! J'ai adoré aller à la gym suédoise avec toi, je suis contente de te l'avoir faite découvrir ! C'était chouette de se motiver toutes les 2 ! Et on peut se féliciter

d'avoir quand même réussi à amener les deux Nico et Romain avec nous! Bon d'accord c'était pas très dur parce que la prof était mignonne mais bon... on a quand même réussi !! Je te souhaite tout plein de courage pour finir ta thèse, mais je ne doute pas que tout va bien se passer pour toi ! Je regrette vraiment de ne pas être là pour toi, mais je te soutiendrai à distance, compte sur moi !! Je ne doute pas que l'on va garder contact, car de toute façon, les Poissons et les Cancers sont faits pour être amis non ?... ☺

Sylvain, Maud et Nico, bon courage à vous aussi pour finir cette thèse, je suis aussi triste de me dire que je ne pourrai pas vous voir et que je ne pourrai pas fêter ça avec vous, mais vous me raconterez !!

Un petit mot aussi pour les amis de ma promo, Cassie-Marie, Leslie, Maëva, Charlotte, Romain, Kristell, Jessie, Sophie... On a passé de belles années en Master à la fac puis on s'est tous soutenus et encouragés en thèse ! J'espère pour vous que tout va bien se passer pour la suite, maintenant que l'on est tous Docteurs ! ☺ On se donnera des nouvelles !

Merci aussi à tous mes amis qui m'encouragent depuis toutes ces années et avec qui je peux partager ma passion !!

Je tiens enfin à remercier mes parents qui ont toujours cru en moi et encouragé. Sans eux je n'en serai pas là aujourd'hui. Merci à ma sœur qui m'a toujours apporté tout son soutien. Enfin, je dois beaucoup à Victor qui a vécu cette période de ma vie à mes côtés, qui m'a toujours soutenue à chaque instant et aussi supportée... ! ☺ Nous partons maintenant vivre cette aventure au Canada tous les deux et j'espère que nous allons en profiter au maximum !! Mais tant que l'on est tous les deux, tout ne peut que bien se passer... ! ☺

Merci à tous, et vous êtes bien sûr les bienvenus pour une visite à Ottawa !!!

P'tite Carole

SOMMAIRE

LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	1
INTRODUCTION	4
PARTIE I : Le Mésothéliome Pleural Malin.....	5
I. Description de la pathologie	5
II. Etiologie.....	5
A. L'amiante	6
1. Exposition à l'amiante	6
2. Rétention des fibres d'amiante dans la plèvre pariétale.....	6
3. Processus de tumorigenèse.....	7
B. Le Simian virus 40	8
III. Le diagnostic reste un challenge.....	9
A. L'imagerie	9
B. L'analyse cytologique.....	10
C. L'analyse immunohistochimique	10
D. Les biomarqueurs solubles.....	11
IV. Prise en charge thérapeutique	13
A. Les traitements conventionnels.....	13
1. La chirurgie.....	13
2. La chimiothérapie	13
3. La radiothérapie	14
4. Vers un traitement multimodal	14
B. Nouvelles modalités thérapeutiques	15
1. Les thérapies ciblées	15
2. Les agents épigénétiques	16
3. Approches immunothérapeutiques	17
PARTIE II : La Virothérapie anti-tumorale.....	19
I. Des virus pour le traitement du cancer	19
II. Le virus de la rougeole	21
A. Structure du virus et son cycle de réplication.....	21
B. Pathologie	23
1. Récepteurs du virus et tropisme cellulaire	23

2.	Manifestations cliniques.....	24
3.	Vaccination	25
C.	Le virus atténué de la rougeole en tant que virus oncolytique.....	26
1.	Ciblage spécifique des cellules tumorales	26
2.	De nombreux types de cancers sont sensibles au MV.....	28
3.	Modifications du virus de la rougeole	29
a)	Optimiser sa spécificité.....	29
i.	Rediriger le MV vers un marqueur tumoral spécifique	29
ii.	Activation dépendante de l'environnement tumoral	30
iii.	Restreindre la réplication du MV au tissu tumoral	31
b)	Optimiser son efficacité lytique.....	32
i.	La radiovirothérapie	32
ii.	La chimiovirothérapie	32
c)	Optimiser son immunogénicité.....	33
d)	Optimiser sa traçabilité <i>in vivo</i>	34
III.	Développement de la virothérapie anti-tumorale en clinique.....	36
A.	Les souches oncolytiques du virus de la rougeole.....	36
1.	Cancer de l'ovaire chimiorésistant.....	36
2.	Myélome Multiple	37
3.	Autres essais cliniques en cours.....	38
B.	Le virus de la vaccine JX-594.....	38
C.	Le virus Herpes Simplex T-Vec.....	39
IV.	Réponse immunitaire innée et virothérapie.....	42
A.	La réponse interféron de type I.....	42
1.	Détection cytoplasmique des virus à ARN.....	42
a)	Structure des hélicases RIG-I et Mda5	42
b)	Ligands de RIG-I	43
c)	Ligands de Mda5	44
2.	Synthèse d'IFN de type I	44
3.	Induction d'un état anti-viral : les ISG.....	45
a)	Voie de signalisation des IFN de type I : la voie JAK-STAT	45
b)	Les IFN-Stimulated Gene (ISG)	46
i.	Mx GTPases	47

ii. ISG15	48
iii. OAS/RNaseL.....	49
iv. PKR.....	49
4. Echappement du virus de la rougeole à la réponse IFN de type I	50
B. Impact de la réponse IFN de type I sur la virothérapie	50
1. IFN de type I et cancer.....	50
2. La réponse IFN de type I conditionne l'efficacité de la virothérapie.....	51
a) Le VSV.....	51
b) Le MV	53
PARTIE III : Virothérapie et réponse immunitaire anti-tumorale	56
I. Système immunitaire et développement tumoral	56
A. Le concept d'immunosurveillance	56
B. Le cancer immunoediting.....	57
1. Mise en évidence	57
2. Un processus en trois phases	57
a) Élimination	57
b) Équilibre.....	59
c) Échappement.....	59
3. 7 ^{ème} caractéristique intrinsèque des cellules tumorales.....	60
II. Briser la tolérance immunitaire	61
A. Importance des lymphocytes T CD8 ⁺ cytotoxiques.....	61
1. Infiltration dans la tumeur : facteur de bon pronostic	61
2. Immunothérapies.....	61
B. Les virus oncolytiques, agents immunothérapeutiques.....	63
III. La réponse immunitaire anti-tumorale.....	64
A. Les cellules dendritiques	64
1. Rôle central dans la réponse immunitaire	64
2. Reconnaissance des pathogènes	64
a) Les récepteurs cytoplasmiques.....	65
i. Les RLR.....	65
ii. Les NLR.....	65
iii. Les senseurs d'ADN	65
b) Les Toll-like récepteurs	65

i. Les TLR de surface	66
ii. Les TLR intracellulaires	66
iii. Signalisation induite par les TLR.....	67
3. Les populations de DC humaines	69
a) Présentation des populations	69
b) Origine des DC du sang	70
c) Spécialisation fonctionnelle des DC du sang	71
i. Profil d'expression des TLR.....	71
ii. Sécrétion de cytokines.....	71
iii. Capacité de présentation des antigènes	72
B. La mort cellulaire immunogène	73
1. La théorie du danger	73
2. Caractéristiques de l'ICD	73
a) Différents types d'ICD	73
b) L'ICD et la réponse immunitaire anti-tumorale.....	74
3. Induction d'une ICD par le MV	76
C. Activation des lymphocytes T CD8 ⁺	76
1. Les DC activent une réponse immunitaire effectrice	76
2. Induction de lymphocytes T CD8 ⁺ anti-tumoraux par le MV	78
D. Fonctions des IFN de type I dans l'immunité anti-tumorale	79
E. Activité cytotoxique des cellules dendritiques	82
1. Découverte des DC cytotoxiques.....	82
2. La protéine TRAIL.....	82
3. DC cytotoxiques en réponse à des virus.....	83
4. DC cytotoxiques en réponse à des ligands de TLR	84
OBJECTIFS DE LA THÈSE.....	87
RÉSULTATS.....	90
Article n°1 : Sensitivity of human pleural mesothelioma to oncolytic measles virus depends on defects of the type I interferon response	91
Article n°2 : Oncolytic measles virus induces TRAIL-mediated cytotoxicity by human myeloid and plasmacytoid dendritic cells.....	108
DISCUSSION.....	142
RÉFÉRENCES.....	164

ANNEXES	206
---------------	-----

Annexe n°1: Oncolytic immunotherapy : the new clinical outbreak.....	
Annexe n°2: Oncolytic virotherapy for human malignant mesothelioma : recent advances	
Annexe n°3: Induction of immunogenic tumor cell death by attenuated oncolytic measles virus	
Contribution aux Annexes n°4 à 6	
Annexe n°4: Natural oncolytic activity of live-attenuated measles virus against human lung and colorectal adenocarcinomas	
Annexe n°5: Human natural killer cells promote cross-presentation of tumor cell-derived antigens by dendritic cells	
Annexe n°6: Angiogenesis stimulated by human kallikrein-related peptidase 12 acting via a platelet-derived growth factor B-dependent paracrine pathway	

LISTE DES ABRÉVIATIONS

5-FC: 5-fluorocytosine	DAI: DNA-dependent Activator of IRF
5-FU: 5-fluorouracil	DAMP: Damage-Associated Molecular Pattern
5-FUMP: 5-fluorouridine-5'-monophosphate	DARPin: Designed Ankyrin Repeat Protein
AIM2: Absent in melanoma 2	DC: Dendritic Cell
ALR: AIM2-Like Receptor	DcR: Decoy Receptor
AP1: Activating Protein 1	DC-SIGN: DC-Specific Intercellular adhesion molecule 3-Grabbing Nonintegrin
ASGCT: American Society of Gene and Cell Therapy	DISC: Death-Inducing Signaling Complex
ATL: Adult T cell Leukemia	DR: Death Receptor
ATP: Adénosine Triphosphate	EGF: Epidermal Growth Factor
BDCA: Blood Dendritic Cell Antigen	EGFR: EGF Receptor
BMDM: Bone Marrow-Derived Macrophage	EIF2α: Eukaryotic Translation Initiation Factor 2 alpha
CARD: Caspase Activation and Recruitment Domain	EMA: Epithelial Membrane Antigen
CCL: Chemokine C-C motif Ligand	EMCV: Encephalomyocarditis Virus
CCR: Chemokine C-C motif Receptor	EpCAM: Epithelial Cell Adhesion Molecule
CD: Cytosine Deaminase	EPP: pneumonectomie extrapleurale
CDC: Complement-Dependent Cytotoxicity	EPR: Enhanced Permeability and Retention
CDP: Common DC Progenitor	FADD: Fas-Associated protein with Death Domain
CEA: CarcinoEmbryonic Antigen	FasL: Fas Ligand
cGAMP: cyclic GMP-AMP	FDA: Food and Drug Administration
cGas: cGAMP synthase	FSME: Früh Sommer Meningo-Encephalitis
CK5/6: Cytokeratin 5/6	GFP: Green Fluorescent Protein
CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité	GM-CSF: Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor
Col3A1 : collagène de type III	GMDP: Granulocyte Monocyte DC Progenitor
CpG: 2'-deoxyribo-Cytidine-Phosphate-Guanosine	GTPases: guanosine triphosphatases
CREB: cAMP response element-binding protein	HER2/neu: Human Epidermal Growth Factor Receptor-2
CRT: calréticuline	HIV: Human Immunodeficiency Virus
CT: Computerized Tomography	HMGB1: High-Mobility Group Box 1
CTD: C-Terminal Domain	HSP: Heat Shock Protein
CTLA-4: Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen-4	HSV: Herpes Simplex Virus
CXCL: C-X-C motif Chemokine Ligand	

ICD: Immunogenic Cell Death	MeP: 6-methylpurine
IDO: Indoleamine 2,3-dioxygenase	MeP-dR: 6-methylpurine-2'-deoxyriboside
IFI: IFN Inducible protein	MIC: MHC-class-I-polypeptide-related sequence
IFIT1: Interferon-induced protein with Tetratricopeptide repeats 1	miR: microARN
IFN: Interferon	MLR: Mixed Lymphocyte Reaction
IFNAR: IFN- α/β Receptor	MMP: Matrix Metalloproteinase
IGF-1: Insulin-like Growth Factor 1	Mo-DC: Monocyte-derived DC
iHDAC: inhibiteur d'histones déacétylases	MPF: Megakaryocyte Potentiating Factor
IKDC: Interferon-Producing Killer Dendritic Cell	MPM: Mésothéliome Pleural Malin
IKKϵ: I κ B kinase- ϵ	MUC-1: Mucin-1
IL: Interleukine	MV: Measles Virus
IMIG: International Mesothelioma Interest Group	Mx: Myxomavirus resistance
IRF: IFN Regulatory Factor	MyD88: Myeloid Differentiation primary response gene 88
IRM: Imagerie par Résonance Magnétique	NALP3: NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 3
ISG: Interferon-Stimulated Gene	NAP: Neutrophil-Activating Protein
ISGF3: ISG Factor 3	NCI: US National Cancer Institute
ISRE: IFN-stimulated response elements	NDV: Newcastle Disease Virus
JAK: Janus Associated Kinase	NF-κB: Nuclear Factor kappa B
Jnk: c-Jun N-terminal kinase	NIS: Na/I Symporter
LACV: LaCrosse Virus	NK: Natural Killer
LBP: LPS-Binding Protein	NKDC: Natural Killer Dendritic Cell
LGP2: Laboratory of Genetics and Physiology 2	NKT: Natural Killer T cells
LPS: Lipopolysaccharide	NLR: NOD-Like Receptor
MAPK: Mitogen-Activated Protein Kinase	NLRP3: NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3
MAVS: Mitochondrial Anti-Viral Signaling	NOD: Nucleotide-binding Oligomerization Domain
MCA: Méthylcholanthrène	NY-ESO-1: New-York Esophageal Squamous cell carcinoma protein 1
Mda5: Melanoma differentiation-associated protein 5	OAS: Oligoadenylate Synthetase
MDA: Microtubule-Destabilizing Agents	ODN: OligoDeoxyNucleotide
M-CSF: Macrophage Colony-Stimulating Factor	OMS: Organisation Mondiale de la Santé
mDC: myeloid DC	OVC: Oncolytic Virus Conference
MDP: Monocyte DC Progenitor	P/D: pleurectomie/décortication
MDSC: Myeloid-Derived Suppressive Cells	

PAMP: Pathogen-Associated Molecular Patterns

PD-1: Programmed cell Death 1

pDC: plasmacytoid DC

PD-L1: Programmed cell Death Ligand 1

Pexa-Vec: pexastimogene devacirepvec

PFU: Plaque Forming Units

PGE2: Prostaglandine E2

PKR: Protein Kinase R

PNP: Purine Nucléoside Phosphorylase

poly(I:C): polyinosinic-polycytidylic acid

PRR: Pattern Recognition Receptor

PSMA: Prostate-Specific Membrane Antigen

RAG: Recombinase Activating Gene

RANTES: Regulated on Activation, Normal T Cell Expressed and Secreted

RE: réticulum endoplasmique

RIG-I: Retinoic acid-Inducible Gene-I

RIPK: Receptor-Interacting Protein Kinase

RLR: RIG-I Like Receptor

RNP: ribonucléoprotéine

ROS: Reactive Oxygen Species

RSAD2: Radical S-Adenosyl Methionine Domain Containing 2

SAHA: suberoylanilide hydroxamic acid

SCD: super-cytosine deaminase

scFv: single-chain fragment variable

shRNA: short-hairpin ARN

SLAM: Signaling Lymphocyte Activation Molecule

SMRP: Soluble Mesothelin-Related Peptide

SPECT-CT: Single-Photon Emission Computed Tomography-Computed Tomography

STAT: Signal Transducer and Activator of Transcription

STING: Stimulator of IFN Gene

SV40: Simian Virus 40

T reg: lymphocytes T régulateurs

TAG-72: Tumor-Associated Glycoprotein-72

TBK1: TANK-binding kinase

TCID50: 50% Tissue Culture Infectious Dose

TCR: T Cell Receptor

TEP: Tomographie par Émission de Positons

TGF-β: Transforming Growth Factor-β

Th: T helper

TIL: Tumor-Infiltrating Lymphocytes

TIR: Toll-IL-1 Receptor

TK: Thymidine Kinase

TLR: Toll-like receptor

TNF-R: TNF-α Receptor

TNF-α: Tumor Necrosis Factor-alpha

TRAF3: TNF Receptor-Associated Factor 3

TRAIL-R: TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand Receptor

TRAIN: Transcription of Repeats Activates Interferon

TRIF: TIR domain-containing adaptor protein inducing interferon-β

TTF-1: Thyroid Transcription Factor-1

T-Vec: talimogene laherparepvec

TYK: Tyrosine Kinase

URPT: uracil phosphoribosyltransferase

UV-B: UltraViolet-B

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor

VSV: Vesicular Stomatitis Virus

WCLC: World Conference on Lung Cancer

WT-1: Wilms Tumor antigen-1

YFV: Yellow Fever Virus

β-gal: β-galactosidase

INTRODUCTION

PARTIE I : Le Mésothéliome Pleural Malin

I. Description de la pathologie

Le mésothéliome malin est une tumeur agressive des séreuses telles que la plèvre, le péritoine et le péricarde. Le mésothéliome pleural malin (MPM), touchant la plèvre, est le plus fréquent des mésothéliomes déclarés (80%) [1]. La plèvre est la séreuse recouvrant les poumons et on distingue la plèvre pariétale, située contre la paroi thoracique, de la plèvre viscérale accolée aux poumons. Ces deux feuillets délimitent la cavité pleurale renfermant un liquide, le liquide pleural, assurant le glissement des deux feuillets l'un sur l'autre lors de la respiration. L'apparition d'un MPM se caractérise par un envahissement de la cavité pleurale par les cellules mésothéliales tumorales et un épanchement pleural, correspondant à une augmentation considérable du volume de liquide pleural (15mL chez un individu sain, 1 à 2L chez un patient atteint de MPM). Cette accumulation de liquide pleural est responsable d'une gêne respiratoire (dyspnée), symptôme majeur du MPM.

Le MPM peut se présenter sous plusieurs formes histologiques : épithélioïde (60% des cas de MPM), sarcomatoïde (10%) ou biphasique (30%), cette dernière étant composée des deux formes épithélioïde et sarcomatoïde. Cette terminologie a été définie par la classification de l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) en 2004 et sert de référence pour le diagnostic de cette tumeur.

Bien que l'incidence de ce cancer soit faible, avec 10 à 30 cas diagnostiqués pour un million de personnes dans la majorité des pays d'Europe [2], il est actuellement considéré comme un enjeu de santé publique étant donné son agressivité, sa résistance aux traitements proposés et son incidence croissante. La médiane de survie est de 40% un an après le diagnostic et de seulement 10% après 5 ans [3].

II. Etiologie

Même si environ 80% des MPM peuvent être attribués à une exposition aux fibres d'amiante, d'autres facteurs, à ce jour controversés, peuvent entraîner le développement de ce cancer. C'est le cas du virus SV40 (Simian Virus 40), de certains carcinogènes environnementaux tels que le minéral ériomite, les radiations ionisantes ainsi que des facteurs génétiques [4].

A. L'amiante

1. Exposition à l'amiante

Le lien entre le MPM et l'exposition à l'amiante a été mis en évidence pour la première fois grâce à une étude épidémiologique publiée par Wagner en 1960, rapportant des cas de MPM chez des personnes travaillant dans les mines d'amiante d'une province d'Afrique du Sud [5]. L'amiante désigne les minéraux silicates hydratés ayant une texture fibreuse. On distingue deux variétés de fibres d'amiante : la serpentine (aussi appelée chrysotile) et les amphiboles (anthophyllite, amosite, crocidolite, actinolite et trémolite) [6]. Grâce à leurs propriétés physico-chimiques intéressantes (incombustibilité, imputrescibilité, résistance thermique, chimique et mécanique), les fibres d'amiante ont été massivement utilisées dans le monde de l'industrie, du bâtiment (en particulier lors de la reconstruction après la seconde guerre mondiale) et pour la construction navale. L'exposition aux fibres d'amiante est donc professionnelle et ceci explique la plus forte incidence chez les hommes que chez les femmes (ratio 5:1) [7]. L'incidence du MPM parmi les personnes professionnellement exposées est 40 fois supérieure à celle observée dans la population globale [8].

Après avoir été reconnue comme l'un des carcinogènes les plus importants, l'amiante a été interdite d'utilisation en France en 1997 et en Europe en 2005. Depuis le 16 janvier 2012, le MPM est considéré comme une maladie à déclaration obligatoire : tout cas de MPM doit être notifié afin d'améliorer la surveillance des cancers liés à l'environnement professionnel. Malgré l'arrêt de l'utilisation de l'amiante dans de nombreux pays, un pic d'incidence est attendu dans les années 2020-2040 en raison du temps de latence important entre l'exposition à l'amiante et l'apparition de la maladie, de 30 ans environ [1, 4]. De plus, l'amiante est encore largement utilisée dans les pays émergents, présageant une augmentation du nombre de cas de MPM à l'échelle mondiale pour les années à venir.

2. Rétention des fibres d'amiante dans la plèvre pariétale

Il est démontré que le pouvoir carcinogène des fibres d'amiante est dû à leurs propriétés physiques, en particulier leur taille et leur diamètre. Les fibres de la famille des amphiboles, notamment la crocidolite, ont un rôle carcinogène clairement établi [9]. En effet, ces fibres sont longues et fines (taille supérieure à $5\mu\text{m}$ et diamètre inférieur à $0,25\mu\text{m}$) et plusieurs travaux ont prouvé que les longues fibres ont un effet cancérigène plus important que les courtes [10, 11]. Les fibres d'amiante inhalées passent des alvéoles pulmonaires vers

l'espace pleural [12] et le mécanisme par lequel ces fibres provoquent un MPM a été décrit [13]. Toute particule gagnant l'espace pleural est normalement éliminée vers les ganglions lymphatiques les plus proches grâce au liquide pleural qui effectue un turn-over rapide au travers des stomata, ouvertures connectant la plèvre pariétale au système lymphatique. Tandis que les fibres courtes comme les chrysotiles peuvent être éliminées correctement, les longues fibres d'amiante ne peuvent pas traverser les stomata du fait de leur taille et s'accumulent autour de ces ouvertures au niveau de la plèvre pariétale, formant des "black spots". Il a effectivement été trouvé dans ces spots, à partir de biopsies, une quantité supérieure d'amphiboles par rapport aux chrysotiles [14]. Cette rétention des fibres d'amiante dans la plèvre pariétale va générer des événements biologiques menant à l'apparition de la pathologie.

3. Processus de tumorigenèse

Divers événements interviennent dans le processus de tumorigenèse. Tout d'abord, la biopersistance des fibres d'amiante, ne se dissolvant pas et ne se fragmentant pas en fibres plus courtes, va entraîner une irritation pleurale due aux dommages répétés sur la surface mésothéliale suivis des cycles de réparation tissulaire pro-inflammatoires [15]. D'autre part, les cellules mésothéliales phagocytent les fibres d'amiante, provoquant une oxydation intracellulaire et des cassures de l'ADN [16, 17]. Il a également été montré que ces fibres interfèrent avec la mitose, générant une aneuploïdie suite à la ségrégation anormale des chromosomes pendant ce processus [18].

Les macrophages pleuraux vont également tenter de phagocyter ces fibres pour les éliminer. Cependant, la taille de ces fibres empêche une phagocytose correcte, provoquant une phagocytose dite contrariée, responsable de la libération de cytokines pro-inflammatoires, de radicaux libres et de ROS (Reactive Oxygen Species) [13]. Ce stress oxydatif ainsi généré va participer indirectement aux dommages génétiques induits par l'amiante dans les cellules mésothéliales [19, 20].

Il a été démontré que les effets directs de l'amiante s'associent à une inflammation chronique dans le processus de tumorigenèse. En effet, une étude a démontré qu'au contact des fibres d'amiante, les macrophages produisent du TNF- α (Tumor Necrosis Factor-alpha) et les cellules mésothéliales expriment le récepteur au TNF- α , TNF-R1 (TNF- α Receptor 1). Le TNF- α active le facteur de transcription NF- κ B (Nuclear Factor kappa B) dans les cellules mésothéliales, induisant leur survie. L'activation de cette voie NF- κ B permet ainsi aux cellules mésothéliales ayant accumulé des dommages à l'ADN, suite à leur exposition aux

fibres d'amiante, de survivre et de proliférer au lieu de mourir [21, 22]. De plus, il a été démontré que les fibres d'amiante entraînent une mort par nécrose des cellules mésothéliales, libérant la protéine HMGB1 (High-Mobility Group Box 1), signal de danger favorisant une réponse inflammatoire et l'accumulation des macrophages produisant du TNF- α , impliqués dans la transformation tumorale [23-25]. Ces travaux ont permis de mettre en évidence l'implication de la réponse inflammatoire chronique induite par les fibres d'amiante dans le développement du MPM.

L'accumulation d'anomalies génétiques et l'inflammation chronique participent au développement du MPM mais d'autres mécanismes sont impliqués, tels que la résistance à l'apoptose, la perte de gènes suppresseurs de tumeur, l'angiogenèse et la production de facteurs de croissance [26].

B. Le Simian virus 40

Le SV40 est un polyomavirus, virus à ADN dont l'hôte principal est le macaque Rhésus. Ce virus a été associé au développement de différentes tumeurs chez l'homme, notamment le MPM [27]. La transmission de ce virus à l'homme est probablement due à la contamination par le SV40 des vaccins contre la poliomyélite produits entre 1954 et 1978 [28]. Bien que son rôle dans le développement du MPM soit encore controversé, une étude a révélé la présence de séquences d'ADN du virus dans des prélèvements de MPM [29], et plus de 50 laboratoires ont rapporté une association positive entre SV40 et MPM [30]. Il a été démontré *in vitro* que les cellules mésothéliales sont sensibles à l'infection par le SV40, mais non lysées, ce qui favorise leur transformation tumorale [31]. Il est décrit notamment que le SV40 immortalise les cellules infectées en activant la télomérase, inactive la protéine suppresseur de tumeur p53 et stimule la croissance cellulaire en activant l'expression du facteur IGF-1 (Insulin-like Growth Factor 1) [32, 33].

Plusieurs études rapportent une co-carcinogénicité des fibres d'amiante et du SV40. En effet, des cellules mésothéliales exposées à l'amiante et au SV40 sont plus sensibles à la transformation tumorale que celles exposées au SV40 seul [24, 31]. Cet effet synergique a également été prouvé *in vivo* chez des hamsters [34] et une étude épidémiologique a révélé que le SV40 augmente le risque de développer un MPM parmi les personnes exposées à l'amiante [35].

III. Le diagnostic reste un challenge

Le MPM est un cancer pour lequel le diagnostic reste un véritable challenge. Les symptômes ressentis (difficultés respiratoires, fatigue, fièvre, douleurs thoraciques notamment) sont communs à un grand nombre de maladies. De plus, il est difficile de distinguer un MPM d'une lésion pleurale bénigne ou de métastases d'autres cancers. En effet, les métastases pleurales les plus fréquentes proviennent des carcinomes du sein (7 à 11%) et du poumon (7 à 15%) [3]. Différentes techniques de diagnostic ont été développées et sont complémentaires. Il est recommandé de prendre en compte l'ensemble des résultats obtenus pour établir le diagnostic définitif du MPM. Des directives sont régulièrement mises à la disposition des médecins, selon les avancées réalisées dans ce domaine, afin de les guider au mieux pour le diagnostic de ce cancer.

A. L'imagerie

Plusieurs méthodes d'imagerie non invasives peuvent être utilisées pour le diagnostic d'un MPM. Elles ne suffisent pas pour établir le diagnostic mais apportent un soutien si un MPM est suspecté. La radiographie est l'outil diagnostique utilisé en premier lieu, en raison de sa facilité d'exécution et de son faible coût. Elle permet de voir une effusion pleurale unilatérale et de détecter un MPM à un stade tardif [36]. Elle ne représente donc pas une méthode diagnostique fiable et spécifique. Le scanner (CT : Computerized Tomography) est utile pour déterminer l'étendue de la tumeur et évaluer d'éventuelles atteintes ganglionnaires [37]. L'IRM (Imagerie par Résonance Magnétique) peut être utilisée pour analyser l'invasion du diaphragme ou de la paroi thoracique par la tumeur, information nécessaire si une intervention chirurgicale est envisagée [38]. Enfin, la TEP (Tomographie par Émission de Positons) est devenue une nouvelle modalité permettant de fournir des informations anatomiques et métaboliques. Elle présente une grande sensibilité pour différencier le MPM des lésions pleurales bénignes et détecter des métastases [1, 38]. Lorsqu'un MPM est suspecté, il est recommandé de réaliser une thoracoscopie guidée par vidéo, meilleure technique de biopsie permettant l'analyse complète de la plèvre grâce au prélèvement de tissu sain et de tissu anormal [39].

B. L'analyse cytologique

Le MPM et d'autres lésions pleurales provoquent l'apparition d'un épanchement pleural, ponctionné afin de soulager le patient et permettant une analyse cytologique. Cette méthode consiste à analyser les différentes cellules présentes dans le liquide pleural. Elle peut s'avérer utile pour le diagnostic d'un cancer, car des cellules tumorales sont présentes dans ce liquide, mais il est toujours difficile de distinguer un MPM d'une métastase d'un autre cancer. De plus, des aberrations cytologiques peuvent être communes à des processus inflammatoires et tumoraux. Bien que cette méthode ne soit pas recommandée pour établir à elle seule le diagnostic d'un MPM, ayant une sensibilité de 51,3%, elle peut néanmoins être utile dans le processus de diagnostic du MPM [40]. De plus, certains marqueurs caractéristiques, également utilisés pour l'analyse immunohistochimique, peuvent permettre d'affiner l'analyse cytologique. Une suspicion de MPM détectée lors de l'analyse cytologique doit toujours être confirmée par une analyse du tissu.

C. L'analyse immunohistochimique

L'analyse immunohistochimique représente la méthode la plus fiable pour le diagnostic du MPM. A partir de la biopsie obtenue sous thoracoscopie, permettant l'accès au tissu sain et au tissu suspect, un marquage de nombreux antigènes et marqueurs spécifiques est effectué grâce à des anticorps. Cette technique représente à ce jour le meilleur moyen de distinguer le MPM d'une métastase, notamment d'origine pulmonaire. Etant donné qu'il n'existe pas de marqueurs ayant une spécificité et une sensibilité de 100% pour le MPM ou pour l'adénocarcinome pulmonaire, un panel d'anticorps a été réalisé, contenant plusieurs anticorps ciblant des marqueurs spécifiques de ces deux pathologies [39, 41] (Tableau 1). Afin que le diagnostic différentiel soit validé, le panel doit contenir au minimum deux marqueurs à valeur diagnostique positive du MPM et deux marqueurs à valeur diagnostique négative [3]. La calrétinine est le marqueur le mieux corrélé avec le diagnostic du MPM [42]. L'IMIG (International Mesothelioma Interest Group) recommande que les marqueurs utilisés possèdent une spécificité et une sensibilité supérieures à 80% pour la lésion en question. Il est également nécessaire de prendre en compte la localisation du marquage (nucléaire, membranaire ou cytoplasmique) ainsi que le pourcentage de cellules marquées pour l'interprétation [43]. L'analyse des marquages immunohistochimiques est complétée par un examen réalisé par un anatomopathologiste expérimenté, faisant partie du réseau Mésopath consulté pour une relecture suite à une suspicion de MPM.

Marqueurs ciblés	MPM	Adénocarcinome pulmonaire
Calrétinine	Positif (nucléaire et cytoplasmique, 80-100%)	Négatif (5-10% positif, cytoplasmique)
Kératine CK5/6	Positif (cytoplasmique, 60-100%)	Négatif (2-10% positif)
WT-1	Positif (nucléaire, 43-93%)	Négatif (0%)
EMA	Positif (membranaire, 60-100%)	Positif (cytoplasmique, 70-100%)
Podoplanine	Positif (membranaire, 80-100%)	Négatif (7% positif)
CEA	Négatif (0%)	Positif (cytoplasmique, 50-90%)
CD15	Négatif (0%)	Positif (membranaire, 50-70%)
EpCAM	Négatif (membranaire, jusqu'à 20% positif)	Positif (membranaire, 95-100%)
TTF-1	Négatif (0%)	Positif (nucléaire, 70-85%)
TAG-72	Négatif (<1%)	Positif (cytoplasmique, 70-85%)

Tableau 1 : Marqueurs utilisés en immunohistochimie pour le diagnostic différentiel entre le MPM et l'adénocarcinome pulmonaire

Différents marqueurs sont utilisés en immunohistochimie pour différencier un MPM d'un adénocarcinome pulmonaire. La présence de marquage, sa localisation cellulaire ainsi que le pourcentage de sensibilité des anticorps utilisés pour ces marqueurs sont indiqués.

Adapté depuis : Scherpereel et al., Guidelines of the European Respiratory Society and the European Society of Thoracic Surgeons for the management of malignant pleural mesothelioma. Eur Respir J, 2010 [3].

CK5/6: cytokeratin 5/6; WT-1: Wilms Tumor antigen-1; EMA: Epithelial Membrane Antigen; CEA: CarcinoEmbryonic Antigen; EpCAM: Epithelial Cell Adhesion Molecule; TTF-1: Thyroid Transcription Factor-1; TAG-72: Tumor-Associated Glycoprotein-72.

D. Les biomarqueurs solubles

L'accessibilité aux échantillons biologiques des patients, sang et liquide pleural, a permis la recherche de biomarqueurs solubles pouvant intervenir dans le diagnostic du MPM. Le marqueur principalement décrit dans la littérature est la mésothéline, plus précisément la forme soluble de cette protéine membranaire, SMRP (Soluble Mesothelin-Related Peptide),

ayant pour origine des phénomènes d'épissages alternatifs ou résultant d'un clivage enzymatique [44]. Le potentiel de la SMRP en tant que biomarqueur a été suggéré dans une étude publiée en 2003 par Robinson et al., suite à des dosages effectués à partir de sérums de patients [45]. Cette étude révèle qu'une forte concentration de cette protéine est retrouvée dans 84% des cas de MPM et dans seulement 2% des sérums de patients souffrant d'autres pathologies. La SMRP peut également être dosée à partir des liquides pleuraux des patients [46]. Cependant, les nombreuses données obtenues jusqu'à aujourd'hui ont permis la réalisation de méta-analyses mettant en évidence un manque de sensibilité de ce marqueur et remettant ainsi en question sa valeur ajoutée pour le diagnostic du MPM [47, 48]. De plus, la SMRP permet seulement d'identifier des patients souffrant d'un MPM de type épithélioïde, étant absente dans les types sarcomatoïdes.

D'autres marqueurs solubles ont été étudiés, notamment l'ostéopontine et le MPF (Megakaryocyte Potentiating Factor) ayant une valeur diagnostique plus faible que la SMRP [49-51], et récemment la fibuline-3 [52]. Notre équipe a également mis en évidence le collagène de type III (Col3A1), CCL2 (Chemokine C-C motif Ligand 2) et la galectin-3 en tant que biomarqueurs prometteurs dosés à partir de liquides pleuraux pour le diagnostic différentiel entre le MPM et l'adénocarcinome pulmonaire [53].

Face au manque de sensibilité de ces marqueurs, plusieurs études se sont intéressées à la valeur diagnostique de combinaison de marqueurs, comme une étude réalisée par notre équipe mettant en évidence l'intérêt de la combinaison SMRP/CCL2/galectin-3 pour le diagnostic du MPM par rapport à la SMRP seule [54].

Aucun des marqueurs décrits, étudié seul ou en combinaison, n'a montré une sensibilité, spécificité et reproductibilité suffisantes pour remplacer le diagnostic par imagerie/cytologie/immunohistochimie [39]. Cependant, certains marqueurs peuvent se révéler utiles pour suivre la progression de la maladie ou évaluer la réponse aux traitements [55]. C'est le cas notamment de la SMRP dont la concentration évolue proportionnellement au stade de la maladie [45]. La FDA (Food and Drug Administration) a d'ailleurs approuvé en 2007 un kit de dosage de la SMRP pour le suivi des patients souffrant d'un MPM.

Le MPM reste un cancer difficile à diagnostiquer et le temps moyen pour établir un diagnostic reste trop élevé. Les symptômes se déclarant tardivement, les patients sont à un stade déjà avancé de la maladie lorsqu'ils se manifestent. Il est nécessaire de réaliser un diagnostic plus rapide, afin de traiter les patients dans les meilleurs délais, et dans ce but la découverte de nouveaux marqueurs spécifiques reste un véritable enjeu.

IV. Prise en charge thérapeutique

Les modalités thérapeutiques conventionnelles proposées aujourd'hui pour le traitement du MPM présentent une efficacité limitée et la médiane de survie des patients reste faible. La réponse des patients aux traitements dépend de leur état général, du stade de la maladie et du sous-type histologique. En effet, il est reconnu que les patients souffrant d'un MPM de type sarcomatoïde, forme agressive, répondent moins bien aux traitements [56, 57]. Il existe trois approches thérapeutiques majeures : la chirurgie, la chimiothérapie et la radiothérapie. Malheureusement, ces traitements sont plutôt considérés comme étant palliatifs, n'assurant pas l'éradication de ce cancer mais permettant d'augmenter la durée de vie des patients et d'améliorer leur qualité de vie en limitant certains symptômes. Il apparaît donc nécessaire de développer de nouvelles approches permettant une meilleure prise en charge thérapeutique des patients.

A. Les traitements conventionnels

1. La chirurgie

La place de la chirurgie dans le traitement du MPM est de plus en plus remise en question. Cette option thérapeutique dépend de différents critères (âge, stade de la maladie, état du patient) et peu de patients sont éligibles à cette procédure radicale (approximativement 22% selon une étude [58]). Le but de la chirurgie est d'effectuer une résection totale de la tumeur. Deux approches chirurgicales sont proposées : la pleurectomie/décortication (P/D), lors de laquelle la plèvre pariétale et la plèvre viscérale sont retirées, et la pneumonectomie extrapleurale (EPP), opération importante permettant d'enlever le poumon touché, la plèvre, le péricarde et une partie du diaphragme [59, 60]. Il est reconnu que la P/D est mieux tolérée que l'EPP, procédure très invasive entraînant un taux de morbidité de 50% [61]. Suite à ces actes chirurgicaux, du tissu tumoral résiduel reste présent et les patients suivent un traitement chimiothérapeutique.

2. La chimiothérapie

Il a été démontré que l'utilisation d'un seul agent chimiothérapeutique n'apporte pas de bénéfice significatif sur la survie des patients souffrant de MPM par rapport à l'administration d'un placebo [62]. L'essai clinique de phase III mené par Vogelzang et al. sur 456 patients atteints de MPM a mis en évidence que la combinaison cisplatine-pémétrexed

augmente la médiane de survie par rapport au cisplatine seul (12,1 mois vs 9,3 mois) [63]. Suite à ces résultats, la combinaison du cisplatine (agent alkylant [64]) et du pémétrexed (Alimta[®], anti-folate [65]) est devenue le traitement standard de première ligne [66]. D'autres agents chimiothérapeutiques ont été testés et n'apportent pas, pour la plupart, de bénéfice par rapport au traitement de référence. Seule l'association du cisplatine avec un autre anti-folate, le raltitrexed (Tomudex[®]), a prouvé son efficacité en permettant une augmentation de la médiane de survie par rapport au cisplatine seul [67].

Certains patients ne répondent pas au traitement de référence et il n'existe pas à ce jour de deuxième ligne de traitement standardisée, bien qu'une étude ait mis en évidence une prolongation de la survie des patients ayant suivi une deuxième ligne de chimiothérapie après avoir échoué au traitement cisplatine-pémétrexed [68].

3. La radiothérapie

Le rôle de la radiothérapie dans le traitement du MPM est controversé [69]. Elle intervient dans sa prise en charge en tant que traitement palliatif et prophylactique et non en tant que traitement curatif. En effet, il n'est pas possible d'irradier la tumeur, trop proche du cœur et des poumons sur lesquels les dommages collatéraux causés seraient sévères [70]. La radiothérapie est utilisée à des fins prophylactiques afin d'éviter toute récurrence de la tumeur au niveau des sites de ponctions et après chirurgie, particulièrement après l'acte chirurgical EPP, l'irradiation de l'hémithorax étant possible puisque le poumon est retiré. De plus, la radiothérapie est proposée dans une intention palliative pour soulager la douleur, notamment après la chirurgie radicale EPP [1].

4. Vers un traitement multimodal

Une stratégie thérapeutique multimodale a été proposée pour le traitement du MPM, associant la chimiothérapie (cisplatine-pémétrexed), la chirurgie (EPP) et la radiothérapie post-chirurgicale. Plusieurs études menées dans des centres spécialisés ont mis en évidence l'efficacité de ce traitement, décrivant une amélioration de la médiane de survie des patients ayant bénéficié de l'intégralité du traitement (29,1 mois) et du taux de survie à 2 ans (61,2%) [71]. Cependant, malgré des résultats positifs obtenus, la question de la faisabilité de cette thérapie tri-modale se pose. En effet, ce traitement lourd n'est applicable qu'à des stades précoces de la maladie, à des patients présentant un bon état général et le réel bénéfice thérapeutique apporté est encore controversé [72, 73].

B. Nouvelles modalités thérapeutiques

Les approches thérapeutiques conventionnelles proposées pour le traitement du MPM sont lourdes à supporter pour les patients et présentent une efficacité insuffisante. De plus, de nombreux patients développent des mécanismes de résistance à la chimiothérapie de référence et aucune autre solution ne peut leur être proposée. Il est donc urgent de développer de nouvelles modalités thérapeutiques. La compréhension des mécanismes impliqués dans la carcinogenèse et la progression du MPM a permis de mettre en évidence de nouvelles cibles potentielles. De nombreuses thérapies sont ainsi en cours d'étude et on dénombre environ 200 essais cliniques. Des revues récentes détaillent les résultats obtenus et je vais présenter dans cette partie certaines de ces approches [74-76].

1. Les thérapies ciblées

De nombreuses thérapies proposées ciblent les voies de signalisation des facteurs de croissance ou les molécules impliquées dans l'angiogenèse. Le récepteur à l'EGF (EGFR, Epidermal Growth Factor Receptor) est surexprimé par les cellules tumorales de MPM et il a été montré *in vitro* que l'inhibition de cette voie de signalisation, grâce à des inhibiteurs de tyrosine kinases, entraîne une diminution de la croissance tumorale et de la survie des cellules de MPM [77]. Basés sur ces résultats, des essais cliniques ont évalué le potentiel thérapeutique de deux inhibiteurs de tyrosine kinases, le gefitinib et l'erlotinib. Malheureusement, les résultats sont décevants et aucune amélioration de la survie n'a été obtenue [78, 79].

Le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) est produit par les cellules de MPM, stimule la croissance tumorale et participe à l'angiogenèse [80]. Une forte concentration de VEGF a été détectée dans les sérums de patients atteints de MPM, ainsi que dans les effusions pleurales, et corrèle avec une faible survie des patients [81, 82]. Suite à la démonstration *in vitro* de l'inhibition de croissance des cellules tumorales suite au blocage de la voie de signalisation du VEGF, il est apparu intéressant d'interférer avec cette voie afin d'obtenir des résultats thérapeutiques prometteurs [83]. De nombreux composés ont été étudiés, dont le bevacizumab (Avastin[®]), anticorps monoclonal se liant au VEGF et empêchant son activité. Plusieurs essais cliniques de phase II n'ont pas mis en évidence d'amélioration de la survie suite à l'ajout du bevacizumab aux traitements chimiothérapeutiques [84-86]. Cependant, après des résultats encourageants obtenus en phase II, les résultats de la phase III d'un essai clinique français de phase II/III randomisé (IFCT-GFPC-0701 MAPS NCT00651456) ont été

dévoilés lors du congrès WCLC (World Conference on Lung Cancer) qui s'est tenu en Septembre 2015 à Denver. Cet essai visait à déterminer si l'ajout de bevacizumab au traitement standard chimiothérapeutique de première ligne cisplatine-pémétréxed augmente la médiane de survie des patients atteints de MPM. Les conclusions mettent en évidence un bénéfice à utiliser le bevacizumab en combinaison avec le traitement chimiothérapeutique de référence, offrant une médiane de survie de 18,82 mois par rapport à 16,07 mois avec la chimiothérapie seule.

2. Les agents épigénétiques

Il est reconnu que le MPM est caractérisé par des modifications épigénétiques, telles que des aberrations de la méthylation de l'ADN ou des altérations de l'acétylation des histones, contribuant au développement tumoral [87, 88]. Les inhibiteurs d'histones déacétylases (iHDAC) favorisent l'expression de certains gènes et leur pouvoir anti-cancéreux a été décrit [89]. Le vorinostat (SAHA, suberoylanilide hydroxamic acid) et le belinostat, deux iHDAC évalués dans des essais cliniques en tant que monothérapies, n'ont pas montré de résultats cliniques pour le traitement des patients souffrant de MPM réfractaires ou de récurrences [90, 91]. Une étude clinique de phase II, menée sur 45 patients, étudie le potentiel de l'association du valproate (un iHDAC) à la doxorubicine (un agent chimiothérapeutique) pour le traitement des patients ayant échoué à la chimiothérapie. Les résultats mettent en évidence que cette combinaison semble prometteuse pour le traitement de ces patients [92]. Il va être maintenant envisagé de tester en clinique l'ajout du valproate au traitement de première ligne cisplatine-pémétréxed, association ayant montré son efficacité *in vitro* et dans un modèle murin [93].

Notre équipe mène des travaux ayant pour but d'améliorer le ciblage des iHDAC dans les tumeurs et de diminuer les doses utilisées. Ainsi, il a été testé un couplage du SAHA à des nanoparticules, présentant une bonne spécificité pour la tumeur dont le réseau vasculaire désorganisé permet l'effet EPR (Enhanced Permeability and Retention). L'iHDAC est ensuite libéré dans l'environnement tumoral grâce au pH acide qui y règne, le mécanisme de couplage aux nanoparticules étant sensible au pH [94]. Cette vectorisation permet l'utilisation d'une dose beaucoup plus faible de SAHA, réduisant les effets secondaires toxiques, et améliore son activité *in vivo* [95]. D'autre part, l'équipe a montré que la combinaison du valproate avec un agent hypométhylant, la décitabine (5-aza-2'-deoxycytidine), induit la mort des cellules tumorales et l'expression d'un antigène de tumeur par les cellules vivantes restantes, ce qui

entraîne une infiltration de la tumeur par des lymphocytes T cytotoxiques spécifiques dans un modèle murin de mésothéliome péritonéal [96].

3. Approches immunothérapeutiques

Il est reconnu que le système immunitaire joue un rôle important dans le contrôle du développement tumoral et de la progression de la maladie. Un cas de rémission transitoire de MPM a été rapporté, étant associé à une infiltration de la tumeur par des cellules lymphocytaires présentant une réactivité vis-à-vis des cellules tumorales [97]. Ce constat a renforcé la notion que le MPM est un cancer potentiellement immunogène, capable d'activer une réponse immunitaire anti-tumorale. Des études ont également démontré que la présence d'un infiltrat lymphocytaire T CD8⁺ corrèle avec un meilleur pronostic pour les patients [98], tandis que la présence de lymphocytes T régulateurs et de cytokines immunosuppressives est associée à un mauvais pronostic [99]. De plus, des travaux de notre équipe ont mis en évidence que des lignées de MPM peuvent être reconnues et lysées par des lymphocytes T, notamment grâce à leur expression de l'antigène de tumeur MUC-1 (Mucin-1) [100].

Il apparaît donc évident qu'il est intéressant de stimuler une réponse immunitaire anti-tumorale afin d'améliorer la réponse clinique des patients et de contrôler l'environnement immunosuppresseur. Cela a été l'objectif des approches immunothérapeutiques développées jusqu'à maintenant contre le MPM [101, 102]. Les immunothérapies étudiées chez l'homme sont décrites dans des revues récentes [102, 103] et en voici quelques exemples (Tableau 2).

Immunothérapie	Objectif	Phase	Refs
Injection de cytokines IFN-α, IFN-β	Stimuler le système immunitaire	I	[104, 105]
Anticorps anti-TGF-β	Bloquer une cytokine immunosuppressive	II	[106]
Injection de cellules dendritiques autologues	Induire des lymphocytes T cytotoxiques spécifiques d'antigènes de tumeur	I	[107]
Vaccination avec le peptide WT-1	Activer une réponse immunitaire spécifique de WT-1	II	[108]
Anticorps anti-mésothéline	Induire la mort des cellules de MPM	II	[109]
Anticorps anti-CTLA-4	Empêcher l'inhibition des lymphocytes T	II	[110]

Tableau 2: Exemples d'immunothérapies pour le traitement du MPM et leur développement en clinique

Adapté depuis : Stahel et al., Searching for targets for the systemic therapy of mesothelioma. Ann Oncol, 2015. [103]. IFN- α , β : Interferon- α , β ; TGF- β : Transforming Growth Factor- β ; WT-1: Wilms Tumor antigen-1; CTLA-4 : Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen-4

De nombreux efforts sont menés afin d'apporter de nouvelles solutions thérapeutiques pour le traitement du MPM, et essayer de proposer une seconde ligne de traitement pour les patients ayant échoué à la première. Beaucoup d'approches immunothérapeutiques développées n'ont pas eu de réel effet sur la survie des patients et les résultats des essais cliniques en cours sont attendus avec espoir.

Conclusion

Le MPM est un cancer très agressif dont le diagnostic, tardif, est délicat. Son incidence croissante en fait un enjeu de santé publique mais sa prise en charge thérapeutique reste un défi. En effet, le traitement chimiothérapeutique de référence n'apporte qu'un faible bénéfice clinique et les différentes approches alternatives testées jusqu'à maintenant n'offrent pas d'amélioration. Les stratégies immunothérapeutiques sont attrayantes car il semble nécessaire de considérer l'importance de l'activation du système immunitaire pour l'obtention d'une meilleure réponse clinique. Cependant, les approches induisant l'activation des effecteurs immunitaires *in situ* sont à privilégier. Dans ce but, la virothérapie anti-tumorale semble prometteuse et l'étude de cette stratégie a fait l'objet de mes travaux de thèse.

PARTIE II : La Virothérapie anti-tumorale

I. Des virus pour le traitement du cancer

Le concept de virothérapie anti-tumorale est né dans les années 1950 suite à des observations cliniques de régressions tumorales coïncidant avec des infections virales naturelles [111]. Les propriétés oncolytiques de certains virus ont été rapportées à cette époque mais l'intérêt pour cette stratégie thérapeutique s'est réellement développé dans les années 1990 grâce à une meilleure compréhension de la biologie des virus et des tumeurs [112].

Les virus oncolytiques ont la particularité de se répliquer préférentiellement ou exclusivement dans les cellules tumorales, entraînant leur lyse, tandis que les cellules saines sont épargnées [113]. Cette propriété est principalement due à la biologie de la tumeur. En effet, il est admis que les virus oncolytiques exploitent les aberrations cellulaires acquises par les cellules tumorales au cours de leur transformation. C'est le cas par exemple de la surexpression par les cellules tumorales, ou de l'expression restreinte au tissu tumoral, de molécules de surface utilisées comme récepteurs d'entrée par les virus, ou encore de défauts dans les mécanismes de défense anti-virale. En effet, il a été mis en évidence que la réponse anti-virale IFN (Interferon) de type I est fréquemment abolie dans les cellules tumorales, les propriétés biologiques des IFN de type I ayant des conséquences incompatibles avec le développement tumoral [114]. La tumeur constitue alors un lieu préférentiel de réplication virale tandis que ces mécanismes demeurent fonctionnels dans les cellules saines, les préservant de l'infection. Ceci sera plus précisément détaillé dans le paragraphe IV.B de cette partie II.

Certains virus oncolytiques présentent une capacité naturelle à se répliquer spécifiquement dans les cellules tumorales tandis que d'autres ont été modifiés génétiquement afin notamment de les rendre dépendants de voies de signalisation ou de mécanismes transcriptionnels constitutivement activés dans les cellules tumorales. Les modifications visant à améliorer la spécificité des virus consistent à : rediriger les virus vers un récepteur particulier spécifique des cellules tumorales ; rendre l'activation du virus dépendante de protéases sécrétées par les cellules tumorales ; restreindre la réplication et la transcription virales dans les cellules tumorales en utilisant des promoteurs activables seulement dans ces cellules ou en intégrant dans le génome viral des séquences reconnues par des microRNA exprimés dans les cellules saines ; et déléter certains gènes viraux codant pour des facteurs

bloquant les réponses anti-virales [115, 116]. D'autres modifications ont également été envisagées afin d'améliorer le pouvoir oncolytique des virus telles que l'insertion de gènes codant pour des enzymes (thymidine kinase ou cytosine déaminase), convertissant des substrats non toxiques en des molécules cytotoxiques dans les cellules infectées, ou de gènes codant pour des protéines pro-apoptotiques. Enfin, l'insertion de gènes codant pour des cytokines immunostimulatrices permet de favoriser l'activation du système immunitaire, propriété importante des virus oncolytiques [115].

Des virus à ADN et à ARN sont évalués aujourd'hui pour leur potentiel oncolytique (Figure 1) [116]. Les virus à ADN sont le plus souvent modifiés afin de cibler les cellules tumorales, tels que l'adénovirus, l'herpès simplex virus (HSV) et le virus de la vaccine. Parmi les virus à ARN, très souvent capables de cibler naturellement les cellules tumorales, on trouve le réovirus, le virus de la stomatite vésiculaire (VSV), le virus de la rougeole (MV, measles virus) ou encore le Newcastle disease virus (NDV).

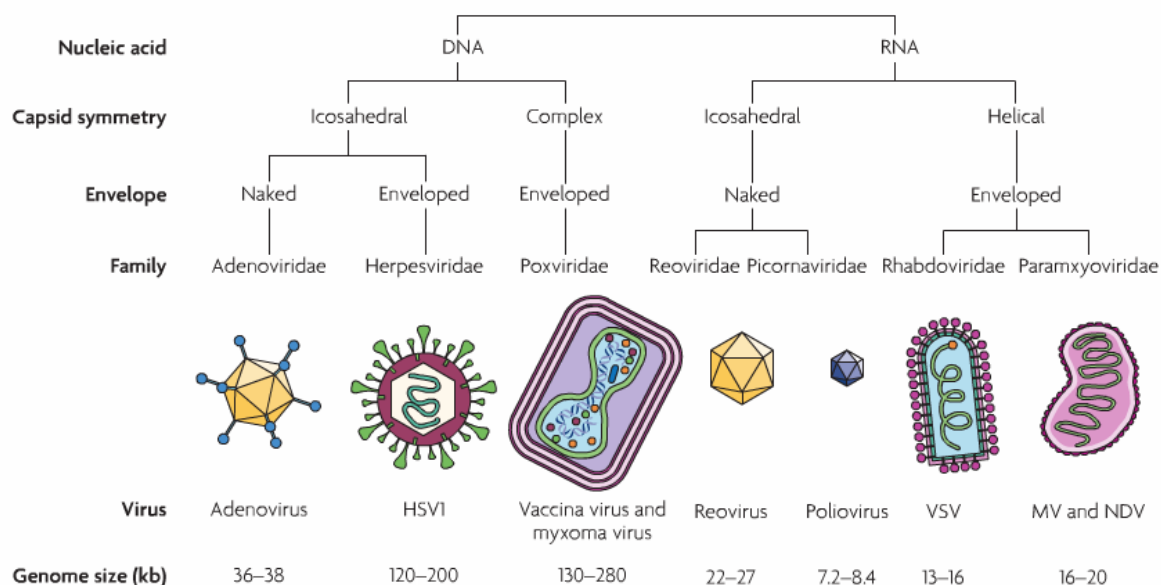


Figure 1 : Principaux virus oncolytiques

Tiré de : Cattaneo et al., Reprogrammed viruses as cancer therapeutics: targeted, armed and shielded. Nat Rev Microbiol, 2008. [115]

HSV1: herpes simplex virus 1; VSV: vesicular stomatitis virus; MV: measles virus; NDV: Newcastle disease virus.

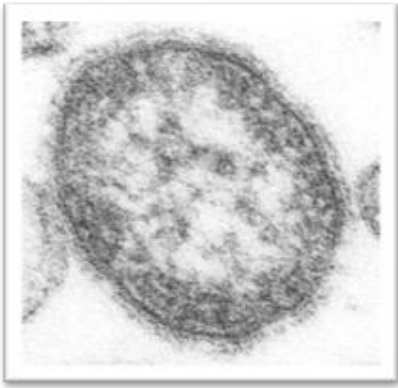
Les recherches sur la stratégie thérapeutique de virothérapie anti-tumorale ne cessent de s'intensifier, cette approche innovante pouvant être sérieusement envisagée comme une alternative aux thérapies conventionnelles. En effet, les virus oncolytiques présentent de nombreux avantages et les modifications génétiques permettent la programmation d'agents thérapeutiques toujours plus efficaces. Parmi l'arsenal des virus oncolytiques, les souches vaccinales du virus de la rougeole sont prometteuses. Elles font preuve d'un fort potentiel oncolytique naturel contre différents types de cancers, peuvent être modifiées afin que leurs performances soit optimisées et les résultats d'essais cliniques en cours sont encourageants.

II. Le virus de la rougeole

A. Structure du virus et son cycle de réplication

Le virus de la rougeole (MV pour measles virus) est un Morbillivirus de la famille des Paramyxoviridae. Chaque particule virale, ayant un diamètre compris entre 150 et 350 nm, contient l'ARN génomique viral de polarité négative et non segmenté de 15 894 nucléotides. Le génome du MV contient 6 gènes, codant pour 8 protéines : 6 protéines structurales composant la particule virale et 2 protéines non structurales théoriquement non incorporées dans les particules (Figure 2). L'ARN viral est complexé à de nombreuses nucléoprotéines N, formant la nucléocapside hélicoïdale, et cette structure s'associe aux phosphoprotéines P et aux protéines Large L exerçant une activité ARN-polymérase ARN-dépendante. Ce complexe transcriptionnellement actif, appelé ribonucléoprotéine (RNP), est recouvert d'une enveloppe lipidique provenant de la cellule hôte à partir de laquelle le virus a bourgeonné. Sur la face interne de cette enveloppe se trouvent des protéines de la matrice M. Deux glycoprotéines sont enchâssées dans la membrane : l'hémagglutinine H, responsable de la fixation du virus à la cellule cible via des récepteurs spécifiques, et la protéine de fusion F assurant la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane de la cellule cible [117]. Les deux protéines non structurales V et C, résultant de transcrits alternatifs du gène codant pour la protéine P, permettent la suppression des réponses immunitaires de la cellule hôte et constituent des facteurs de virulence pour le virus [118].

A.



B.

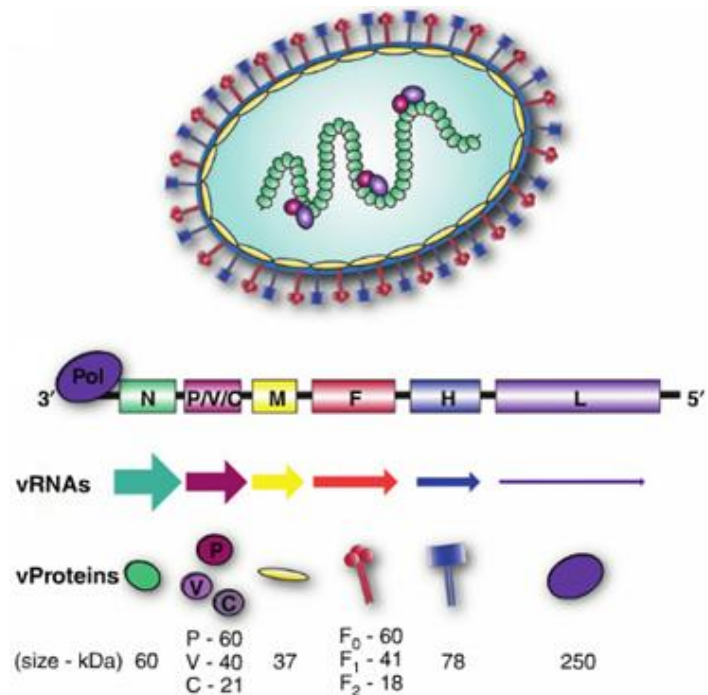


Figure 2 : Le virus de la rougeole

A. Particule virale observée par microscopie électronique à transmission (Photo fournie par CDC/Cynthia S. Goldsmith, William Bellini, PhD). **B.** Représentation schématique de la structure d'une particule virale et de l'organisation du génome.

Tiré de : Delpeut et al., Host factors and measles virus replication. Curr Opin Virol, 2012. [117]

L'interaction entre l'hémagglutinine et les récepteurs spécifiques provoque un changement de conformation de la protéine F, permettant l'insertion du domaine de fusion dans la membrane de la cellule cible [119]. La transcription du génome viral peut alors commencer dans le cytoplasme de la cellule hôte. La séquence leader en 3' du génome viral contient des sites de fixation de l'ARN-polymérase ARN-dépendante qui va commencer la transcription des gènes viraux. Cette polymérase peut se détacher du complexe ribonucléoprotéique au niveau des régions intergéniques et, en aval de la région 3', les gènes sont de moins en moins transcrits. Les ARN messagers sont coiffés, polyadénylés et codent pour les différentes protéines virales. D'autre part, l'ARN génomique négatif est transcrit en anti-génome complet de polarité positive, servant de patron pour la synthèse de nouveaux génomes viraux. Suite à la réplication du génome viral et la synthèse des protéines virales, des particules matures vont bourgeonner à la membrane de la cellule hôte [117].

B. Pathologie

1. Récepteurs du virus et tropisme cellulaire

En 2000, Tatsuo et al. décrivent pour la première fois que les souches sauvages du virus de la rougeole entrent dans les cellules grâce au récepteur CD150/SLAM (Signaling Lymphocyte Activation Molecule) [120]. Cette molécule est exprimée par les lymphocytes T et B activés, les macrophages et les cellules dendritiques (DC, Dendritic Cell) [121-123]. Récemment, deux laboratoires ont mis en évidence un récepteur épithélial du MV, la molécule Nectin-4 impliquée dans les jonctions adhérentes [124, 125]. L'expression restreinte de ces récepteurs CD150/SLAM et Nectin-4, respectivement par les cellules immunitaires et au niveau du pôle basolatéral des cellules épithéliales, a favorisé la compréhension de la pathogenèse de la rougeole.

Ainsi, il est admis que les cellules initialement infectées par le MV sont les DC résidentes et les macrophages alvéolaires du tractus respiratoire [126, 127]. A l'état immature, ces cellules n'expriment pas la molécule CD150/SLAM mais il a été décrit que l'adsorption du MV sur la molécule DC-SIGN (DC-Specific Intercellular adhesion molecule 3-Grabbing Nonintegrin), une lectine de type C, entraîne la relocalisation du pool intracellulaire de CD150/SLAM à la surface, permettant l'entrée du virus dans la cellule [128, 129]. Les DC infectées migrent ensuite vers les ganglions lymphatiques au sein desquels ils vont transmettre le virus aux lymphocytes T et B activés de manière dépendante de CD150/SLAM, initiant l'infection. Dans ces tissus lymphoïdes, il est fréquent d'observer la formation de syncytia, larges cellules multi-nucléées résultant de la fusion de cellules infectées, exprimant les protéines virales H et F à leur surface, avec les cellules voisines non infectées exprimant CD150/SLAM [130]. A partir de ces ganglions, le virus va pouvoir se propager aux autres organes lymphoïdes tels que la rate, le thymus et les amygdales, provoquant une virémie secondaire. L'infection va également gagner d'autres organes (la peau, les reins, le foie...) participant à la dissémination du virus.

L'importante contagiosité du virus peut être expliquée par sa dissémination par aérosol. Les DC ainsi que les lymphocytes T et B infectés, migrant dans le tractus respiratoire, transmettent le virus aux cellules épithéliales via le récepteur Nectin-4 situé à leur pôle basolatéral [131]. Il a été décrit que l'infection des cellules épithéliales intervient bien dans le processus de dissémination et non dans les phases initiales de l'infection, contrairement à ce qui était considéré auparavant [132].

2. Manifestations cliniques

La période d'incubation avant l'apparition des symptômes est assez longue, entre 10 et 14 jours. La maladie de la rougeole est caractérisée notamment par une forte fièvre, de la toux et des éruptions cutanées. Le développement de réponses immunitaires est nécessaire afin d'assurer l'élimination du virus, la guérison ainsi que l'établissement d'une immunité à long terme. L'immunité innée est activée, induisant la production de cytokines anti-virales (IFN- α et - β), mais une réponse immunitaire adaptative humorale et cellulaire est nécessaire pour l'élimination du virus [133]. Des anticorps sont produits contre différentes protéines virales et ceux dirigés contre l'hémagglutinine assurent la neutralisation du virus et une immunisation à vie. De plus, il a été montré que les lymphocytes T CD8⁺ jouent un rôle important dans le contrôle et l'élimination de la maladie [134]. En effet, lorsque ces cellules sont absentes, les singes infectés par le MV présentent une virémie plus longue et souffrent de symptômes plus sévères [135].

Paradoxalement, le MV est également responsable d'une immunosuppression importante qui dure jusqu'à plusieurs mois après la disparition des autres symptômes. Cette immunosuppression augmente la susceptibilité aux infections opportunistes bactériennes ou virales, responsables de la majorité des décès causés par la rougeole [136]. Cette immunosuppression peut être attribuée au tropisme cellulaire du MV, provoquant une déplétion des cellules immunitaires, mais d'autres mécanismes ont été rapportés [136, 137]. Plus rarement, le MV peut conduire à des cas d'encéphalomyélites fatales, suite à l'infection des neurones lors de la virémie secondaire [117, 138].

Cette maladie est très contagieuse et reste l'une des principales causes de décès chez les enfants dans le monde. Au sein d'une population complètement susceptible à l'infection par le MV, 12 à 18 personnes peuvent être contaminées à partir d'une seule personne infectée [133]. Ceci implique que 95% de la population soit immunisée afin d'interrompre la transmission de ce virus. Des campagnes de vaccination ont ainsi été menées afin de l'éradiquer.

3. Vaccination

La première souche de MV, souche Edmonston, a été obtenue à partir d'un patient en 1954 par Enders et Peebles [139]. Suite à des passages successifs sur différents types cellulaires (cellules épithéliales humaines de rein, fibroblastes d'embryon de poulet ou encore cellules Vero dérivées de rein de singe), d'autres souches ont été générées (Figure 3). Cette culture des virus sur des cellules hôtes non naturelles a entraîné des modifications participant à l'atténuation de ces souches, telles qu'une abolition du lymphotropisme [140]. En effet, suite aux passages sur des cellules n'exprimant pas le récepteur CD150/SLAM, les souches ont évolué et acquis la capacité à utiliser la molécule CD46 comme récepteur, grâce à la mutation N481Y souvent retrouvée dans l'hémagglutinine [140, 141]. D'autres mutations sont apparues dans les protéines virales, contribuant à l'atténuation de la virulence du virus, mais une analyse comparative des séquences nucléotidiques montre une différence génétique de 0,3% seulement entre les souches vaccinales et la souche sauvage Edmonston [141, 142].

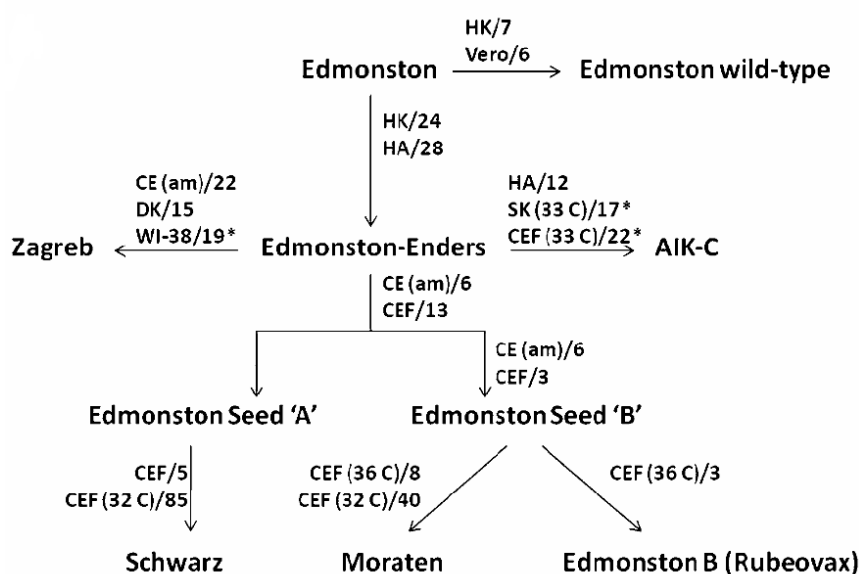


Figure 3 : Souches vaccinales du virus de la rougeole

Obtention des souches vaccinales du virus de la rougeole après des passages successifs de la souche sauvage Edmonston sur différents types cellulaires.

Tiré de : Bankamp et al. Genetic characterization of measles vaccine strains. J Infect Dis, 2011. [141]

En 1963, la souche vaccinale Edmonston B a été utilisée aux Etats-Unis pour la vaccination mais malgré une protection efficace, elle provoquait une trop forte fièvre et de la toux. La souche Schwarz, plus atténuée, a donc été privilégiée et est à présent la souche vaccinale standard pour la vaccination dans le monde [143, 144]. L'âge de la vaccination des enfants est entre 9 et 15 mois et il est décrit que la proportion des enfants ayant une concentration d'anticorps protectrice est de 85% lors d'une vaccination à 9 mois et 90-95% lors d'une vaccination à 12 mois [145]. L'injection de deux doses est recommandée afin d'obtenir une immunisation de la population suffisante pour bloquer la transmission du virus [146]. En France, le premier vaccin contre la rougeole a été disponible en 1968 et la vaccination grâce au vaccin ROR (Rougeole-Oreillons-Rubéole) a été introduite au calendrier vaccinal en 1986.

Grâce à un vaccin sûr et peu coûteux et aux importantes campagnes de vaccination menées, le nombre de morts suite à une infection par le virus de la rougeole a diminué dans les pays développés et en voie de développement [147], même si l'OMS rapporte encore 20 millions de personnes infectées par la rougeole chaque année. La couverture vaccinale est encore difficile dans certains pays et une recrudescence des cas de rougeole dans plusieurs pays occidentaux est due notamment à des réticences à l'égard de la vaccination [133, 148].

C. Le virus atténué de la rougeole en tant que virus oncolytique

Le potentiel anti-tumoral du virus sauvage de la rougeole a été rapporté en 1971 suite à l'observation de régressions de tumeurs hématologiques, telles que le lymphome de Burkitt, la maladie de Hodgkin ou les leucémies, suite à une infection naturelle par le virus de la rougeole [149-152]. Il est fort probable que ces régressions tumorales soient dues à l'effet cytopathique du virus sur les cellules tumorales, qui sont des cellules immunitaires exprimant son récepteur CD150/SLAM. Les souches vaccinales ont préservé cet effet cytopathique intéressant et ciblent un autre récepteur, la molécule CD46 qui est souvent surexprimée par les cellules tumorales. Ces propriétés font de ces virus atténués de la rougeole de potentiels virus oncolytiques.

1. Ciblage spécifique des cellules tumorales

Il a été décrit que les souches atténuées du virus de la rougeole se lient à la molécule CD46 pour entrer dans les cellules [153-155]. CD46 est une glycoprotéine transmembranaire régulatrice de la voie du complément [156]. Son rôle est d'inhiber la cascade du complément

en inactivant les composants C3b et C4b, et son expression ubiquitaire par toutes les cellules nucléées de l'organisme les protège d'une activation accidentelle du complément [157]. Il est désormais bien établi que de nombreux types de cellules tumorales surexpriment cette molécule afin d'échapper à la lyse médiée par le complément (CDC, Complement-Dependent Cytotoxicity) résultant d'une réponse humorale dirigée contre elles [158, 159]. Cet avantage sélectif rend les cellules tumorales insensibles à certaines thérapies ciblées utilisant le principe de CDC, mais les expose à une infection par les souches atténuées du virus de la rougeole [160]. Anderson et al. ont démontré que l'infection des cellules tumorales par le MV augmente progressivement avec la densité d'expression de CD46 et que l'effet cytopathique est régulé par un effet de seuil. En effet, la formation de syncytia, permettant d'augmenter la propagation du virus et entraînant la mort des cellules tumorales, dépend d'une certaine densité d'expression de CD46 à la surface des cellules [161]. Ainsi, contrairement aux cellules tumorales, les cellules saines exprimant faiblement CD46 ne sont pas sensibles à l'effet cytopathique du MV et ne représentent pas un lieu de réplication adéquate.

Récemment, Nectin-4 a été décrite comme étant un récepteur des souches vaccinales et sauvages du virus de la rougeole [124, 125, 162]. Cette protéine transmembranaire de la superfamille des immunoglobulines est impliquée dans les jonctions adhérentes entre les cellules épithéliales [163]. La Nectin-4 est une protéine embryonnaire principalement exprimée au niveau du placenta, mais elle est retrouvée en quantité modérée au niveau de l'épithélium des voies respiratoires, permettant l'infection des cellules épithéliales par leur pôle basolatéral pour la dissémination du virus sauvage de la rougeole [125, 131]. La protéine Nectin-4 est exprimée à des niveaux anormalement élevés par certains types de cancers, notamment les adénocarcinomes du poumon, du sein, du côlon et de l'ovaire [125, 164-166]. Elle intervient dans la transformation tumorale en favorisant les interactions entre les cellules tumorales, les rendant indépendantes vis-à-vis de l'adhésion à la matrice extracellulaire [167]. Les tumeurs d'origine épithéliale sont caractérisées par une altération plus ou moins importante de leur polarité, facilitant l'accès du MV à son récepteur Nectin-4 ainsi que sa propagation entre les cellules tumorales.

La surexpression des molécules CD46 et Nectin-4 confère un avantage sélectif aux cellules tumorales mais permet aux souches vaccinales du virus de la rougeole de les cibler spécifiquement et d'exercer leur pouvoir oncolytique.

2. De nombreux types de cancers sont sensibles au MV

Le potentiel oncolytique des souches atténuées du virus de la rougeole (Edmonston et Schwarz) envers une diversité importante de cancers humains a été démontré dans des études pré-cliniques *in vitro*, sur des cellules tumorales primaires et des lignées tumorales, et *in vivo*, principalement dans des modèles de xénogreffes de cellules tumorales humaines chez des souris immunodéficientes [168] (Tableau 3). Notre équipe a ainsi montré que le MPM, les adénocarcinomes pulmonaires et coliques, ainsi que le mélanome sont sensibles au MV [169-171] (Annexe n°4).

Type de cancer		Références
Cancers hématologiques	Lymphome T	[172-175]
	Myélome multiple	[176-179]
Cancers solides	Carcinome mammaire	[180-182]
	Carcinome ovarien	[183-186]
	Cancer de la prostate	[187-189]
	Adénocarcinome pulmonaire	[170, 190, 191]
	Mésothéliome pleural malin	[169, 192]
	Carcinome colorectal	[170, 193]
	Carcinome hépatocellulaire	[194-196]
	Cancer du pancréas	[197, 198]
	Glioblastome multiforme	[199-202]
	Médulloblastome	[203-205]
	Cancer squameux de la tête et du cou	[206, 207]
	Mélanome	[208, 209]
	Carcinome rénal	[210]
	Ostéosarcome	[211]
	Cancer de la thyroïde	[212]

Tableau 3 : Etudes pré-cliniques *in vitro* et *in vivo* évaluant l'efficacité oncolytique du MV

Adapté depuis : Msaouel et al., Oncolytic measles virus strains as novel anticancer agents. Expert Opin Biol Ther, 2013. [168]

Ces études pré-cliniques *in vitro* et *in vivo* ont démontré que le MV est capable de cibler spécifiquement de nombreux types de cellules tumorales et d'exercer son activité oncolytique. De plus, les études *in vivo* chez la souris prouvent la faisabilité d'injection du virus par différentes voies d'administration. Cependant, de plus en plus de travaux menés ces dernières années évaluent le potentiel de MV génétiquement modifiés, présentant notamment une meilleure spécificité envers les cellules tumorales et une efficacité lytique potentialisée.

3. Modifications du virus de la rougeole

a) Optimiser sa spécificité

Le tropisme naturel du MV oncolytique envers les molécules CD46 et Nectin-4, surexprimées par de nombreuses tumeurs, permet un ciblage spécifique des cellules tumorales. Il peut toutefois être intéressant d'améliorer la spécificité du MV afin de renforcer sa sécurité d'utilisation chez l'homme, en limitant l'infection des tissus sains, et pour pallier à la variabilité d'expression de ses récepteurs entre les patients atteints d'un même cancer. De nombreux MV modifiés possédant un tropisme tumoral renforcé ont ainsi été créés grâce à la manipulation du génome et aux techniques de sélection et d'amplification des virus recombinants [115, 213, 214].

i. Rediriger le MV vers un marqueur tumoral spécifique

Le fait que la fixation du virus sur son récepteur et la fusion avec la cellule cible soient des événements médiés par deux protéines distinctes facilite la stratégie de modification du virus. En effet, il est ainsi possible de modifier la protéine H (hémagglutinine) pour améliorer le tropisme tumoral du virus, sans compromettre ses propriétés fusogènes. Afin de rediriger le MV vers un marqueur tumoral particulier, il est nécessaire d'inactiver sa capacité à se fixer sur son récepteur naturel CD46. L'identification des acides aminés nécessaires pour l'interaction de la protéine H avec CD46 a permis la génération de virus recombinants ayant perdu leur tropisme naturel [215].

Une des stratégies consiste à modifier la partie C-terminale de la protéine H en insérant un fragment d'anticorps à chaîne unique (scFv, single-chain fragment variable), constitué uniquement des régions variables de la chaîne lourde et de la chaîne légère d'un anticorps, reconnaissant spécifiquement un marqueur exprimé à la surface des cellules tumorales. Plusieurs virus recombinants ont ainsi été générés, possédant une protéine H fusionnée à un fragment scFv dirigé contre CD138 ou CD38, deux marqueurs associés au

myélome multiple [177, 179], CD20, un marqueur du lymphome non-Hodgkinien [175, 216] ou encore contre un marqueur membranaire spécifique du cancer de la prostate PSMA (Prostate-Specific Membrane Antigen) [188]. Ces études *in vitro* et *in vivo* dans des modèles murins ont démontré un ciblage efficace des cellules tumorales par ces virus et le maintien de leur potentiel oncolytique.

Récemment, Friedrich et ses collègues ont développé une nouvelle stratégie pour optimiser la spécificité tumorale du MV, en ajoutant un motif répété de protéine ankyrine (DARPin, Designed Ankyrin Repeat Protein) à l'extrémité de la protéine H [217]. Comme beaucoup de protéines à motifs répétés, les ankyrines sont impliquées dans les interactions entre protéines et reconnaissent leur cible avec une forte affinité et spécificité [218]. Les DARPins spécifiques pour des marqueurs tumoraux sont sélectionnées par la technique de phage et ribosome display [219], et les séquences codant pour ces motifs sont insérées dans le génome du MV afin de créer une protéine de fusion H-DARPin. Ainsi, les travaux de Friedrich ont permis d'obtenir un MV recombinant capable de reconnaître deux marqueurs tumoraux simultanément, HER2/*neu* (Human Epidermal Growth Factor Receptor-2) et EpCAM. Les résultats obtenus montrent que ce MV redirigé élimine complètement les xénogreffes de tumeurs humaines chez la souris et présente des effets sur les tissus sains très atténués [217]. Les auteurs mettent en avant l'intérêt d'utiliser ce virus bispécifique, pouvant permettre l'infection de variants tumoraux ayant perdu l'expression d'un des marqueurs et le ciblage des cellules tumorales souches exprimant le marqueur EpCAM. Les DARPins présentent ainsi de nombreux avantages par rapport aux fragments scFv : elles sont stables, de petite taille, leur conformation est préservée dans la protéine de fusion, elles n'ont pas tendance à s'agréger, et il est possible d'envisager la génération de MV-DARPin multispécifiques.

ii. Activation dépendante de l'environnement tumoral

Il est également possible de modifier la protéine de fusion F du MV. Cette protéine requiert un clivage par la furine, une protéase cellulaire ubiquitaire, pour être activée et permettre la fusion du virus avec la cellule hôte. Le site de clivage peut être modifié afin d'être reconnu par des protéases spécifiques et restreindre l'activation de la protéine F à certains tissus [220]. Ainsi, les MMP (Matrix Metalloproteinase), endopeptidases surexprimées par de nombreuses cellules tumorales pour dégrader la matrice extracellulaire et faciliter l'invasion tumorale, peuvent être exploitées pour cette stratégie [221]. Les travaux de

Mühlebach et al. ont montré, sur des coupes de tissus hépatiques sains ou tumoraux de 44 patients, que la présence du site de clivage de la MMP-2 dans la protéine F du MV restreint son activité oncolytique au tissu tumoral et diminue les dommages sur les tissus sains [194].

iii. Restreindre la réplication du MV au tissu tumoral

Il est possible de contrôler la réplication du MV en exploitant l'expression tissu-spécifique des microARN (miR). Ces ARN simple brin non codants de 22 nucléotides en moyenne exprimés par nos cellules interviennent dans la régulation post-transcriptionnelle de l'expression de nos gènes. Le miR s'apparie au niveau de sa séquence complémentaire à l'ARN messager du gène cible et conduit à la répression de sa traduction ou à sa dégradation [222]. Les miR interviennent dans divers processus biologiques en régulant de nombreux gènes et leur dérégulation est observée dans différents types de cancers [223]. Les travaux menés depuis plusieurs années ont abouti à la description de signatures miR, permettant de distinguer les tissus sains des tissus tumoraux et de différencier les types de cancers selon le profil d'expression des miR [224]. Cette expression différentielle des miR entre le tissu sain et le tissu tumoral est exploitée afin de restreindre la réplication de certains virus oncolytiques au tissu tumoral [225]. Il a été démontré que le miR-7 n'est plus exprimé par les cellules de glioblastome multiforme, puisqu'il réprime l'expression du récepteur à l'EGF [226], alors qu'il est présent dans le tissu neuronal sain. Un virus MV sensible au miR-7 a été généré, contenant des séquences cibles du miR-7 au niveau de la région 3' non transcrite du gène codant pour la protéine F, afin de restreindre la réplication de ce virus au tissu tumoral. En effet, la présence de miR-7 dans le tissu sain inhibe la traduction des protéines virales et ainsi bloque la propagation du virus. Ce virus MV sensible à miR-7 a prouvé son efficacité dans un modèle de xénogreffe de glioblastome multiforme humain chez la souris, sans entraîner de neurotoxicité après une injection intracrânienne [227].

Ces stratégies permettent d'accroître la spécificité du MV envers les cellules tumorales et d'atténuer fortement les effets indésirables sur les tissus sains, renforçant ainsi la sécurité d'utilisation du MV chez l'homme. Il est désormais intéressant d'envisager des modifications augmentant l'efficacité lytique du MV au niveau du site tumoral.

b) Optimiser son efficacité lytique

L'effet cytopathique du MV repose en partie sur la formation de syncytia, cellules géantes multinucléées, conduisant à la mort des cellules tumorales. Il peut être cependant intéressant de modifier le virus afin d'augmenter ses propriétés lytiques, en permettant notamment une association avec des traitements conventionnels.

i. La radiovirothérapie

Le groupe de Stephen Russell a développé un MV recombinant pour le symporteur d'Iode/Sodium (NIS, Na/I Symporter), le MV-NIS, permettant de combiner l'effet lytique du MV avec la radiothérapie. Ce MV induit l'expression du NIS à la surface des cellules infectées, favorisant l'accumulation intracellulaire de radioisotopes tels que l'Iode 131 (^{131}I). Cet isotope radioactif émet des particules β lors de sa décroissance qui peuvent pénétrer les tissus environnants jusqu'à 400 μm à partir du point d'émission, induisant l'irradiation des cellules voisines non infectées [228]. Cette stratégie de radiovirothérapie a démontré une potentialisation de l'activité oncolytique du MV dans des modèles de xénogreffes de myélome multiple [228], de cancer de la prostate [189], de glioblastome [201], de cancer squameux de la tête et du cou [206] et de cancer de la thyroïde [212]. Bien que le plus souvent un effet synergique soit obtenu grâce à cette stratégie de radiovirothérapie, il a également été montré que l'administration d' ^{131}I induit la régression de xénogreffes de myélome multiple qui étaient résistantes à la lyse induite par le MV-NIS [228].

ii. La chimiovirothérapie

Des stratégies de chimiovirothérapie ont été développées et consistent à armer le MV avec des gènes codant pour des enzymes "prodrogues convertases", capables de convertir des molécules chimiques non toxiques en agents cytotoxiques. Ainsi, l'équipe de Roberto Cattaneo a développé un MV recombinant pour la purine nucléoside phosphorylase (PNP) d'*Escherichia coli*, une enzyme convertissant le 6-méthylpurine-2'-deoxyriboside (MeP-dR) en 6-méthylpurine (MeP). Cette molécule est ensuite métabolisée en analogues toxiques de l'adénosine triphosphate (ATP), inhibant immédiatement la synthèse d'ADN, d'ARN et des protéines et menant à la mort cellulaire [229]. Ce MV-PNP, après une injection intra-tumorale ou systémique dans un modèle murin syngénique de cancer du côlon, interfère avec la progression tumorale et augmente la survie des souris après l'administration de la prodrogue MeP-dR [193]. Des études ont rapporté la puissance de cette stratégie puisqu'un faible niveau

d'expression de la PNP dans la tumeur permet la mort des cellules tumorales induite par la prodrogue [193, 230].

Plus récemment, un MV équipé d'un autre gène suicide a été généré, codant pour la Super-Cytosine Deaminase (SCD). Cette protéine résulte de la fusion de deux enzymes provenant de la levure *Saccharomyces cerevisiae* : la Cytosine Deaminase (CD) et l'Uracil phosphoribosyltransferase (URPT). Cette enzyme bifonctionnelle convertit la prodrogue 5-fluorocytosine (5-FC) en agent chimiothérapeutique 5-fluorouracil (5-FU) et facilite la conversion du 5-FU en 5-fluorouridine-5'-monophosphate (5-FUMP), permettant une toxicité sur les cellules tumorales résistantes au 5-FU [231]. Le 5-FUMP est ensuite métabolisé par la cellule et interfère avec les processus de réparation de l'ADN et la synthèse de l'ADN, de l'ARN et des protéines. L'activité cytosine deaminase de cette protéine de fusion est 100 fois supérieure à celle de la protéine native, permettant l'utilisation de faibles doses de 5-FC. Ce système d'activation de la prodrogue 5-FC intégré dans le MV a démontré son efficacité chez la souris envers des xénogreffes de carcinome hépatique [232], de mélanome [209] et de cancer squameux de la tête et du cou [207].

Ces stratégies de chimiovirothérapie, basées sur l'effet synergique entre l'activité oncolytique du MV et l'action cytotoxique des agents chimiothérapeutiques, sont prometteuses. Elles apportent un bénéfice thérapeutique supérieur à celui obtenu avec le virus seul et sont à considérer pour de futures applications cliniques [116].

Il est possible d'effectuer plusieurs modifications du virus de la rougeole, conduisant à l'optimisation de sa spécificité envers les cellules tumorales et de son effet cytotoxique [197, 233]. Ces virus MV hautement spécifiques et armés constituent de puissants agents thérapeutiques.

c) Optimiser son immunogénicité

Il est apparu depuis quelques années que l'induction de réponses immunitaires anti-tumorales par les virus oncolytiques participe activement à la réponse clinique observée avec ces agents thérapeutiques. Cette interaction bénéfique entre le virus de la rougeole et le système immunitaire sera développée dans la troisième partie de ma thèse.

Différentes modifications ont été apportées au MV afin d'augmenter ses propriétés immunostimulatrices, notamment l'insertion du gène codant pour l'IFN- β . Les IFN de type I, tels que l'IFN- β , possèdent des propriétés immunostimulatrices grâce à l'activation des cellules NK (Natural Killer), des lymphocytes T et des macrophages, et exercent un effet anti-

angiogénique [234]. Li et ses collègues ont ainsi démontré qu'un MV codant pour l'IFN- β murin infecte efficacement des tumeurs de mésothéliome humaines greffées chez des souris immunodéficientes et modifie favorablement le microenvironnement tumoral par rapport au MV [192]. En effet, le MV-IFN- β facilite l'infiltration de la tumeur par des cellules immunitaires CD68⁺ (2 à 4 fois plus que le MV) et réduit la densité vasculaire de la tumeur entraînant une diminution du nombre de cellules endothéliales CD31⁺.

Un MV codant pour la protéine soluble immunostimulatrice NAP (Neutrophil-Activating Protein) d'*Helicobacter pylori* [235], agoniste du TLR2 (Toll-Like Receptor 2), apporte une meilleure efficacité thérapeutique que le MV dans un modèle pré-clinique de cancer du sein métastatique en doublant la médiane de survie [236]. Cet effet bénéfique a été corrélé avec l'induction, par la protéine NAP sécrétée en grande quantité par les cellules tumorales infectées, d'une inflammation et d'une réponse immunitaire de polarisation Th1 (T helper 1) caractérisée par une forte concentration des cytokines TNF- α , IL-6 (Interleukine-6) et IL-12 dans l'effusion pleurale.

Plus récemment, un MV codant pour le GM-CSF (Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor) a été évalué dans un modèle murin immunocompétent de cancer colorectal [237]. L'injection intra-tumorale de ce virus MV-GM-CSF retarde la progression tumorale et prolonge la médiane de survie par rapport au MV. Une immunité anti-tumorale a été mise en évidence par la présence de cellules immunitaires effectrices anti-tumorales dans la rate des souris et par une infiltration des tumeurs sous-cutanées par des lymphocytes T CD3⁺ spécifiques d'antigènes tumoraux. Ainsi, plus d'un tiers des souris traitées avec le MV-GM-CSF ont présenté une régression complète de la tumeur et rejeté les greffes de tumeurs successives, suggérant l'établissement d'une réponse immunitaire anti-tumorale protectrice à long terme.

Ces résultats soulignent le potentiel thérapeutique de virus MV codant pour des protéines immunostimulatrices, permettant le recrutement de cellules immunitaires anti-tumorales agissant de concert avec le virus pour éliminer la tumeur.

d) Optimiser sa traçabilité *in vivo*

Afin d'évaluer l'efficacité thérapeutique du MV au niveau clinique, il est nécessaire de pouvoir suivre de manière non invasive la réplication du virus, la localisation de l'infection et son étendue. Des modifications du MV ont ainsi été apportées afin de faciliter ce suivi pharmacocinétique. Dans un premier temps, le MV a été modifié afin d'exprimer une protéine

soluble CEA, permettant un dosage sérique attestant de la réplication virale. Dans une étude clinique de phase I pour le traitement du cancer de l'ovaire, chaque injection du MV-CEA était suivie d'une augmentation sérique du CEA [238]. Cependant, la détection de ce marqueur dans la circulation sanguine ne permet pas de déterminer si le virus s'est répliqué dans le tissu tumoral ou dans les tissus sains.

Dans le cas du myélome multiple, un MV codant pour la chaîne légère λ d'immunoglobuline a été généré afin de suivre la réplication spécifique du virus dans les cellules tumorales. Les cellules de myélome multiple sont des lymphocytes B activés, produisant de grandes quantités d'immunoglobulines monoclonales. L'infection de ces cellules tumorales par le MV- λ induit la production spécifique d'une immunoglobuline chimérique unique, constituée d'une chaîne légère κ et d'une chaîne légère λ , pouvant être détectée dans le sang [239].

Le MV-NIS, décrit précédemment pour son utilisation dans la stratégie de radiovirothérapie, possède l'avantage de permettre également le suivi de la réplication virale au niveau du site tumoral [240, 241]. Les cellules tumorales infectées par ce virus expriment le symporteur NIS ce qui leur permet de concentrer l'Iode¹²³, un isotope émettant des rayonnements γ . Ces rayonnements permettent de visualiser la dispersion de l'infection au sein de la tumeur grâce à la technique d'imagerie SPECT-CT (Single-Photon Emission Computed Tomography-Computed Tomography). Cette technique très informative permet de corréler la réplication du virus et sa distribution avec les réponses cliniques obtenues.

Les nombreuses études pré-cliniques menées ont permis de prouver l'efficacité oncolytique du virus de la rougeole et de démontrer le bénéfice thérapeutique apporté par certaines modifications, visant à améliorer sa spécificité ainsi que ses propriétés lytiques et immunostimulatrices. Ce virus est actuellement évalué au niveau clinique chez l'homme pour le traitement de différents cancers.

III. Développement de la virothérapie anti-tumorale en clinique

La virothérapie anti-tumorale est une stratégie thérapeutique en plein essor. Le premier virus oncolytique ayant reçu une autorisation de mise sur le marché en 2005 est l'adénovirus H101, utilisé uniquement en Chine pour le traitement de cancers ORL en combinaison avec la radiothérapie [242]. Les résultats pré-cliniques prometteurs contre différents types de cancers, obtenus avec de nombreux virus oncolytiques, ont abouti à un transfert vers la clinique.

A. Les souches oncolytiques du virus de la rougeole

1. Cancer de l'ovaire chimiorésistant

Les propriétés oncolytiques du virus atténué de la rougeole ont été évaluées contre le cancer de l'ovaire chimiorésistant par l'équipe d'Evanthia Galanis à la Mayo Clinic (Rochester, MN, USA). Deux essais cliniques de phase I testant le MV-CEA [238] et le MV-NIS [243] ont été menés chez des patientes souffrant de cancers de l'ovaire réfractaires aux traitements à base de taxol et de platine. Le MV-CEA ou le MV-NIS ont été injectés à différentes doses dans la cavité péritonéale des patientes, sélectionnées pour être immunisées contre le virus de la rougeole (possédant un taux d'anticorps IgG anti-rougeole ≥ 20 unités ELISA/mL). Le traitement est répété tous les mois, jusqu'à 6 cycles. Dans ces essais, la réplication du virus a pu être suivie de manière non invasive par un dosage sérique du CEA pour le MV-CEA et par imagerie SPECT-CT suivant l'injection d' ^{123}I pour le MV-NIS.

Le MV-CEA a permis une stabilisation de la maladie pour 14 patientes sur les 21 traitées, avec un doublement de la médiane de survie par rapport à celle attendue pour ces patientes (12,15 mois vs 6 mois) [244]. La réponse clinique dépend de la dose injectée : la médiane de survie est de 10,6 mois pour les faibles doses (10^3 - 10^7 TCID₅₀, 50% Tissue Culture Infectious Dose) et passe à 38,4 mois pour les fortes doses (10^8 - 10^9 TCID₅₀), 10^9 TCID₅₀ correspondant à 100 000 fois la dose injectée lors d'une vaccination de l'enfant [238].

Le MV-NIS a été injecté à 16 patientes ayant échoué à 4 lignes de chimiothérapies. Seules les fortes doses ont été testées suite aux résultats obtenus avec le MV-CEA. Une stabilisation de la maladie a été observée pour 13 patientes sur les 16, avec une médiane de survie de 26,5 mois (16,3-37,3 mois). Dans cette étude, il a été montré que le niveau basal d'anticorps anti-rougeole n'augmente pas après injection du MV-NIS. En revanche, le traitement avec ce virus active une réponse immunitaire anti-tumorale caractérisée par la présence de lymphocytes T spécifiques d'antigènes de tumeur dans le sang [243].

Ces résultats cliniques sont encourageants, offrant une prolongation de la médiane de survie aux patientes par rapport à celle apportée par certaines nouvelles thérapies testées (6 à 12 mois seulement) [245]. Il est intéressant de mettre en évidence la réponse immunitaire anti-tumorale induite par le virus, pouvant contribuer favorablement à la réponse clinique. Basé sur ces résultats, un essai de phase II randomisé est en cours de recrutement (NCT02364713, <http://www.clinicaltrials.gov>), visant à comparer l'administration intra-péritonéale du MV-NIS à un traitement chimiothérapeutique.

2. Myélome Multiple

Un essai clinique de phase I a été réalisé à la Mayo Clinic par l'équipe de Stephen Russell, évaluant l'efficacité du MV-NIS contre le myélome multiple disséminé réfractaire aux traitements existants. Des résultats préliminaires concernant deux patientes traitées ont été publiés en 2014 [246]. Ces patientes, non immunisées contre le virus de la rougeole et présentant un mauvais pronostic vital suite à l'échec des thérapies conventionnelles, ont reçu une seule injection systémique de la plus forte dose de MV-NIS, 10^{11} TCID₅₀. L'infection spécifique des plasmocytomes disséminés a pu être suivie grâce au MV-NIS.

Cette unique injection intraveineuse du MV-NIS a entraîné une rémission de la maladie ayant duré 9 mois pour la patiente 1 au moment de la publication. Chez cette patiente, un plasmocytome palpable au niveau du front a commencé à diminuer 36 heures après l'injection du MV-NIS et n'était plus palpable 6 semaines après. Lors du 9^{ème} congrès annuel sur les virus oncolytiques qui s'est tenu à Boston en Juin 2015 (OVC 2015), Stephen Russell a indiqué que cette patiente était toujours en vie 24 mois après le traitement [247] (Annexe n°1). Chez la patiente 2, malgré une rémission de la maladie 6 semaines après l'injection du MV-NIS, des plasmocytomes en progression ont été détectés.

C'est la première fois que la rémission complète d'un cancer disséminé est obtenue après une injection systémique du virus de la rougeole, grâce à l'infection spécifique des différents sites tumoraux par le MV-NIS. Un essai clinique de phase II est en cours de recrutement à la Mayo Clinic (NCT00450814), évaluant le MV-NIS avant ou sans cyclophosphamide, une chimiothérapie, pour le traitement du myélome multiple réfractaire.

3. Autres essais cliniques en cours

D'autres essais cliniques de phase I sont en cours à la Mayo Clinic, visant à évaluer l'efficacité oncolytique du MV-NIS contre le mésothéliome pleural malin après injection intrapleurale (NCT01503177), et contre les cancers squameux récurrents ou métastatiques de la tête et du cou après injection intratumorale (NCT01846091). L'efficacité du MV-CEA va être testée contre le glioblastome multiforme récurrent suite à l'injection du virus dans la cavité après résection de la tumeur par chirurgie, précédée ou non d'une injection intratumorale avant l'acte chirurgical (NCT00390299).

B. Le virus de la vaccine JX-594

Le virus de la vaccine JX-594, aussi appelé Pexa-Vec pour pexastimogene devacirepvec (SillaJen Biotherapeutics et Transgene S.A), est un virus oncolytique de la famille des Poxviridae. Ce virus à ADN, dérivé de la souche vaccinale Wyeth, présente une inactivation du gène codant pour la thymidine kinase (TK) et exprime les gènes codant pour le GM-CSF et la β -galactosidase (β -gal). La réplication du virus dépend donc d'une activité TK cellulaire, qui est constitutivement augmentée dans les cellules tumorales à cause d'anomalies de leur cycle cellulaire [248]. Il a également été décrit que certains mécanismes impliqués dans le tropisme tumoral du JX-594 sont inhérents à la biologie de la tumeur : la réplication du virus dépend de la voie de signalisation EGFR/Ras/MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase), activée dans 90% des cancers solides, et de l'inactivation de la voie IFN de type I [249]. Les gènes codant pour le GM-CSF et la β -gal permettent respectivement de stimuler une réponse immunitaire anti-tumorale et de suivre la réplication virale sur des biopsies [250].

Un premier essai clinique de phase I a été effectué sur 14 patients souffrant de cancer du foie primaire ou métastatique, réfractaire aux traitements standards [251]. L'injection intratumorale du JX-594 est bien tolérée pour une dose maximale de 10^9 PFU (Plaque Forming Units), ayant pour seuls effets secondaires des symptômes grippaux. Une dissémination du virus dépendante de sa réplication est observée dans le sang plus de 20 jours après l'injection intratumorale, résultant en une infection de sites tumoraux non injectés. De plus, pour 4 des 6 patients injectés avec la dose maximale, l'expression de GM-CSF a conduit à une augmentation du nombre de neutrophiles dans le sang.

Plus récemment, un essai clinique de phase II randomisé a été mené sur 30 patients atteints de carcinome hépatocellulaire avancé [252]. Les résultats ont montré que la survie des patients dépend de la dose injectée. Ainsi, la médiane de survie des patients ayant reçu la

faible dose (10^8 PFU) est de 6,7 mois alors que celle du groupe ayant reçu la forte dose (10^9 PFU) est de 14,1 mois. Les réponses cliniques obtenues sont indépendantes d'une immunité pré-existante contre le virus de la vaccine. Cette étude a mis en évidence l'induction d'une réponse immunitaire humorale et cellulaire par le JX-594. Le sérum de 70% des patients contient des anticorps présentant une activité cytotoxique dépendante du complément *in vitro* envers des lignées tumorales de carcinome hépatocellulaire. De plus, des lymphocytes T cytotoxiques spécifiques d'antigènes du virus de la vaccine et du transgène β -gal ont été générés. Quatre patients ayant reçu la forte dose de JX-594 avaient échoué au traitement avec le sorafenib, un inhibiteur de tyrosine kinase, et leur espérance de vie n'était que de 2 à 4 mois selon les résultats d'un essai clinique de phase III évaluant le sorafenib [253]. L'injection du JX-594 a permis une augmentation de leur médiane de survie à 13,1 mois et deux patients étaient encore en vie deux ans après le traitement. Un essai clinique de phase III randomisé est prévu afin d'évaluer l'efficacité du JX-594 en combinaison avec le sorafenib, comparé au sorafenib seul, chez des patients souffrant de carcinome hépatocellulaire n'ayant reçu aucun traitement systémique au préalable (NCT02562755).

En 2013, le JX-594 avait été injecté à plus de 160 patients atteints de cancers variés et bien toléré après une injection intratumorale [251, 252] ou intraveineuse [254]. Son pouvoir oncolytique puissant a été décrit ainsi que ses capacités immunostimulatrices, améliorant considérablement la survie des patients. De plus, le JX-594 est capable d'infecter les cellules endothéliales associées aux tumeurs, entraînant une perturbation de la vascularisation tumorale et augmentant ainsi son efficacité anti-tumorale [255]. L'ensemble de ces caractéristiques fait du JX-594 un virus oncolytique très prometteur qui est actuellement évalué dans de nombreux essais cliniques.

C. Le virus Herpes Simplex T-Vec

Le virus Herpes Simplex HSV-1, appelé T-Vec (talimogene laherparepvec, Amgen), est le virus oncolytique ayant le développement clinique le plus avancé. Ce virus à ADN double brin de la famille des Herpesviridae a été obtenu après plusieurs modifications de la souche JS1, consistant en la délétion de deux gènes viraux non essentiels. Le gène codant pour le facteur de neurovirulence ICP34.5 a été délété, atténuant ainsi la pathogénicité du virus et favorisant une spécificité pour les cellules tumorales. En effet, le facteur ICP34.5 bloque normalement la protéine PKR (Protein Kinase R), qui inhibe la réplication virale après détection du virus, et la délétion de ce facteur confère au virus un tropisme pour les cellules

tumorales dans lesquelles la protéine PKR est souvent inactive [256]. La délétion du gène codant pour la protéine ICP47 entraîne la surexpression du gène US11, codant pour une protéine impliquée dans le blocage de la PKR. Ces deux délétions permettent ainsi d'assurer la réplication spécifique et efficace du virus dans les cellules tumorales. De plus, la délétion d'ICP47 restaure la capacité de présentation d'antigènes par les cellules infectées, favorisant la génération d'une réponse immunitaire anti-tumorale [257]. Enfin, ce virus a été modifié pour exprimer le GM-CSF, qui permet le recrutement et l'activation des cellules immunitaires. La stratégie thérapeutique pour le T-Vec repose donc sur deux propriétés : premièrement, le virus induit la mort des cellules tumorales après leur infection spécifique et deuxièmement, une réponse immunitaire anti-tumorale se met en place, amplifiée par la production locale de GM-CSF.

L'efficacité oncolytique du T-Vec a été évaluée dans un essai clinique de phase II sur 50 patients atteints de mélanome métastatique non opérable de stade IIIc et IV, après injections intratumorales. Les résultats parus en 2009 ont mis en évidence une réponse chez 26% des patients, caractérisée par une régression partielle ou complète des tumeurs injectées et distantes non injectées [258]. La survie globale des patients est de 58% un an après le traitement et de 52% à 24 mois. Afin de caractériser l'effet du T-Vec sur la réponse immunitaire anti-tumorale, une étude a pu être menée à partir des échantillons de tumeurs et de sang des patients [259]. Une réponse immunitaire anti-tumorale locale et systémique a été mise en évidence, démontrée par la présence de lymphocytes T spécifiques de l'antigène de tumeur MART-1 dans le microenvironnement tumoral des lésions injectées et non injectées, comparé aux patients n'ayant pas reçu le T-Vec. De plus, le T-Vec induit une diminution du nombre de lymphocytes T régulateurs CD4⁺, CD8⁺ et de cellules MDSC (Myeloid-Derived Suppressive Cells) dans les tumeurs injectées, réduisant ainsi l'environnement immunorégulateur défavorable.

L'ensemble de ces résultats encourageants obtenus lors de la phase II de l'essai clinique a permis la mise en place de la phase III [260], dont les résultats viennent d'être publiés en Septembre 2015 [261]. Cet essai randomisé de phase III, incluant 436 patients souffrant de mélanome non opérable de stade IIIb à IV, a consisté à comparer l'efficacité du T-Vec, injecté en intratumoral, à l'injection sous-cutanée de GM-CSF recombinant ayant montré des effets bénéfiques en tant qu'adjuvant dans les thérapies du mélanome [262]. La médiane de survie globale obtenue avec le T-Vec est de 23,3 mois et de 18,9 mois avec le GM-CSF. Les résultats ont permis de déterminer que l'efficacité du T-Vec par rapport au GM-CSF est plus prononcée chez les patients souffrant d'un mélanome de stade IIIb à

IVM1a, ayant au maximum des métastases ganglionnaires, par rapport aux patients ayant des métastases pulmonaires ou viscérales (médiane de survie de 41,1 mois avec le T-Vec vs 21,5 mois avec le GM-CSF). De plus, le T-Vec est plus efficace que le GM-CSF seul chez les patients n'ayant pas reçu de traitements au préalable (médiane de survie de 33,1 mois avec le T-Vec vs 17 mois avec le GM-CSF). Le statut sérologique des patients vis-à-vis du HSV n'a aucun effet sur la réponse.

Le T-Vec a prouvé sa sécurité d'utilisation ainsi que son efficacité thérapeutique et représente une nouvelle thérapie potentielle pour le traitement des patients souffrant de mélanomes métastatiques, puisqu'il vient d'être approuvé par la FDA le 27 Octobre 2015 pour une utilisation aux USA. La mise en évidence d'une réponse immunitaire anti-tumorale locale et systémique induite par le T-Vec est en faveur d'une combinaison avec d'autres agents immunothérapeutiques. Ainsi, un essai clinique de phase I/II évalue actuellement le T-Vec associé à l'ipilimumab, un anticorps monoclonal ciblant la molécule CTLA-4 qui inhibe l'activation du système immunitaire. Lors du congrès OVC 2015 sur les virus oncolytiques, Robert Andtbacka a présenté les résultats préliminaires montrant que les réponses cliniques avec cette combinaison sont meilleures que celles obtenues avec le T-Vec seul [247] (Annexe n°1). Un essai clinique de phase II va être initié pour comparer l'efficacité du T-Vec combiné à l'ipilimumab par rapport à l'ipilimumab seul.

Jusqu'à aujourd'hui, plus de 1000 patients, dont certains souffrant de MPM [263] (Annexe n°2), ont reçu une injection intratumorale ou intraveineuse d'un virus oncolytique au cours d'essais cliniques de phase I à III. Une étape importante vient d'être franchie avec l'approbation de la FDA concernant l'utilisation du T-Vec, et plusieurs virus oncolytiques sont dans des phases finales de développement clinique. Il est probable que les virus oncolytiques deviennent rapidement une nouvelle option thérapeutique pour le traitement des cancers.

IV. Réponse immunitaire innée et virothérapie

A. La réponse interféron de type I

Nos cellules ont évolué afin de détecter rapidement tout pathogène et de contrôler l'infection. Cette immunité innée anti-virale, première ligne de défense contre l'intrusion de pathogènes, repose en grande partie sur la réponse IFN de type I déclenchée dans les cellules infectées. En 1957, Isaacs et Lindenmann ont observé que le milieu de culture de cellules infectées par le virus de la grippe confère à des cellules naïves une résistance à l'infection [264]. Cette substance produite par les cellules infectées, interférant avec la dissémination du virus, a été nommée interféron. Cette réponse anti-virale peut se décomposer en trois phases essentielles : la détection du virus, la production d'IFN de type I et l'induction d'un état anti-viral. Elle est induite par différents types de virus et je vais ici décrire la réponse déclenchée suite à l'infection par un virus à ARN, tel que le virus de la rougeole.

1. Détection cytoplasmique des virus à ARN

La réponse anti-virale IFN de type I débute grâce à la détection de motifs viraux, les PAMP (Pathogen-Associated Molecular Pattern), par des récepteurs spécifiques PRR (Pattern Recognition Receptor). Les différents PRR se distinguent par les PAMP qu'ils reconnaissent et par le compartiment cellulaire dans lequel ils se trouvent. Les récepteurs TLR sont localisés au niveau de la membrane cellulaire ou dans les compartiments endosomaux, et leur expression est plutôt restreinte aux cellules immunitaires. La détection cytoplasmique des PAMP viraux, assurée par les hélicases à ARN, va être présentée dans cette partie.

a) Structure des hélicases RIG-I et Mda5

En 2004, deux PRR cytoplasmiques impliqués dans la reconnaissance d'ARN viral ont été identifiés : RIG-I (Retinoic acid-Inducible Gene-I) et Mda5 (Melanoma differentiation-associated protein 5) [265, 266]. Ces hélicases à ARN sont regroupées dans la famille des récepteurs RLR (RIG-I Like Receptor) et partagent la même structure (Figure 4). Ces protéines possèdent un domaine "DEXH/D box RNA helicase" (en référence aux acides aminés Asp-Glu-x-Asp/His, x pouvant être n'importe quel acide aminé), permettant la liaison aux molécules d'ARN, et une activité ATPase. Leur partie N-terminale contient deux domaines CARD (Caspase Activation and Recruitment Domain) indispensables pour la

transduction du signal. Le CTD (C-Terminal Domain) inhibe l'activation de ces protéines en absence de leurs ligands.

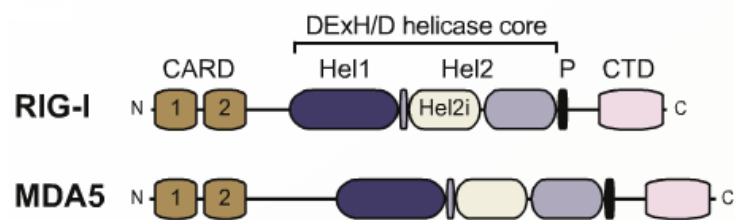


Figure 4 : Structure des RLR RIG-I et Mda5

Tiré de : Goubau et al. Cytosolic Sensing of Viruses. Immunity, 2013.[267]

b) Ligands de RIG-I

En 2006, deux groupes ont décrit que RIG-I reconnaît les ARN viraux possédant un groupement triphosphate en 5' (5'-PPP), particularité permettant de discriminer le soi du non-soi [268, 269]. En effet, les ARN de l'hôte contiennent une coiffe en 5' (pour les ARN messagers) ou sont dépourvus de ce groupement (pour les ARN de transfert et ribosomaux), les ARN 5'-PPP présents dans le cytoplasme d'une cellule étant ainsi spécifiques d'une infection virale. Cependant, deux études ont ensuite démontré en 2009 que l'ARN 5'-PPP nécessite également une région double brin pour activer RIG-I [270, 271]. Cette structure d'ARN 5'-PPP contenant une région en épingle à cheveux, due à l'hybridation de séquences complémentaires présentes aux extrémités 5' et 3', est retrouvée dans le génome de nombreux virus à ARN simple brin négatif comme le virus de la grippe (Influenza A) et le virus de la rougeole [270, 272, 273]. Il a été décrit que ce sont principalement les ARN génomiques viraux qui sont reconnus par RIG-I lors d'une infection par le virus Influenza A, le virus Sendai ou le VSV [274, 275].

Certains ARN ne possédant pas l'extrémité 5'-PPP peuvent également être reconnus par RIG-I. Cela a été démontré avec l'ARN double brin artificiel poly(I:C) (polyinosinic-polycytidylic acid), lorsque sa taille est inférieure à 1 kb [276]. La reconnaissance par RIG-I d'ARN double brin courts, générés pendant la réplication virale, a été démontrée lors de l'infection par le VSV [276].

c) Ligands de Mda5

Les ligands de Mda5 sont moins bien caractérisés. Différentes études ont démontré que Mda5 est impliquée dans la reconnaissance des longs ARN double brin. En effet, cette hélicase est activée par le long poly(I:C) [276] et par des intermédiaires réplicatifs ARN double brin lors de l'infection par un picornavirus [277]. Récemment, il a été décrit que Mda5 reconnaît également des structures ARN de haut poids moléculaire, contenant des ARN simple brin et double brin, générées lors de l'infection par le virus EMCV (Encephalomyocarditis Virus) ou le virus de la vaccine [276, 278].

Les hélicases RIG-I et Mda5 sont exprimées de façon ubiquitaire et partagent une homologie structurale. Bien qu'elles soient toutes les deux impliquées dans la détection d'ARN viral, elles ne sont pas redondantes car elles se distinguent par les structures d'ARN qu'elles reconnaissent. Après la liaison à leurs ligands respectifs, RIG-I et Mda5 induisent une signalisation commune menant à la production d'IFN de type I. La protéine LGP2 (Laboratory of Genetics and Physiology 2) appartient également à la famille des RLR mais ne possède pas le domaine de transduction du signal CARD, contrairement à RIG-I et Mda5 [267]. Des études sont nécessaires afin de clarifier le rôle de cette protéine, même si des travaux suggèrent qu'elle pourrait agir comme régulateur négatif de la réponse IFN de type I [279].

2. Synthèse d'IFN de type I

Après la reconnaissance de l'ARN viral, les deux hélicases RIG-I et Mda5 subissent un changement conformationnel permettant leur liaison à la protéine adaptatrice MAVS (Mitochondrial Anti-Viral Signaling), découverte simultanément par quatre groupes en 2005 [280]. Le rôle essentiel de MAVS dans la réponse anti-virale a été mis en évidence grâce à des souris invalidées pour le gène codant pour cette protéine [281, 282]. La protéine MAVS contient un domaine CARD en N-terminal, et un domaine transmembranaire en C-terminal permettant sa localisation dans la membrane mitochondriale. L'interaction homotypique entre les domaines CARD des hélicases RIG-I et Mda5 et le domaine CARD de MAVS est essentielle pour la signalisation. L'engagement de MAVS entraîne un changement conformationnel conduisant à une agrégation massive de protéines MAVS à la membrane mitochondriale, résultant en une importante amplification du signal [283]. Plusieurs protéines cytoplasmiques sont ensuite recrutées au niveau du complexe MAVS et induisent l'activation

des kinases TBK1 (TANK-binding kinase) et IKK ϵ (IkB kinase- ϵ), responsables de l'activation d'IRF3 et IRF7 (IFN Regulatory Factor), et des kinases IKK α et IKK β , responsables de l'activation de NF- κ B [267]. La phosphorylation d'IRF3 et IRF7 entraîne une homodimérisation ou une hétérodimérisation de ces facteurs de transcription qui rejoignent alors le noyau. IRF3 est exprimé constitutivement dans les cellules, et reste dans un état latent. IRF7 est en revanche présent dans le cytoplasme à un faible niveau, son expression étant ensuite fortement induite pendant la phase tardive de la réponse IFN de type I, en réponse à l'IFN- β , permettant la transcription des gènes codant pour les IFN- α (il existe 13 gènes chez l'homme) et une amplification de la réponse anti-virale [284]. Le facteur de transcription NF- κ B est activé suite à la phosphorylation d'IkB α , protéine inhibitrice dégradée ensuite par ubiquitination.

L'activation des facteurs de transcription IRF3, IRF7 et NF- κ B permet l'induction d'IFN- β et de cytokines pro-inflammatoires. Au cours de cette phase, certains ISG (Interferon-Stimulated Gene) sont également exprimés, indépendamment de la liaison des IFN de type I sur leur récepteur comme cela va être décrit par la suite pour la plupart des ISG. Ces ISG sont principalement ceux codant pour les IRF et les PRR, permettant une amplification rapide de la réponse anti-virale [285] (Figure 5).

3. Induction d'un état anti-viral : les ISG

a) Voie de signalisation des IFN de type I : la voie JAK-STAT

Les IFN de type I produits par les cellules infectées vont agir de manière autocrine et paracrine, sur les cellules voisines, après fixation sur leur récepteur IFNAR (IFN- α/β Receptor), hétérodimère composé des deux sous-unités IFNAR1 et 2 [285]. La liaison des IFN de type I à leur récepteur entraîne la phosphorylation des kinases associées à la partie cytoplasmique du récepteur, JAK1 (Janus Associated Kinase 1) et TYK2 (Tyrosine Kinase 2), qui vont à leur tour phosphoryler le récepteur au niveau de résidus tyrosine conservés. Cela entraîne le recrutement et la phosphorylation des protéines STAT1 et 2 (Signal Transducer and Activator of Transcription). Ces protéines activées forment un hétérodimère et interagissent avec IRF9, formant ainsi le complexe ternaire ISGF3 (ISG Factor 3). Ce complexe passe ensuite dans le noyau où il va se fixer sur les sites appropriés ISRE (IFN-Stimulated Response Elements) au niveau des promoteurs des ISG, induisant la transcription de centaines d'ISG (Figure 5).

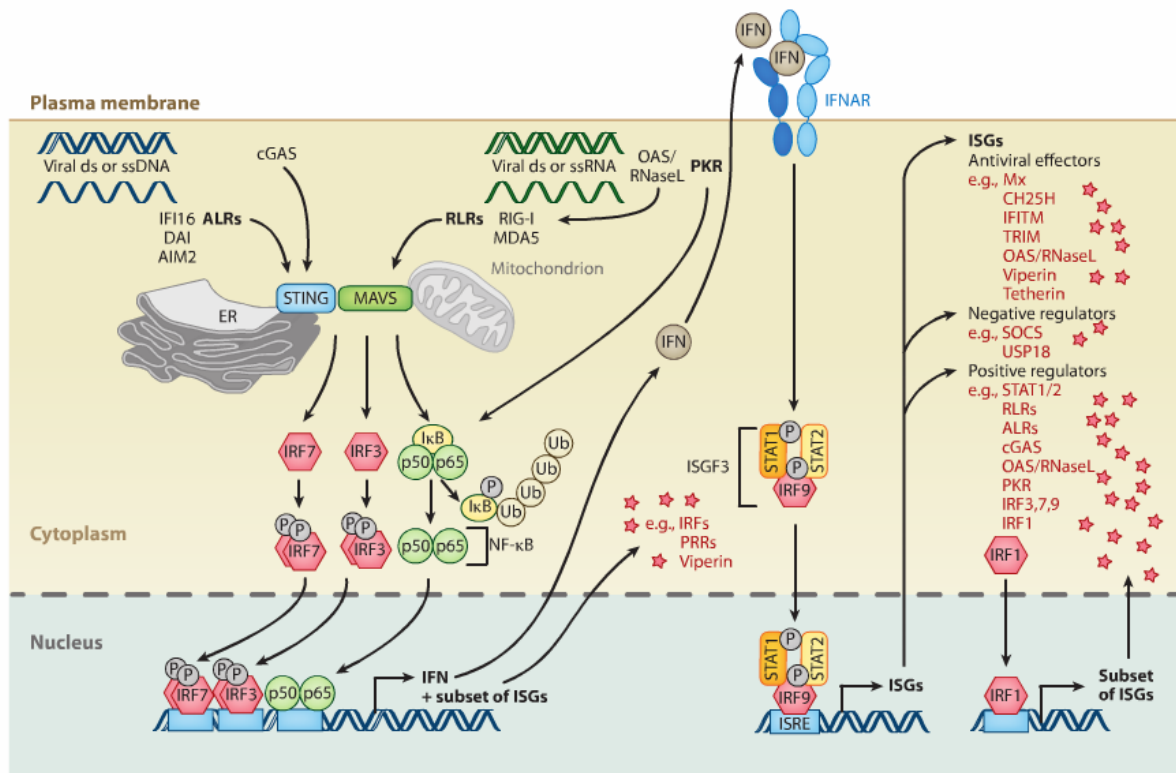


Figure 5 : La réponse IFN de type I induite par la détection cytoplasmique d'ARN viral

Les ARN viraux sont détectés par des hélicases RIG-I et Mda5. La voie de signalisation dépendante de MAVS mène à l'activation des facteurs de transcription IRF7, IRF3 et NF-κB induisant l'expression d'IFN-β et de certains ISG. La fixation des IFN de type I (α et β) sur leur récepteur IFNAR induit la transcription, grâce au complexe ISGF3, de multiples ISG responsables de l'état anti-viral de la cellule.

Tiré de : Schneider et al. Interferon-stimulated genes: a complex web of host defenses. Annu Rev Immunol, 2014. [285]

b) Les IFN-Stimulated Gene (ISG)

Un très grand nombre d'ISG sont exprimés suite à la signalisation induite par les IFN de type I. Ils couvrent un large spectre d'action, pouvant posséder une activité anti-virale intrinsèque, un rôle de régulation positive ou négative de la signalisation, une activité pro-apoptotique ou intervenir directement dans la voie de signalisation afin d'amplifier la réponse anti-virale. Les analyses transcriptionnelles ont permis d'identifier plus de 300 ISG et de les classer selon leur activité [286]. Malgré les études fonctionnelles réalisées ces dernières années, suite à la surexpression d'un ISG ou son invalidation, la fonction de nombreux ISG reste encore à ce jour à déterminer et représente un des enjeux majeurs des recherches menées sur l'immunité innée [287, 288].

Afin de réaliser leur cycle de réplication complet, les virus doivent entrer dans les cellules, répliquer leur génome et produire les protéines virales, puis sortir de la cellule afin d'infecter de nouvelles cellules. Chacune de ces étapes représente une cible potentielle pour les ISG [285].

i. Mx GTPases

Les protéines Mx (Myxomavirus resistance), Mx1 et Mx2 chez l'homme, sont des dynamin-like GTPases (guanosine triphosphatases) dont l'expression dépend exclusivement de la signalisation IFN de type I ou type III [289]. Elles sont de ce fait d'excellents marqueurs de l'induction d'une réponse anti-virale. L'activité anti-virale de la protéine Mx1 a été mise en évidence chez la souris contre le virus Influenza A [290]. L'intervention de cette protéine au cours du cycle de réplication de ce virus a été depuis largement étudiée, bien que certains mécanismes restent encore obscurs [291]. La récente caractérisation de sa structure a permis de mieux comprendre son mécanisme d'action. Mx1 possède un domaine GTPase en N-terminal, un domaine central et un domaine effecteur GTPase en C-terminal, contenant un motif leucine zipper. La structure de cette protéine est essentielle pour son oligomérisation et la formation d'unités circulaires, nécessaires à la reconnaissance des structures virales et à son activité enzymatique [291, 292]. L'acquisition de cette forme est importante pour l'activité anti-virale de Mx1, des mutations abolissant son oligomérisation résultant en une perte de cette fonction [293].

Il est décrit que Mx1 intervient rapidement au cours du cycle viral et exerce son action anti-virale en capturant des composants viraux, les empêchant d'atteindre leur destination ou d'exercer leur fonction. Ainsi, il est reconnu pour différents virus que Mx1 encercle les nucléocapsides viraux et empêche la réplication du virus [294, 295] (Figure 6).

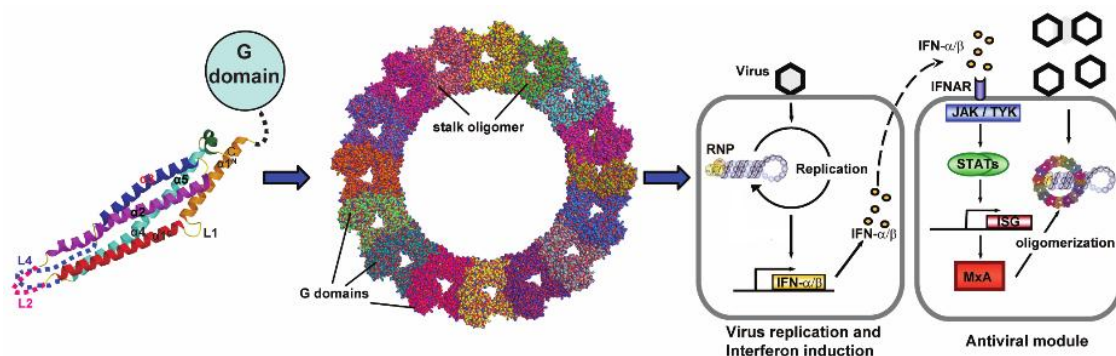


Figure 6 : Structure la protéine Mx1 et mécanisme d'action

Le monomère Mx1 s'oligomérisé et forme une structure circulaire, nécessaire à sa fonction anti-virale. Les IFN de type I synthétisés suite à la détection d'un virus entraînent l'expression de l'ISG Mx1 (aussi nommé MxA). Cette protéine cytoplasmique va alors détecter les complexes ribonucléoprotéiques (RNP) des particules virales infectant la cellule, menant à l'inhibition de la réplication du virus suite à la capture de composants viraux essentiels. Tiré de : Daumke et al. Structure of the MxA stalk elucidates the assembly of ring-like units of an antiviral module. Small GTPases, 2010. [296]

Cette interaction mène à la relocalisation de composants viraux dans des agrégats, au blocage de la translocation du génome viral dans le noyau, comme pour le virus Influenza A [297], ou interfère avec l'intégrité fonctionnelle des virus [298]. Il a également été démontré que la localisation de cette protéine au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique lisse lui permet d'interférer avec la nucléoprotéine N nouvellement synthétisée du virus à ARN LACV (LaCrosse Virus) et de séquestrer cette protéine essentielle à la réplication du virus [299, 300].

L'activité anti-virale de Mx1 a été décrite contre de nombreux virus [291, 298], y compris contre le virus de la rougeole. Grâce à des transfections stables de Mx1 dans une lignée de glioblastome ou une lignée monocyttaire, il a été décrit que Mx1 inhibe la transcription du MV ou interfère avec la synthèse des glycoprotéines virales [301, 302].

La protéine Mx2 a quant à elle été caractérisée pour son action anti-rétrovirale, inhibant l'entrée dans le noyau du génome rétro-transcrit du virus HIV-1 (Human Immunodeficiency Virus 1), événement nécessaire au cycle de réplication du virus [303].

ii. ISG15

ISG15 est l'un des ISG les plus fortement induits par la réponse IFN de type I déclenchée par une infection virale [304]. Cette protéine ubiquitin-like est reliée de manière covalente à ses protéines cibles au cours d'un processus post-traductionnel nommé ISGylation, grâce à l'action de 3 enzymes dont l'expression est également dépendante des IFN de type I [304]. De nombreuses protéines, provenant du virus ou de la cellule hôte, ont été identifiées comme étant les cibles d'ISG15 [305, 306]. Il a été décrit récemment que l'ISGylation impacte préférentiellement les protéines nouvellement synthétisées, une des enzymes impliquée dans ce processus étant associée aux polyribosomes [307]. Dans une cellule stimulée par les IFN de type I, l'ISGylation affecte ainsi les protéines virales traduites et interfère avec leurs fonctions. Certaines cibles d'ISG15 sont cependant des protéines de la cellule hôte. Contrairement à l'ubiquitination, l'ISGylation n'entraîne pas forcément la dégradation de la protéine. Ainsi, l'ISGylation d'IRF3 augmente sa stabilité et empêche sa dégradation, potentialisant son activité transcriptionnelle [308, 309]. De façon similaire, l'ISGylation d'un régulateur négatif de la traduction (4EHP) augmente son affinité pour la coiffe en 5' des ARN messagers et de ce fait bloque l'initiation de la traduction [310]. En plus de son activité anti-virale intracellulaire, ISG15 est sécrété par les cellules immunitaires, menant à la production d'IFN- γ par les lymphocytes T et les cellules NK [311]. L'ISGylation

est un mécanisme anti-viral important induit par les IFN de type I et le répertoire des nombreuses activités d'ISG15 est encore à définir.

iii. OAS/RNaseL

La voie anti-virale OAS (Oligoadenylate Synthetase)/RNaseL est activée suite à la reconnaissance d'ARN double brin par l'enzyme OAS. Suite à l'activation par l'ARN viral, l'enzyme OAS1 s'oligomérisse afin de former un tétramère, forme active qui induit la synthèse de 2',5'-oligoadénylates à partir d'ATP [312]. Ces 2',5'-oligoadénylates activent ensuite spécifiquement la RNaseL, endoribonucléase à l'état latent dans le cytoplasme, menant à son homodimérisation. L'enzyme ainsi activée dégrade les régions simple brin d'ARN de la cellule hôte ou viraux [313]. Le clivage d'ARN cellulaires provoque une diminution des synthèses protéiques de la cellule hôte. De plus, l'ARN dégradé par la RNaseL peut activer les PRR cytoplasmiques tels que RIG-I et Mda5, résultant en une amplification de la synthèse d'IFN de type I [314]. Les souris déficientes pour la RNaseL produisent moins d'IFN- β lors d'une infection virale que les souris sauvages [314].

iv. PKR

La protéine PKR est une kinase reconnaissant les ARN double brin. L'interaction entre l'enzyme et son substrat entraîne une autophosphorylation et une dimérisation de la protéine. Le dimère actif phosphoryle le facteur d'initiation de la traduction EIF2 α (Eukaryotic Translation Initiation Factor 2 alpha), provoquant un arrêt de la traduction des ARN messagers viraux et cellulaires. La PKR régule ainsi la réplication virale ainsi que de nombreuses voies de signalisation cellulaires [312].

Les protéines OAS et PKR étant capables de reconnaître directement les ARN viraux, elles sont également considérées comme étant des PRR, capables d'induire l'expression des IFN de type I (Figure 5) [285, 315]. Le système OAS/RNaseL fournit des ligands supplémentaires aux PRR cytoplasmiques et la PKR participe à la dégradation d'I κ B induite par sa phosphorylation, résultant en l'activation de NF- κ B [316]. Contrairement à ISG15 et Mx1, les protéines OAS et PKR sont exprimées de manière ubiquitaire à un faible niveau, particularité reflétant le fait que ces protéines ne sont pas seulement des effecteurs anti-viraux mais également des détecteurs, capables de déclencher la réponse IFN de type I. Leur expression est cependant augmentée par la signalisation des IFN de type I.

4. Echappement du virus de la rougeole à la réponse IFN de type I

Le virus de la rougeole est détecté par les hélicases cytoplasmiques RIG-I et Mda5 [317, 318]. Cependant, comme de nombreux virus, il a développé des stratégies d'évasion à la réponse anti-virale IFN de type I induite suite à sa détection [319, 320]. Ainsi, la protéine V interagit avec Mda5 au niveau de son domaine hélicase, inhibant donc la liaison de Mda5 avec son ligand et la transduction du signal [266, 321]. D'autre part, le virus de la rougeole est capable d'inhiber la signalisation induite par la liaison des IFN de type I sur leur récepteur. En effet, les protéines P et V inhibent la phosphorylation de STAT1 et empêchent sa translocation au noyau, bloquant ainsi l'expression des ISG [322, 323]. La protéine V est également capable de se lier à IRF9, affectant la formation du complexe ISGF3 indispensable à la transcription des ISG [324]. D'autres protéines virales ont un rôle antagoniste envers cette réponse anti-virale, telles que les protéines C et N impliquées dans le blocage de la signalisation IFN de type I en s'associant au récepteur IFNAR ou interférant avec la translocation nucléaire de STAT1 et 2 [325-327].

Contrairement au virus sauvage, les virus atténués de la rougeole sont moins efficaces pour bloquer la réponse anti-virale IFN de type I. Ceci est principalement dû à des mutations survenant dans différentes protéines virales, notamment la protéine V, lors du processus d'atténuation [141, 328, 329]. De plus, l'infection des cellules par les souches atténuées du virus de la rougeole entraîne la génération d'un plus fort pourcentage de particules défectives interférentes, pouvant activer la production d'IFN de type I suite à leur détection par RIG-I et Mda5 [330].

B. Impact de la réponse IFN de type I sur la virothérapie

1. IFN de type I et cancer

Les IFN de type I et les ISG induits possèdent de nombreuses propriétés s'ajoutant à leur pouvoir anti-viral. En effet, ils provoquent l'arrêt du cycle cellulaire, fournissent des signaux anti-angiogéniques, inhibent la synthèse protéique, promeuvent l'apoptose et activent le système immunitaire [114, 286, 331, 332]. Ces conséquences physiologiques sont incompatibles avec l'évolution tumorale et il n'est pas surprenant de trouver de nombreuses mutations dans les cellules tumorales, les rendant insensibles aux IFN de type I ou incapables de produire ces cytokines. Il est ainsi reconnu que la diminution de l'expression du gène codant pour le facteur de transcription IRF7 favorise la dissémination métastatique du cancer

du sein [333]. De plus, des mutations ou des délétions du facteur STAT1 sont fréquemment retrouvées dans les cellules tumorales, notamment dans les cellules de mélanome et de lymphome T cutané [334-336]. L'expression de ce facteur suppresseur de tumeur est abolie dans les cancers du sein exprimant le récepteur à l'œstrogène, permettant la tumorigenèse [337]. Une perte homozygote du cluster de gènes impliqués dans la réponse IFN de type I sur le chromosome 9p21 est retrouvée dans certains cancers et est associée à un mauvais pronostic [338-340]. D'autre part, une des caractéristiques principales des cellules tumorales réside dans leur synthèse protéique incontrôlée. L'activation de l'oncogène Ras empêche la phosphorylation de PKR et donc du facteur EIF2 α , autorisant une synthèse protéique non maîtrisée [114]. Enfin, il a été démontré que l'absence de la protéine suppresseur de tumeur p53 dans de nombreux cancers entraîne une dérégulation de la méthylation de l'ADN, favorisant la transcription de régions génomiques répétées et non codantes. L'accumulation d'ARN dans le cytoplasme, formant des ARN double brin pouvant être détectés par la PKR ou le système OAS/RNaseL notamment, induit une forte réponse IFN de type I nommée TRAIN (Transcription of Repeats Activates Interferon), menant à l'apoptose de la cellule. La perte de la réponse IFN de type I dans ces cellules tumorales p53 mutée leur permettrait ainsi de tolérer cet événement et d'y survivre [341].

2. La réponse IFN de type I conditionne l'efficacité de la virothérapie

Les défauts de la réponse IFN de type I fréquemment observés dans les cellules tumorales sont exploités par les virus oncolytiques, naturellement sensibles aux propriétés anti-virales des IFN de type I ou conçus pour y être sensibles [342]. De tels virus vont ainsi déclencher la réponse IFN de type I dans les cellules saines, induisant des protéines anti-virales et des signaux pro-apoptotiques, empêchant le virus de prendre le contrôle de la machinerie cellulaire et de se propager. En revanche, cette défense innée étant compromise dans les cellules tumorales, ces dernières représentent une niche favorable à la réplication de ces virus et à leur propagation.

a) Le VSV

Il a été démontré que le VSV exploite naturellement les défauts de la réponse IFN de type I, caractéristiques des cellules tumorales, pour exercer son pouvoir oncolytique [343]. Ce virus possède un large tropisme cellulaire, entrant dans la cellule par endocytose, mais sa réplication est fortement inhibée par les IFN de type I produits par les cellules saines qui

possèdent une réponse anti-virale innée intacte. Le VSV se propage efficacement dans 80% des lignées tumorales du panel NCI-60 (US National Cancer Institute) et possède une activité anti-tumorale dans différents modèles murins immunocompétents [344]. Cependant, les souches de VSV conservent une neurotoxicité pouvant conduire dans certains cas à la mort des animaux suite à une encéphalomyélite. Une nouvelle souche a donc été générée (VSVΔ51), présentant une mutation de la protéine virale M normalement impliquée dans le blocage de l'export des ARN messagers du noyau et séquestrant de cette façon les ARN messagers codant pour les ISG. Le VSV mutant perd donc cette faculté et induit efficacement une réponse IFN de type I dans les cellules saines, limitant ainsi sa réplication dans les tissus sains. L'activité oncolytique envers les cellules tumorales de ce virus est cependant préservée, 81% des lignées testées présentant des défauts dans la réponse IFN de type I. Le VSVΔ51, bien toléré après une injection systémique et n'induisant plus de neurotoxicité, a démontré son pouvoir thérapeutique dans des modèles murins de gliome, de cancer du sein métastatique, de cancer de la vessie et de myélome multiple [345-348]. Dans le but d'améliorer la spécificité du VSV envers les cellules tumorales, un VSV recombinant pour l'IFN- β a été créé. Ainsi, le virus se réplique efficacement dans les cellules tumorales insensibles à l'IFN- β produit, tandis que ce dernier induit un état anti-viral dans les cellules saines, améliorant sa sécurité d'utilisation en réduisant l'effet cytopathique non voulu sur les tissus sains [349]. Ce virus VSV-IFN- β a été testé contre différents cancers [350-352].

Les cellules tumorales sont parfois complètement dépourvues d'une réponse anti-virale fonctionnelle, cependant une inactivation partielle est plus couramment retrouvée, menant à une efficacité limitée de la virothérapie anti-tumorale. Le VSV présente ainsi une efficacité oncolytique variable selon l'état de la réponse IFN de type I dans les cellules tumorales. Cette hétérogénéité de sensibilité à l'infection par le VSV a été démontrée pour différents cancers tels que le mélanome, le cancer de la prostate, le cancer du pancréas et le mésothéliome [353-356]. Il a été décrit qu'une lignée résistante du cancer de la prostate exprime constitutivement des protéines anti-virales et une protéine PKR phosphorylée [354]. De la même manière, les cellules tumorales pancréatiques résistantes à l'infection expriment constitutivement les protéines anti-virales Mx1 et OAS, pouvant être des biomarqueurs potentiels de la sensibilité à l'infection [355]. Le VSV-IFN- β évalué contre le mésothéliome a montré une efficacité limitée. En effet, sur 12 lignées testées, 4 sont sensibles à l'infection et à la lyse induite par le VSV, étant incapables de répondre aux IFN de type I, tandis que les 8 lignées résistantes sont sensibles à l'IFN- β produit lors de la réplication du virus [356].

b) Le MV

Comme mentionné précédemment, l'atténuation du virus de la rougeole le rend naturellement sensible à la réponse anti-virale IFN de type I. En plus d'être attribuée à la surexpression de leurs récepteurs, la spécificité anti-tumorale des souches atténuées du virus de la rougeole peut être due aux défauts de la réponse IFN de type I souvent présents dans les cellules tumorales. Les cellules saines sont quant à elles protégées grâce à l'intégrité de leurs défenses anti-virales. Toutefois, l'inactivation de la réponse IFN de type I étant hétérogène entre les tumeurs, plusieurs travaux récents ont démontré que cela génère des phénomènes de résistance à la virothérapie basée sur le MV.

Une étude, menée sur 4 lignées de leucémies à cellules T de l'adulte (ATL, Adult T cell Leukemia) et 2 lignées T CD4⁺ en contrôle, a démontré que les IFN de type I sont associés à une réduction de la sensibilité à l'effet oncolytique du MV sur les lignées d'ATL *in vitro* et *in vivo* [357]. La sécrétion d'IFN- β inhibe l'infection par le MV de 2 lignées sur les 6 testées et les lignées sensibles présentent des défauts de production d'IFN de type I et de réactivité aux IFN de type I exogènes.

Berchtold et ses collaborateurs ont analysé la sensibilité de cellules tumorales de sarcome à l'infection par la souche Schwarz du MV [358]. Sur les 8 lignées testées, 5 sont sensibles à l'infection. Les auteurs ont démontré que les 3 lignées résistantes expriment un plus faible niveau du récepteur au MV CD46 et se sont intéressés à l'analyse de la réponse IFN de type I. En effet, l'inhibition de la réplication virale dans les lignées résistantes n'est pas due à une différence d'entrée du virus par rapport aux cellules sensibles mais à une forte expression, basale et induite par le MV, des détecteurs intracellulaires du virus RIG-I et Mda5, de l'ISG IFIT1 (Interferon-induced protein with Tetratricopeptide repeats 1) inhibant la traduction, ainsi qu'à la phosphorylation de STAT1 induite par le MV. On peut noter dans cette étude certaines exceptions, à savoir une lignée sensible exprimant IFIT1 et 3 lignées sensibles sécrétant de l'IFN- β après infection par le MV. Le même groupe a étudié le phénomène de résistance au MV oncolytique de 5 lignées parmi 54 lignées provenant du panel NCI-60 [359]. Il a été démontré que l'altération de la réplication virale dans 4 lignées résistantes sur les 5 est due à la phosphorylation de STAT1 et à l'expression de l'ISG IFIT1. Une seule lignée résistante ne montre aucune réponse IFN de type I induite par le MV, comme la lignée sensible testée en parallèle.

Enfin, des travaux menés sur 7 lignées de cancer du poumon non à petites cellules ont mis en évidence une lignée résistante à l'infection par le MV Edmonston [191]. Les résultats

suggèrent que l'activité anti-virale de la protéine PKR, induisant la phosphorylation du facteur EIF2 α , inhibe la réplication du MV dans la lignée résistante en contrôlant la traduction.

Le statut de la réponse IFN de type I conditionne donc l'efficacité de différents virus oncolytiques dont le MV. En effet, la déficience de cette voie de signalisation dans de nombreuses cellules tumorales permet leur ciblage par les virus oncolytiques, naturellement sensibles aux effecteurs anti-viraux ou rendus sensibles afin de limiter l'infection des cellules saines. Cependant, la réponse IFN de type I persistante dans certaines tumeurs constitue un obstacle à la virothérapie.

Conclusion

La virothérapie anti-tumorale est une stratégie thérapeutique en plein essor. Parmi l'arsenal des virus oncolytiques disponibles, le virus atténué de la rougeole MV est un candidat intéressant. En effet, il possède de nombreuses caractéristiques requises pour être un virus oncolytique idéal [114]. Le MV a la particularité d'infecter préférentiellement les cellules tumorales, profitant de certaines aberrations apparues au cours du processus de tumorigenèse, notamment la surexpression des récepteurs spécifiques au MV et certains défauts dans la réponse anti-virale IFN de type I favorisant la réplication du virus. Les tissus sains sont de ce fait épargnés de l'effet cytotoxique du MV. De plus, le pouvoir réplcatif de ce virus permet l'amplification, au sein de la tumeur, de la dose thérapeutique administrée.

De plus, ce virus peut contenir des transgènes de grande taille tout en gardant sa stabilité *in vitro* et *in vivo*, offrant ainsi de larges possibilités de modifications [214]. C'est ainsi que de nombreux MV recombinants ont pu être créés, permettant notamment l'amélioration de la spécificité envers les cellules tumorales, de l'efficacité lytique et du suivi de la réplication. Le MV ainsi que des MV recombinants ont prouvé leur pouvoir oncolytique *in vitro* et *in vivo* dans des modèles animaux envers de nombreux types de cancers.

Les souches vaccinales du MV possèdent d'autres caractéristiques rendant favorable leur transfert à la clinique. Elles sont génétiquement stables et aucune réversion vers une forme pathogène n'a été rapportée à ce jour [168]. De plus, l'injection de ces souches à des millions de personnes pendant les campagnes de vaccination a permis de démontrer leur sécurité d'utilisation, présentant très peu d'effets indésirables.

Au regard de ces propriétés intéressantes, le MV et différents variants ont donc été testés au cours de premières phases d'essais cliniques contre différents cancers. Les résultats obtenus sont très prometteurs et encouragent la poursuite de leur évaluation clinique.

Bien qu'auparavant uniquement considérés comme de puissants agents thérapeutiques permettant de lyser efficacement la tumeur, il est de plus en plus reconnu que de nombreux virus oncolytiques, tels que le MV, ont aussi la capacité d'activer le système immunitaire et d'entraîner l'établissement de réponses anti-tumorales spécifiques qui pourraient jouer un rôle important dans l'éradication des tumeurs primaires et des métastases.

PARTIE III : Virothérapie et réponse immunitaire anti-tumorale

I. Système immunitaire et développement tumoral

A. Le concept d'immunosurveillance

L'hypothèse de l'implication du système immunitaire dans le contrôle de la progression tumorale a été émise au début du 20^{ème} siècle, en 1909 par Paul Ehrlich, mais n'a pas pu être testée expérimentalement. Grâce au développement des connaissances en immunologie, Burnet et Thomas proposent en 1950 le concept d'immunosurveillance des cancers, suggérant que les lymphocytes sont responsables de l'élimination des cellules transformées apparaissant dans notre organisme [360, 361]. Cependant, les résultats obtenus chez les souris immunodéficientes nude n'ont pas apporté de preuve convaincante [362, 363]. Ceci a pu s'expliquer plus tard par l'immunodéficiência imparfaite des souris nude, préservant une immunité fonctionnelle résiduelle, suffisante pour empêcher la survenue de cancer grâce à quelques lymphocytes T et des cellules NK [364, 365]. C'est à partir des années 1990 que le concept d'immunosurveillance des cancers est à nouveau étudié, grâce à des modèles de souris génétiquement modifiées. En 2001, le travail de Shankaran et ses collègues apporte définitivement la preuve de l'implication des lymphocytes cytotoxiques et de l'IFN- γ dans l'immunosurveillance des cancers [366]. L'utilisation de souris déficientes pour le gène RAG-2 (Recombinase Activating Gene-2), provoquant une perte des lymphocytes T, B et des cellules NKT (Natural Killer T cells), ou déficientes pour la réponse à l'IFN- γ (perte des gènes impliqués dans la signalisation de l'IFN- γ), a permis de mettre en évidence la fonction des lymphocytes et de l'IFN- γ dans le contrôle des tumeurs chimiquement induites ou spontanées.

L'existence d'un mécanisme d'immunosurveillance chez l'homme a été observée chez des individus présentant une immunodéficiência congénitale ou acquise et chez les patients transplantés sous traitement immunosuppresseur, pour lesquels l'incidence des cancers est plus élevée que pour les sujets immunocompétents [367]. De plus, des réponses immunitaires spontanées, cellulaires et humores, ont été détectées chez des patients ayant un cancer [368-370].

Malgré ces différentes preuves soutenant le concept d'immunosurveillance des cancers, le développement des tumeurs n'est pas contrôlé efficacement chez les individus

immunocompétents, suggérant une interaction complexe entre la tumeur et le système immunitaire.

B. Le cancer immunoediting

1. Mise en évidence

Grâce à des approches de transplantation tumorale, l'influence du système immunitaire sur l'immunogénicité des tumeurs induites par l'agent chimique carcinogène MCA (Méthylcholanthrène) a été évaluée [366]. Dans cette étude, des cellules tumorales de sarcome induit par le MCA chez des souris immunocompétentes ou des souris immunodéficientes RAG-2^{-/-} induisent le développement de tumeurs chez les souris RAG-2^{-/-} après injection sous-cutanée. Ces mêmes lignées ont été injectées à des souris immunocompétentes naïves. Tandis que les tumeurs obtenues chez des souris RAG-2^{-/-} sont rejetées dans 40% des souris immunocompétentes, celles obtenues chez les souris immunocompétentes induisent une tumeur chez tous les animaux. Les tumeurs gardent ainsi une empreinte de l'environnement immunologique dans lequel elles se sont développées. Ces résultats démontrent que les tumeurs ayant progressé malgré un système immunitaire intact deviennent moins immunogènes. C'est ainsi que le phénomène de cancer immunoediting a été mis en évidence en 2004 par Dunn et ses collègues, précisant l'interaction complexe entre le système immunitaire et la tumeur [368]. En éliminant les cellules tumorales apparaissant dans l'organisme, le système immunitaire sélectionne paradoxalement des variants tumoraux peu immunogènes, favorisant le développement subséquent de la tumeur.

2. Un processus en trois phases

a) Élimination

Cette première phase du cancer immunoediting est la phase d'élimination, correspondant à l'immunosurveillance. Au cours de cette phase, différents acteurs du système immunitaire participent à l'élimination des cellules tumorales (Figure 7). L'environnement inflammatoire généré par l'apparition des cellules transformées recrute des cellules de l'immunité innée telles que les lymphocytes T $\gamma\delta$, les cellules NKT, NK et les macrophages. Les cellules tumorales mourantes permettent l'activation de l'immunité adaptative, entraînant des réponses lymphocytaires T CD4⁺ et CD8⁺ spécifiques d'antigènes tumoraux. Au cours de cette phase, des IFN de type I sont produits ainsi que de l'IFN- γ en grande quantité, intervenant dans l'immunosurveillance en agissant sur des populations cellulaires différentes.

L'IFN- γ sécrété dans l'environnement tumoral recrute et active des cellules immunitaires telles que les macrophages. De plus, l'IFN- γ a la propriété d'augmenter l'immunogénicité des cellules tumorales en favorisant l'expression des composants intervenant dans la présentation des antigènes sur le CMH I (Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe I), reconnu par les lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques [368]. Les IFN de type I sont notamment capables d'activer les cellules dendritiques, d'augmenter l'efficacité lytique des macrophages et des cellules NK et d'induire la production d'IL-15, augmentant le priming et la survie des lymphocytes T [371, 372]. Le système immunitaire et les cytokines produites ont donc la capacité de protéger l'organisme de l'apparition d'une tumeur mais dans la plupart des cas, des cellules tumorales persistent et évoluent au cours de la phase d'équilibre.

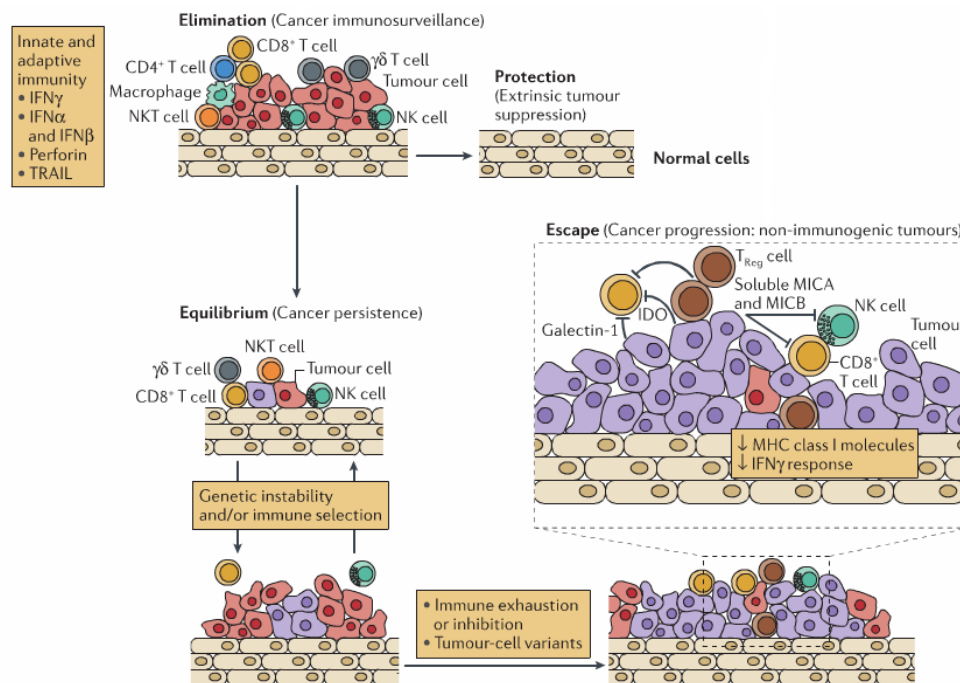


Figure 7 : Le cancer immunoediting

Le processus de cancer immunoediting se décompose en 3 phases : élimination, équilibre et échappement. Au cours de la phase d'élimination, des réponses immunitaire innées et adaptatives se mettent en place afin d'éliminer les cellules tumorales apparues dans l'organisme. La suppression complète des cellules tumorales est rare et un état d'équilibre s'établit entre le système immunitaire et les cellules tumorales restantes. La pression de sélection exercée par les cellules immunitaires va favoriser l'apparition de nouveaux variants tumoraux, moins immunogènes et mettant en place de nombreuses stratégies d'évasion au système immunitaire. La phase d'échappement correspond à la croissance des cellules tumorales résistantes dans un environnement rendu immunosuppresseur par divers mécanismes, menant à la détection clinique de la tumeur.

Tiré de : Dunn et al. Interferons, immunity and cancer immunoediting. Nat Rev Immunol, 2006. [371]

b) Équilibre

Le système immunitaire et les cellules tumorales ayant survécu à la phase d'élimination entrent dans une phase d'équilibre dynamique, au cours de laquelle les cellules immunitaires exercent une pression de sélection puissante et incessante, maîtrisant le développement tumoral, mais insuffisante pour éliminer la tumeur. Les cellules tumorales subissent alors une sélection Darwinienne : les variants tumoraux originaux sont détruits et différentes mutations entraînent l'émergence de nouveaux variants, moins immunogènes et résistants à l'attaque du système immunitaire (Figure 7). Au cours de cette phase, la plus longue du cancer immunoediting, le système immunitaire sculpte donc l'immunogénicité de la tumeur et favorise la croissance des nouveaux variants au cours de la 3^{ème} phase.

c) Échappement

Les variants sélectionnés au cours de la phase d'équilibre sont capables de croître dans un environnement immunologique intact. De nombreuses stratégies d'évasion vis-à-vis du système immunitaire sont mises en place par les cellules tumorales, grâce à des mutations génétiques et épigénétiques [368, 373]. Certaines modifications empêchent la détection des cellules tumorales par le système immunitaire, telles que la perte d'expression de la molécule CMH I, affectant la reconnaissance par les lymphocytes T cytotoxiques CD8⁺, la perte d'expression ou l'expression d'une forme soluble des protéines MIC (MHC-class-I-polypeptide-related sequence), ligands du récepteur des cellules NK empêchant donc l'action de ces cellules [374, 375]. Les cellules tumorales résistent à l'élimination par le système immunitaire, notamment en perdant la sensibilité aux IFN de type I et à l'IFN- γ et en compromettant la fonction de lyse des lymphocytes T cytotoxiques, grâce à la perte d'expression des récepteurs de mort Fas et TRAIL-R (TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand Receptor) ou à la surexpression d'une sérine protéase inactivant la molécule pro-apoptotique granzyme B [373, 376]. D'autre part, les cellules tumorales interfèrent avec le développement d'une réponse immunitaire efficace en générant un environnement immunosuppresseur via la production des cytokines TGF- β et IL-10 et de l'enzyme IDO (Indoleamine 2,3-dioxygenase), inhibant l'activation et la prolifération de nombreuses cellules immunitaires (apparition de cellules T régulatrices, inhibition de la prolifération des lymphocytes T notamment) [373, 377] (Figure 7). De plus, les cellules tumorales expriment PD-L1 (Programmed cell Death Ligand 1), se liant à son récepteur PD-1 (Programmed cell Death 1) exprimé par les lymphocytes T anti-tumoraux activés pour entraîner l'inhibition de

leur activité cytotoxique [378]. L'ensemble de ces mécanismes, ainsi que beaucoup d'autres non décrits ici, participent à l'échappement de la tumeur au système immunitaire, permettant sa croissance jusqu'à sa détection clinique [379].

3. 7^{ème} caractéristique intrinsèque des cellules tumorales

En 2000, Hanahan et Weinberg ont proposé une classification de 6 modifications caractéristiques que doivent acquérir les cellules pour leur transformation tumorale [380]. L'instabilité génétique génère de nombreuses mutations impliquées dans la tumorigenèse et il est reconnu que l'inflammation chronique promeut le développement tumoral. Les cellules tumorales deviennent indépendantes vis-à-vis des signaux de croissance, résistantes aux inhibiteurs de croissance, à l'apoptose, et également capables de proliférer indéfiniment, de stimuler l'angiogenèse et d'envahir les tissus pour former des métastases [379]. Suite aux nombreux travaux sur le cancer immunoediting, il est apparu que les cellules tumorales sont capables de s'adapter à la pression de sélection exercée par le système immunitaire, en devenant moins immunogènes et en inactivant les réponses immunitaires. La capacité d'échappement à l'élimination par le système immunitaire est ainsi devenue la 7^{ème} caractéristique des cellules tumorales [381]. Au cours de cette récente réactualisation, une 8^{ème} caractéristique a également été ajoutée, correspondant à la reprogrammation du métabolisme énergétique [381].

La meilleure compréhension des mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans les trois phases de l'immunoediting permet le développement de nouvelles approches immunothérapeutiques et l'amélioration de celles existantes. Ainsi, il est intéressant d'identifier les acteurs immunitaires intervenant efficacement dans la phase d'élimination pour potentialiser l'effet anti-tumoral. De plus, l'étude de la phase d'équilibre permet de définir les cibles moléculaires participant à la modification de l'immunogénicité. Enfin, en élucidant les mécanismes impliqués dans l'échappement des cellules tumorales à la détection et à l'élimination par le système immunitaire, il est possible de développer des outils permettant de démasquer les cellules tumorales et de briser la tolérance immunitaire.

II. Briser la tolérance immunitaire

Depuis plusieurs décennies, de nombreuses immunothérapies ont été développées, ayant pour objectif d'initier une réponse immunitaire anti-tumorale efficace ou de réactiver celle existante, notamment en inhibant les mécanismes immunosuppresseurs mis en place par la tumeur [382]. Parmi le large éventail des immunothérapies disponibles, plusieurs prennent en compte l'importance de la réponse lymphocytaire T CD8⁺ dans l'élimination de la tumeur.

A. Importance des lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques

1. Infiltration dans la tumeur : facteur de bon pronostic

Plusieurs études ont mis en évidence que la présence de lymphocytes infiltrant la tumeur (TIL, Tumor-Infiltrating Lymphocytes) corrèle avec une meilleure survie des patients [368]. Cette corrélation a été observée dans différents types de cancers, tels que le mélanome, le cancer du rein, de l'ovaire, du sein et du côlon [383-387]. Parmi les TIL, les lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques sont le plus souvent associés à un pronostic favorable, cependant une étude récente a montré que l'analyse des ratios entre les différentes populations de TIL est plus informative [388]. Il a notamment été décrit que le ratio élevé entre les lymphocytes T CD8⁺ et les lymphocytes T régulateurs est de bon pronostic dans le cancer de l'ovaire [389]. Il a également été suggéré que le type, la densité et la localisation des cellules immunitaires dans la tumeur sont de meilleurs facteurs prédictifs de la survie des patients atteints de cancer colorectal, par rapport à l'analyse histopathologique couramment effectuée [387]. Ces observations suggèrent que les lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques jouent un rôle majeur dans la réponse immunitaire anti-tumorale. Ils ont la capacité de reconnaître des antigènes de tumeur (répertoriés pour la plupart dans la base de données <http://www.cancerimmunity.org>) à la surface des cellules tumorales et d'entraîner leur lyse.

2. Immunothérapies

Partant de ce constat, des stratégies d'immunothérapies se sont développées, visant à utiliser ces cellules ou à les induire afin de cibler et détruire les tumeurs [390]. Une stratégie majeure d'immunothérapie passive développée est le transfert adoptif de lymphocytes T, consistant à injecter aux patients des lymphocytes T cytotoxiques autologues spécifiques d'antigènes tumoraux qui ont été purifiés, sélectionnés et amplifiés *ex vivo* à partir de TIL ou de lymphocytes circulants. Ces lymphocytes T anti-tumoraux sont réinjectés aux patients

après une immunodéplétion effectuée par un traitement chimiothérapeutique, seul ou associé à une très forte irradiation. Ce traitement de transfert adoptif chez les patients immunodéplétés, combiné à une injection d'IL-2, prolonge la survie des patients atteints de mélanome métastatique ou d'autres tumeurs [391, 392]. De nombreux essais cliniques sont en cours dans différents cancers [393]. Les résultats sont encourageants mais cette procédure reste lourde et se heurte à certains critères limitants pour l'obtention d'une efficacité thérapeutique, tels que l'état de différenciation des lymphocytes injectés, leur migration et l'activité cytotoxique envers les cellules tumorales. De plus, un des défis réside dans l'identification des antigènes tumoraux spécifiques de chaque patient permettant de proposer un traitement personnalisé efficace [392].

Des stratégies d'immunothérapie active, reposant sur la vaccination anti-tumorale grâce aux cellules dendritiques (DC), ont été largement développées ces dernières décennies [390]. Les DC, jouant un rôle central dans l'établissement de réponses immunitaires anti-tumorales comme il en sera discuté plus loin, ont été utilisées afin de générer des réponses lymphocytaires T spécifiques d'antigènes de tumeur *in vivo*. Ainsi, des antigènes de tumeur sont délivrés aux DC *ex vivo* sous différentes formes (protéines, peptides, ARN, lysats cellulaires) et les DC chargées sont réinjectées aux patients dans le but d'induire une réponse immunitaire spécifique de la tumeur, capable de la détruire, et de générer une mémoire immunitaire à long terme empêchant les récives éventuelles [394]. L'efficacité de cette stratégie, évaluée dans différents cancers, dépend de nombreux paramètres tels que la préparation des DC, leur mode de chargement et la nature des antigènes tumoraux, leur état d'activation, leur mode d'injection, ainsi que la composition de l'environnement tumoral [395]. Bien qu'une meilleure compréhension de la biologie des DC ait permis l'amélioration de cette stratégie, des études sont à poursuivre afin de révéler le réel impact thérapeutique des DC générées *ex vivo*. Deux essais de phase III sont en cours, évaluant l'effet de la vaccination avec les DC autologues en combinaison avec un traitement chimiothérapeutique [396].

Les résultats cliniques obtenus avec les approches immunothérapeutiques développées intensivement ces dernières années, visant à injecter des lymphocytes T ou des DC manipulés *ex vivo*, ne sont pas à la hauteur de l'espoir généré initialement. De nombreux paramètres sont à prendre en considération et limitent l'efficacité thérapeutique. Il apparaît préférable de développer des stratégies thérapeutiques ayant la capacité d'activer directement *in vivo* le système immunitaire. Ainsi, il a été montré qu'une réponse immunitaire anti-tumorale peut être générée par des thérapies telles que certaines chimiothérapies et la virothérapie, intervenant de manière favorable dans le résultat clinique observé.

B. Les virus oncolytiques, agents immunothérapeutiques

Auparavant considérés comme étant simplement de puissants agents destructeurs des cellules tumorales, les virus oncolytiques ont prouvé leur capacité à générer une réponse immunitaire anti-tumorale, devenant de nouveaux agents immunothérapeutiques [397-399]. De nombreuses preuves se sont accumulées à l'issue d'études pré-cliniques avec différents virus oncolytiques [400]. Il a notamment été démontré que l'inoculation intra-tumorale du HSV dans des tumeurs colorectales, de mélanome ou de neuroblastome chez la souris entraîne la régression des tumeurs injectées et également des tumeurs contra-latérales non injectées, grâce à la génération de lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques spécifiques d'antigènes tumoraux [401, 402]. Cette réponse immunitaire anti-tumorale systémique assure une protection à long terme et n'est pas mise en place chez les souris nude. L'efficacité thérapeutique du réovirus et du NDV envers des tumeurs résistantes à l'infection *in vitro* et *in vivo* apporte également une preuve de l'engagement du système immunitaire [403, 404]. Enfin, les lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques jouent un rôle crucial dans le traitement par le VSV [405].

Ces nombreuses données expérimentales ont démontré que de nombreux virus oncolytiques sont capables de briser la tolérance immunitaire de la tumeur, pouvant ainsi bénéficier de la participation d'une réponse immunitaire anti-tumorale spécifique pour assurer une efficacité thérapeutique. Cet effet immunothérapeutique, étudié *in vitro* avec des cellules humaines, est désormais évalué dans les essais cliniques, grâce à la mesure de réponses immunitaires contre des antigènes tumoraux, comme cela a été décrit dans le paragraphe III de la partie II. Il est également important de rappeler que des virus oncolytiques recombinants pour des protéines immunostimulatrices sont générés afin d'améliorer leur potentiel immunostimulateur (dans la partie II, voir le paragraphe II.C.3.c) et le paragraphe III) [406].

Il ressort de l'étude des interactions entre le système immunitaire et la tumeur une importante complexité. Les recherches se sont intéressées au développement d'immunothérapies ayant pour but de rediriger le système immunitaire contre la tumeur et de contrer les mécanismes d'échappement mis en place. Les virus oncolytiques sont considérés aujourd'hui comme des agents immunothérapeutiques et il est important de comprendre leurs effets sur différents acteurs du système immunitaire impliqués dans l'établissement de réponses anti-tumorales. Certains mécanismes vont être décrits ci-après en prenant comme exemple le virus oncolytique de la rougeole.

III. La réponse immunitaire anti-tumorale

A. Les cellules dendritiques

1. Rôle central dans la réponse immunitaire

Les cellules dendritiques (DC) ont été découvertes par Ralph Steinman en 1973, à qui le prix Nobel de médecine a été décerné en 2011 [407-409]. Ces cellules sont présentes dans tous les tissus sous forme immature et exercent un rôle de sentinelles. Elles constituent un lien entre l'immunité innée et adaptative et sont chargées de maintenir la tolérance ou d'activer une réponse immunitaire. Les DC sont considérées comme étant des cellules présentatrices d'antigènes professionnelles, capables d'activer des lymphocytes T naïfs n'ayant jamais rencontré l'antigène. L'antigène est présenté au TCR (T Cell Receptor) des lymphocytes T sous forme d'un complexe peptide-CMH dans les organes lymphoïdes. A l'état immature, les DC possèdent des propriétés de phagocytose importantes et présentent des antigènes du soi, ayant pour conséquence la délétion ou l'anergie des lymphocytes T réactifs ainsi que la différenciation en lymphocytes T régulateurs. En absence de danger, les DC immatures induisent ainsi une tolérance périphérique [410-412]. Ces cellules sentinelles sont capables de détecter toute situation de danger en périphérie, notamment l'invasion par des pathogènes, grâce à des récepteurs spécifiques PRR. Après capture de l'antigène en périphérie et intégration du signal de danger, les DC matures vont induire dans les organes lymphoïdes secondaires la différenciation des lymphocytes T naïfs spécifiques de l'antigène en cellules effectrices, grâce à la présentation efficace de l'antigène associée à une co-stimulation. Les propriétés fonctionnelles des DC dépendent donc de leur état de maturation, déterminé par l'environnement dans lequel elles ont acquis l'antigène [413, 414].

2. Reconnaissance des pathogènes

L'organisme a évolué pour être capable de détecter des motifs moléculaires conservés entre les pathogènes, les PAMP, grâce à des récepteurs spécifiques PRR exprimés par les DC. On distingue les PRR d'endocytose des PRR de signalisation. Parmi ces derniers, certains récepteurs sont cytoplasmiques et d'autres membranaires.

a) Les récepteurs cytoplasmiques

i. Les RLR

Les RLR RIG-I et Mda5 sont des récepteurs cytoplasmiques impliqués dans la reconnaissance d'ARN viraux. Ils ont été décrits dans la partie II, paragraphe IV.A.1.

ii. Les NLR

Les protéines NOD1 et NOD2 (Nucleotide-binding Oligomerization Domain) de la famille des NLR (NOD-Like Receptor) interviennent dans la reconnaissance de motifs dérivés du peptidoglycane bactérien [415]. La protéine NALP3 (NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 3) détecte différents motifs microbiens et conduit à la formation de l'inflammasome NLRP3 (NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3), responsable de la libération des cytokines pro-inflammatoires IL-1 β et IL-18 suite à l'activation de la caspase 1 [415].

iii. Les senseurs d'ADN

Différents senseurs cytoplasmiques d'ADN ont été identifiés comme IFI16 (IFN Inducible protein 16), AIM2 (Absent in melanoma 2) et DAI (DNA-dependent Activator of IRF), appartenant à la famille des récepteurs ALR (AIM2-Like Receptor) [285, 416-418]. Le signal déclenché par l'activation de ces récepteurs est transduit par la protéine STING (Stimulator of IFN Genes) située dans la membrane du réticulum endoplasmique, menant à la sécrétion d'IFN de type I [419, 420]. La protéine AIM2 intervient dans la formation d'un inflammasome suite à la reconnaissance de virus à ADN et de bactéries intracellulaires, entraînant la libération d'IL-1 β et d'IL-18 [421]. Plus récemment, il a été démontré que l'ADN cytoplasmique peut être détecté par l'enzyme cGas (cyclic GMP-AMP (cGAMP) synthase) [422]. cGas synthétise un dinucléotide cyclique cGAMP qui agit en temps que second messenger pour activer STING et induire la production d'IFN de type I [423].

b) Les Toll-like récepteurs

Les TLR sont des récepteurs transmembranaires impliqués dans la reconnaissance spécifique de différents PAMP. Leur domaine extracellulaire, comprenant des motifs riches en leucine, intervient dans la reconnaissance du pathogène tandis que le domaine intracellulaire TIR (Toll-IL-1 Receptor) permet la transduction du signal [424]. Chez

l'homme, on compte 10 TLR capables de reconnaître des PAMP de différentes natures, tels que des lipides, des lipoprotéines, des protéines et des acides nucléiques provenant de microbes variés (bactéries, virus, parasites et champignons) [425]. Les TLR se trouvent dans des compartiments cellulaires différents selon le PAMP reconnu. Ainsi, certains TLR sont ancrés dans la membrane cytoplasmique et reconnaissent principalement des composants de surface des micro-organismes, tandis que d'autres TLR, impliqués dans la reconnaissance des acides nucléiques microbiens, sont exprimés dans le compartiment endolysosomal [424].

i. Les TLR de surface

Parmi les TLR de surface se trouve le TLR4 qui, complexé à la protéine MD2, se lie au LPS (Lipopolysaccharide) composant la paroi des bactéries Gram négatif. D'autres protéines accessoires sont recrutées dans ce complexe et interviennent dans la liaison au LPS : les protéines LBP (LPS-Binding Protein) et CD14 [426].

Le TLR2 reconnaît de nombreux PAMP, notamment des lipoprotéines de bactéries, l'acide lipotéichoïque et le peptidoglycane des bactéries Gram positif, le zymosan des champignons ou encore l'hémagglutinine du virus de la rougeole [425]. Le TLR2 forme généralement des hétérodimères avec le TLR1 ou le TLR6, dont la structure permet de discriminer différentes lipoprotéines bactériennes [427, 428].

Le TLR5 intervient dans la détection de la flagelline des bactéries à flagelles [425].

ii. Les TLR intracellulaires

Les TLR intracellulaires sont retenus au niveau du réticulum endoplasmique et rejoignent les membranes des vésicules intracellulaires telles que les endosomes, les lysosomes ou les endolysosomes suite à une stimulation, afin de détecter les acides nucléiques microbiens [429]. Le TLR3 se lie à l'ARN double brin et forme un homodimère stable pour induire une signalisation efficace. Les ARN double brin détectés proviennent du génome de certains virus comme le réovirus, d'intermédiaires réplicatifs de virus à ARN ou encore d'ARN interférents [425]. Le TLR3 peut également détecter le poly(I:C), un analogue synthétique d'ARN double brin mimant une infection virale [424].

Les TLR7 et 8 sont impliqués dans la reconnaissance des ARN simple brin viraux (virus HIV, virus Influenza A, VSV...) [424, 430, 431]. De nombreux virus entrent dans la cellule par la voie endosomale et l'acidification dans les phagolysosomes permet la dégradation des particules virales, rendant accessible l'acide nucléique aux TLR7 et 8. Ce

même processus intervient lors de la phagocytose de cellules infectées. Le TLR7 peut être activé par l'imiquimod (R837) et le resiquimod (R848), dérivés d'imidazoquinolines, tandis que le TLR8 n'est sensible qu'au R848.

Le TLR9 reconnaît les motifs CpG non méthylés (2'-deoxyribo-Cytidine-Phosphate-Guanosine) présents dans le génome de nombreuses bactéries et virus, tels que le HSV-1 et -2 [432, 433]. L'activation du TLR9 peut également être obtenue grâce à des oligonucléotides synthétiques contenant des motifs CpG, appelés CpG ODN (OligoDeoxyNucleotide) [434]. De même que le TLR7, le TLR9 requiert l'acidification des endolysosomes pour accéder à l'acide nucléique.

iii. Signalisation induite par les TLR

Après leur activation, les TLR peuvent réguler deux voies de signalisation distinctes selon la protéine adaptatrice recrutée [435, 436] (Figure 8). Ainsi on distingue la voie dépendante de l'adaptateur MyD88 (Myeloid Differentiation primary response gene 88), activée par tous les TLR excepté le TLR3. Le recrutement de MyD88 au niveau du domaine TIR du TLR induit une cascade de signalisation aboutissant à l'activation du facteur de transcription NF- κ B et des MAPK p38 et Jnk (c-Jun N-terminal kinase) activant les facteurs de transcription CREB (cAMP response element-binding protein) et AP1 (Activating Protein 1). L'activation de cette voie de signalisation a pour conséquence la synthèse de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6 et l'IL-12 [424]. Il a été montré, grâce à l'étude des cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC), que MyD88 est également impliqué dans la signalisation des TLR7, 8 et 9 pour induire la production d'IFN de type I. Suite à l'activation de ces TLR, le facteur de transcription IRF7, qui est exprimé de manière constitutive dans ces cellules, est recruté par MyD88 et un complexe multiprotéique se forme pour induire la phosphorylation d'IRF7 [437, 438]. Le facteur de transcription IRF7 ainsi activé transloque dans le noyau et induit la synthèse de grandes quantités d'IFN de type I.

La protéine adaptatrice TRIF (TIR domain-containing adaptor protein inducing interferon- β) est utilisée par le TLR3 et le TLR4 [439, 440]. La voie de signalisation de TRIF culmine en l'activation concomitante des facteurs de transcription NF- κ B et IRF3. Tandis que NF- κ B induit la production de cytokines pro-inflammatoires, IRF3 entraîne la synthèse d'IFN- β .

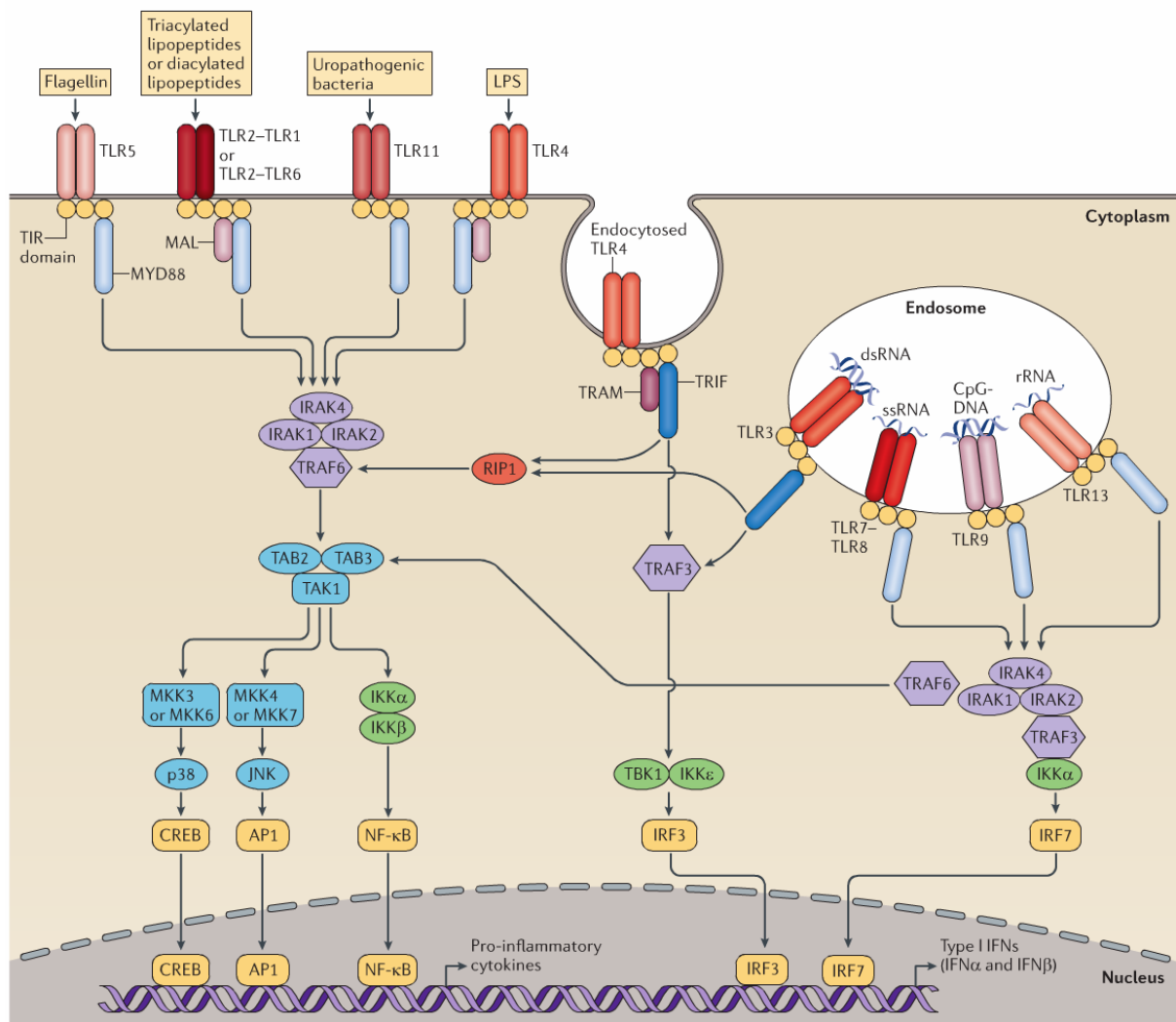


Figure 8 : Voies de signalisation des TLR

Les TLR sont des récepteurs impliqués dans la reconnaissance spécifique de motifs microbiens, les PAMP. Situés au niveau de la membrane plasmique, les TLR1, 2, 4, 5 et 6 reconnaissent des composants protéiques et lipidiques des microbes, principalement des bactéries. Les TLR intracellulaires sont insérés dans la membrane des vésicules endosomales et sont impliqués dans la détection d'acides nucléiques, principalement d'origine virale. Deux voies de signalisation distinctes sont activées par les TLR : la voie dépendante de la protéine adaptatrice MyD88, menant à la synthèse de cytokines pro-inflammatoires grâce aux facteurs de transcription NF-κB, CREB et AP1, et la voie dépendante de TRIF conduisant à la synthèse d'IFN de type I suite à l'activation des facteurs de transcription IRF3 et IRF7. Les TLR11 et 13 apparaissant sur cette figure sont des TLR murins qui n'ont pas été abordés ici.

Tiré de : O'Neill et al. The history of Toll-like receptors - redefining innate immunity. Nat Rev Immunol, 2013.[436]

3. Les populations de DC humaines

Les DC ont la capacité d'orchestrer la réponse immunitaire effectrice suite à la reconnaissance des pathogènes ou autres signaux de danger. Il est établi qu'il existe différentes populations de DC se distinguant par leur phénotype, leur localisation et leur fonction [441]. Les DC murines ont été largement étudiées mais les travaux menés sur les populations de DC humaines, notamment de récentes études génomiques et fonctionnelles, ont permis de révéler des équivalences entre les DC murines et humaines [442, 443].

a) Présentation des populations

Les populations de DC humaines peuvent se différencier selon l'expression de marqueurs phénotypiques particuliers [444]. Ainsi, on distingue les DC du sang parmi la population des cellules exprimant le CMH II et n'exprimant pas les différents marqueurs d'autres lignages tels que le CD3 (lymphocytes T), CD19/20 (lymphocytes B), CD14 (monocytes), CD56 (cellules NK) et glycophorine-A (globules rouges). Elles peuvent être divisées en 2 groupes : les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) $CD11c^-/CD123^{high}$, exprimant les marqueurs BDCA-2 (Blood Dendritic Cell Antigen-2) et BDCA-4, et les cellules dendritiques myéloïdes (mDC) $CD11c^+/CD123^{neg}$ [445]. La population des mDC peut être subdivisée en 2 sous-populations : les DC $CD1c^+$ (BDCA-1⁺) et les DC $CD141^+$ (BDCA-3⁺) [446]. La fréquence de ces DC dans le sang est faible, les pDC et les DC $CD1c^+$ représentant 0,3% des PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cells) et les DC $CD141^+$ seulement 0,04% [447]. Ces DC du sang sont également retrouvées dans les organes lymphoïdes et constituent les DC résidentes [448, 449]. Différentes populations de DC ont d'autre part été décrites dans la peau : les cellules de Langerhans dans l'épiderme, ainsi que les DC $CD1a^+$ et les DC $CD14^+$ dans le derme [450, 451]. Les DC retrouvées dans les tissus ont la capacité de migrer jusqu'aux ganglions lymphatiques drainants afin d'assurer leurs fonctions et sont appelées DC migratoires [449]. Enfin, l'équivalent murin des DC inflammatoires vient d'être caractérisé chez l'homme, dérivant de monocytes sur le site inflammatoire [452]. Des études transcriptomiques ont pu en effet déterminer que ces cellules présentent une signature génique plus proche des monocytes que des DC. Cependant, il reste à déterminer si ces cellules dérivent de monocytes $CD14^+$ ou $CD16^+$ [453]. La caractérisation des DC par l'analyse phénotypique peut cependant s'avérer insuffisante, certains marqueurs pouvant évoluer pendant la maturation par exemple, menant à de mauvaises interprétations [444]. Il a récemment été proposé que la combinaison du phénotypage avec l'analyse de

l'expression de gènes caractéristiques et certains tests fonctionnels permettrait de confirmer de manière plus robuste l'identité des DC [454].

b) Origine des DC du sang

Alors que l'ontogenèse des DC a été décrite chez la souris, la compréhension de l'origine de ces cellules chez l'homme a été un challenge [455]. Récemment, le processus d'hématopoïèse des DC du sang a été clarifié et différents progéniteurs et précurseurs ont été identifiés [456-458] (Figure 9). A partir des cellules souches hématopoïétiques dans la moelle osseuse, des progéniteurs communs GMDP (Granulocyte Monocyte DC Progenitor) sont à l'origine des granulocytes et des progéniteurs MDP (Monocyte DC Progenitor). Les MDP entraînent la formation de monocytes et des progéniteurs communs de DC CDP (Common DC Progenitor). Ces progéniteurs résident dans la moelle osseuse et le cordon ombilical et donnent naissance aux pDC et à des précurseurs de DC conventionnelles (myéloïdes) pré-cDC circulants. Ces précurseurs, présents dans la moelle osseuse, le sang et les amygdales, sont à l'origine des deux populations distinctes de DC myéloïdes BDCA-1⁺ (CD1c⁺) et BDCA-3⁺ (CD141⁺).

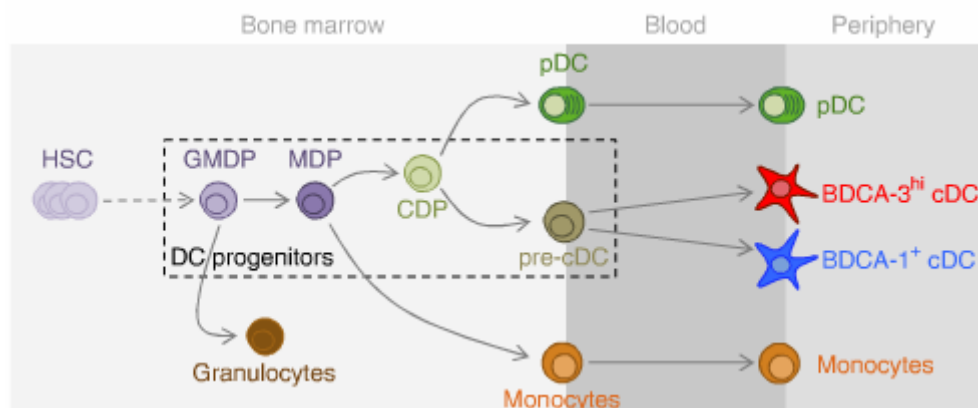


Figure 9 : Origine des DC du sang chez l'homme

L'hématopoïèse des DC chez l'homme s'initie dans la moelle osseuse à partir des cellules souches hématopoïétiques générant des GMDP (Granulocyte Monocyte DC Progenitor), se développant en granulocytes ou MDP (Monocytes DC Progenitor). Les MDP donnent naissance aux monocytes et aux CDP (Common DC Progenitor), initiant la formation des pDC et des précurseurs des DC conventionnelles (myéloïdes) pré-cDC. Ces précurseurs circulants sont à l'origine de la différenciation en DC BDCA-3⁺ (CD141⁺) et en DC BDCA-1⁺ (CD1c⁺).

Tiré de : Breton et al. Defining human dendritic cell progenitors by multiparametric flow cytometry. Nat Protoc, 2015. [458]

c) Spécialisation fonctionnelle des DC du sang

i. Profil d'expression des TLR

Les DC du sang sont caractérisées par leur profil d'expression des récepteurs TLR, contribuant à leur spécialisation fonctionnelle. Le répertoire TLR des différentes populations a été caractérisé principalement grâce à des analyses par PCR quantitative et des tests de réactivité à différents agonistes [459, 460]. Ainsi, les DC CD1c⁺ expriment les TLR1, 2, 4, 5, 6, 8 et plus faiblement les TLR3 et 10 [444, 459]. Les DC CD141⁺ sont caractérisées par leur forte expression du TLR3, et expriment les TLR1, 2, 6, 8 et 10 [459, 461]. Contrairement aux DC myéloïdes, les pDC possèdent un répertoire de TLR plus restreint, étant les seules DC à exprimer fortement les TLR7 et 9 [448, 460]. Une expression des TLR1, 6, 8 et 10 a également été rapportée [459]. L'expression restreinte du TLR7 par les pDC est cependant controversée, différentes études montrant qu'il est faiblement exprimé par les DC myéloïdes et plus particulièrement par les DC CD1c⁺ [459, 462, 463]. Cette expression différentielle des TLR permet aux DC d'être complémentaires pour les réponses aux différents pathogènes, les pDC étant par exemple spécialisées dans la réponse anti-virale [464].

ii. Sécrétion de cytokines

L'engagement des TLR entraîne la sécrétion de cytokines spécifiques par les différentes populations de DC. Cependant, le profil cytokinique dépend du stimulus utilisé pour un type de DC donné [459]. Les DC CD1c⁺ sécrètent de l'IL-1 α/β , de l'IL-6, de l'IL-8 et du TNF- α suite à la stimulation de leurs différents TLR [459]. Ces DC sont également caractérisées par leur importante sécrétion d'IL-12p70 en réponse à une stimulation des TLR3, 4 et 8 [459, 465]. Il a été rapporté que les DC CD141⁺ sécrètent d'importantes quantités d'IFN de type I et de chimiokine CXCL10 (C-X-C motif Chemokine Ligand 10) suite à l'activation du TLR3, ainsi que de l'IL-6, de l'IL-8 et du TNF- α [461, 466]. De plus, les DC CD141⁺ se caractérisent par leur capacité de sécrétion d'IFN de type III en réponse à l'engagement du TLR3 par un ligand synthétique ou par le virus de l'hépatite C [467, 468]. Les pDC sont quant à elles reconnues comme étant spécialisées dans la production d'importantes quantités d'IFN de type I en réponse aux virus, suite à l'activation des TLR7 et 9 [469]. Une dichotomie fonctionnelle a été mise en évidence pour les pDC selon les ligands utilisés. Il a ainsi été démontré que lorsque les ligands des TLR7 et 9 (virus HIV et CpG-A respectivement) sont retenus de façon stable dans les endosomes précoces, cela permet une synthèse de grandes quantités d'IFN- α grâce au facteur de transcription IRF7. En revanche,

les ligands R848 (pour le TLR7) et CpG-B (pour le TLR9) transitent rapidement vers les endosomes tardifs et favorisent l'activation de la voie NF- κ B, menant à la synthèse de cytokines pro-inflammatoires, telles que l'IL-6, l'IL-8 et le TNF- α , et à une maturation complète des pDC impliquée dans l'activation des lymphocytes T spécifiques [470-472].

iii. Capacité de présentation des antigènes

Les différentes populations de DC du sang occupent une place importante dans l'établissement des réponses immunitaires. Ainsi, grâce à leurs profils d'expression des TLR et de cytokines distincts, les DC interviennent de façon spécifique dans la réponse immunitaire. De nombreuses études réalisées ces dernières années ont notamment évalué la capacité des différentes populations de DC à activer les lymphocytes T CD8⁺ grâce à la présentation croisée des antigènes internalisés sur le CMH I [473]. Un intérêt particulier a été porté sur les DC CD141⁺ qui expriment le récepteur membranaire de type lectin-C Clec9A ainsi que le récepteur à chimiokine XCR1, et qui correspondent aux homologues des cellules CD8 α ⁺ murines spécialisées dans la présentation croisée d'antigènes [474, 475]. Les DC CD141⁺ ont été considérées comme étant les plus efficaces pour réaliser la présentation croisée et activer les lymphocytes T CD8⁺ [447, 461, 474, 475]. Cependant, des résultats contradictoires ont ensuite été rapportés, montrant une efficacité similaire entre les différentes populations de DC [476-478]. Il apparaît que l'efficacité de présentation croisée des DC dépend notamment de la forme d'antigène délivrée, ceux provenant de cellules nécrotiques étant présentés préférentiellement par les DC CD141⁺ grâce à l'expression du récepteur Clec9A [461]. Les pDC effectuent également la présentation croisée de différentes formes d'antigènes [444]. La capacité d'activation des lymphocytes T CD4⁺ et la polarisation de la réponse ont également été évaluées dans différentes études [444, 459, 461]. Il est important de noter que contrairement aux DC résidentes des organes lymphoïdes, les DC du sang nécessitent une stimulation appropriée par des ligands de TLR afin de devenir pleinement fonctionnelles *in vitro* [449].

De nombreux progrès ont été réalisés concernant l'identification des différentes populations de DC chez l'homme et des mécanismes impliqués dans leur activation, menant à la tolérance envers des antigènes du soi ou à une réponse immunitaire spécifique contre des antigènes provenant de pathogènes ou de cellules tumorales. Il a été mis en évidence que les DC sont activées lorsqu'elles perçoivent des signaux de danger. Cette particularité est

exploitée dans certaines stratégies thérapeutiques anti-tumorales telles que la virothérapie anti-tumorale.

B. La mort cellulaire immunogène

1. La théorie du danger

Jusqu'aux années 1990, il était considéré que l'activation d'une réponse immunitaire résultait de la discrimination entre le "soi" et le "non-soi", la présence de PAMP reconnus par les récepteurs spécifiques exprimés par les DC étant nécessaire. Cependant, il est apparu que cette théorie ne permettait pas d'expliquer certaines situations, telles qu'une tolérance envers des bactéries de notre flore commensale ou encore une activation contre des antigènes du "soi" dans le cadre de maladies auto-immunes. En 1994, Polly Matzinger remet en cause le modèle immunologique du "soi" vs "non-soi" et propose la théorie du danger, selon laquelle la réponse immunitaire est modulée par les signaux de danger intégrés par les DC [479, 480]. Alors que l'apoptose, mort cellulaire programmée de nos cellules impliquée dans l'homéostasie, est un événement non immunogène, elle peut le devenir suite à un stress ou à un dommage causé par un pathogène. Dans ces conditions, la libération de signaux de danger associés aux dommages cellulaires, nommés DAMP (Damage-Associated Molecular Pattern), induit le recrutement et l'activation des DC déclenchant une réponse immunitaire. Cette théorie a conduit à la caractérisation de différents types de morts cellulaires immunogènes (ICD, Immunogenic Cell Death) et a permis l'émergence de traitements thérapeutiques anti-tumoraux reposant sur ce concept qui pourraient apporter une meilleure réponse clinique.

2. Caractéristiques de l'ICD

a) Différents types d'ICD

Différents types d'ICD ont été caractérisés, induits notamment par des pathogènes. C'est le cas de la pyroptose, déclenchée par l'activation de l'inflammasome et la libération d'IL-1 β , et de la nécroptose induite par le TNF- α , menant à l'activation des protéines RIPK1 et RIPK3 (Receptor-Interacting Protein Kinase 1 and 3) ainsi qu'à la libération d'HMGB1 et d'ADN génomique [481, 482]. La nécrose est une ICD provoquée par un traumatisme physique ou un dommage induit par un agent chimique ou des pathogènes. Au cours de ce processus, la perte de l'intégrité membranaire provoque la libération de différents DAMP tels que la protéine non-histone associée à la chromatine HMGB1 ou les protéines HSP (Heat Shock Protein), protéines chaperonnes facilitant la présentation d'antigène en se liant aux

peptides antigéniques [483]. Certaines protéines peuvent être exprimées à la surface des cellules mourantes, telles que les protéines HSP ou la F-actine, fournissant ainsi un signal de phagocytose (signal "eat-me") aux DC [484, 485]. Sous certaines conditions, l'apoptose peut également posséder un caractère immunogène, notamment suite à une infection virale ou à certains traitements anti-tumoraux [486, 487].

b) L'ICD et la réponse immunitaire anti-tumorale

De nombreux agents anti-tumoraux, notamment des chimiothérapies, ont été évalués pour leur capacité à induire une ICD. Afin de déterminer expérimentalement si les traitements provoquent une ICD, deux conditions doivent être satisfaites [486]. Si les cellules tumorales succombent à une ICD *in vitro*, leur injection sans adjuvant chez une souris doit déclencher une réponse immunitaire anti-tumorale, protégeant la souris de l'établissement d'une tumeur après une injection subséquente du même type de cellules tumorales vivantes. De plus, si une ICD apparaît *in vivo* suite au traitement de la tumeur, cela doit mener au recrutement de cellules immunitaires effectrices sur le site tumoral, participant à une réduction de la croissance ou de la masse tumorale. C'est ainsi que de nombreux agents thérapeutiques ont été répertoriés comme étant des inducteurs d'ICD, tels que les chimiothérapies anthracyclines (doxorubicine, mitoxantrone), l'oxaliplatine ou encore les rayonnements ionisants [486, 488].

Des analyses biochimiques ont permis de révéler les caractéristiques de l'ICD, permettant d'expliquer comment le système immunitaire distingue une ICD d'une mort non immunogène (Figure 10). Ainsi, il a été décrit que l'apoptose immunogène se caractérise par différents changements de la surface cellulaire ainsi que par la libération de molécules solubles, événements apparaissant de manière séquentielle dans le temps. En réponse à différents inducteurs d'ICD, le stress du réticulum endoplasmique (RE) entraîne une relocalisation de la calréticuline (CRT), normalement située dans la lumière du RE, au niveau de la membrane plasmique [489]. Cette ecto-CRT apparaît lors d'une phase précoce de l'apoptose, avant l'exposition des phosphatidylsérines à la surface cellulaire [490]. Elle constitue un signal de phagocytose pour les DC, exprimant son récepteur CD91 [491]. Un second événement intervenant dans l'immunogénicité de la mort est l'autophagie, permettant la libération d'ATP dans le microenvironnement tumoral [492]. L'ATP extracellulaire attire les macrophages et les DC en ciblant ses récepteurs purinergiques P2Y2 et P2X7 à leur surface [493, 494]. La fixation de l'ATP sur le récepteur P2X7 entraîne l'activation de l'inflammasome NLRP3 qui conduit à la sécrétion d'IL-1 β et d'IL-18 grâce à la caspase 1

activée, permettant l'induction de lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques anti-tumoraux et le recrutement de lymphocytes T $\gamma\delta$, sécrétant respectivement de l'IFN- γ et de l'IL-17 [495, 496]. Enfin, lors de la phase plus tardive de l'apoptose, la protéine HMGB1 est libérée dans le milieu extracellulaire et intervient dans la perception d'ICD par les cellules immunitaires [497]. En effet, HMGB1 se lie au récepteur TLR4 sur les DC, entraînant l'augmentation de l'expression de la pro-IL-1 β (forme immature de l'IL-1 β qui sera clivée par l'inflammasome) et optimisant la présentation croisée des antigènes capturés en empêchant leur dégradation lysosomale [498].

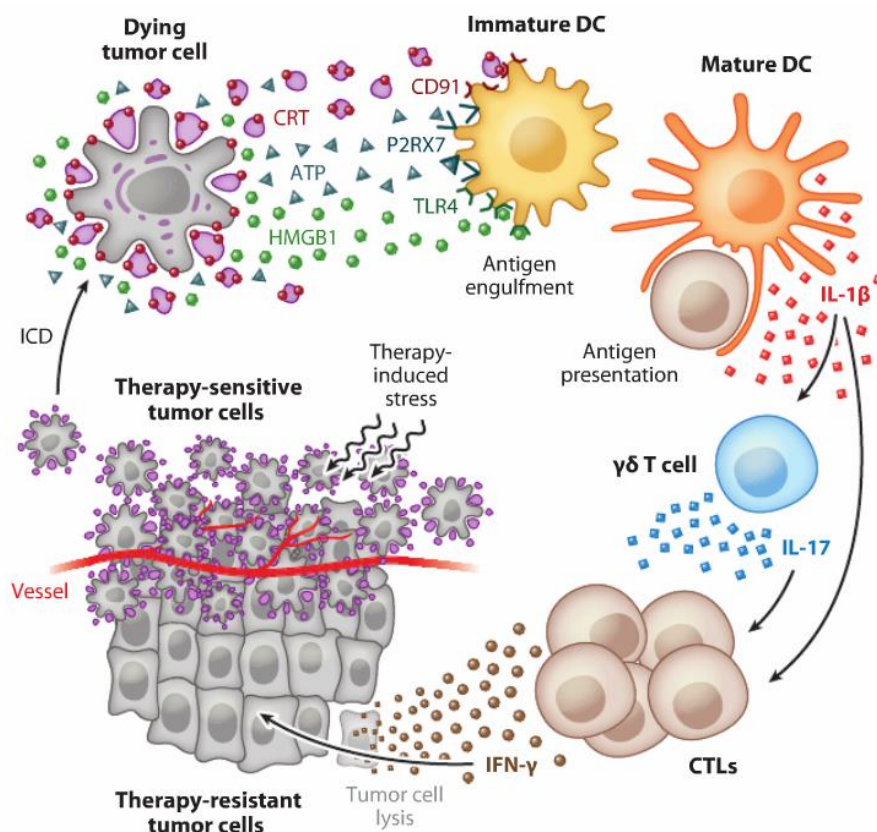


Figure 10 : Propriétés de l'ICD

Certains traitements, tels que certaines chimiothérapies, induisent une IDC caractérisée par l'exposition de la calréticuline (CRT) à la surface des cellules ainsi que par la sécrétion d'ATP et d'HMGB1. Ces molécules agissent sur les cellules dendritiques (DC) en se fixant sur leurs récepteurs spécifiques et favorisent l'acquisition d'antigènes par les DC, leur maturation, la présentation efficace des antigènes aux lymphocytes T CD8⁺ spécifiques et la production de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 β . Les cellules immunitaires recrutées sur le site tumoral, telles que les lymphocytes T $\gamma\delta$ et les lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques (CTL) peuvent ainsi participer à l'élimination de la tumeur.

ATP : adenosine triphosphate ; CRT : calreticulin ; CTL : cytotoxic CD8⁺ T lymphocyte ; DC : dendritic cell ; HMGB1 : high-mobility group box 1 ; IFN : interferon ; IL : interleukin ; TLR : Toll-like receptor.

Tiré de : Kroemer et al. Immunogenic cell death in cancer therapy. Annu Rev Immunol, 2013. [486]

L'émission de ces différents DAMP au cours de l'ICD est importante pour l'établissement d'une réponse immunitaire anti-tumorale efficace, permettant d'éliminer les cellules tumorales résistantes au traitement. Chez l'homme, des polymorphismes des gènes codant pour le récepteur P2X7 ou pour le TLR4, entraînant une diminution de leur fonction, sont associés à un mauvais pronostic chez les patientes souffrant de cancer du sein traitées par les anthracyclines [495, 499]. Ceci met en évidence l'importance de l'ICD dans le succès thérapeutique de certains agents anti-tumoraux et les nouvelles thérapies anti-tumorales sont désormais souvent sélectionnées selon ce critère [500].

3. Induction d'une ICD par le MV

Des études ont montré que les cellules tumorales infectées par le MV expriment des DAMP [501] (Annexe n°3). Anne Gauvrit a mis en évidence en 2008 dans notre laboratoire que l'infection des cellules de MPM par le MV induit l'ICD, caractérisée par la libération d'HSP (HSP70 et gp96) et menant à la sécrétion par les Mo-DC (Monocyte-derived DC) de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6, l'IL-1 β , l'IFN- α , l'IL-12 et le TNF- α [169]. En revanche, les cellules irradiées aux UV-B (UltraViolet-B), induisant une mort non immunogène, n'expriment pas de DAMP et ne stimulent pas les DC. En 2011, Donnelly et ses collègues ont confirmé la capacité du MV à induire une ICD en étudiant les facteurs immunogènes libérés par des cellules de mélanome infectées. Ainsi, ils ont identifié différents DAMP, tels que HMGB1 et différentes cytokines pro-inflammatoires telles que des IFN de type I, l'IFN de type III (IL-28), l'IL-6, l'IL-8 et RANTES (Regulated on Activation, Normal T Cell Expressed and Secreted) [208].

C. Activation des lymphocytes T CD8⁺

1. Les DC activent une réponse immunitaire effectrice

Les DC présentes dans le sang et les tissus périphériques sont dans un état immature et exercent leur rôle de cellules sentinelles, intégrant en permanence les différents signaux de l'environnement grâce à l'expression de récepteurs spécifiques. Ainsi, en présence d'une situation anormale, les DC perçoivent le danger grâce à la reconnaissance des DAMP et/ou des PAMP et migrent rapidement sur les lieux de l'inflammation grâce à la présence de chimiokines et cytokines les attirant. Les DC immatures internalisent alors des antigènes selon différents mécanismes et migrent vers les ganglions lymphatiques drainants en suivant le gradient de chimiokines CCL19/CCL21, grâce à l'expression du récepteur CCR7 (Chemokine

C-C motif Receptor 7) [502]. La maturation des DC se caractérise par différentes modifications, telles que la diminution de leur capacité de capture des antigènes, l'expression à leur surface du complexe CMH II de présentation des antigènes et des molécules de co-stimulation, ainsi que la sécrétion de cytokines [502]. Ces caractéristiques vont participer à l'activation des lymphocytes T naïfs. Au sein des organes lymphoïdes secondaires, les DC vont pouvoir présenter les antigènes aux lymphocytes T naïfs, grâce à la présentation de peptides sur les molécules CMH I et CMH II. Alors que le CMH I est présent sur toutes les cellules nucléées de l'organisme, les molécules CMH II sont exprimées uniquement par les cellules présentatrices d'antigènes professionnelles. Les peptides présentés sur le CMH II résultent de la dégradation, dans les compartiments endolysosomiaux, d'antigènes internalisés provenant de bactéries, de cellules infectées ou encore de cellules tumorales, et permettent l'activation spécifique des lymphocytes T CD4⁺. Les peptides présentés sur les molécules CMH I sont issus de protéines endogènes dégradées dans le cytoplasme par le protéasome et sont présentés aux lymphocytes T CD8⁺ [502, 503]. Toutefois, il est reconnu que les DC peuvent réaliser la présentation croisée d'antigènes, correspondant à la présentation de peptides exogènes sur les molécules CMH I aux lymphocytes T CD8⁺ [504]. Deux voies de présentation croisée ont été identifiées : la voie cytoplasmique reflétant le passage des protéines internalisées des vésicules de phagocytose vers le cytosol ; la voie endocytaire dans laquelle les peptides sont chargés sur les molécules CMH I directement dans les phagosomes, grâce à une capacité de dégradation protéolytique diminuée dans les DC [505-507].

L'activation des lymphocytes T naïfs requiert l'établissement d'une synapse immunologique entre les DC et les lymphocytes T, stabilisée grâce à des molécules d'adhésion [508]. Au sein de cette synapse, les TCR s'accumulent et interagissent avec les complexes CMH/peptide, interaction renforcée par la liaison avec les co-récepteurs CD4 et CD8, fournissant le premier signal d'activation transduit par CD3. Le second signal est délivré par l'interaction des molécules de co-stimulation CD80 et CD86, dont l'expression est augmentée lors de la maturation des DC, avec leur récepteur CD28 exprimé par les lymphocytes T naïfs. De nombreuses autres protéines interviennent dans la synapse immunologique, ayant une fonction stimulatrice ou inhibitrice dans l'activation des lymphocytes T. Enfin, le troisième signal consiste en la sécrétion de cytokines par les DC, dont la nature est déterminante pour la polarisation de la réponse immunitaire induite [509]. En effet, en fonction des signaux qui les ont activées, les DC vont influencer le devenir des lymphocytes T CD4⁺, se différenciant en différents types de cellules effectrices auxiliaires, le type Th1 étant nécessaire à l'établissement de réponses effectrices cytotoxiques, grâce

notamment à l'engagement de la molécule CD40 de la DC [509-511]. L'activité cytotoxique exercée par les lymphocytes T CD8⁺ dépend de la reconnaissance, sur les cellules cibles, du complexe CMH I/peptide. Différents mécanismes peuvent intervenir pour induire l'apoptose des cellules cibles, tels que le système perforine/granzyme B, la liaison de la protéine FasL (Fas Ligand) ou du TNF- α sécrété sur leurs récepteurs respectifs présents sur les cellules cibles [512].

Dans le cadre de l'immunothérapie anti-tumorale, la présentation croisée présente un intérêt particulier car elle permet l'activation de cellules effectrices cytotoxiques, spécifiques d'antigènes tumoraux acquis par les DC à partir de cellules tumorales, qui pourront intervenir dans l'éradication de la tumeur.

2. Induction de lymphocytes T CD8⁺ anti-tumoraux par le MV

Comme mentionné précédemment, de nombreux virus oncolytiques induisent une réponse immunitaire importante pour leur efficacité thérapeutique. Concernant le MV, certaines preuves cliniques ont été rapportées. Dans un essai clinique de phase I, le traitement de patients souffrant de lymphome T cutané par le MV a permis des régressions de tumeurs non injectées, suggérant l'activation d'une réponse immunitaire anti-tumorale [173]. Il a récemment été mis en évidence que des lymphocytes T spécifiques d'antigènes de tumeur sont présents dans le sang de patientes souffrant de cancer de l'ovaire et ayant été traitées par le MV-NIS lors d'un essai clinique de phase I [243].

Des études *in vitro* ont mis en évidence l'ICD induite par le MV, activant les DC responsables de l'établissement d'une réponse lymphocytaire T CD8⁺ spécifique d'antigènes tumoraux. Ainsi, dans l'étude d'Anne Gauvrit réalisée au sein de notre équipe, la co-culture des Mo-DC immatures avec les cellules tumorales infectées par le MV induit l'internalisation de fragments de cellules tumorales infectées et la maturation des Mo-DC exprimant les marqueurs membranaires CD80, CD86, CD40 et CD83 et sécrétant des cytokines pro-inflammatoires [169]. Ces Mo-DC sont capables d'effectuer la présentation croisée de peptides dérivés de l'antigène de tumeur mésothéline et ainsi d'activer des lymphocytes T CD8⁺ naïfs spécifiques de cet antigène. Bien que les cellules tumorales irradiées aux UV-B soient internalisées par les Mo-DC immatures, l'absence de caractère immunogène de la mort ne permet pas leur maturation, rendant impossible l'activation d'une réponse immunitaire anti-tumorale spécifique.

Après avoir confirmé que les cellules de mélanome expriment des signaux de danger et des cytokines pro-inflammatoires suite à l'infection par le MV, Donnelly et ses collègues ont démontré l'activation des Mo-DC par ces cellules infectées, exprimant les marqueurs de co-stimulation CD80 et CD86. La capacité de ces Mo-DC à stimuler une réponse immunitaire adaptative fonctionnelle a ensuite été évaluée *in vitro*, après une co-culture avec des PBMC autologues. L'établissement d'une réponse lymphocytaire T CD8⁺ a pu être mis en évidence chez 9 donneurs sur les 12 testés. Les lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques expriment le marqueur de dégranulation CD107 suite à la reconnaissance de la lignée de mélanome ayant activée les Mo-DC, produisent de l'IFN- γ et exercent une lyse fonctionnelle spécifique envers cette lignée [208].

Les pDC représentent une population de DC spécialisées dans les réponses anti-virales et sont capables d'effectuer la présentation croisée d'antigènes. Les travaux de Jean-Baptiste Guillaume dans notre laboratoire ont rapporté que les pDC du sang exposées à des cellules tumorales infectées par le MV sont capables de produire d'importantes quantités d'IFN- α , suite à la reconnaissance de l'ARN simple brin du MV par le TLR7 dans l'endosome [171]. Cette étude a permis de démontrer que les pDC, comme les Mo-DC, internalisent efficacement les cellules tumorales infectées par le MV, mûrent (expression de CD83, CD86 et CD40) et réalisent la présentation croisée d'un antigène de tumeur NY-ESO-1 (New-York Esophageal Squamous cell carcinoma protein 1) à un clone de lymphocytes T CD8⁺ spécifiques de l'antigène présenté sur le CMH I. En revanche, les pDC exposées aux cellules tumorales irradiées aux UV-B gardent un phénotype immature et ne présentent pas l'antigène.

Ces études montrent que l'infection de cellules tumorales par le MV induit une ICD capable d'activer *in vitro* les fonctions de présentation croisée des Mo-DC et des pDC du sang, assurant l'activation de lymphocytes T CD8⁺ spécifiques d'antigènes tumoraux pouvant ainsi exercer leur activité cytotoxique envers les cellules tumorales.

D. Fonctions des IFN de type I dans l'immunité anti-tumorale

Initialement mis en évidence pour leurs fonctions anti-virales, les IFN de type I ont également démontré leur potentiel anti-tumoral en agissant directement sur les cellules tumorales, induisant l'arrêt du cycle cellulaire, la différenciation, l'apoptose et en favorisant l'arrêt de l'angiogenèse. Il est devenu désormais évident que les IFN de type I jouent un rôle crucial dans la réponse immunitaire anti-tumorale, étant les médiateurs entre l'immunité innée

et adaptative [513] (Figure 11). Une des caractéristiques principales correspond à leur capacité à augmenter les propriétés cytotoxiques des NK, notamment en favorisant leur expansion et leur survie grâce à l'induction d'IL-15 [514-516]. L'activité anti-tumorale des NK est contrôlée par les IFN de type I qui peuvent être sécrétés par les pDC activées sur le site tumoral [517, 518]. Les IFN de type I agissent également sur les lymphocytes T. En effet, ils induisent une signalisation favorisant leur survie *in vitro* lorsqu'ils sont activés, ainsi que l'expansion clonale et la différenciation en effecteurs des lymphocytes T CD8⁺ [519, 520]. De même *in vivo*, l'expansion clonale des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ spécifiques et la formation d'effecteurs mémoires sont optimisées par les IFN de type I lors d'une infection virale [521, 522]. Enfin, l'IFN- α agit sur les lymphocytes T CD8⁺ naïfs et améliore leur activation [523]. D'autre part, il est décrit que les IFN de type I peuvent stimuler la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β et IL-18) par les macrophages et inactiver les fonctions suppressives des lymphocytes T régulateurs (T reg) [372]. Il a également été observé que les IFN de type I induisent la maturation des DC, caractérisée par l'expression des marqueurs CD80, CD86, CD83, CD40 et des CMH I et II [513]. De plus, ils régulent les réponses immunitaires en favorisant la présentation croisée des antigènes aux lymphocytes T CD8⁺ [524-526].

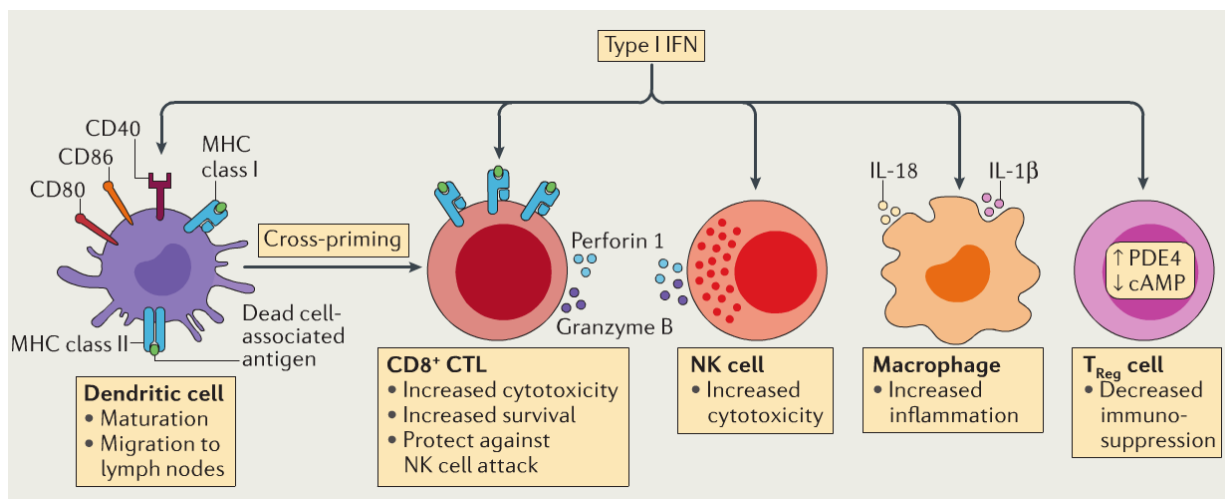


Figure 11 : Effet des IFN de type I sur les cellules immunitaires

Les IFN de type I agissent sur de nombreux acteurs du système immunitaire tels que les cellules dendritiques (DC), les lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques (CTL), les cellules NK, les macrophages et les lymphocytes T régulateurs (T reg). Ils ont le pouvoir de favoriser les propriétés immunostimulatrices de ces cellules et de diminuer l'immunosuppression induite par les T reg. Ainsi, ils optimisent notamment la présentation croisée des antigènes par les DC aux lymphocytes T CD8⁺, augmentent les propriétés cytotoxiques des effecteurs CTL et des NK et favorisent la production de cytokines pro-inflammatoires.

Tiré de : Zitvogel et al. Type I interferons in anticancer immunity. Nat Rev Immunol, 2015. [372]

Des réponses lymphocytaires T anti-tumorales spontanées ont été identifiées chez des patients atteints de cancer et des études ont été menées afin de caractériser les mécanismes impliqués dans ces réponses [527, 528]. Des analyses génomiques de métastases humaines ont révélé une corrélation entre la présence de lymphocytes T CD8⁺ et l'expression de nombreux gènes régulés par les IFN de type I, orientant ainsi les expériences vers la recherche d'un lien entre la signalisation IFN de type I et l'activation spontanée de lymphocytes T CD8⁺ contre des antigènes de tumeur [529, 530]. Grâce à des travaux menés chez la souris, Gajewski et ses collaborateurs ont mis en évidence que la production d'IFN- β par les DC CD11c⁺, dans les ganglions drainant la tumeur, induit l'accumulation des DC CD8 α ⁺ dans la tumeur et potentialise leur capacité de présentation croisée d'antigènes de tumeur aux lymphocytes T CD8⁺ [529]. Lorsque la signalisation IFN de type I est abolie ou que les DC CD8 α ⁺ sont absentes, le développement des réponses lymphocytaires T CD8⁺ anti-tumorales spontanées est compromis. Tandis que le mécanisme par lequel les IFN de type I induisent l'accumulation intra-tumorale des DC CD8 α ⁺ reste à élucider, de récents travaux ont identifié ce qui déclenche la production d'IFN de type I [531]. Contrairement aux DAMP précédemment décrits, induits par différents traitements anti-tumoraux, les réponses immunitaires spontanées observées doivent être initiées par d'autres facteurs. Il a été démontré que l'ADN des cellules tumorales mourant par nécrose est détecté par STING dans les DC, suite à la formation de dinucléotides cycliques par l'enzyme cGAS, menant à l'activation du facteur de transcription IRF3 et à la production d'IFN- β . De plus, les DC activées par l'ADN provenant de cellules tumorales acquièrent un phénotype mature et produisent les cytokines nécessaires à une activation optimale des lymphocytes T CD8⁺. L'implication de STING dans l'établissement de réponses immunitaires spontanées permet d'envisager de nouvelles stratégies thérapeutiques anti-tumorales [532].

L'ensemble de ces travaux a permis de révéler l'importance des IFN de type I, et notamment de leurs effets sur les DC, dans la mise en place d'une réponse immunitaire anti-tumorale. La volonté d'activer de manière appropriée la signalisation IFN de type I au sein de la tumeur, corrélant avec un meilleur pronostic, va ainsi mener au développement de stratégies thérapeutiques anti-tumorales plus efficaces [372].

E. Activité cytotoxique des cellules dendritiques

1. Découverte des DC cytotoxiques

Comme discuté précédemment, les DC sont essentielles à l'établissement d'une réponse immunitaire innée et adaptative envers les pathogènes et les cellules tumorales, notamment grâce à leur pouvoir d'activation des lymphocytes T naïfs. Au regard de plusieurs études menées chez la souris et chez l'homme, une activité cytotoxique directement exercée par les DC a été mise en évidence.

Une controverse est tout d'abord apparue dans la littérature concernant la découverte par trois groupes indépendants d'une nouvelle population de DC cytotoxiques parmi les DC chez la souris, possédant les caractéristiques phénotypiques, moléculaires et fonctionnelles des DC et des cellules NK, se retrouvant sous le nom de NKDC (Natural Killer Dendritic Cell) ou IKDC (Interferon-Producing Killer Dendritic Cell) [533-535]. Cependant, il est apparu que cette terminologie était inappropriée, ces cellules représentant une population de NK dans un état de différenciation ou d'activation particulier plutôt qu'une nouvelle population de DC [443, 536-538]. Ceci a généré une confusion et un scepticisme concernant la découverte des propriétés cytotoxiques des populations de DC.

De récentes études ont mis en évidence, chez la souris et chez l'homme, des DC ayant acquis un pouvoir cytotoxique tout en préservant les caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles des DC, et n'exprimant pas de marqueurs classiques des cellules NK. Chez l'homme, il a ainsi été démontré que les Mo-DC peuvent devenir des effecteurs cytotoxiques, notamment dans un contexte infectieux, puis les études se sont ensuite tournées vers les DC circulantes du sang, les mDC et les pDC, représentant un modèle plus physiologique. Une excellente revue rapporte de façon détaillée l'ensemble des travaux obtenus avec ces différents types de DC humaines [539].

2. La protéine TRAIL

Dans de nombreux travaux réalisés, la cytotoxicité des DC passe par l'expression de la molécule TRAIL à leur surface [539]. Cette protéine transmembranaire de la famille TNF forme un homotrimère pour être biologiquement active. TRAIL possède différents récepteurs à la surface des cellules cibles : deux récepteurs de mort TRAIL-R1 (DR4, Death Receptor 4) et TRAIL-R2 (DR5), et deux récepteurs leurres TRAIL-R3 (DcR1, Decoy Receptor 1) et TRAIL-R4 (DcR2) inhibant la voie de signalisation. La fixation de TRAIL induit

l'oligomérisation du récepteur et l'initiation de l'apoptose, grâce aux domaines intracellulaires FADD (Fas-Associated protein with Death Domain) recrutant les pro-caspases 8 et 10 pour former un complexe multi-protéique DISC (Death-Inducing Signaling Complex). Une fois activées dans ce complexe, les caspases 8 et 10 provoquent le clivage de la caspase 3, induisant les modifications biochimiques et morphologiques caractéristiques de l'apoptose [540]. En plus d'induire une mort dépendante des caspases, il a été démontré que TRAIL peut entraîner la mort par nécrose [541]. Une fois exprimée à la surface des cellules, TRAIL peut être clivée par des métalloprotéases, générant une forme soluble pouvant exercer une activité cytotoxique [540]. Cependant, les études mettent plutôt en évidence un effet cytotoxique de TRAIL membranaire [539, 542]. Cette protéine est impliquée dans l'apoptose des cellules tumorales et des cellules infectées par un virus [543, 544]. Il est reconnu que le gène codant pour TRAIL est un ISG, et il a été observé que l'expression de TRAIL à la surface des DC est induite par les IFN de type I [332, 545, 546].

3. DC cytotoxiques en réponse à des virus

L'infection par le virus sauvage de la rougeole génère une immunosuppression due à plusieurs événements. Il a été décrit que les DC infectées par le MV peuvent être tuées par les lymphocytes T activés via la voie de signalisation Fas/FasL [547]. Des travaux ont également montré que les Mo-DC infectées exercent une activité cytotoxique envers les lymphocytes T activés, médiée par la molécule TRAIL [548]. L'expression de TRAIL à la surface de l'ensemble des Mo-DC est induite par l'IFN- α produit par celles infectées par le MV [549].

En 2006, Chaperot et ses collaborateurs ont décrit que le virus Influenza inactivé génère des pDC cytotoxiques exprimant TRAIL et lysant des cellules sensibles à TRAIL [550]. Cette étude a également démontré l'implication des IFN de type I dans l'expression de TRAIL par les pDC.

L'équipe de De Vries a publié des travaux mettant en évidence l'induction par le virus vaccinal de l'encéphalite à tiques FSME (Früh Sommer Meningo-Encephalitis) de pDC cytotoxiques exprimant TRAIL, le granzyme B ainsi que le marqueur de cellules NK CD56 [551]. Cependant, l'activité cytotoxique exercée par ces pDC envers différentes cellules cibles ne dépend pas de ces marqueurs et nécessite un contact cellulaire. De plus, ces pDC activées par le FSME acquièrent un phénotype mature, sécrètent des cytokines pro-inflammatoires et ont la capacité de présenter un antigène et de stimuler des lymphocytes T CD8⁺ naïfs

spécifiques, comme cela a été montré par l'expression du marqueur d'activation CD69, la sécrétion d'IFN- γ et l'induction de la prolifération.

Enfin, des travaux menés sur le HIV ont démontré sa capacité à induire des pDC cytotoxiques *in vitro*, et des pDC exprimant TRAIL ont été détectées au cours de la phase virémique chez des patients infectés [552, 553]. Le contact des pDC TRAIL⁺ et des lymphocytes T CD4⁺ infectés par le HIV, exprimant TRAIL-R1, entraîne la lyse de ces derniers. Cette activité cytotoxique est abolie par des anticorps bloquants anti-TRAIL ou anti-IFN- α . D'autre part, il a été démontré que l'activation de lymphocytes T CD4⁺ non infectés par le HIV les rend également susceptibles à une lyse dépendante de TRAIL par les pDC activées. Ainsi, les pDC cytotoxiques des patients atteints du HIV induisent la mort des lymphocytes T CD4⁺ infectés, participant à l'élimination de la maladie, mais également des lymphocytes T CD4⁺ non infectés mais activés par une autre infection par exemple, contribuant à l'amplification de l'état d'immunodéficience des patients et facilitant les infections opportunistes [553].

Les différents virus décrits, capables d'induire des DC cytotoxiques et plus particulièrement des pDC cytotoxiques, sont des virus à ARN simple brin. Il est ainsi probable que ces virus soient reconnus par le TLR7 dans les pDC et induisent l'expression de TRAIL suite à la production d'IFN- α . De nombreuses études ont de ce fait étudié la capacité de différents ligands de TLR à générer des DC cytotoxiques.

4. DC cytotoxiques en réponse à des ligands de TLR

Différentes études ont ainsi démontré que des ligands des TLR7/8 et 9 (R848 et des CpG ODN, respectivement) induisent l'expression de marqueurs de maturation et de TRAIL par les pDC, les dotant d'une fonction cytotoxique envers des cellules cibles, notamment des cellules tumorales [550, 551]. Une étude récente ayant analysé de nombreux agonistes des TLR a montré que les pDC expriment effectivement TRAIL en réponse à l'activation des TLR endosomaux (TLR7 et 9) uniquement, sous la dépendance de la sécrétion d'IFN de type I [542]. Ces pDC cytotoxiques ont la capacité de stimuler la prolifération de lymphocytes T dans un test MLR (Mixed Lymphocyte Reaction) allogénique et provoquent la lyse médiée par TRAIL des cellules Jurkat et de cellules de mélanome exprimant le récepteur TRAIL-R2. Dans cette étude, la molécule pro-apoptotique granzyme B a également été détectée dans les pDC isolées du sang et dans une moindre mesure après leur stimulation par les agonistes des

TLR7/8 et 9, cependant la présence d'autres molécules lytiques, telles que la perforine, la granulysine et le lysozyme, n'a pas été mise en évidence. Ces pDC granzyme B⁺ ne lysent pas les cellules cibles dans cette étude, confirmant le rôle controversé du granzyme B exprimé seul [554]. Certains résultats obtenus ont également attesté que les IFN de type I peuvent sensibiliser les cellules cibles pré-traitées à la lyse médiée par TRAIL et activer directement les propriétés cytotoxiques des pDC sans agonistes des TLR [542, 550].

Cet effet des ligands de TLR sur les DC a révélé des opportunités thérapeutiques pour le traitement des cancers. De plus, il est reconnu que les cellules tumorales sont sensibles à la mort induite par TRAIL tandis que les cellules saines sont épargnées [555]. Des travaux menés chez la souris ont analysé l'effet de l'application locale d'une crème contenant 5% d'imiquimod (Aldara[®]) chez des souris souffrant de mélanome. Ce traitement entraîne des régressions complètes ou partielles des tumeurs, corrélant avec la densité de pDC dans l'infiltrat immunitaire et suggérant ainsi une implication de ces cellules dans l'effet anti-tumoral observé [556]. Une étude plus récente menée par Drobits et ses collaborateurs, chez des souris atteintes de mélanome, a permis de décrire la contribution des pDC à l'élimination des tumeurs et le mécanisme de leur recrutement sur le site tumoral [557]. L'application d'imiquimod mène à la sécrétion de CCL2 par les mastocytes infiltrés dans la tumeur, suite à l'engagement du TLR7 et du récepteur aux IFN de type I. L'inflammation ainsi générée recrute dans la peau les pDC exprimant CCR2, où elles sont à leur tour exposées à l'agoniste du TLR7. L'activation du TLR7 conduit à la production d'IFN de type I par les pDC, agissant de manière autocrine pour induire l'expression de TRAIL et du granzyme B. L'activité cytotoxique des pDC envers les cellules tumorales est principalement médiée par le granzyme B, sans la perforine, et également par TRAIL. Cette étude a démontré *in vivo* que le traitement des mélanomes par l'imiquimod permet le recrutement des pDC et leur transformation sur le site tumoral en effecteurs cytotoxiques capables d'éliminer directement les cellules tumorales [557, 558].

Chez 7 patients atteints de carcinome basocellulaire, le traitement par Aldara[®] a permis la régression complète des lésions tumorales après 6 semaines de traitement [559]. L'émergence d'un infiltrat immunitaire, caractérisé par la présence de DC myéloïdes CD11c⁺ exprimant la perforine et le granzyme B et de pDC exprimant TRAIL, a été observée sur des coupes de tissus. La poursuite des analyses fonctionnelles, menées à partir des DC du sang activées par un ligand de TLR7/8, a révélé que les DC CD11c⁺ exercent une activité cytotoxique efficace dépendante du granzyme B et de la perforine et que la lyse médiée par

les pDC est dépendante de TRAIL. Ainsi, chez l'homme, l'induction de DC cytotoxiques par un ligand de TLR7 favorise la régression tumorale.

Conclusion

Les cellules dendritiques exercent un rôle de sentinelles dans notre organisme et établissent le lien entre l'immunité innée et adaptative. Il est désormais admis que leur rôle dans l'immunité anti-tumorale est crucial. Il est reconnu que les DC sont capables d'intégrer les signaux de danger libérés lors de la mort cellulaire immunogène induite par certains agents thérapeutiques, et sont capables d'acquérir des antigènes de tumeur. En tant que cellules présentatrices d'antigènes professionnelles, les DC ont le pouvoir d'activer des lymphocytes T naïfs et d'induire leur différenciation en effecteurs anti-tumoraux. L'activation de lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques spécifiques d'antigènes de tumeur représente un facteur de bon pronostic pour les patients. D'autre part, grâce à leur capacité de production d'IFN de type I, les DC orchestrent la réponse immunitaire innée et adaptative. Enfin, ces cellules peuvent exercer une activité cytotoxique anti-tumorale directe suite à une activation appropriée, pouvant agir de concert avec leurs autres fonctions afin d'éliminer efficacement la tumeur. Ainsi, en plus de provoquer la mort des cellules tumorales, l'établissement de ces réponses anti-tumorales est un des objectifs des thérapies actuellement développées et la virothérapie anti-tumorale basée sur l'utilisation du MV répond à ces critères. Il est désormais proposé d'utiliser le terme d'immunothérapie oncolytique pour décrire cette modalité thérapeutique, plus révélateur des propriétés immunostimulatrices des virus oncolytiques.

OBJECTIFS DE LA THÈSE

Le MPM est un cancer agressif contre lequel les thérapies conventionnelles ne sont pas efficaces. L'équipe du Dr Marc Grégoire, en collaboration avec celle du Dr Frédéric Tangy de l'Institut Pasteur de Paris, s'intéresse au développement de la virothérapie anti-tumorale basée sur l'utilisation du virus atténué de la rougeole MV afin d'apporter une solution thérapeutique à ces patients. Ce virus oncolytique a montré son potentiel anti-tumoral dans de nombreux modèles *in vitro* et *in vivo* chez la souris et est actuellement à l'essai au niveau clinique chez l'homme. Les premiers résultats obtenus sont encourageants et notre équipe souhaiterait promouvoir le développement d'un essai clinique de phase I/II pour le traitement du MPM, en collaboration avec les services de pneumologie des CHU de Nantes et Lille.

Des travaux menés dans l'équipe ont permis de montrer que certaines lignées de MPM peuvent être infectées par le MV. Cependant, mon travail de thèse a consisté dans un premier temps à étudier la sensibilité de l'ensemble des lignées de MPM dérivées de patients dont nous disposons dans notre collection d'échantillons biologiques, afin d'estimer la fraction de patients qui seraient sensibles à cette approche thérapeutique. En parallèle, il était important de vérifier la sensibilité de différents types de cellules saines pouvant se retrouver au contact du virus. De plus, bien qu'il soit établi dans la littérature que la sensibilité des cellules tumorales à l'infection dépend de la surexpression du récepteur au MV CD46 à leur surface, mon travail a eu pour objectif de définir plus précisément les mécanismes régissant la sensibilité des lignées de MPM à l'infection et à la réplication du virus, en m'intéressant notamment à la réponse anti-virale IFN de type I en réponse au MV.

D'autre part, notre équipe s'est également intéressée à l'activation du système immunitaire par les cellules tumorales infectées par le MV. Anne Gauvrit a montré en 2008 que la mort immunogène des cellules tumorales induite par le MV, caractérisée par la libération de différents signaux de danger, est responsable de la maturation des cellules dendritiques dérivées de monocytes (Mo-DC) et de la présentation croisée d'antigène de tumeur à des lymphocytes T CD8⁺. Les travaux de Jean-Baptiste Guillaume ont ensuite démontré en 2013 que les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC), activées par la reconnaissance de l'ARN simple brin du MV par le TLR7 suite à la phagocytose des cellules tumorales infectées par le MV, sont capables d'effectuer la présentation croisée de l'antigène de tumeur NY-ESO-1 à des lymphocytes T CD8⁺ spécifiques et de sécréter d'importantes quantités d'IFN- α . Il a été décrit par différentes équipes que les DC peuvent devenir des effecteurs cytotoxiques suite à un contact avec un virus, dont le virus sauvage de la rougeole, ou avec des ligands de TLR, notamment le TLR7 pour les pDC. Dans un contexte tumoral,

ces DC cytotoxiques, et plus particulièrement les pDC, ont le potentiel de participer à l'élimination de la tumeur. Mon travail de thèse a donc consisté dans un second temps à poursuivre la caractérisation de l'effet immunostimulant du MV en étudiant l'acquisition de propriétés cytotoxiques par différentes populations de DC du sang, les DC myéloïdes CD1c⁺ et les pDC, suite au contact avec le virus oncolytique MV.

La meilleure compréhension des mécanismes contrôlant l'infection des cellules tumorales par les virus oncolytiques est nécessaire afin de mettre en place des solutions améliorant leur efficacité. De plus, un bon virus oncolytique doit avoir la capacité de briser la tolérance immunitaire en entraînant la mort immunogène des cellules tumorales et en activant les acteurs du système immunitaire, tels que les cellules dendritiques. Mes travaux de thèse menés avec le virus oncolytique MV se sont donc inscrits dans les recherches actuelles concernant la virothérapie anti-tumorale.

RÉSULTATS

Article n°1 : Sensitivity of human pleural mesothelioma to oncolytic measles virus depends on defects of the type I interferon response

Carole Achard, Nicolas Boisgerault, Tiphaine Delaunay, David Roulois, Steven Nedellec, Pierre-Joseph Royer, Mallory Pain, Chantal Combredet, Mariana Mesel-Lemoine, Laurent Cellerin, Antoine Magnan, Frédéric Tangy, Marc Grégoire and Jean-François Fonteneau

Introduction : Le mésothéliome pleural malin (MPM) est un cancer agressif de la plèvre principalement dû à une exposition aux fibres d'amiante. Ce cancer étant résistant aux thérapies conventionnelles, il est urgent de proposer de nouvelles modalités thérapeutiques. Dans ce but, nous développons la stratégie de virothérapie anti-tumorale basée sur l'utilisation du virus atténué de la rougeole (MV). Il est reconnu que le MV est un virus oncolytique infectant et lysant préférentiellement les cellules tumorales grâce à leur surexpression de son récepteur principal CD46. Dans le but de développer un essai clinique de phase I/II pour le traitement du MPM, nous avons analysé la sensibilité de nombreuses lignées de MPM au MV et défini les mécanismes qui la régissent.

Méthodes : Nous avons ainsi étudié *in vitro* la sensibilité de 22 lignées de MPM dont nous disposons dans notre collection d'échantillons biologiques afin d'estimer la fraction de patients souffrant de MPM qui pourraient être sensibles à cette approche thérapeutique. Nous avons également évalué la sensibilité de 4 types de cellules saines (cellules mésothéliales saines, cellules épithéliales bronchiques, cellules endothéliales pulmonaires et fibroblastes pulmonaires). Afin d'expliquer les différences de sensibilité observées entre les lignées de MPM, nous avons analysé l'expression de CD46 à leur surface ainsi que la réponse anti-virale interféron (IFN) de type I développée en réponse au MV.

Résultats : Nos résultats démontrent que 15 lignées de MPM sur les 22 testées sont efficacement infectées et lysées par le MV, tandis que les cellules saines sont peu ou pas sensibles. Nous avons confirmé la surexpression de CD46 par la majorité des lignées de MPM par rapport aux cellules saines. Cependant, la sensibilité de ces lignées au MV ne corrèle pas avec le niveau d'expression de CD46 à leur surface. Nous avons toutefois confirmé que la présence de CD46 est nécessaire pour l'infection car l'entrée du virus est bloquée par un anticorps spécifique de CD46. Nous avons ensuite déterminé que sur les 15 lignées de MPM sensibles au MV, 11 ne développent pas de réponse IFN de type I suite à l'exposition au virus,

avec aucune production d'IFN- α et - β et pas d'expression de la protéine anti-virale Mx1. En revanche, la réplication du MV est inhibée dans ces lignées par l'ajout d'IFN de type I exogènes. Les quatre types de cellules saines ainsi que les lignées de MPM résistantes à l'infection développent une réponse IFN de type I fonctionnelle en réponse au MV, capable de les préserver de l'infection.

Conclusion : Nous montrons que les défauts de la réponse IFN de type I présents dans la majorité des lignées de MPM dictent leur sensibilité à l'infection par le MV. Bien que la présence de CD46 à la surface des cellules soit nécessaire à l'infection, son niveau d'expression ne détermine pas la sensibilité à l'infection contrairement à ce qui est admis dans la littérature. Nous confirmons ainsi l'activité oncolytique du MV envers 70% des lignées de MPM et définissons plus précisément les mécanismes déterminant la sensibilité de ces cellules tumorales au MV.

Sensitivity of human pleural mesothelioma to oncolytic measles virus depends on defects of the type I interferon response

Carole Achard^{1,2,3}, Nicolas Boisgerault^{1,2,3}, Tiphaine Delaunay^{1,2,3}, David Roulois^{1,2,3}, Steven Nedellec^{3,4}, Pierre-Joseph Royer^{3,5}, Mallory Pain^{3,5}, Chantal Combredet⁶, Mariana Mesel-Lemoine⁶, Laurent Cellerin⁷, Antoine Magnan^{3,5,8}, Frédéric Tangy⁶, Marc Grégoire^{1,2,3} and Jean-François Fonteneau^{1,2,3}

¹ INSERM, UMR892, Institut de Recherche en Santé de l'Université de Nantes,

France ² CNRS, UMR6299, Institut de Recherche en Santé de l'Université de

Nantes, France ³ Université de Nantes, Nantes, France

⁴ INSERM UMS016, SFR Santé, Nantes, France

⁵ INSERM UMRS1087, Institut du Thorax, Nantes, France

⁶ CNRS UMR3569, Unité de Génomique Virale et Vaccination, Institut Pasteur, Paris, France

⁷ CHU de Nantes, Service d'Oncologie Médicale Thoracique et Digestive, Nantes, France

⁸ CHU de Nantes, Service de Pneumologie, Nantes, France

Correspondence to: Jean-François Fonteneau, **email:** jean-francois.fonteneau@inserm.fr

Keywords: oncolytic virus, Measles virus, oncolytic virotherapy, mesothelioma, type I Interferon

Received: October 08, 2015

Accepted: October 22, 2015

Published: November 02, 2015

This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

ABSTRACT

Attenuated measles virus (MV) is currently being evaluated as an oncolytic virus in clinical trials and could represent a new therapeutic approach for malignant pleural mesothelioma (MPM). Herein, we screened the sensitivity to MV infection and replication of twenty-two human MPM cell lines and some healthy primary cells. We show that MV replicates in fifteen of the twenty-two MPM cell lines. Despite overexpression of CD46 by a majority of MPM cell lines compared to healthy cells, we found that the sensitivity to MV replication did not correlate with this overexpression. We then evaluated the antiviral type I interferon (IFN) responses of MPM cell lines and healthy cells. We found that healthy cells and the seven insensitive MPM cell lines developed a type I IFN response in presence of the virus, thereby inhibiting replication. In contrast, eleven of the fifteen sensitive MPM cell lines were unable to develop a complete type I IFN response in presence of MV. Finally, we show that addition of type I IFN onto MV sensitive tumor cell lines inhibits replication. These results demonstrate that defects in type I IFN response are frequent in MPM and that MV takes advantage of these defects to exert oncolytic activity.

INTRODUCTION

Antitumor virotherapy using oncolytic viruses is a developing strategy to treat cancer [1]. Among oncolytic viruses, attenuated strains of measles virus (MV) have been shown to infect and kill a large variety of tumor cell lines [2, 3]. Phase I clinical trials using the Edmonston strain of MV have shown clinical benefits for the treatment of cutaneous T cell lymphoma [4], ovarian cancer [5, 6] and disseminated multiple myeloma [1]. The Edmonston MV is also currently being evaluated in on-going phase I

clinical trials for the treatment of squamous cell carcinoma of the head and the neck, glioma and mesothelioma by the group of Stephen J. Russell at the Mayo Clinic [1].

Schwarz and Edmonston attenuated strains of MV use the CD46 molecule as the major receptor to infect human cells, unlike the pathogenic strains that mainly use the CD150 molecule [7-9]. The membrane cofactor protein CD46 is ubiquitously expressed at a low level by all nucleated cells and blocks the complement cascade at the C3 activation stage [10]. CD46 is often overexpressed on tumor cells of many cancer types to escape complement-

mediated cytotoxicity [11, 12]. This expression at high density confers to attenuated MV a natural tropism for tumor cells. In fact, above a certain threshold of CD46 expression, the killing and syncytia formation mediated by MV infection increase dramatically [7]. Healthy cells that express a low level of CD46 are not infected [13].

Recently, nectin-4 has been described as a receptor for attenuated and wild-type MV, but its implication in the oncolytic activity of MV is still to be determined [14, 15].

The overexpression of CD46 is probably not the only factor that conditions the ability of MV to preferentially replicate in and kill tumor cells. In fact, there is now evidence that host-cell translational activity upon viral replication [16] and defects in the capacity of tumor cells to develop an antiviral innate immune response [17, 18] participate in MV oncolytic activity. All nucleated cells are equipped with intracytoplasmic sensors that are able to detect viral infection [19]. In the case of paramyxoviruses, helicases such as RIG-I and MDA5 detect viral RNA and induce the secretion of type I IFN, mainly IFN- β in non-immune cells that protect infected and neighboring cells from viral replication. Indeed, exposure to type I IFN induces in cells expressing the IFN- α/β receptors IFNAR1/IFNAR2 the expression of hundreds of IFN-sensitive genes (ISG) that exert antiviral activity [19]. Among these, the IFN-induced GTP-binding protein Mx1 is able to inhibit the early steps of viral replication by interfering with the formation of the ribonucleoprotein complex [20].

We have previously shown that the Schwarz attenuated strain of MV induces immunogenic cell death of malignant pleural mesothelioma (MPM) cells [21, 22]. In this study, we screened the sensitivity to MV infection and replication of twenty-two MPM cell lines established in our laboratory [23], and four different types of primary healthy cells. We found that fifteen MPM cell lines were sensitive to MV replication. We then measured the cell surface expression of CD46, nectin-4 and CD150, the three known MV receptors. We found that CD46 was often overexpressed by MPM cell lines compared with healthy primary cells and was used as an entry receptor. However, we failed to observe a correlation between the level of CD46 expression and the sensitivity of MPM tumor cell lines to MV replication. We then analyzed the capacity of the different MPM cell lines to develop a type I and type III IFN response after exposure to MV. We found that their sensitivity to MV replication was strongly related to their type I IFN response.

RESULTS

Sensitivity of MPM and healthy primary cells to MV infection

To determine the sensitivity of a large number of MPM cell lines to MV infection and replication, we set up an assay using a recombinant MV encoding the cherry fluorescent protein (MV-ch). By measuring fluorescence at 610 nm, we followed daily MV-ch replication in twenty-two MPM cell lines exposed to different multiplicities of viral infection (MOI) (Figure 1). Simultaneously, we quantified cell viability using the UptiBlue™ assay that is based on their metabolic activity. We also filmed by time-lapse microscopy some of the MPM cell lines exposed to MV encoding the enhanced green fluorescent protein (MV-eGFP) at an MOI = 1 (Videos 1-9). We observed no or low replication of MV in seven tumor cell lines. For five of these, no MV replication was observed: Meso4 (Video 1), Meso45, Meso52 (Video 2), Meso61 and Meso173, but their viability decreased at the highest MOI. For the other two tumor cell lines, Meso95 and Meso150 (Video 3), MV replicated in a few cells, which then induced apoptosis of the neighboring non-infected cells.

In the fifteen other MPM cell lines we observed a strong replication of MV that led to cell death, with kinetics depending on the cell lines. MPM cell lines such as Meso31, Meso35, Meso152 and Meso225 underwent cell death quite fast after infection (Videos 4, 5, 6, 7), whereas for other sensitive cell lines, such as Meso11 and Meso163, cell death was slower (Videos 8, 9). This delay allows these latter cell lines to accumulate fluorescence resulting from viral replication. We also observed that infection was usually accompanied by the formation of syncytia (Videos 4, 6, 7, 8), but not in all tumor cell lines (Videos 5, 9). Green fluorescence measured in the videos (Supplemental figure 1) was very similar to the results obtained with cherry fluorescence measured using MV-ch (Figure 1). We observed no replication or very limited replication in Meso4, 52 and 150, a replication that stopped around day 3 and day 4 for Meso31, 35, 152 and 225, and a replication that continued after day 5 for Meso11 and 163. Altogether, these results show that approximately 70% of MPM tumor cell lines are sensitive to the replication and oncolytic activity of Schwarz MV.

Using the same techniques, we also measured the sensitivity to MV infection of four different human primary healthy cell types: peritoneal mesothelial cells (MES-F), bronchial epithelial cells (CEB), pulmonary endothelial cells (HMVEC-L) and lung fibroblasts (CCD-19Lu) (Figure 2). We observed no infection of CEB (Supplemental video 10) and a very limited infection with no syncytia formation for MES-F (Supplemental video 11), HMVEC-L, and CCD-19Lu cells. The viability of

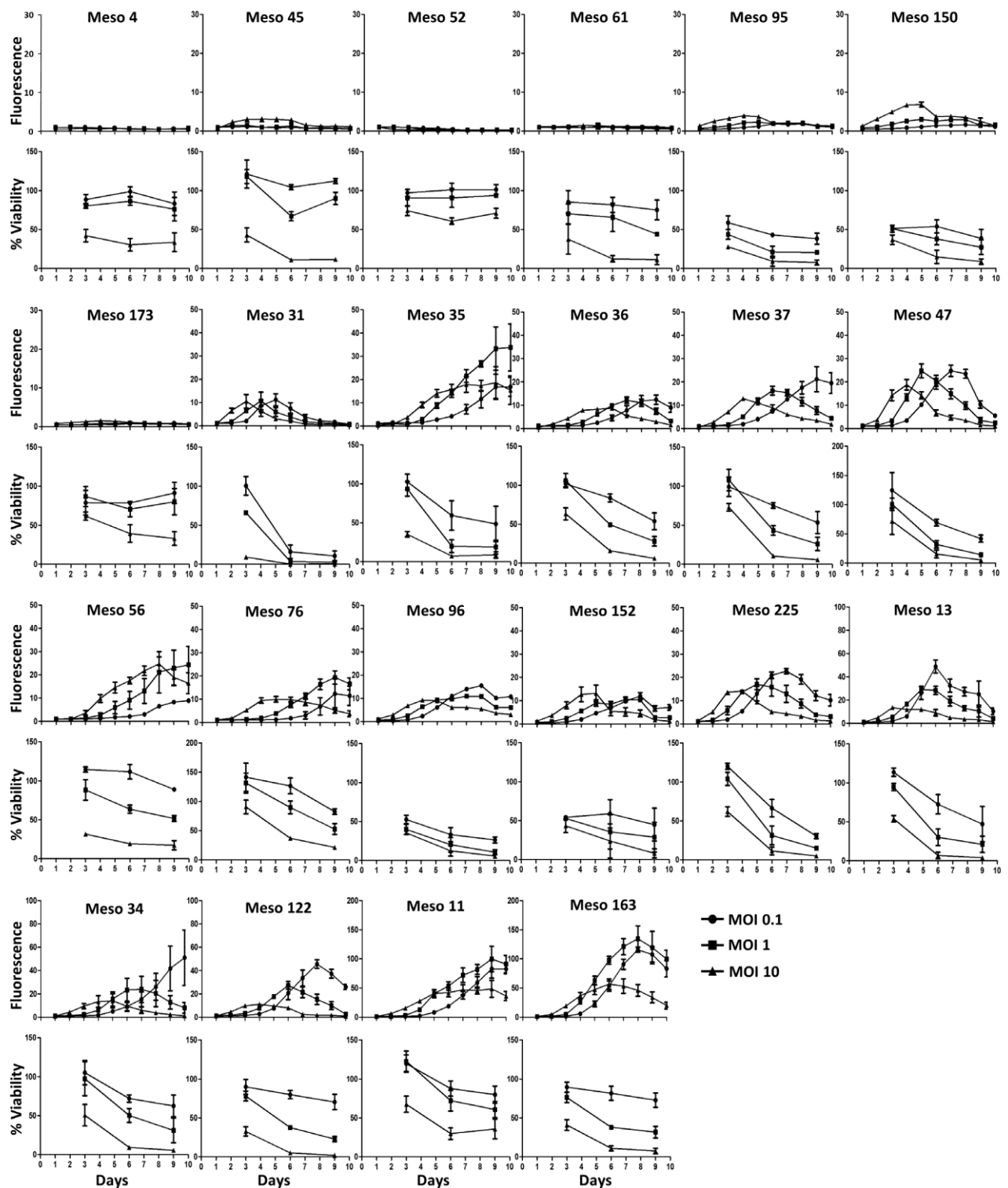


Figure 1: A majority of MPM tumor cell lines are sensitive to MV replication and oncolytic activity. MPM cell lines were infected with MV-ch or MV at different MOI: 0.1 (circles), 1 (squares) and 10 (triangles). MV-ch and MV were used for the MV replication assay and the cell viability assay, respectively. The fluorescence values correspond to the ratio between the fluorescence measured in infected tumor cells and non-infected cells. Cell viability is expressed as a percentage compared to non-infected cells. Results are expressed as the mean $\pm$ SEM of three independent experiments.

these primary cells decreased, especially at the highest MOI.

Expression of CD46, CD150 and nectin-4 by MPM and healthy primary cells

We measured the expression of known MV receptors (CD46, CD150 and nectin-4) on the surface of MPM and healthy primary cells. The majority of MPM cells expressed higher levels of CD46 than healthy primary cells (Figure 3A-3B). However, no statistical difference was observed between MPM cells sensitive or not to MV infection (Figure 3B). We did not detect any expression of CD150 or nectin-4 (Supplemental figure 2), which are receptors for the pathogenic as well as vaccine MV strains [14, 15, 24]. Altogether these data show that a majority of tumor MPM cell lines overexpress CD46 as the only known MV receptor and that sensitivity of these cells to MV infection is not related to CD46 expression.

MV uses CD46 to infect MPM tumor cells

To determine whether CD46 plays a role in MPM cell infection, we exposed eight MPM cell lines to MV-ch in the presence of anti-CD46 mAb or isotype control mAb (Figure 3C). On Meso4, which is not sensitive to MV infection, the anti-CD46 mAb had no effect on replication, but slightly increased cell viability. On the seven other MV-sensitive cell lines, the anti-CD46 mAb significantly delayed MV replication and cell death. These delays were similar to the shifts observed between infection at MOI = 1 and 0.1 (Figure 1A), suggesting that the anti-CD46

mAb inhibited approximately 90% of the infection. This demonstrates that CD46 is required for MV infection of MPM tumor cells.

IFN type I response prevents MV replication in MPM tumor cells and healthy primary cells

Since the sensitivity of MPM tumor cell lines to MV replication did not correlate with the CD46 expression level (Figure 3B), we sought to identify other factors that condition sensitivity to MV replication. We investigated the activation of antiviral type I and III IFN response by tumor cell lines and healthy primary cells exposed for 72 hours to MV by analyzing the expression of five specific genes by RT-qPCR (Figure 4).

We first analyzed the expression of two helicase genes: the *DDX58* gene that encodes the retinoic acid-inducible gene-1 protein (RIG-I) and the *IFIH1* gene that encodes melanoma differentiation-associated protein 5 (MDA5). These two proteins are intracytoplasmic sensors of viral ssRNA and dsRNA, able to induce type I IFN response against MV [25]. We observed that following MV exposure, the expression of both genes was increased in all tumor cell lines and healthy primary cells, thus indicating that MV was detected by all these cells (Figure 4).

We then looked at the expression of two type I IFN genes: *IFNA1* and *IFNB1* that encode IFN- α and IFN- β , respectively (Figure 4). Constitutive expression of *IFNA1* was observed in the absence of MV in all healthy cells and in all insensitive tumor cell lines, with the exception of Meso173. *IFNA1* expression was increased in all these

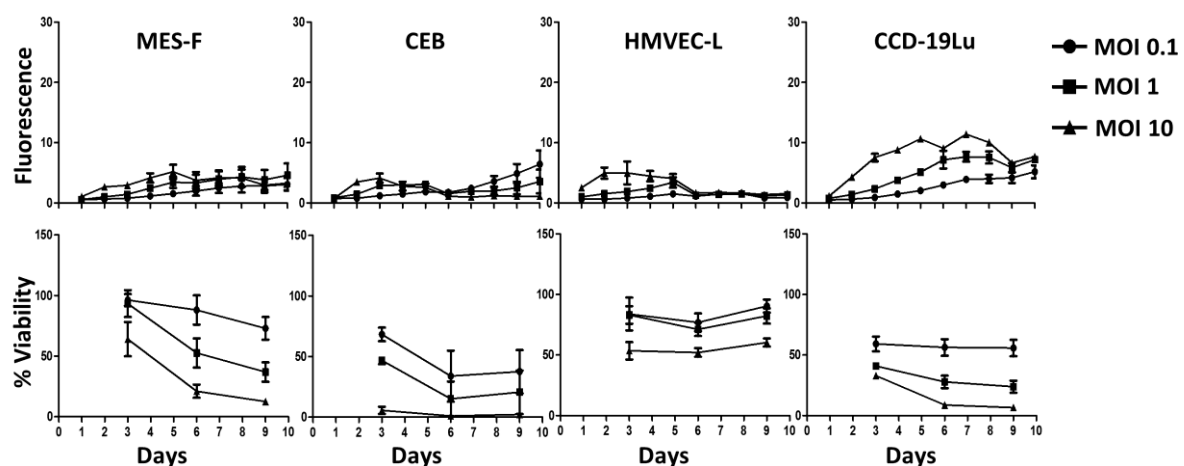


Figure 2: Healthy cells are not sensitive to MV replication. 4 types of healthy cells (mesothelial cells MES-F, bronchial epithelial cells CEB, pulmonary endothelial cells HMVEC-L and pulmonary fibroblasts CCD-19Lu) were infected with MV-ch or MV at different MOI: 0.1 (circles), 1 (squares) and 10 (triangles). MV-ch and MV were used for the MV replication assay and the cell viability assay, respectively. The fluorescence values correspond to the ratio between the fluorescence measured in infected tumor cells and non-infected cells. The cell viability is expressed as a percentage compared to non-infected cells. Results are expressed as the mean $\pm$ SEM of three independent experiments.

cell lines in the presence of the virus, with the exception of CEB. In the fifteen sensitive tumor cell lines, a weak constitutive expression of *IFNA1* in the absence of the virus was found in six tumor cell lines (Meso35, 36, 37, 56, 34 and 122) and was increased in the presence of MV

in four of these (Meso35, 36, 34 and 122). In the nine other sensitive tumor cell lines, we never detected *IFNA1* expression, either in the presence or absence of MV. Regarding *IFNB1*, a weak constitutive expression in the absence of the virus was detected only in the insensitive

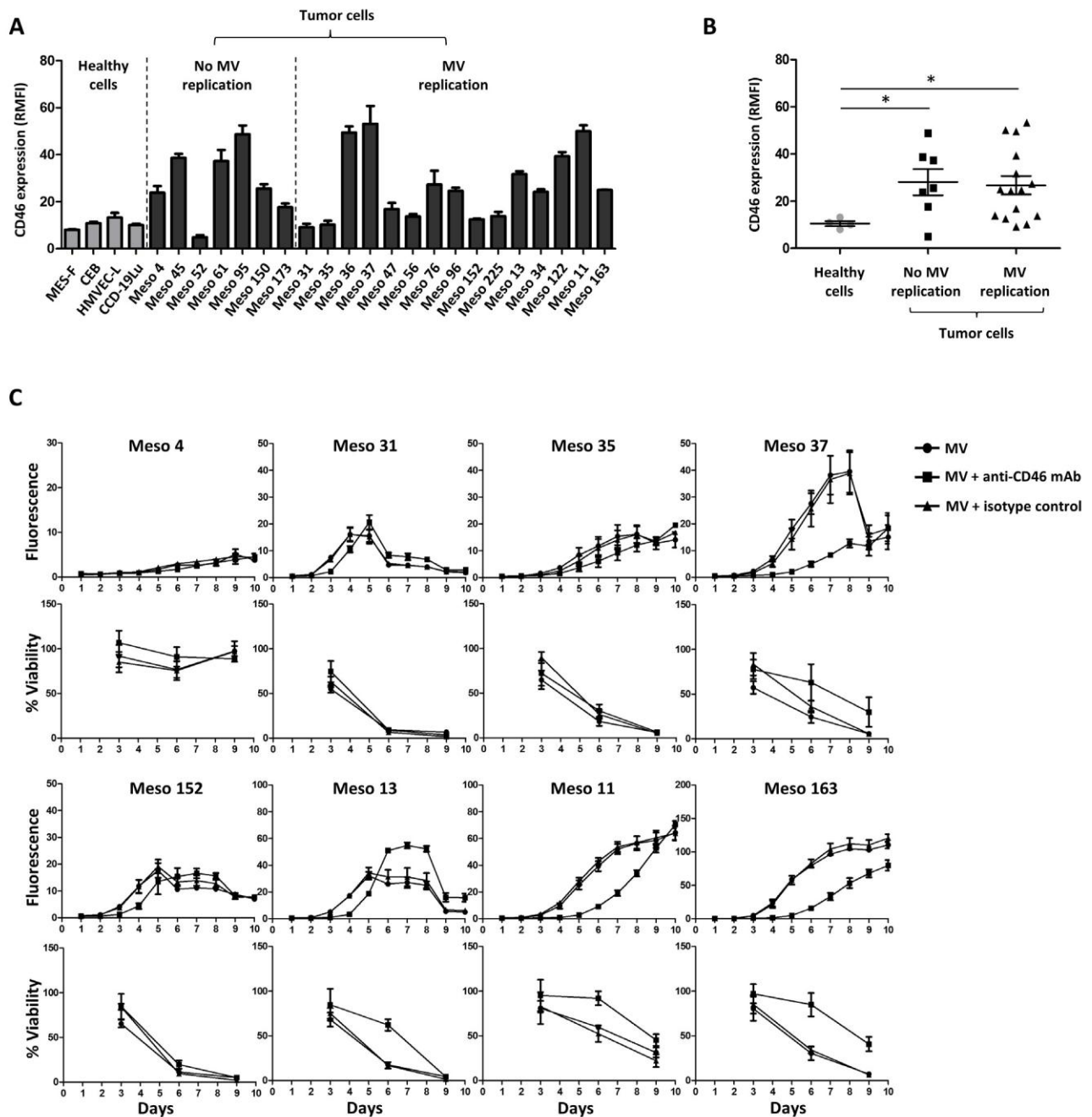


Figure 3: Absence of correlation between CD46 surface expression and MPM sensitivity to MV replication. (A) Expression of CD46 is measured on the cell surface by flow cytometry. Results are expressed as RMFI $\pm$ SEM of three independent experiments. (B) Scatter plot representation of the CD46 expression on healthy and tumor cells surfaces. Each point represents the mean of RMFI obtained in three independent experiments. * $p < 0.05$, Mann-Whitney test. (C) MV replication and cell viability were assessed after MV-ch or MV infection, respectively (MOI = 1) in the presence or absence of an anti-CD46 blocking mAb. An isotype was used as a control. The fluorescence values correspond to the ratio between the fluorescence measured in infected tumor cells and non-infected cells. The cell viability is expressed as a percentage compared to non-infected cells. Results are expressed as the mean $\pm$ SEM of three independent experiments.

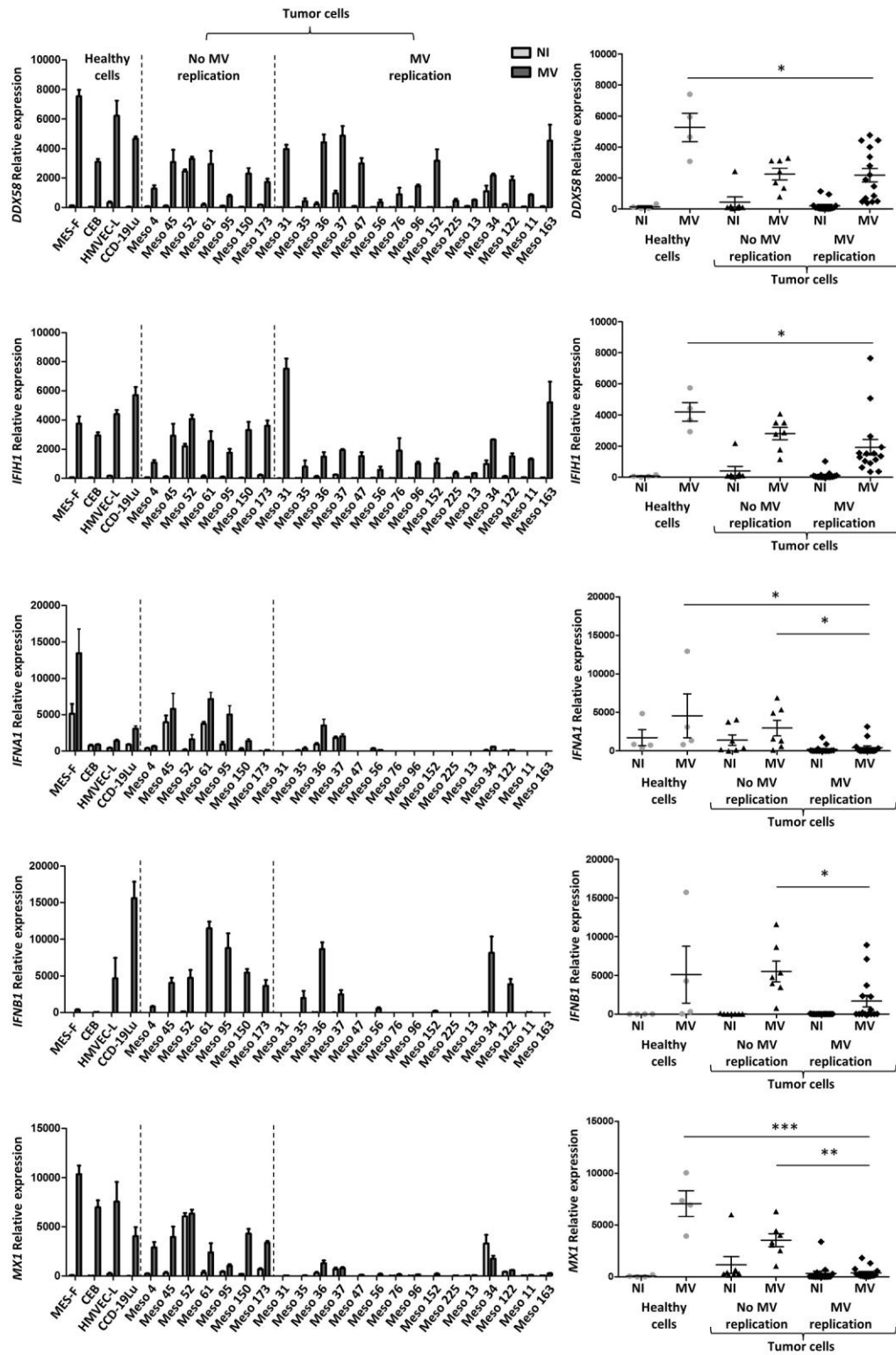


Figure 4: The sensitivity to MV infection depends on defects of the antiviral type I IFN response. The expression of five genes implicated in the antiviral type I IFN response was analyzed by RT-qPCR 72 hours after MV infection of tumor and healthy cells (MOI = 1). The expression is expressed as relative expression compared to *RPLPO* gene expression. Non-infected cells (NI) are in light gray and infected cells (MV) are in dark gray. The *DDX58* and *IFIH1* genes code for RIG-I and MDA5 proteins, respectively. The *IFNA1* gene codes for IFN- α , *IFNB1* for IFN- β , and *Mx1* for Mx1 protein. For each gene, a histogram shows the expression by each cell line, and a scatter plot shows the expression by groups (healthy cells, tumor cells with no MV replication, tumor cells with MV replication). Results are expressed as the mean $\pm$ SEM of three independent experiments. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$, one-way ANOVA (Kruskal-Wallis).

Meso52 cell line (Figure 4). In the presence of MV, we measured a significant induction of *IFNB1* expression in all insensitive tumor cells lines and in all healthy cells, even in CEB in which *IFNB1* expression was increased 20-fold. In contrast, seven out of the fifteen sensitive tumor cell lines expressed *IFNB1* in response to the virus (Meso35, 36, 37, 56, 152, 34 and 122), whereas the eight other sensitive tumor cell lines did not. We also measured the expression of the *IFNL1* gene that encodes the type III IFN, IFN- λ 1 (Supplemental Figure 3). In contrast to type I IFN, all tumor cell lines were able to express this gene in the presence of the virus with no significant differences whether MV-sensitive or not.

Finally, we measured the expression of the *MX1* gene that encodes the interferon-induced GTP-binding protein Mx1. The *MX1* gene is an ISG that is expressed following signaling from the type I IFN receptor, IFNAR1/IFNAR2. Among healthy primary cells, we found a weak constitutive expression of *MX1* only in HMVEC-L (Figure 4E). In the presence of MV, a strong increase of *MX1* expression was induced in all healthy cells. Similarly, in MV-insensitive MPM cell lines, the weak constitutive expression of *MX1* was highly increased after MV addition. Conversely, among the fifteen MV-sensitive MPM cell lines, we found no constitutive expression of *MX1* in eleven, a weak constitutive expression in three (Meso36, 37, 122) and a strong constitutive expression

only for one (Meso34). In the presence of MV, we observed a significant increase of *MX1* expression only for Meso36. The *MX1* expression did not change for all the other sensitive cell lines.

These results indicate that cells that are able to develop a complete type I IFN response, whether they are healthy primary or tumor cells, are not sensitive to MV infection. On the contrary, tumor cell lines that are unable to develop a type I IFN response are sensitive to MV infection, with the four exceptions, Meso36, 37, 34 and 122, which express *IFNA1*, *IFNB1* and *MX1* and are sensitive to MV replication. These results also signify that the capacity to achieve a complete type I IFN response is defective in numerous MPM cell lines.

We then sought to confirm these results by measuring IFN- α and IFN- β secretion by ELISA in the culture supernatants (Figure 5). Regarding IFN- α , we did not detect significant secretion in the supernatants of tumor cell lines and healthy primary cell cultures in the absence of MV, except for Meso52 (Figure 5). This suggests that the IFN- α mRNA observed by RT-qPCR in several tumor cell lines in the absence of the virus was either not translated into proteins or resulted in levels undetectable by ELISA. In the presence of MV, IFN- α was significantly secreted by all insensitive cell lines and by two out of three healthy primary cell cultures, whereas only four out of the fifteen sensitive tumor cell lines (Meso36, 37, 34 and 122)

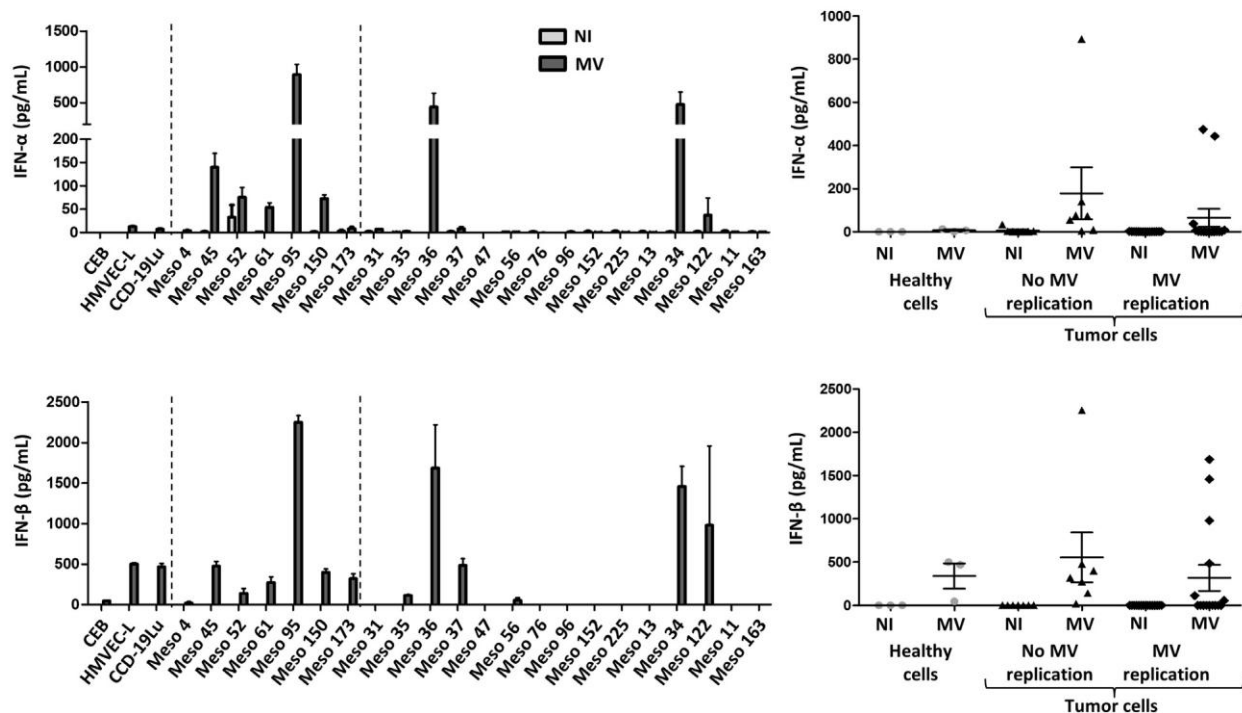


Figure 5: Secretion of the type I IFN, IFN- α and IFN- β , after MV infection. IFN- α and IFN- β secretion was measured by ELISA, 72 hours after MV infection of tumor and healthy cells (MOI = 1). Non-infected cells (NI) are in light gray and infected cells (MV) are in dark gray. For each IFN, a histogram shows the expression by each cell line, and a scatter plot shows the expression by groups (healthy cells, tumor cells with no MV replication, tumor cells with MV replication). Results are expressed as the mean $\pm$ SEM of three independent experiments.

secreted IFN- α . Regarding IFN- β , the results obtained by RT-qPCR were confirmed with the observation that this cytokine was secreted by all insensitive cell lines and healthy primary cells cultures, and by only six out of the fifteen sensitive cell lines (Meso35, 36, 37, 56, 34 and 122) (Figure 5). Interestingly, the four sensitive cell lines secreting IFN- α in the presence of the virus also secreted IFN- β .

We also measured the cytoplasmic expression of Mx1 protein by flow cytometry in tumor cell lines and healthy primary cells (Figure 6). We found high levels of Mx1 in the cytoplasm of healthy primary cells only when they were exposed to MV. In all insensitive tumor cell lines, we found cytoplasmic Mx1 in non-infected cells that was increased in the presence of MV, except for Meso52 where Mx1 was already present in equally high amounts in absence of the virus. For the fifteen tumor cell lines sensitive to MV replication, cytoplasmic Mx1 was not detected in the absence of MV except for four cell lines (Meso34, 36, 37 and 122). In the presence of MV, six out of the fifteen sensitive cell lines did not express Mx1 in their cytoplasm (Meso31, 47, 76, 225, 13 and 11), five expressed low levels in a fraction of the cells (Meso35, 56, 96, 152, and 163) and the last three expressed high levels of Mx1 in 100% of the cells (Meso34, 36, 37 and 122) similarly to what was observed in insensitive tumor cell lines.

Overall, these results show that tumor cells that constitutively express Mx1 are not sensitive to MV replication, with the exception of Meso34, 36, 37 and 122. They also demonstrate that the cells that fail to develop a complete type I IFN response, illustrated by the absence of IFN- α , IFN- β and Mx1 expression, are sensitive to MV replication with the same exceptions: Meso34, 36, 37 and 122.

IFN- α and IFN- β inhibit MV replication in MPM cell lines sensitive to MV replication

In the last set of experiments we tested the effect of type I IFN (IFN- α and IFN- β) on MV replication in sensitive tumor cell lines. We first measured the expression of IFNAR1 and IFNAR2 in all MPM cells lines. A low expression was found on the surface of all tumor cell lines (data not shown). We then exposed the fifteen MPM cell lines sensitive to MV to increasing amounts of IFN- α and IFN- β and measured MV replication using MV-ch (Figure 7). MV replication was reduced in a dose-dependent manner in all tumor cell lines. Interestingly, the inhibition was lower in three out of the four MPM cell lines that express IFN- α , IFN- β and Mx1 constitutively (Meso34, 36 and 37), whereas the inhibition was more profound in tumor cell lines that did not develop a type I IFN response in the presence of the virus, such as Meso31, 47, 76, 225 and 11. In addition, exposure to IFN- α and IFN- β induced a strong expression of Mx1 in all of these fifteen sensitive tumor cell lines (data not shown). These results show that the majority of MPM cell lines that are sensitive to MV replication would not be able to replicate the virus if they were able to produce their own type I IFN in response to the virus.

DISCUSSION

In this study, we measured the sensitivity of a large panel of human MPM tumor cell lines and of different types of healthy cells to the oncolytic activity of the Schwarz vaccine strain of MV. We found that fifteen out of twenty-two MPM tumor cell lines are sensitive to MV replication and cytopathic effect, whereas replication was limited or absent in the four types of healthy cells (fibroblasts, mesothelial, bronchial and endothelial cells) as well as in the seven remaining MPM tumor cell lines.

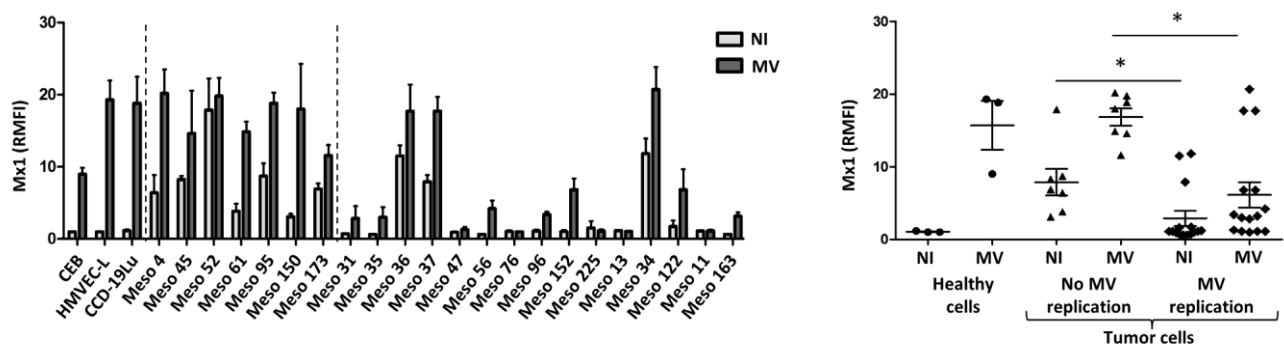


Figure 6: Sensitivity to MV replication correlates with the absence of expression of the antiviral protein Mx1. Intracytoplasmic Mx1 staining was performed on non-infected (NI) or on MV-infected tumor cells (MOI = 1, 72h) and fluorescence was analyzed by flow cytometry. The histogram represents the expression of Mx1 (RMFI) by each cell line (NI is in light gray and MV in dark gray), and the scatter plot shows Mx1 expression by groups (healthy cells, tumor cells with no MV replication, tumor cells with MV replication). Results are expressed as the mean $\pm$ SEM of three independent experiments. * p < 0.05, One-way ANOVA (Kruskal-Wallis).

Our data also show that the sensitivity of tumor cell lines is not correlated to overexpression of the MV cell receptor CD46, contrary to what has been described in the literature [3, 7]. Nevertheless, the virus needs CD46 to enter the cells. In a search for factors that affect the sensitivity of MPM tumor cells to MV oncolytic activity, we studied the innate antiviral type I and III IFN immune response of these cells. Our results suggest that MV enters into all tumor cell lines and healthy cells, since we observed the upregulation of genes encoding the cytoplasmic viral sensors RIG-I and MDA5 in the presence of the virus. However, we observed type I IFN production (IFN- α and - β) mainly by insensitive tumor cell lines and healthy cells exposed to MV. More strikingly, when we analyzed the expression of the ISG Mx1, we found this protein in the cytoplasm of all insensitive tumor cell lines and healthy cells exposed to MV. In contrast, eleven out of fifteen sensitive tumor cell lines were unable to express a high level of Mx1 in response to MV. Overall, this study suggests that about 70% of MPM patients are potentially sensitive to MV oncolytic activity and that this activity depends on defects in the intracellular innate antiviral response in MPM tumor cells rather than on CD46 overexpression on the cell surface.

We observed that exposure of insensitive tumor cell lines or healthy cells to high titers of MV (MOI = 10) results in viability loss for the majority of them. This is likely due to the induction of the innate antiviral immune response that is known to affect viability, notably by limiting host translational activity or by inducing apoptosis [19]. This is particularly true for the MPM tumor cell lines Meso95 and Meso150. For these cells, we observed that infection of a limited number of cells induces apoptosis

of neighboring non-infected cells (Supplemental video 2). Apoptosis of non-infected cells was also observed at the lowest MOI, suggesting that a few infected cells are sufficient to induce apoptosis of neighboring cells. We classified Meso95 and Meso150 as tumor cell lines that are insensitive to MV replication. However, they could be considered as sensitive to the oncolytic activity of MV, even if MV replication is limited to a few cells. Overall, these results show that seventeen out of the twenty-two studied MPM tumor cell lines (77%) are sensitive to the oncolytic activity of MV. Furthermore, MV still has an effect on insensitive tumor cell lines by inducing a strong type I IFN response that could be beneficial for the patient by increasing tumor immunogenicity [26-28].

Two other groups recently studied the implication of the intracellular antiviral response on the sensitivity of tumor cell lines to MV oncolytic activity [16-18]. Berchtold and collaborators studied the sensitivity of eight human sarcoma tumor cell lines to the Schwarz strain of MV [18]. They found that five out of eight tumor cell lines were sensitive, whereas the remaining three were not. They then observed that the three insensitive cell lines express on their surface a lower level of CD46 molecules compared to the five sensitive cell lines, a result compatible with the accepted view that the oncolytic activity of MV depends on overexpression of CD46 by tumor cells [3, 7]. They also analyzed type I IFN response in tumor cells exposed to MV. When they analyzed the completion of this response by measuring expression of the ISG *IFIT1*, they found that it was expressed in the three insensitive cell lines and only in one out of the five sensitive cell lines. This last result matches our results that were obtained on a larger series of tumor cell lines

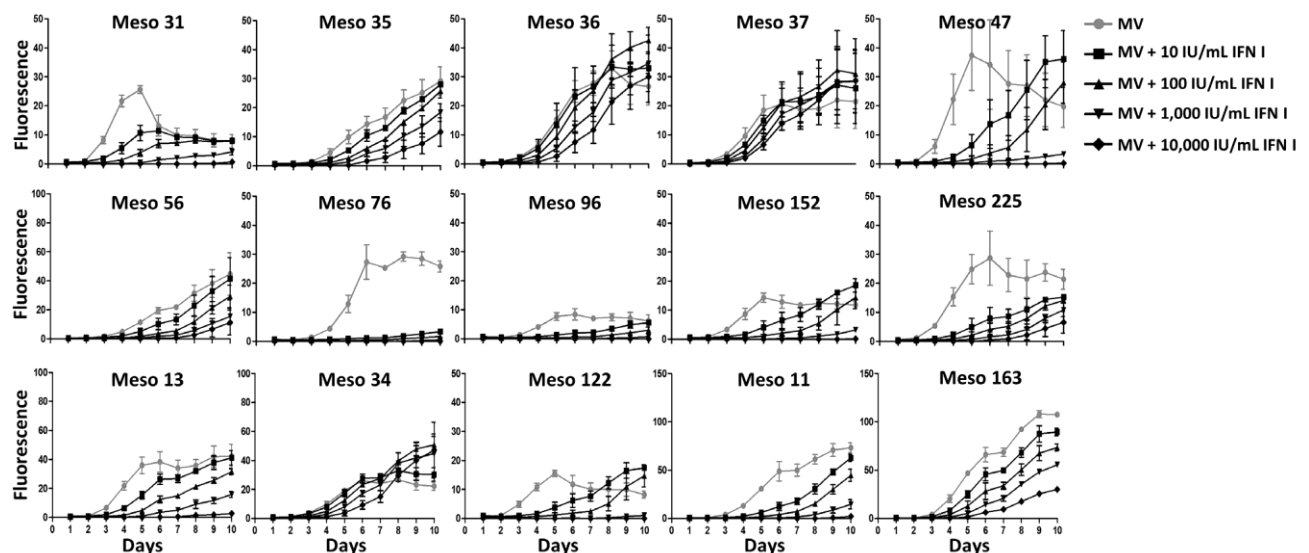


Figure 7: Type I IFN inhibit MV replication in the majority of MV-sensitive tumor cell lines. MPM cell lines were infected with MV-ch (MOI = 1) in the presence of different amounts of IFN I (IFN- α and IFN- β) for MV replication assay. The fluorescence values correspond to the ratio between the fluorescence measured in infected tumor cells in the presence or absence of type I IFN and the non-infected cells. Data represent the mean $\pm$ SEM of three independent experiments.

and also on some healthy primary cells. The same group confirmed this result in an additional study where they analyzed type I IFN response in five MV-insensitive tumor cell lines compared to one sensitive tumor cell line [17]. They found that four out of the five insensitive tumor cell lines expressed IFIT1 in the presence of the virus, whereas the remaining insensitive cell line and the sensitive one did not develop a type I IFN response. The MV receptor level was not measured in this study. Finally, Patel and collaborators studied the sensitivity of seven human lung adenocarcinoma cell lines and two types of healthy cells to the Edmonston strain of MV [16]. They also analyzed PKR antiviral activity, whose expression is dependent on the type I IFN response, in two sensitive and one insensitive tumor cell line. Their results suggest that the PKR antiviral activity plays a role in the limited infection of the resistant tumor cell line by limiting the host transcriptional activity. Overall, our study performed on twenty-two MPM cell lines and four types of primary cells confirms and extends the previous conclusions obtained on a limited number of tumor cell lines that the type I IFN response in tumor cells affects their sensitivity to MV oncolytic activity. Furthermore, we clearly show that type I IFN defects play a greater role than CD46 overexpression.

We observed that some tumor cell lines that appear to develop a type I IFN response are nevertheless sensitive to MV oncolytic activity, as also observed in other studies [16-18]. This observation could be explained by the presence of two cellular subpopulations in these tumor cell lines: one sensitive subpopulation unable to express ISG in the presence of the virus, and one insensitive subpopulation competent in type I IFN response. However, we ruled out this hypothesis since we observed only one Mx1-positive population in these tumor cell lines in the presence of MV. This suggests that in sensitive tumor cell lines that produce type I IFN and express Mx1 in response to MV, other ISG involved in the inhibition of MV replication are missing. Indeed, while hundreds of ISG have been identified, we only studied Mx1 whose role in MV replication is not well characterized, especially with attenuated strains [29, 30]. Furthermore, this activity is likely to be cell-type dependent. It is thus possible that Mx1 antiviral activity acts in combination with other ISG that are not expressed in the four sensitive tumor cell lines that produce type I IFN and express Mx1 in response to MV, whereas these required ISG are expressed in the seven insensitive tumor cell lines, thereby blocking MV replication. In support of this hypothesis, it was demonstrated in a study that analyzed expression of 380 ISG in response to a panel of viruses that most ISG do not inhibit viral replication when expressed individually, and that antiviral activity is observed when ISG are expressed in combination [31, 32].

We thought to confirm these results *in vivo* with experiments on human MPM tumors engrafted in immunodeficient mice as we previously did for colon and

lung adenocarcinoma [33]. However, these models are very different from what may happen in immunocompetent patients. Indeed, in these models, healthy mouse cells do not express receptors for MV and would not produce type I IFN. In addition, there is no immune system in these mice to respond to type I IFN produced by insensitive tumor cells. Thus, an immunocompetent animal model for mesothelioma needs to be developed to extend this study *in vivo*.

MV is currently being evaluated in clinical trials for the treatment of different types of cancers [1] and the first published results are promising [4-6, 34]. In our study, we define more precisely the mechanisms that dictate the sensitivity of MPM tumor cells to MV. These mechanisms should be taken into consideration to analyze the clinical outcome of MV-based virotherapy. It would be probably informative to know the type I IFN response capability of tumor cells from responding patients to better understand the efficacy of this therapeutic strategy.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture

Human MPM cell lines (from Meso4 to Meso225) were established in our laboratory from pleural effusions collected by thoracocentesis, and genetically characterized [23]. All patients gave their informed consent. All cell lines were maintained in RPMI-1640 medium supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum, 100U/mL penicillin, 100µg/mL streptomycin and 2mM L-glutamine (all reagents from Gibco-Invitrogen) and cultured at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere.

Normal peritoneal mesothelial cells MES-F were purchased from Tebu-bio, pulmonary fibroblasts CCD-19Lu from the ATCC-LGC Standards, and pulmonary endothelial cells HMVEC-L from Lonza. These cells were cultured in their specific media according to the manufacturers' recommendations. The bronchial epithelial cells were obtained and cultured as previously described [35]. Cells were routinely checked for *Mycoplasma* contamination using the Plasmotest™ from InvivoGen.

MV infection

Live-attenuated Schwarz vaccine strain of measles virus (MV), MV recombinant for the enhanced green fluorescent protein (MV-eGFP) and MV recombinant for the cherry protein (MV-ch) were produced and purified as previously described [36]. Infection of cells with the different measles virus vaccinal strains lasted 2 hours at 37°C. Viral inoculum was then replaced by fresh culture medium, unless otherwise indicated.

MV replication assay

A day before infection, cells were seeded in 96-well plates, at a density of 5,000 cells/well for the MPM cell lines, and at the recommended density for each healthy cell type. Different multiplicities of infection (MOI) were used for infection with MV-ch (0.1, 1 and 10). Fluorescence at 610nm was analyzed every day during 10 days using a ChemiDoc™ MP imaging system (Bio-Rad). Quantification was performed using Image Lab 4.1 Software (Bio-Rad) with the relative fluorescence corresponding to the ratio between the fluorescence measured in infected cells and the non-infected cells. The medium was replaced every 3 days to match the conditions of the cell viability assay. For the CD46 blocking assay, we used a CD46-specific mAb (clone M177, Hycult Biotech) or a mouse IgG1 isotype as a control (clone MOPC-21, Biolegend) at a final concentration of 10µg/mL. These antibodies were added 30 minutes before adding the MV-ch at an MOI = 1. To test the inhibition of MV replication with type I IFN, we added rhIFN- α -2a and rhIFN- β -1a (ImmunoTools) at concentrations ranging from 10IU/mL to 10,000IU/mL, 4 hours before the infection with MV-ch at MOI = 1, and the viral inoculum was not replaced for this assay.

Cell viability assay

Cells were seeded in 96-well plates and infected with MV as described in the previous paragraph. Cell viability was measured using Uptibblue reagent (Interchim), an oxidation-reduction sensor that indicates cell metabolic activity. At days 3, 6 and 9 after the infection, the Uptibblue reagent was added (5%, v/v) into the culture medium for 2 hours at 37°C. Fluorescence was then measured at 590nm using a ChemiDoc™ MP imaging system (Bio-Rad). Quantification was performed using Image Lab 4.1 Software (Bio-Rad) and the viability was expressed as a percentage compared to non-infected cell viability. Culture medium containing Uptibblue was then replaced by fresh medium to continue the kinetic experiment.

Video microscopy

A day before infection, cells were seeded in 24-well plates, at a density of 10⁵ cells/well for the MPM cell lines, and at the recommended density for healthy cells. Cells were infected with MV-eGFP (MOI = 1). The time-lapse video microscopy was performed using a Leica DMI6000B microscope with a 10x objective. Images were acquired every 15 or 30 minutes for 3 to 4.5 days. We used MetaMorph® Microscopy Automation & Image Analysis Software (version 7.8) and Fiji Software for acquisition and analysis.

Flow cytometry

To measure CD46 expression on the cell surface, we stained the cells with a FITC-conjugated anti-CD46 mAb (clone E4.3, BD Biosciences). Fluorescence was measured on FACS Calibur (BD Biosciences) and analyzed using FlowJo software. The results are expressed as relative mean of fluorescence intensity (RMFI). To measure Mx1 in the cytoplasm 72 hours after infection with MV at MOI = 1, cells were fixed with PBS containing 4% paraformaldehyde for 10 minutes at room temperature. Cell washes and mAb dilutions were performed with PBS containing 0.1% BSA (bovine serum albumin) and 0.1% saponin. Unconjugated anti-Mx1 mAb (clone M143, Dr. Georg Kochs, University Medical Center Freiburg) and, as a control, an unconjugated mouse IgG2a isotype (clone MOPC-173, Biolegend) were used. A DyLight™488-conjugated anti-mouse IgG antibody (clone Poly4053, Biolegend) was used as secondary antibody. The results are expressed as RMFI.

Real-time RT-qPCR

MPM cell lines and healthy cells were seeded in 6-well plates at a density of 0.5x10⁶ cells/well and infected with MV at MOI = 1. 72 hours after infection, total cell RNA was extracted using the Nucleospin® RNA II kit (Macherey-Nagel) and 0.5µg total RNA was reverse transcribed using MMLV reverse transcriptase (Invitrogen). PCR reactions were conducted using QuantiTect primer assays (Qiagen) and Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Fisher Scientific) according to the manufacturer's instructions. Gene expression was analyzed in non-infected and infected cells using QuantiTect primers pairs for *IFNA1* (coding for IFN- α), *IFNB1* (IFN- β), *IFNL1* (IFN- λ 1), *Mx1* (Mx1), *DDX58* (RIG-I) and *IFIH1* (MDA5). The gene expression was expressed as relative expression compared to the expression of a housekeeping gene that encodes human large ribosomal protein (RPLPO).

Cytokine detection

IFN- α and IFN- β production were measured by ELISA (MabTech and PBL Assay Science, respectively), according to the manufacturer's instructions. Supernatants of MPM cell lines and healthy cells were collected 72 hours after infection with MV at MOI = 1 and used directly for ELISA without freezing.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 5 software (GraphPad Software Inc.) . To compare

two groups, a nonparametric, one-sided, unpaired Mann-Whitney comparison test was used. For statistical analysis comparing more than two groups, nonparametric one-way ANOVA (Kruskal-Wallis test) was used, with Dunn's post-test. All data are presented as mean±SEM. P values less than 0.05 were considered to be statistically significant. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Philippe Hulin and the cellular and tissular core facility of Nantes University (MicroPiCell) for their expertise in video microscopy. We also thank Juliette Desfrancois and the core facility of flow cytometry (Cytocell). This work was supported by “la Ligue Régionale Grand Ouest contre le Cancer (CSIRGO : CD16, CD22, CD44, CD49, CD72, CD79 and CD85)”, “La Ligue Nationale contre le Cancer”, “ARSMESO44 association”, “la Fondation du Souffle et le Fonds de Dotation Recherche en Santé Respiratoire”, “la Fondation pour la Recherche Médicale (FRM)”, and “la Fondation ARC pour la recherche sur le cancer”.

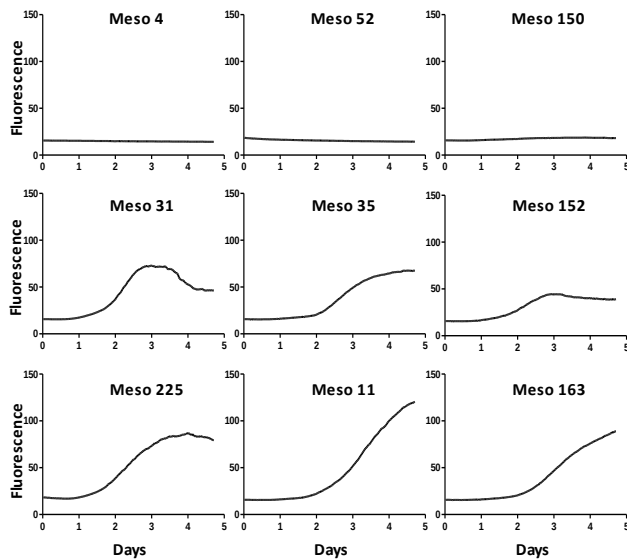
CONFLICTS OF INTEREST

J.F.F., M.G. and F.T own patents on the use of attenuated MV for antitumor virotherapy.

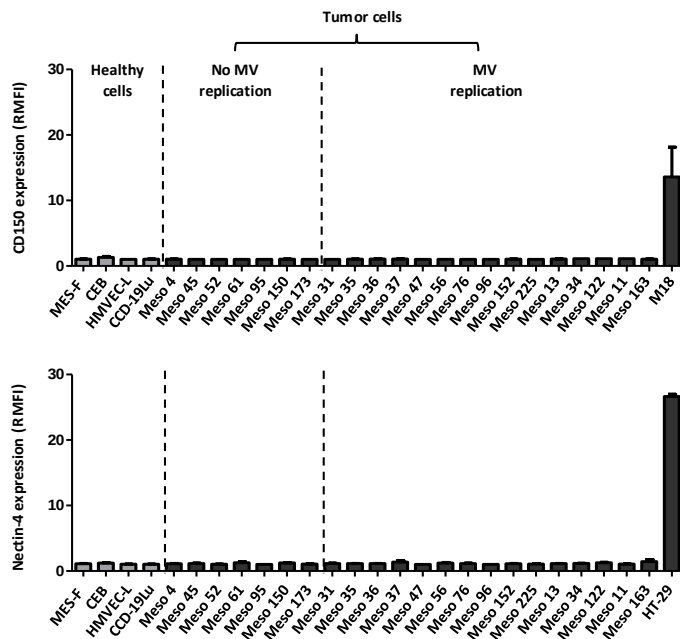
REFERENCES

1. Russell SJ, Peng KW and Bell JC. Oncolytic virotherapy. *Nat Biotechnol.* 2012; 30:658-670.
2. Guillerme JB, Gregoire M, Tangy F and Fonteneau JF. Antitumor virotherapy by attenuated measles virus (MV). *Biology (Basel).* 2013; 2:587-602.
3. Msaouel P, Iankov ID, Dispenzieri A and Galanis E. Attenuated oncolytic measles virus strains as cancer therapeutics. *Curr Pharm Biotechnol.* 2012; 13:1732-1741.
4. Heinzerling L, Kunzi V, Oberholzer PA, Kundig T, Naim H and Dummer R. Oncolytic measles virus in cutaneous T-cell lymphomas mounts antitumor immune responses *in vivo* and targets interferon-resistant tumor cells. *Blood.* 2005; 106:2287-2294.
5. Galanis E, Hartmann LC, Cliby WA, Long HJ, Peethambaram PP, Barrette BA, Kaur JS, Haluska PJ, Jr., Aderca I, Zollman PJ, Sloan JA, Keeney G, Atherton PJ, Podratz KC, Dowdy SC, Stanhope CR, et al. Phase I trial of intraperitoneal administration of an oncolytic measles virus strain engineered to express carcinoembryonic antigen for recurrent ovarian cancer. *Cancer Res.* 2010; 70:875-882.
6. Galanis E, Atherton PJ, Maurer MJ, Knutson KL, Dowdy SC, Cliby WA, Haluska P, Jr., Long HJ, Oberg A, Aderca I, Block MS, Bakkum-Gamez J, Federspiel MJ, Russell SJ, Kalli KR, Keeney G, et al. Oncolytic measles virus expressing the sodium iodide symporter to treat drug-resistant ovarian cancer. *Cancer Res.* 2015; 75:22-30.
7. Anderson BD, Nakamura T, Russell SJ and Peng KW. High CD46 receptor density determines preferential killing of tumor cells by oncolytic measles virus. *Cancer Res.* 2004; 64:4919-4926.
8. Dorig RE, Marciel A, Chopra A and Richardson CD. The human CD46 molecule is a receptor for measles virus (Edmonston strain). *Cell.* 1993; 75:295-305.
9. Nanche D, Varior-Krishnan G, Cervoni F, Wild TF, Rossi B, Rabourdin-Combe C and Gerlier D. Human membrane cofactor protein (CD46) acts as a cellular receptor for measles virus. *J Virol.* 1993; 67:6025-6032.
10. Liszewski MK and Atkinson JP. Membrane cofactor protein. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1992; 178:45-60.
11. Fishelson Z, Donin N, Zell S, Schultz S and Kirschfink M. Obstacles to cancer immunotherapy: expression of membrane complement regulatory proteins (mCRPs) in tumors. *Mol Immunol.* 2003; 40:109-123.
12. Ravindranath NM and Shuler C. Expression of complement restriction factors (CD46, CD55 & CD59) in head and neck squamous cell carcinomas. *J Oral Pathol Med.* 2006; 35:560-567.
13. Peng KW, TenEyck CJ, Galanis E, Kalli KR, Hartmann LC and Russell SJ. Intraperitoneal therapy of ovarian cancer using an engineered measles virus. *Cancer Res.* 2002; 62:4656-4662.
14. Muhlebach MD, Mateo M, Sinn PL, Prufer S, Uhlig KM, Leonard VH, Navaratnarajah CK, Frenzke M, Wong XX, Sawatsky B, Ramachandran S, McCray PB, Jr., Cichutek K, von Messling V, Lopez M and Cattaneo R. Adherens junction protein nectin-4 is the epithelial receptor for measles virus. *Nature.* 2011; 480:530-533.
15. Noyce RS, Bondre DG, Ha MN, Lin LT, Sisson G, Tsao MS and Richardson CD. Tumor cell marker PVRL4 (nectin 4) is an epithelial cell receptor for measles virus. *PLoS Pathog.* 2011; 7:e1002240.
16. Patel MR, Jacobson BA, Belgium H, Raza A, Sadiq A, Drees J, Wang H, Jay-Dixon J, Etchison R, Federspiel MJ, Russell SJ and Kratzke RA. Measles vaccine strains for virotherapy of non-small-cell lung carcinoma. *J Thorac Oncol.* 2014; 9:1101-1110.
17. Noll M, Berchtold S, Lampe J, Malek NP, Bitzer M and Lauer UM. Primary resistance phenomena to oncolytic measles vaccine viruses. *Int J Oncol.* 2013; 43:103-112.
18. Berchtold S, Lampe J, Weiland T, Smirnow I, Schleicher S, Handgretinger R, Kopp HG, Reiser J, Stubenrauch F, Mayer N, Malek NP, Bitzer M and Lauer UM. Innate immune defense defines susceptibility of sarcoma cells to measles vaccine virus-based oncolysis. *J Virol.* 2013; 87:3484-3501.
19. Schneider WM, Chevillotte MD and Rice CM. Interferon-stimulated genes: a complex web of host defenses. *Annu Rev Immunol.* 2014; 32:513-545.
20. Mitchell PS, Emerman M and Malik HS. An evolutionary

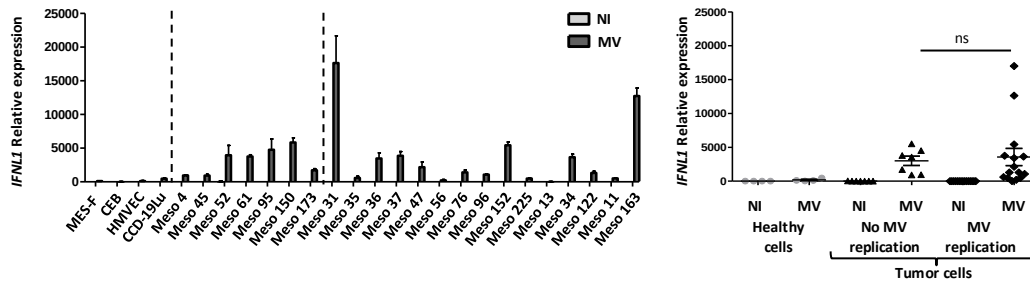
- perspective on the broad antiviral specificity of MxA. *Curr Opin Microbiol.* 2013; 16:493-499.
21. Gauvrit A, Brandler S, Sapede-Pero C, Boisgerault N, Tangy F and Gregoire M. Measles virus induces oncolysis of mesothelioma cells and allows dendritic cells to cross-prime tumor-specific CD8 response. *Cancer Res.* 2008; 68:4882-4892.
 22. Guillerme JB, Boisgerault N, Roulois D, Menager J, Combredet C, Tangy F, Fonteneau JF and Gregoire M. Measles virus vaccine-infected tumor cells induce tumor antigen cross-presentation by human plasmacytoid dendritic cells. *Clin Cancer Res.* 2013; 19:1147-1158.
 23. Gueugnon F, Leclercq S, Blanquart C, Sagan C, Cellierin L, Padiou M, Perigaud C, Scherpereel A and Gregoire M. Identification of novel markers for the diagnosis of malignant pleural mesothelioma. *Am J Pathol.* 2011; 178:1033-1042.
 24. Erlenhofer C, Duprex WP, Rima BK, ter Meulen V and Schneider-Schaulies J. Analysis of receptor (CD46, CD150) usage by measles virus. *J Gen Virol.* 2002; 83:1431-1436.
 25. Runge S, Sparrer KM, Lassig C, Hembach K, Baum A, Garcia-Sastre A, Soding J, Conzelmann KK and Hopfner KP. *in vivo* ligands of MDA5 and RIG-I in measles virus-infected cells. *PLoS Pathog.* 2014; 10:e1004081.
 26. Diamond MS, Kinder M, Matsushita H, Mashayekhi M, Dunn GP, Archambault JM, Lee H, Arthur CD, White JM, Kalinke U, Murphy KM and Schreiber RD. Type I interferon is selectively required by dendritic cells for immune rejection of tumors. *J Exp Med.* 2011; 208:1989-2003.
 27. Fuertes MB, Kacha AK, Kline J, Woo SR, Kranz DM, Murphy KM and Gajewski TF. Host type I IFN signals are required for antitumor CD8⁺ T cell responses through CD8 α ⁺ dendritic cells. *J Exp Med.* 2011; 208:2005-2016.
 28. Lenci RE, Bevier M, Brandt A, Bermejo JL, Sucker A, Moll I, Planelles D, Requena C, Nagore E, Hemminki K, Schadendorf D and Kumar R. Influence of genetic variants in type I interferon genes on melanoma survival and therapy. *PLoS One.* 2012; 7:e50692.
 29. Pavlovic J, Arzet HA, Hefti HP, Frese M, Rost D, Ernst B, Kolb E, Staeheli P and Haller O. Enhanced virus resistance of transgenic mice expressing the human MxA protein. *J Virol.* 1995; 69:4506-4510.
 30. Schneider-Schaulies S, Schneider-Schaulies J, Schuster A, Bayer M, Pavlovic J and ter Meulen V. Cell type-specific MxA-mediated inhibition of measles virus transcription in human brain cells. *J Virol.* 1994; 68:6910-6917.
 31. Schoggins JW, MacDuff DA, Imanaka N, Gainey MD, Shrestha B, Eitson JL, Mar KB, Richardson RB, Ratushny AV, Litvak V, Dabelic R, Manicassamy B, Aitchison JD, Aderem A, Elliott RM, Garcia-Sastre A, et al. Pan-viral specificity of IFN-induced genes reveals new roles for cGAS in innate immunity. *Nature.* 2014; 505:691-695.
 32. Schoggins JW, Wilson SJ, Panis M, Murphy MY, Jones CT, Bieniasz P and Rice CM. A diverse range of gene products are effectors of the type I interferon antiviral response. *Nature.* 2011; 472:481-485.
 33. Boisgerault N, Guillerme JB, Pouliquen D, Mesel-Lemoine M, Achard C, Combredet C, Fonteneau JF, Tangy F and Gregoire M. Natural oncolytic activity of live-attenuated measles virus against human lung and colorectal adenocarcinomas. *Biomed Int Res.* 2013; 2013:387362.
 34. Russell SJ, Federspiel MJ, Peng KW, Tong C, Dingli D, Morice WG, Lowe V, O'Connor MK, Kyle RA, Leung N, Buadi FK, Rajkumar SV, Gertz MA, Lacy MQ and Dispenzieri A. Remission of Disseminated Cancer After Systemic Oncolytic Virotherapy. *Mayo Clin Proc.* 2014; 89:926-933.
 35. Hackett TL, Warner SM, Stefanowicz D, Shaheen F, Pechkovsky DV, Murray LA, Argentieri R, Kicic A, Stick SM, Bai TR and Knight DA. Induction of epithelial-mesenchymal transition in primary airway epithelial cells from patients with asthma by transforming growth factor- β 1. *Am J Respir Crit Care Med.* 2009; 180:122-133.
 36. Combredet C, Labrousse V, Mollet L, Lorin C, Delebecque F, Hurtrel B, McClure H, Feinberg MB, Brahic M and Tangy F. A molecularly cloned Schwarz strain of measles virus vaccine induces strong immune responses in macaques and transgenic mice. *J Virol.* 2003; 77:11546-11554.



Supplemental figure 1. MV replication measured by time-lapse video microscopy. MPM cell lines were infected with MV-eGFP at MOI=1. Fluorescence microscopy video was performed with a picture taken every 30 minutes with a Leica DMI6000B microscope with a 10x objective. The fluorescence values correspond to the mean of GFP fluorescence measured per field. Results are expressed as the mean of four randomly selected fields.



Supplemental figure 2. MPM tumor cell lines and healthy cells do not express CD150 and nectin-4 at their surface. Expression of CD150 and nectin-4 was measured on the cell surface by flow cytometry. Melanoma M18 and colorectal adenocarcinoma HT29 tumor cells were used as positive controls for the expression of CD150 and nectin-4, respectively. The results are expressed as the RMFI mean $\pm$ SEM of three independent experiments.



Supplemental figure 3. The sensitivity to MV infection does not depend on defects of the antiviral type III IFN response. The expression of the gene *IFNL1* coding for IFN- λ 1, implicated in the antiviral type III IFN response, was analyzed by RT-qPCR 72h after MV infection of tumor and healthy cells (MOI=1). The expression is expressed as relative expression compared to *RPLPO* gene expression. Non-infected cells (NI) are in light gray and infected cells (MV) are in dark gray. A histogram shows the expression by each cell line, and a scatter plot shows the expression by groups (healthy cells, tumor cells with no MV replication, tumor cells with MV replication). Results are expressed as the mean $\pm$ SEM of three independent experiments. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$, one-way ANOVA (Kruskal-Wallis).

Article n°2 : Oncolytic measles virus induces TRAIL-mediated cytotoxicity by human myeloid and plasmacytoid dendritic cells

Carole Achard, Jean-Baptiste Guillaume, Nicolas Boisgerault, Chantal Combredet, Frédéric Tangy, Marc Grégoire and Jean-François Fonteneau.

Introduction : Le virus atténué de la rougeole (MV) est un virus oncolytique actuellement évalué dans des essais cliniques en tant qu'agent thérapeutique contre le cancer. Bien qu'à l'origine il soit considéré que l'efficacité du MV se base sur son activité lytique envers les cellules tumorales, il est désormais admis qu'elle repose également sur sa capacité à activer les cellules dendritiques (DC) permettant d'initier des réponses immunitaires anti-tumorales. En effet, le MV induit la mort immunogène des cellules tumorales, permettant d'activer la maturation des DC et leur capacité de présentation croisée d'antigènes de tumeur à des lymphocytes T CD8⁺. En plus de leur fonction de cellules présentatrices d'antigènes, les DC peuvent exercer une activité cytotoxique. Dans notre étude, nous avons analysé la capacité du MV à activer les fonctions cytotoxiques des DC.

Méthodes : Nous avons étudié la capacité du MV à induire l'acquisition de marqueurs de cytotoxicité par les DC myéloïdes CD1c⁺ et les DC plasmacytoïdes (pDC) du sang. Pour cela, nous avons analysé l'expression de TRAIL, du granzyme B et de la perforine par les DC en réponse au MV. Nous avons ensuite voulu identifier les senseurs du MV responsables de l'activation des DC en utilisant des inhibiteurs spécifiques des récepteurs cytoplasmiques RLR (RIG-I et Mda5) et du TLR7 présent dans le compartiment endolysosomal. Enfin, nous avons validé les fonctions cytotoxiques des DC activées par le MV envers les cellules cibles Jurkat sensibles à la lyse médiée par TRAIL.

Résultats : Nous montrons que le MV induit l'expression de TRAIL à la surface des DC CD1c⁺ et des pDC, de manière dépendante de leur sécrétion d'IFN- α en réponse au MV. Le MV induit la sécrétion de granzyme B par les pDC uniquement, tandis que la perforine n'est pas exprimée par les deux types de DC. Nous démontrons ensuite que dans les pDC, les voies de signalisation TLR7 et RLR sont activées par le MV, suite à la reconnaissance de l'ARN simple brin génomique ou d'intermédiaires réplicatifs. Cela provoque la sécrétion d'une importante quantité d'IFN- α qui induit l'expression de TRAIL. En revanche, dans les DC CD1c⁺, seuls les RLR sont impliqués, entraînant la production d'une plus faible quantité

d'IFN- α qui permet néanmoins l'expression de TRAIL à leur surface. Enfin, les DC CD1c⁺ et les pDC activées par le MV deviennent fonctionnellement cytotoxiques, capables d'induire la lyse médiée par TRAIL des cellules cibles Jurkat.

Conclusion : Nous montrons que le MV, détecté dans les DC myéloïdes et dans les pDC par différents senseurs, est capable d'activer leurs propriétés cytotoxiques via l'expression de TRAIL, dépendante de la sécrétion d'IFN- α . Ces DC cytotoxiques pourraient participer à l'éradication des cellules tumorales. D'autre part, la sécrétion d'IFN- α par les DC peut contribuer à l'établissement de réponses immunitaires anti-tumorales. Ainsi, en activant différentes fonctions anti-tumorales des DC, le MV représente un agent immunothérapeutique intéressant.

Oncolytic measles virus induces TRAIL-mediated cytotoxicity by human myeloid and plasmacytoid dendritic cells

Carole Achard^{1,2,3}, Jean-Baptiste Guillaume^{1,2,3}, Nicolas Boisgerault^{1,2,3}, Chantal Combredet⁴, Frédéric Tangy⁴, Marc Grégoire^{1,2,3} and Jean-François Fonteneau^{1, 2, 3}.

¹INSERM, UMR892, Institut de Recherche en Santé de l'Université de Nantes, France.

²CNRS, UMR6299, Institut de Recherche en Santé de l'Université de Nantes, France.

³Université de Nantes, Nantes, France.

⁴CNRS-UMR3569, Unité de Génomique Virale et Vaccination, Institut Pasteur, Paris, France.

Corresponding author: Dr. Jean-François Fonteneau,

INSERM UMR892, CNRS UMR6299, Institut de Recherche Thérapeutique de l'Université de Nantes, 8 quai Moncousu, BP70721, 44007 Nantes Cedex 1, France.

Tel: (+33)228080239, Fax: (+33)228080204, E-mail: jean-francois.fonteneau@inserm.fr

Conflict of interest: J.F.F., M.G. and F.T own patents on the use of attenuated MV for antitumor virotherapy.

Abstract

Attenuated measles virus (MV) is currently being evaluated in clinical trials as an oncolytic therapeutic agent against cancer. Originally based on its lytic activity against tumor cells, it is now admitted that the effectiveness of MV also lies in its ability to initiate antitumor immune responses through the activation of dendritic cells (DCs). In this study, we investigated the capacity of oncolytic MV to convert human blood myeloid CD1c⁺ DCs and plasmacytoid DCs (pDCs) into cytotoxic effectors. We found that MV induces the expression of the cytotoxic protein TRAIL on the surface of DCs. We demonstrate that the secretion of IFN- α by DCs in response to MV is responsible for the TRAIL expression. We then sought to identify the sensors involved in the detection of MV by these DCs, leading to the secretion of IFN- α and the subsequent TRAIL expression. We show that low amount of IFN- α , sufficient to induce TRAIL expression, is secreted by CD1c⁺ DCs after the recognition of the MV genome and replication intermediates by the RIG-I like receptors (RLRs). In pDCs, MV is recognized by the RLRs and also by the TLR7, which binds to the MV single-stranded RNA (ssRNA) independently of MV replication and leads to the secretion of high amount of IFN- α . Finally, we showed that MV-stimulated DCs induce the specific lysis of Jurkat cells sensitive to TRAIL-mediated death. Our results demonstrate that MV can activate cytotoxic myeloid CD1c⁺ DCs and pDCs, which may participate to the antitumor immune response.

Keywords

Oncolytic virus, measles virus, myeloid dendritic cells, plasmacytoid dendritic cells, type I interferon, TRAIL

Introduction

Among the viruses currently evaluated for their antitumor properties, attenuated strains of measles virus (MV) display a potent and spontaneous oncolytic activity against a wide variety of cancers [1, 2]. Indeed, MV Schwarz and Edmonston live-attenuated vaccine strains preferentially infect and kill tumor cells, since they often overexpress CD46, the major receptor for attenuated MV, and present defects in the antiviral innate immune response [3-5]. Phase I clinical trials using MV Edmonston were conducted against cutaneous T cell lymphoma [6], ovarian cancer [7, 8] and disseminated multiple myeloma [9], and encouraging clinical benefits were observed. Although the effectiveness of oncolytic viruses, including MV, was originally thought to be mainly based on their lytic activity against tumor cells, growing evidence now points out their ability to initiate systemic antitumor immune responses [8, 10, 11]. They are therefore considered as new immunotherapeutic agents against cancer [12].

Oncolytic MV can stimulate antitumor immune responses through its ability to stimulate dendritic cells (DCs) [13-15]. DCs are antigen presenting cells (APCs) that play a central role in the establishment of immune responses notably by inducing antigen-specific T cell responses [16]. In humans, numerous DC subsets have been characterized, based on their phenotype, localization and function [17]. In the blood, three main DC subsets are found: the myeloid CD141⁺ DCs and CD1c⁺ DCs, and the plasmacytoid dendritic cells (pDCs) that produce huge amounts of type I IFN in response to viruses in addition to display APC functions [18-20]. DCs are also able to exert cytotoxic activity after appropriate activation [21]. Indeed, the expression of the TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) protein on the surface of DCs elicits the death of target cells that express TRAIL receptors, such as tumor cells and infected cells [22-25]. It has been described that Mo-DCs (monocyte-derived DCs) infected with the wt (wild-type) strain of MV [26, 27], pDCs exposed to inactivated

influenza virus [28] or pDCs from HIV (human immunodeficiency virus)-infected patients [29, 30] express TRAIL after secreting IFN- α and are responsible for the lysis of TRAIL-sensitive cells. In addition, exposure of pDCs in vitro to TLR7/8 and TLR9 agonists endows them with a tumoricidal activity that rely on their TRAIL expression [28, 31, 32].

Several types of PRRs (pattern recognition receptors) are found in DCs, such as the ubiquitously expressed RLRs (RIG-I-like receptors) or the TLRs (Toll-like receptors) whose expression is more restricted. These receptors allow them to recognize invading pathogens [33]. Among the PRRs, the cytosolic RLRs RIG-I (retinoic acid-inducible gene I) and Mda5 (melanoma differentiation-associated protein 5) are able to recognize the MV ssRNA and its replication intermediates [34, 35]. After activation of these RLRs, the signal transduces through MAVS (mitochondrial antiviral signaling) proteins, allowing the activation of TBK-1 (TANK-binding kinase 1) and different IKKs (I κ B kinases, IKK- α , - β and - ϵ), responsible for the activation of the transcription factors IRF-3 and -7 (IFN regulatory factor) and NF- κ B (nuclear factor kappa-light-chain enhancer of activated B cells) [36]. These activated transcription factors lead to the expression of the genes encoding the type I IFN- α and - β , as well as other pro-inflammatory cytokines or antiviral proteins. MV can also stimulate directly pDCs that recognize the MV ssRNA through TLR7 in the endosomal/lysosomal compartment [15]. After the detection of viral ssRNA by TLR7, the MyD88 pathway induces the activation of NF- κ B and IRF-7 that leads to the secretion of large amounts of IFN- α [37].

We have previously shown that MV-infected tumor cells induce a strong IFN- α secretion by triggering TLR7 activation in pDCs [15]. Furthermore, wt MV is able to generate cytotoxic Mo-DCs [26]. Thus, in our study, we addressed in vitro the ability of MV Schwarz to induce cytotoxic functions in human blood pDCs and CD1c⁺ DCs. We show that after exposure to MV, pDCs and CD1c⁺ DCs secrete IFN- α , leading to the expression of TRAIL on their surface. We then analyzed the sensors potentially involved in the recognition of MV

in these DCs. We demonstrate that in pDCs, both TLR7 and RLRs pathways are activated and responsible for the secretion of high amounts of IFN- α and the subsequent expression of TRAIL, whereas in CD1c⁺ DCs, MV triggers only the RLRs signaling pathway that results in the production of a low amount of IFN- α which is still sufficient to induce TRAIL expression. We finally assessed the functional cytotoxic activity of the DCs against TRAIL-sensitive Jurkat cells. Our results show that pDCs and CD1c⁺ DCs activated by MV become efficient cytotoxic effectors that can cause lysis of TRAIL-sensitive cells.

Results

MV induces TRAIL expression and IFN- α secretion by pDCs and CD1c⁺ DCs

To determine whether MV is able to induce the expression of cytotoxic proteins by DCs, we exposed pDCs and CD1c⁺ DCs to the virus at a MOI (Multiplicity of infection) of 10 and assessed the expression of TRAIL, granzyme B and perforin. We also analyzed the expression of the maturation marker CD83 and the secretion of IFN- α . pDCs expressed CD83 and TRAIL on their surface after exposure to MV and IL-3, compared to the pDCs cultured with the survival factor IL-3 alone (Figure 1A). As previously reported [15], MV also induced the secretion of a large amount of IFN- α by pDCs (Figure 1A). Like pDCs, the myeloid CD1c⁺ DCs expressed CD83 and TRAIL after exposure to MV, but they secreted smaller amounts of IFN- α (Figure 1B). The two subsets of DCs responded differently to the TLR7 specific agonist R837. pDCs exposed to R837 expressed CD83, TRAIL and secreted IFN- α , although to a lesser extent than in response to MV (6-fold difference) (Figure 1A). In contrast, CD1c⁺ DCs exposed to R837 only expressed the maturation marker CD83 and totally failed to express TRAIL and to secrete IFN- α (Figure 1B). We also measured the expression of two other markers involved in the cytotoxic activity: granzyme B and perforin. Whereas neither pDCs nor CD1c⁺ DCs secreted perforin in response to MV and R837 (data not shown), granzyme B was secreted only by pDCs exposed to IL-3 or to MV in presence of IL-3 (Supplemental Figure 1).

In previous studies, we showed that oncolytic MV Schwarz induces immunogenic death of tumor cells, whereas UV irradiation induces a non-immunogenic cell death [13, 15]. We thus analyzed whether pDCs and CD1c⁺ DCs expressed TRAIL in response to MV-infected tumor cells compared to UV-irradiated tumor cells. We observed TRAIL expression by pDCs and CD1c⁺ DCs only when they are co-cultured with MV-infected tumor cells (Supplemental Figure 2).

TRAIL expression depends on IFN- α secreted by DCs exposed to MV

It is known that the gene encoding TRAIL is an interferon-stimulated gene (ISG) and different studies have shown that type I IFNs are required to induce TRAIL expression on DCs [38, 39]. Thus, we investigated whether TRAIL expression is affected by the pretreatment of pDCs and CD1c⁺ DCs with Ruxolitinib, an inhibitor of the Janus kinases JAK1 and 2 implicated in the IFNAR (IFN- α/β Receptor) signaling. The fraction of pDCs expressing TRAIL in response to MV or R837 was drastically reduced after pretreatment with Ruxolitinib (Figure 2A). Similarly, Ruxolitinib inhibited the expression of TRAIL on CD1c⁺ DCs exposed to MV (Figure 2B). We then confirmed that the addition of exogenous type I IFNs induced expression of TRAIL by pDCs and CD1c⁺ DCs (Figure 2C). Treatment of these two types of DCs with Ruxolitinib prior to type I IFN exposure prevented TRAIL expression (Figure 2C). These results indicate that MV is able to induce TRAIL expression on pDCs and CD1c⁺ DCs following the secretion of IFN- α .

MV induces IFN- α and TRAIL expression after RLR activation in CD1c⁺ DCs and RLR/TLR7 activation in pDCs

Next, we sought to identify the sensors involved in the recognition of MV in pDCs and CD1c⁺ DCs, leading to the secretion of IFN- α and the subsequent expression of TRAIL (Figure 3). We used two inhibitors: IRS661, a specific inhibitor of TLR7, and MRT67307, which inhibits the kinases TBK1 and IKK- ϵ that transduce the signal from the RLRs RIG-I and Mda5 [40]. Regarding the pDCs exposed to MV, pretreatment with IRS661 reduced the secretion of IFN- α by more than 20 folds (Figure 3A). However, the expression of TRAIL induced by MV was not modified by IRS661, certainly because the pDCs still secreted a significant amount of IFN- α . In contrast, IRS661 is able to completely prevent the IFN- α production and the TRAIL expression induced by the TLR7 agonist R837, suggesting that

MV is not detected only by TLR7 in pDCs but at least by one other sensor. Pretreatment of pDCs with MRT67307, before exposure to MV, resulted in an important reduction of IFN- α secretion (538,2 pg/mL compared to 57 689,5 pg/mL when pDCs are exposed to MV alone), associated with a smaller fraction of TRAIL⁺ pDCs (Figure 3A). Moreover, the addition of both IRS661 and MRT67307 almost completely inhibited the secretion of IFN- α and the expression of TRAIL on pDCs exposed to MV. These results show that two different types of sensors are involved in the recognition of MV RNA in pDCs, leading to the production of IFN- α and the expression of TRAIL: TLR7 and the cytosolic RLRs RIG-I and Mda5.

We also performed the same experiments on CD1c⁺ DCs. We observed that the pretreatment with the TLR7 inhibitor IRS661 hardly inhibited the secretion of IFN- α by CD1c⁺ DCs exposed to MV and did not affect their TRAIL expression (Figure 3B). These results suggest that TLR7 is barely implicated in the recognition of MV in CD1c⁺ DCs. Nevertheless, the RLRs inhibitor MRT67307 strongly reduced the secretion of IFN- α and the fraction of CD1c⁺ DCs that express TRAIL, but contrary to the pDCs, no synergy was observed between the two inhibitors IRS661 and MRT67307, compared to the MRT67307 alone. These observations revealed that CD1c⁺ DCs are able to detect MV RNA in their cytoplasm mainly through cytosolic RLRs to induce the secretion of IFN- α and TRAIL expression. We then used a UV-inactivated MV to confirm these results. Indeed, the UV irradiation impairs the replication of the virus and the formation of replication intermediates, thus inhibiting the recognition by the RLRs, but the UV-inactivated MV should be still recognized by TLR7 since viral replication is not required [41, 42]. UV-inactivated MV failed to induce IFN- α secretion and TRAIL expression by CD1c⁺ DCs (Figure 3B). This result confirmed that MV replication is necessary in CD1c⁺ DCs to induce IFN- α secretion and TRAIL expression through the RLRs pathway, since the TLR7 is not activated in response to UV-inactivated MV. In contrast, the UV-inactivated MV was still able to induce the secretion

of a high amount of IFN- α and TRAIL expression by pDCs through TLR7 activation, since IRS661 reduced the production of IFN- α in this condition (data not shown).

To confirm that the activation of cytosolic RLRs can lead to the generation of pDCs and CD1c⁺ DCs that secrete IFN- α and express TRAIL, we used two synthetic RLRs agonists, 5'-ppp-dsRNA LyoVec (5' triphosphate double-stranded RNA) and PolyI:C HMW LyoVec (PolyI:C High Molecular Weight LyoVec), which are recognized by RIG-I and Mda5, respectively. The cationic lipid transfection reagent LyoVec complexed with these agonists facilitates their uptake. We showed that these two agonists induced the secretion of IFN- α by pDCs and CD1c⁺ DCs, but at higher amounts for the pDCs, especially for 5'-ppp-dsRNA LyoVec (Figure 3C and D). The production of IFN- α was associated with the expression of TRAIL on DCs (Figure 3C and D). To ensure that this was due to the respective cytosolic RLRs, we pretreated the DCs with the specific inhibitor MRT67307. Regarding the pDCs exposed to the RLRs agonists, MRT67307 reduced the secretion of IFN- α compared to non-pretreated cells (Figure 3C). The decrease in TRAIL expression induced by MRT67307 was more evident on pDCs exposed to the PolyI:C HMW LyoVec than on pDCs exposed to 5'-ppp-dsRNA LyoVec, probably because the latter still expressed enough IFN- α to induce TRAIL expression. MRT67307 completely abolished the secretion of IFN- α by CD1c⁺ DCs activated by the RLRs agonists, and the fraction of CD1c⁺ DCs expressing TRAIL was significantly reduced, about 4-fold decrease for the CD1c⁺ DCs stimulated with 5'-ppp-dsRNA LyoVec and 5-fold decrease for those stimulated with PolyI:C HMW LyoVec (Figure 3D).

Together, these results demonstrate that MV is detected in DCs through two distinct pathways. We show that the secretion of IFN- α and the subsequent TRAIL expression depend on the recognition of MV by TLR7 and the cytosolic RLRs in pDCs, whereas only the RLRs are involved in CD1c⁺ DCs.

DCs activated with MV acquire a functional cytotoxic activity

To further characterize the cytotoxic activity of the TRAIL⁺ DCs, we performed a cytotoxic assay with Jurkat cells as target cells, as they express the TRAIL receptor DR5 (death receptor 5) and are sensitive to TRAIL-dependent cell death [31].

At an effector:target ratio of 20:1, we detected that 18,1% of Jurkat cells were specifically lysed by pDCs exposed to MV (Figure 4A). This specific lysis was reduced when pDCs were pretreated with MRT67307, a combination of MRT67307 and IRS661, or Ruxolitinib, but not when pDCs were pretreated with IRS661 alone. Thus, the specific lysis of Jurkat cells by pDCs correlated with their TRAIL expression (Figures 2A, 3A and 4A). After stimulation with the TLR7 agonist R837, the pDCs were able to lyse 21% of Jurkat cells. Moreover, pDCs acquired a functional cytotoxic activity against Jurkat cells after activation with exogenous type I IFN or the RIG-I agonist 5'-ppp-dsRNA LyoVec, which was abolished by the specific inhibitors Ruxolitinib and MRT67307, respectively.

The CD1c⁺ DCs were also able to kill Jurkat cells after exposure to MV (15% of specific lysis), and this ability was reduced by the different inhibitors (Figure 4B). Like the expression of TRAIL, the specific lysis of Jurkat cells was affected by the RLR signaling inhibitor MRT67307, but not by the TLR7 inhibitor IRS661 (Figure 3B and 4B). As expected, the UV-inactivated MV, as well as R837, did not generate functional cytotoxic CD1c⁺ DCs (Figure 4B). However, like for pDCs, exogenous type I IFN and 5'-ppp-dsRNA LyoVec induce cytotoxic CD1c⁺ DCs and this ability was almost lost when these DCs were pretreated with the specific inhibitors Ruxolitinib or MRT67307, respectively. These results match those of TRAIL expression (Figures 2C and 3D).

Discussion

Several studies show that DCs can become cytotoxic after stimulation by viruses, especially RNA viruses, or with different TLRs agonists [21]. This phenomenon has been described more extensively for the pDC subset. In this study, we showed that oncolytic MV induces the expression of the pro-apoptotic protein TRAIL on human blood myeloid CD1c⁺ DCs and pDCs. We also determined that MV induces the secretion of large amounts of IFN- α by pDCs, whereas CD1c⁺ DCs secrete this cytokine in lower quantities. We then demonstrated, using the type I IFN-signaling inhibitor Ruxolitinib, that the IFN- α secreted by both subsets of DCs in response to MV is involved in TRAIL expression. We showed that the IFN- α secretion and the subsequent TRAIL expression are triggered by the detection of MV by the cytosolic RLRs in CD1c⁺ DCs, whereas in pDCs both RLR and TLR7 signaling pathways are involved.

Our results are consistent with other works, showing that TRAIL expression on Mo-DCs and pDCs depends on IFN- α secretion induced by their stimulation [27, 28, 30, 31]. However, one study revealed that TRAIL can also be rapidly expressed on pDCs after a TLR7 stimulation, following STAT1 phosphorylation and independently of their IFN- α secretion [43].

Several studies were conducted to identify which signaling pathway is involved in the detection of RNA viruses and the subsequent activation of plasmacytoid and myeloid DCs. Experiments have been performed using DCs from mice deficient for different components of the RLR pathway such as RIG-I [44], TBK-1 and IKK- ϵ [45] or MAVS [46], and from mice deficient for TLR7 or MyD88, which is involved in the TLR7 signaling pathway [44]. Together, these reports suggest that the RLR pathway is exploited by myeloid DCs to recognize and respond to RNA viruses, whereas pDCs respond exclusively through TLR7. pDCs are known to be specialized in the antiviral immune responses as they are the most

important source of type I IFN in response to viruses through TLR7 and TLR9 [47]. However, the model based only on the TLR7-sensing of RNA viruses in pDCs has been reconsidered. Indeed, in their study, Kato et al. [44] noted that IFN- α secretion by NDV (Newcastle disease virus)-stimulated pDCs from MyD88-deficient mice is impaired, but not completely abrogated. This suggests that another pathway, potentially involving RIG-I, may contribute to type I IFN response to RNA viruses in pDCs. Hornung and collaborators demonstrated that single-stranded RNA viruses such as paramyxoviruses, entering pDCs via cell fusion, are able to induce a replication-dependent IFN- α secretion independently of TLR7 detection [48]. Moreover, a recent study highlighted the involvement of the RLR signaling in pDCs responding to the yellow fever live vaccine YF-17D, which is a positive-sense RNA virus [49]. The authors demonstrated that this virus is able to stimulate either the TLR7 or the RIG-I signaling pathway in pDCs, depending on how it enters the cells. In this model, free viral particles stimulate RIG-I in a replication-dependent manner, whereas the TLR7-dependent IFN- α secretion is triggered by the contact between pDCs and virus-infected cells. The authors performed gene-silencing experiments on Gen2.2 cells, a leukemic pDC cell line which shares phenotypic and functional features with normal pDCs [28], to severely reduce either the expression of TLR7 or RIG-I and thus confirmed the results obtained with specific inhibitors of these signaling pathways. In our study, we showed that MV activates the RLR pathway in addition to TLR7 in pDCs, since the specific inhibition of TLR7 with IRS661 alone is not sufficient to abrogate the secretion of IFN- α and the expression of TRAIL, which require the use of specific inhibitors of both the TLR7 and RLR signaling pathways.

As the TLR and the RLR signaling pathways are supposed to be distinct, we did not expect to obtain such an important reduction of IFN- α secretion and TRAIL expression on pDCs following pretreatment with the RLR inhibitor MRT67307 alone, which inhibits the kinases TBK1 and IKK- ϵ . However, a study shows that the specific TLR7 agonist R837

induces the activation of TBK1 through its phosphorylation in bone marrow-derived macrophages (BMDMs), suggesting that a TLR agonist that engages MyD88 can activate an IKK-related kinase [50]. Furthermore, two reports simultaneously demonstrated that the protein TRAF3 (TNF receptor-associated factor 3), which links TLR adaptor proteins to downstream kinases and thus leads to the activation of TBK1 and IKK- ϵ , is involved in the TLR7-dependent type I IFN production in pDCs [51] and in BMDMs [52]. It is thus possible that MRT67307 inhibited not only the RLR signaling but also partly the TLR7 signaling.

Regarding the CD1c⁺ DCs, we found that only the RLR pathway is involved in the secretion of IFN- α and the expression of TRAIL in response to MV. There is a controversy concerning the expression of TLR7 by CD1c⁺ DCs, with some reports indicating that these DCs express it [53-55], although at a much lower level than pDCs, whereas others studies show an expression restricted to pDCs [56, 57]. Even if we show here that R837 induces the expression of the maturation marker CD83 by CD1c⁺ DCs, suggesting that they express TLR7, this TLR7 agonist fails to trigger the production of IFN- α and thus TRAIL expression. This absence of IFN- α secretion may be explained by the low expression of both TLR7 and the transcription factor IRF-7 by myeloid dendritic cells compared to pDCs [58-61], the latter being constitutively express at a high level in pDCs which are specialized in the production of high amount of type I IFN. We confirmed the involvement of the RLR pathway in CD1c⁺ DCs in response to MV by using a UV-irradiated MV, whose replication is impaired and fails to induce neither the secretion of IFN- α nor the expression of TRAIL. In addition to impairing the formation of replication intermediates, the UV-irradiation might affect the structure of the MV genome and thus prevent its direct recognition by RIG-I [62]. However, UV-irradiated MV is still recognized by TLR7 in pDCs, since viral replication is not required for the TLR7 recognition. This has been also shown with UV-irradiated MV [41], Sendai virus and

influenza virus [42], even though they do not induce an IFN- α secretion similar to their living counterparts, except for UV-irradiated MV.

Our results, showing that the RLR pathway is involved in the recognition of MV in pDCs and CD1c⁺ DCs, are consistent with other reports indicating that attenuated strains of MV efficiently infect and replicate in Mo-DCs [41, 63] as well as in pDCs [41, 64, 65]. MV genomes as well as replication intermediates are therefore susceptible to be recognized by RIG-I and Mda5 in the cytoplasm. MV also induces the secretion of type I IFN by MoDCs [27], PBMCs [64, 66] and pDCs [64]. In pDCs, cytosolic viral RNA of certain ssRNA viruses can access endosomal and lysosomal compartments, in which TLR7 is located, by the process of autophagy [42]. As it is described that attenuated strains of MV induce a CD46-dependent autophagy [67] and as pDCs express CD46 [41], this phenomenon could explain how TLR7 detects MV RNA and replication intermediates in these cells.

In our study, we demonstrated that the expression of TRAIL, induced by MV on DCs, renders them functionally cytotoxic against Jurkat cells, which are described as sensitive to TRAIL-mediated death [31, 32, 68]. Even though we measured granzyme B secretion by pDCs stimulated by MV, we did not assess the effect of this protein secreted alone without perforin. However, more and more studies showed that granzyme B can have antitumor functions [69] and can also facilitate the cytotoxic lymphocytes transmigration by remodeling the extracellular matrix [70]. Contrary to the study that identified cytotoxic myeloid CD11c⁺ DCs, which express perforin and granzyme B after stimulation with a TLR7/8 ligand [68], none of these proteins are expressed nor secreted by CD1c⁺ DCs exposed to MV.

Activation of DC cytotoxic functions in vitro reveals new therapeutics opportunity for the treatment of cancers. Moreover, it is admitted that tumor cells are sensitive to TRAIL-mediated death whereas healthy cells are not [71]. In a mouse melanoma model, topical application of Aldara® cream, containing the TLR7 ligand imiquimod, leads to the

recruitment of pDCs at the tumor site and correlates with partial or complete regression of tumors [72]. Recently, the mechanism of action was uncovered, explaining how pDCs convert into antitumor cytotoxic effectors through the expression of TRAIL and the pro-apoptotic protein granzyme B [73]. In the same way, treatment of basal cell carcinoma patients with Aldara® cream leads to partial or complete regression of the lesions, accompanied by an inflammatory infiltrate containing cytotoxic pDCs and myeloid CD11c⁺ DCs [68]. Together, these reports suggest that the induction of cytotoxic DCs with a TLR7 agonist is favorable to obtain tumor regression and our results suggest that it can be also achieved with oncolytic MV.

In addition to induce functional cytotoxic DCs, oncolytic MV is able to trigger the immunogenic death of tumor cells, which activates the maturation of DCs and their ability to cross-present tumor antigens [8, 13-15, 74]. Moreover, MV also induces the secretion of IFN- α by DCs, especially by pDCs, which contributes to elicit antitumor immune responses and correlates with favorable disease outcomes [75]. The type I IFN secreted in the tumor environment could also sensitize tumor cells to TRAIL-mediated lysis [28, 76]. Thus, oncolytic MV represents a potent immunotherapeutic agent which activates diverse antitumor properties of the DCs that may participate to tumor cell eradication.

Figures

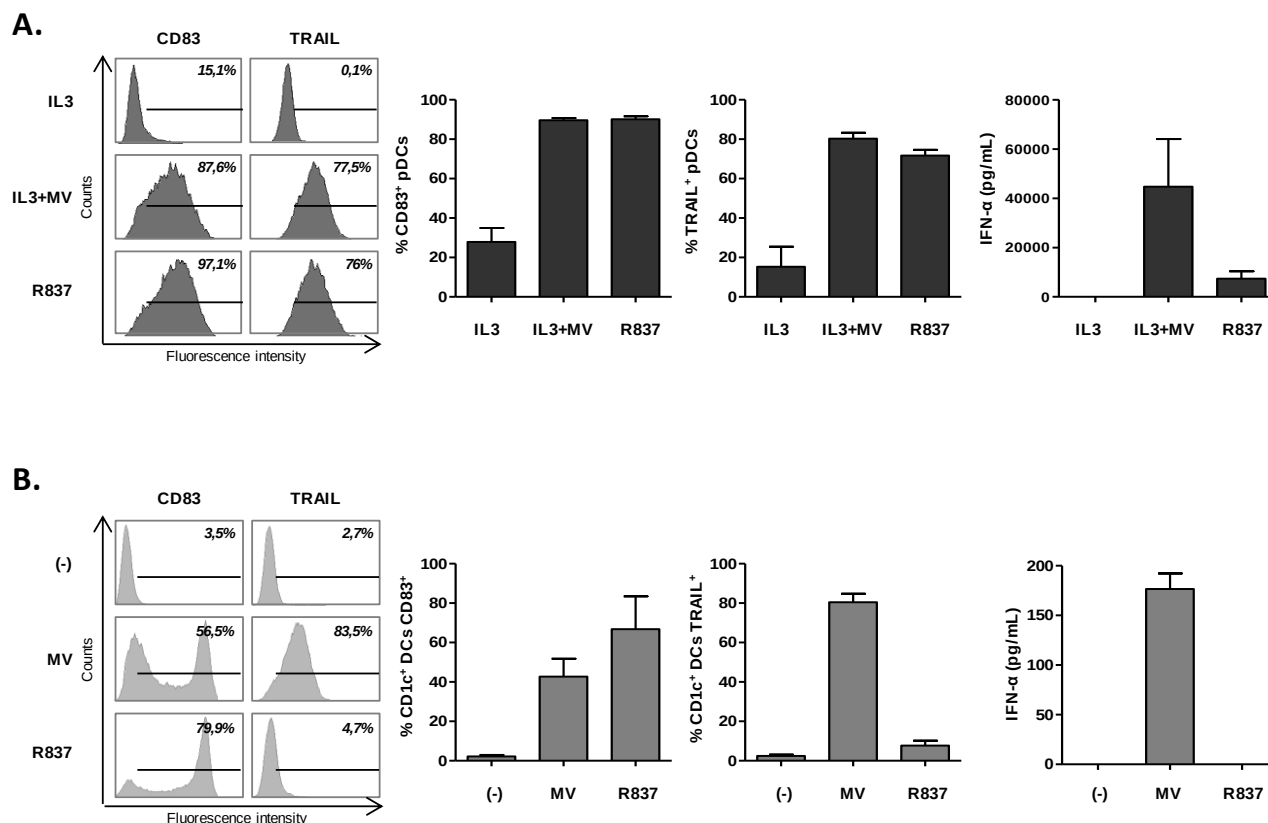


Figure 1: MV induces TRAIL expression and IFN- α secretion by pDCs and CD1c⁺ DCs

MV induces TRAIL expression and IFN- α secretion by pDCs and CD1c⁺ DCs. pDCs were cultured with IL3, IL3+MV or the TLR7 agonist R837 (A). CD1c⁺ DCs were cultured alone (-), with MV or R837 (B). The percentage of DCs expressing CD83 or TRAIL on their surface was determined by flow cytometry. IFN- α secretion was measured by ELISA. Results are expressed as the mean $\pm$ SEM of three independent experiments.

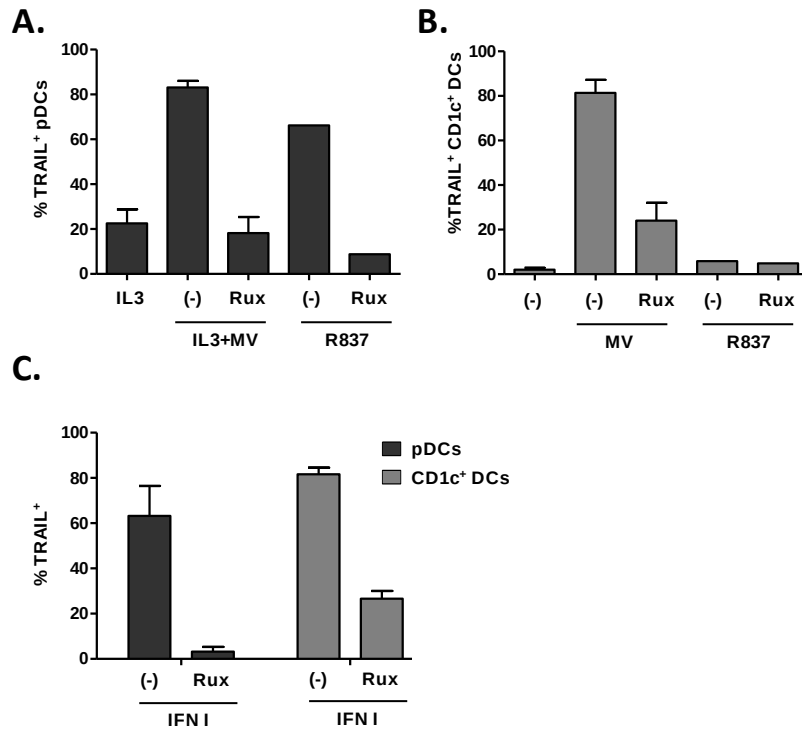


Figure 2: TRAIL expression depends on IFN- α secreted by DCs exposed to MV

pDCs (A) and CD1c⁺ DCs (B) were pretreated or not with Ruxolitinib (Rux) before exposure to IL3+MV or MV respectively, or before exposure to R837. The percentage of DCs expressing TRAIL on their surface was determined by flow cytometry. (C) pDCs and CD1c⁺ DCs were pretreated or not with Rux before exposure to type I IFN (rhIFN- α -2a and rhIFN- β -1a). The percentage of DCs expressing TRAIL on their surface was determined by flow cytometry. Results are expressed as the mean $\pm$ SEM of three independent experiments.

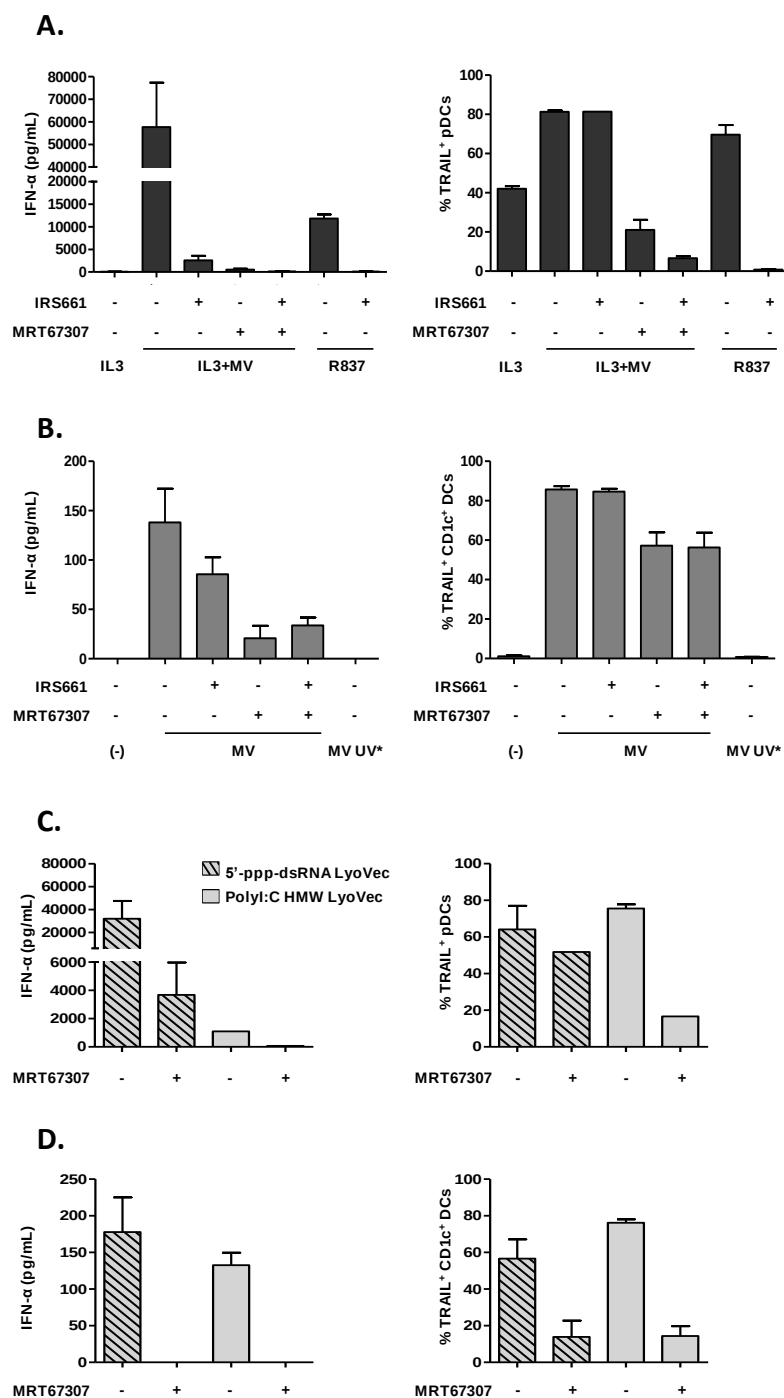


Figure 3: MV induces IFN- α and TRAIL expression after RLR activation in CD1c+ DCs and RLR/TLR7 activation in pDCs

(A) pDCs were pretreated or not with IRS661 (TLR7 inhibitor) or with MRT67307 (RLR inhibitor) and then cultured with IL3, IL3+MV or with R837. IFN- α secretion was measured by ELISA and the percentage of pDCs expressing TRAIL on their surface was determined by flow cytometry. (B) CD1c+ DCs were pretreated or not with IRS661 or with MRT67307 and then cultured alone, with MV, or UV-inactivated MV (MV UV). IFN- α secretion was measured by ELISA and the percentage of CD1c+ DCs expressing TRAIL on their surface was determined by flow cytometry. pDCs (C) and CD1c+ DCs (D) were pretreated or not with MRT67307 and then exposed either to 5'-ppp-dsRNA LyoVec, a RIG-I agonist, or to PolyI:C HMW LyoVec, a Mda5 agonist. IFN- α secretion was measured by ELISA and the percentage of DCs expressing TRAIL on their surface was determined by flow cytometry. Results are expressed as the mean $\pm$ SEM of three independent experiments.

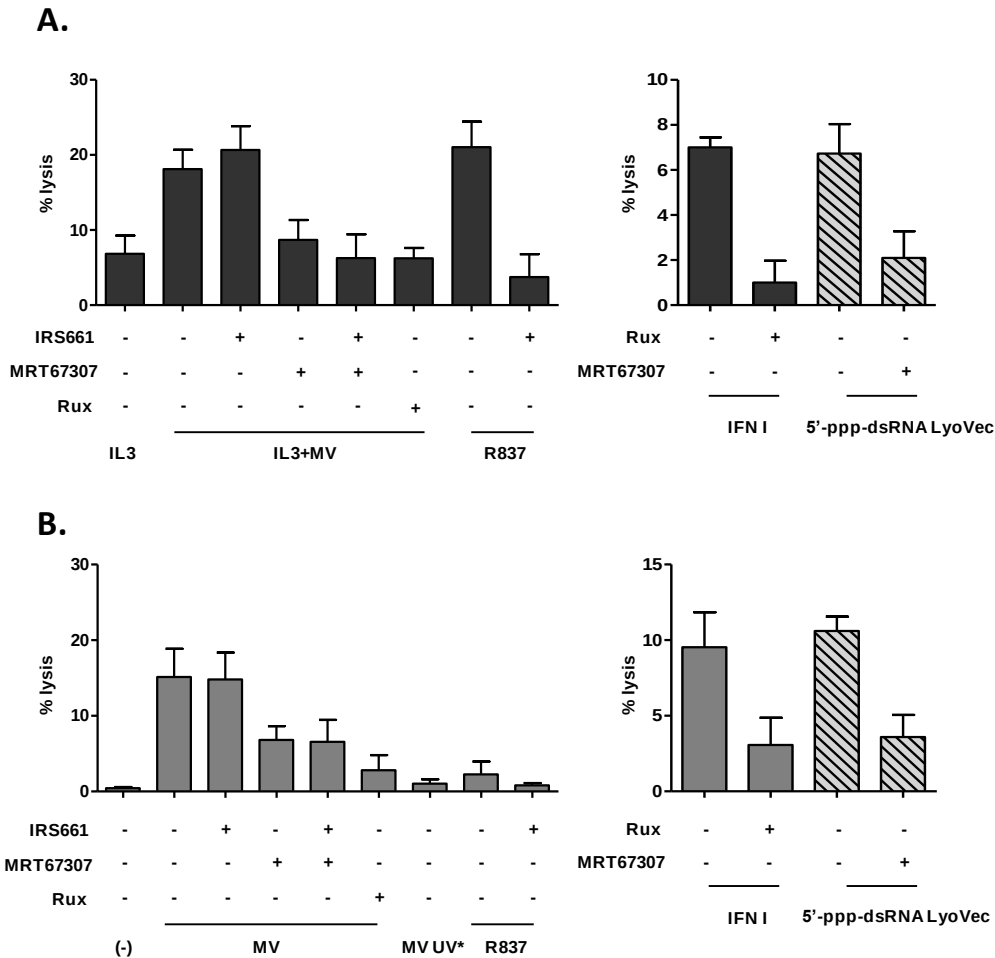
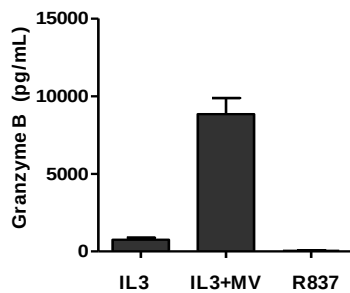


Figure 4: DCs activated with MV acquire a functional cytotoxic activity

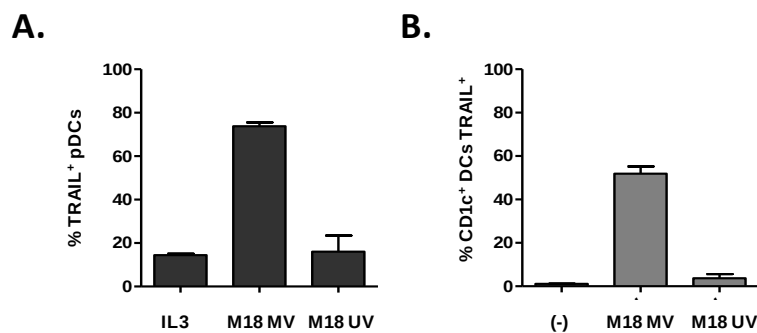
(A) pDCs were pretreated or not with IRS661, MRT67307 or Rux and then cultured with IL3+MV, R837, type I IFN (rhIFN- α -2a and rhIFN- β -1a) or 5'-ppp-dsRNA LyoVec. They were then added to the target Jurkat cells at an E:T of 20:1. The percentage of specific lysis of Jurkat cells was determined by the measure of 51Cr release in the supernatants. (B) CD1c⁺ DCs were pretreated or not with IRS661, MRT67307 or Rux and then cultured with MV, UV-inactivated MV, R837, type I IFN (rhIFN- α -2a and rhIFN- β -1a) or 5'-ppp-dsRNA LyoVec. They were then added to the target Jurkat cells at an E:T of 20:1 and the percentage of specific lysis of Jurkat cells was determined by the measure of 51Cr release in the supernatants. Results are expressed as mean $\pm$ SEM of at least three independent experiments and each condition was assessed in triplicates.

Supplemental figures



Supplemental figure 1: MV induces granzyme B secretion by pDCs

pDCs were cultured with IL3, IL3+MV or the TLR7 agonist R837. Granzyme B secretion was measured by ELISA. Results are expressed as the mean $\pm$ SEM of three independent experiments



Supplemental figure 2: MV-infected tumor cells induce TRAIL expression on pDCs and CD1c+ DCs

pDCs were cultured with IL3 or with MV-infected or UV-irradiated melanoma cells M18 (A). CD1c⁺ DCs were cultured alone or with MV-infected or UV-irradiated melanoma cells M18 (B). The percentage of DCs expressing TRAIL on their surface was determined by flow cytometry. Results are expressed as the mean $\pm$ SEM of three independent experiments.

Materials and Methods

Dendritic cell isolation

Platelet apheresis residues from healthy donors were provided by the Etablissement Français du Sang of Nantes. The dendritic cells (DCs) were obtained from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), as previously described [77]. Briefly, DCs were enriched by counterflow centrifugation elutriation and then purified, using a human pan-DC pre-enrichment kit (Stemcell Technologies) as recommended by the manufacturer, which consists in an immunomagnetic negative isolation of DCs. Among the cells obtained, pDCs were stained with an APC-conjugated anti-BDCA-4 mAb (Miltenyi) and CD1c⁺ DCs with a FITC-conjugated anti-CD1c mAb (eBiosciences) to sort them by flow cytometry (FACS Aria III, BD Biosciences). To improve the cell sorting, BV421-conjugated anti-CD3, anti-CD19 and anti-CD14 mAbs (BD Biosciences) were also used for the staining.

Dendritic cell culture

DCs were cultured in RPMI-1640 medium supplemented with 2% human albumin, 100U/mL penicillin, 100µg/mL streptomycin and 2mM L-glutamine (all reagents were from Gibco-Invitrogen) at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere for 16 hours. 100,000 DCs were seeded in 96-well plates in a final volume of 200µL. CD1c⁺ DCs were cultured alone or with the live-attenuated Schwarz strain of measles virus (MV) at an MOI (multiplicity of infection) of 10. pDCs were cultured with the survival factor IL3 alone (rhIL3, 20ng/mL, CellGenix) or with IL3 and MV (MOI=10). MV is produced and purified as previously described [78]. MV was inactivated by irradiation with UV-B (312 nm) during 10 minutes (Bio-Link, Vilber Lourmat). DCs were also cultivated with the TLR7 agonist R837 (1µg/mL, Invivogen), exogenous type I IFN (rhIFN- α -2a and rhIFN- β -1a, 100ng/mL, ImmunoTools), the RIG-I agonist 5'-ppp-dsRNA LyoVec (10µg/mL, Invivogen) or with the Mda5 agonist

PolyI:C High Molecular Weight (HMW) LyoVec (0,1µg/mL, Invivogen). For the inhibition experiments of TLR7, TBK1 and IKK-ε (RLRs signaling pathway), or JAK 1 and 2 (IFNAR signaling), DCs were pretreated for 30 minutes with a specific immunoregulatory DNA sequence IRS661 (1µM, Eurofins), MRT67307 (8µM, Sigma Aldrich) or Ruxolitinib (2,5µM, Invivogen), respectively. After the pretreatment, the agonists were added to the cultures.

Flow cytometry

To determine the expression of CD83 and TRAIL on DCs, we stained them with a PE-Cy7-conjugated anti-CD83 mAb (BD Biosciences) and a PE-conjugated anti-TRAIL mAb (Biolegend). Results are presented as the percentage of DCs expressing the different markers compared to DCs stained with the corresponding isotypes. The analysis was performed on live cells which were Zombie NIRTM negative (Biolegend), BDCA-4+ for the pDCs and CD1c+ for the CD1c+ DCs. Fluorescence was analyzed with a FACS Canto II (BD Biosciences) using the BD FACSDivaTM software.

Cytokine detection

IFN-α production was measured by ELISA (Mabtech) according to the manufacturer's instructions. Supernatants of pDCs and CD1c+ DCs were collected after their culture during 16 hours. ELISA were performed directly without freezing supernatants.

Cytotoxicity assay

Jurkat cells were cultured in RPMI-1640 medium supplemented with 10% fetal calf serum, 100U/mL penicillin, 100µg/mL streptomycin and 2mM L-glutamine (all reagents were from Gibco-Invitrogen) at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. The cytotoxicity assay was performed with this medium. Target Jurkat cells were incubated during 1 hour with Na²⁵¹CrO₄

at 37°C and then washed with culture medium. 1,000 ⁵¹Cr-labeled target cells per well were seeded in 96-well plates and the effector cells (DCs) were added at an effector to target (E:T) ratio of 20:1, in triplicates. After 4 hours of incubation at 37°C, 25µL of supernatant were harvested and mixed with 100µL of the scintillation liquid cocktail (OptiPhase Supermix, PerkinElmer). The ⁵¹Cr released in supernatants was measured using the MicroBeta® plate-based counter (PerkinElmer). The percentage of specific lysis was calculated as follows: $[(ES - SR) / (MR - SR)] \times 100$, where ES, SR and MR correspond to experimental, spontaneous and maximum ⁵¹Cr release, respectively. SR was calculated from target cells incubated with culture medium alone and MR corresponds to the ⁵¹Cr released by target cells lysed with culture medium containing 5% Triton X-100. Neither MV nor the different reagents used to activate the DCs affect the SR.

Acknowledgments

We thank Delphine Coulais and Anne-Claire Branchu for their technical assistance and the Platform of Clinical Transfer and Development facility for the dendritic cells. We also thank Juliette Desfrancois-Noël, Nadège Marec and the core facility of flow cytometry (Cytocell). This work was supported by “La Ligue Régionale Grand Ouest contre le Cancer” (CSIRGO: CD16, CD22, CD44, CD49, CD72, CD79 and CD85), “La Ligue Nationale contre le Cancer”, “ARSMESO44 association”, “La Fondation du Souffle et le Fonds de Dotation Recherche en Santé Respiratoire”, and “la Fondation pour la Recherche Médicale (FRM)”.

References

1. Msaouel, P., M. Opyrchal, E. Domingo Musibay, and E. Galanis, Oncolytic measles virus strains as novel anticancer agents. *Expert Opin Biol Ther*, 2013. 13(4): p. 483-502.
2. Guillaume, J.B., M. Gregoire, F. Tangy, and J.F. Fonteneau, Antitumor Virotherapy by Attenuated Measles Virus (MV). *Biology (Basel)*, 2013. 2(2): p. 587-602.
3. Fishelson, Z., N. Donin, S. Zell, S. Schultz, and M. Kirschfink, Obstacles to cancer immunotherapy: expression of membrane complement regulatory proteins (mCRPs) in tumors. *Mol Immunol*, 2003. 40(2-4): p. 109-23.
4. Anderson, B.D., T. Nakamura, S.J. Russell, and K.W. Peng, High CD46 receptor density determines preferential killing of tumor cells by oncolytic measles virus. *Cancer Res*, 2004. 64(14): p. 4919-26.
5. Achard, C., N. Boisgerault, T. Delaunay, D. Roulois, S. Nedellec, P.J. Royer, M. Pain, C. Combredet, M. Mesel-Lemoine, L. Cellerin, A. Magnan, F. Tangy, M. Gregoire, and J.F. Fonteneau, Sensitivity of human pleural mesothelioma to oncolytic measles virus depends on defects of the type I interferon response. *Oncotarget*, 2015.
6. Heinzerling, L., V. Kunzi, P.A. Oberholzer, T. Kundig, H. Naim, and R. Dummer, Oncolytic measles virus in cutaneous T-cell lymphomas mounts antitumor immune responses in vivo and targets interferon-resistant tumor cells. *Blood*, 2005. 106(7): p. 2287-94.
7. Galanis, E., L.C. Hartmann, W.A. Cliby, H.J. Long, P.P. Peethambaram, B.A. Barrette, J.S. Kaur, P.J. Haluska, Jr., I. Aderca, P.J. Zollman, J.A. Sloan, G. Keeney, P.J. Atherton, K.C. Podratz, S.C. Dowdy, et al., Phase I trial of intraperitoneal administration of an oncolytic measles virus strain engineered to express carcinoembryonic antigen for recurrent ovarian cancer. *Cancer Res*, 2010. 70(3): p. 875-82.
8. Galanis, E., P.J. Atherton, M.J. Maurer, K.L. Knutson, S.C. Dowdy, W.A. Cliby, P. Haluska, Jr., H.J. Long, A. Oberg, I. Aderca, M.S. Block, J. Bakkum-Gamez, M.J. Federspiel, S.J. Russell, K.R. Kalli, et al., Oncolytic measles virus expressing the sodium iodide symporter to treat drug-resistant ovarian cancer. *Cancer Res*, 2015. 75(1): p. 22-30.
9. Russell, S.J., M.J. Federspiel, K.W. Peng, C. Tong, D. Dingli, W.G. Morice, V. Lowe, M.K. O'Connor, R.A. Kyle, N. Leung, F.K. Buadi, S.V. Rajkumar, M.A. Gertz, M.Q. Lacy, and A. Dispenzieri, Remission of disseminated cancer after systemic oncolytic virotherapy. *Mayo Clin Proc*, 2014. 89(7): p. 926-33.

- 10.** Prestwich, R.J., K.J. Harrington, R.G. Vile, and A.A. Melcher, Immunotherapeutic potential of oncolytic virotherapy. *Lancet Oncol*, 2008. 9(7): p. 610-2.
- 11.** Lichty, B.D., C.J. Breitbach, D.F. Stojdl, and J.C. Bell, Going viral with cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*, 2014. 14(8): p. 559-67.
- 12.** Fonteneau, J.F., C. Achard, C. Zaupa, J. Foloppe, and P. Erbs, Oncolytic immunotherapy: the new clinical outbreak. *Oncoimmunology*, 2016. 5(1).
- 13.** Gauvrit, A., S. Brandler, C. Sapede-Peroz, N. Boisgerault, F. Tangy, and M. Gregoire, Measles virus induces oncolysis of mesothelioma cells and allows dendritic cells to cross-prime tumor-specific CD8 response. *Cancer Res*, 2008. 68(12): p. 4882-92.
- 14.** Donnelly, O.G., F. Errington-Mais, L. Steele, E. Hadac, V. Jennings, K. Scott, H. Peach, R.M. Phillips, J. Bond, H. Pandha, K. Harrington, R. Vile, S. Russell, P. Selby, and A.A. Melcher, Measles virus causes immunogenic cell death in human melanoma. *Gene Ther*, 2013. 20(1): p. 7-15.
- 15.** Guillerme, J.B., N. Boisgerault, D. Roulois, J. Menager, C. Combredet, F. Tangy, J.F. Fonteneau, and M. Gregoire, Measles virus vaccine-infected tumor cells induce tumor antigen cross-presentation by human plasmacytoid dendritic cells. *Clin Cancer Res*, 2013. 19(5): p. 1147-58.
- 16.** Banchereau, J. and R.M. Steinman, Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*, 1998. 392(6673): p. 245-52.
- 17.** Durand, M. and E. Segura, The known unknowns of the human dendritic cell network. *Front Immunol*, 2015. 6: p. 129.
- 18.** Ziegler-Heitbrock, L., P. Ancuta, S. Crowe, M. Dalod, V. Grau, D.N. Hart, P.J. Leenen, Y.J. Liu, G. MacPherson, G.J. Randolph, J. Scherberich, J. Schmitz, K. Shortman, S. Sozzani, H. Strobl, et al., Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood*, 2010. 116(16): p. e74-80.
- 19.** Dzionek, A., A. Fuchs, P. Schmidt, S. Cremer, M. Zysk, S. Miltenyi, D.W. Buck, and J. Schmitz, BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood. *J Immunol*, 2000. 165(11): p. 6037-46.
- 20.** Gilliet, M., W. Cao, and Y.J. Liu, Plasmacytoid dendritic cells: sensing nucleic acids in viral infection and autoimmune diseases. *Nat Rev Immunol*, 2008. 8(8): p. 594-606.
- 21.** Tel, J., S. Anguille, C.E. Waterborg, E.L. Smits, C.G. Figdor, and I.J. de Vries, Tumoricidal activity of human dendritic cells. *Trends Immunol*, 2014. 35(1): p. 38-46.
- 22.** Gonzalvez, F. and A. Ashkenazi, New insights into apoptosis signaling by Apo2L/TRAIL. *Oncogene*, 2010. 29(34): p. 4752-65.

23. Kemp, T.J., J.S. Kim, S.A. Crist, and T.S. Griffith, Induction of necrotic tumor cell death by TRAIL/Apo-2L. *Apoptosis*, 2003. 8(6): p. 587-99.
24. Johnstone, R.W., A.J. Frew, and M.J. Smyth, The TRAIL apoptotic pathway in cancer onset, progression and therapy. *Nat Rev Cancer*, 2008. 8(10): p. 782-98.
25. Sedger, L.M., D.M. Shows, R.A. Blanton, J.J. Peschon, R.G. Goodwin, D. Cosman, and S.R. Wiley, IFN-gamma mediates a novel antiviral activity through dynamic modulation of TRAIL and TRAIL receptor expression. *J Immunol*, 1999. 163(2): p. 920-6.
26. Vidalain, P.O., O. Azocar, B. Lamouille, A. Astier, C. Rabourdin-Combe, and C. Servet-Delprat, Measles virus induces functional TRAIL production by human dendritic cells. *J Virol*, 2000. 74(1): p. 556-9.
27. Vidalain, P.O., O. Azocar, C. Rabourdin-Combe, and C. Servet-Delprat, Measle virus-infected dendritic cells develop immunosuppressive and cytotoxic activities. *Immunobiology*, 2001. 204(5): p. 629-38.
28. Chaperot, L., A. Blum, O. Manches, G. Lui, J. Angel, J.P. Molens, and J. Plumas, Virus or TLR agonists induce TRAIL-mediated cytotoxic activity of plasmacytoid dendritic cells. *J Immunol*, 2006. 176(1): p. 248-55.
29. Hardy, A.W., D.R. Graham, G.M. Shearer, and J.P. Herbeuval, HIV turns plasmacytoid dendritic cells (pDC) into TRAIL-expressing killer pDC and down-regulates HIV coreceptors by Toll-like receptor 7-induced IFN-alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. 104(44): p. 17453-8.
30. Sary, G., I. Klein, S. Kohlhofer, F. Koszik, T. Scherzer, L. Mullauer, H. Quendler, N. Kohrgruber, and G. Stingl, Plasmacytoid dendritic cells express TRAIL and induce CD4+ T-cell apoptosis in HIV-1 viremic patients. *Blood*, 2009. 114(18): p. 3854-63.
31. Kalb, M.L., A. Glaser, G. Sary, F. Koszik, and G. Stingl, TRAIL(+) human plasmacytoid dendritic cells kill tumor cells in vitro: mechanisms of imiquimod- and IFN-alpha-mediated antitumor reactivity. *J Immunol*, 2012. 188(4): p. 1583-91.
32. Tel, J., E.L. Smits, S. Anguille, R.N. Joshi, C.G. Figdor, and I.J. de Vries, Human plasmacytoid dendritic cells are equipped with antigen-presenting and tumoricidal capacities. *Blood*, 2012. 120(19): p. 3936-44.
33. Akira, S., S. Uematsu, and O. Takeuchi, Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, 2006. 124(4): p. 783-801.
34. Ikegame, S., M. Takeda, S. Ohno, Y. Nakatsu, Y. Nakanishi, and Y. Yanagi, Both RIG-I and MDA5 RNA helicases contribute to the induction of alpha/beta interferon in measles virus-infected human cells. *J Virol*, 2010. 84(1): p. 372-9.

35. Runge, S., K.M. Sparrer, C. Lassig, K. Hembach, A. Baum, A. Garcia-Sastre, J. Soding, K.K. Conzelmann, and K.P. Hopfner, In vivo ligands of MDA5 and RIG-I in measles virus-infected cells. *PLoS Pathog*, 2014. 10(4): p. e1004081.
36. Goubau, D., S. Deddouche, and C. Reis e Sousa, Cytosolic sensing of viruses. *Immunity*, 2013. 38(5): p. 855-69.
37. Kawai, T. and S. Akira, The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol*, 2010. 11(5): p. 373-84.
38. Chawla-Sarkar, M., D.J. Lindner, Y.F. Liu, B.R. Williams, G.C. Sen, R.H. Silverman, and E.C. Borden, Apoptosis and interferons: role of interferon-stimulated genes as mediators of apoptosis. *Apoptosis*, 2003. 8(3): p. 237-49.
39. Fanger, N.A., C.R. Maliszewski, K. Schooley, and T.S. Griffith, Human dendritic cells mediate cellular apoptosis via tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). *J Exp Med*, 1999. 190(8): p. 1155-64.
40. Clark, K., M. Pegg, L. Plater, R.J. Sorcek, E.R. Young, J.B. Madwed, J. Hough, E.G. McIver, and P. Cohen, Novel cross-talk within the IKK family controls innate immunity. *Biochem J*, 2011. 434(1): p. 93-104.
41. Duhon, T., F. Herschke, O. Azocar, J. Druelle, S. Plumet, C. Delprat, S. Schicklin, T.F. Wild, C. Rabourdin-Combe, D. Gerlier, and H. Valentin, Cellular receptors, differentiation and endocytosis requirements are key factors for type I IFN response by human epithelial, conventional and plasmacytoid dendritic infected cells by measles virus. *Virus Res*, 2010. 152(1-2): p. 115-25.
42. Lee, H.K., J.M. Lund, B. Ramanathan, N. Mizushima, and A. Iwasaki, Autophagy-dependent viral recognition by plasmacytoid dendritic cells. *Science*, 2007. 315(5817): p. 1398-401.
43. Di Domizio, J., A. Blum, M. Gallagher-Gambarelli, J.P. Molens, L. Chaperot, and J. Plumas, TLR7 stimulation in human plasmacytoid dendritic cells leads to the induction of early IFN-inducible genes in the absence of type I IFN. *Blood*, 2009. 114(9): p. 1794-802.
44. Kato, H., S. Sato, M. Yoneyama, M. Yamamoto, S. Uematsu, K. Matsui, T. Tsujimura, K. Takeda, T. Fujita, O. Takeuchi, and S. Akira, Cell type-specific involvement of RIG-I in antiviral response. *Immunity*, 2005. 23(1): p. 19-28.
45. Matsui, K., Y. Kumagai, H. Kato, S. Sato, T. Kawagoe, S. Uematsu, O. Takeuchi, and S. Akira, Cutting edge: Role of TANK-binding kinase 1 and inducible IkappaB kinase in IFN responses against viruses in innate immune cells. *J Immunol*, 2006. 177(9): p. 5785-9.

46. Sun, Q., L. Sun, H.H. Liu, X. Chen, R.B. Seth, J. Forman, and Z.J. Chen, The specific and essential role of MAVS in antiviral innate immune responses. *Immunity*, 2006. 24(5): p. 633-42.
47. Colonna, M., G. Trinchieri, and Y.J. Liu, Plasmacytoid dendritic cells in immunity. *Nat Immunol*, 2004. 5(12): p. 1219-26.
48. Hornung, V., J. Schlender, M. Guenther-Biller, S. Rothenfusser, S. Endres, K.K. Conzelmann, and G. Hartmann, Replication-dependent potent IFN- α induction in human plasmacytoid dendritic cells by a single-stranded RNA virus. *J Immunol*, 2004. 173(10): p. 5935-43.
49. Bruni, D., M. Chazal, L. Sinigaglia, L. Chauveau, O. Schwartz, P. Despres, and N. Jouvenet, Viral entry route determines how human plasmacytoid dendritic cells produce type I interferons. *Sci Signal*, 2015. 8(366): p. ra25.
50. Clark, K., O. Takeuchi, S. Akira, and P. Cohen, The TRAF-associated protein TANK facilitates cross-talk within the IkappaB kinase family during Toll-like receptor signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011. 108(41): p. 17093-8.
51. Oganessian, G., S.K. Saha, B. Guo, J.Q. He, A. Shahangian, B. Zarnegar, A. Perry, and G. Cheng, Critical role of TRAF3 in the Toll-like receptor-dependent and -independent antiviral response. *Nature*, 2006. 439(7073): p. 208-11.
52. Hacker, H., V. Redecke, B. Blagoev, I. Kratchmarova, L.C. Hsu, G.G. Wang, M.P. Kamps, E. Raz, H. Wagner, G. Hacker, M. Mann, and M. Karin, Specificity in Toll-like receptor signalling through distinct effector functions of TRAF3 and TRAF6. *Nature*, 2006. 439(7073): p. 204-7.
53. Hemont, C., A. Neel, M. Heslan, C. Braudeau, and R. Josien, Human blood mDC subsets exhibit distinct TLR repertoire and responsiveness. *J Leukoc Biol*, 2013. 93(4): p. 599-609.
54. Flacher, V., M. Bouschbacher, E. Verronese, C. Massacrier, V. Sisirak, O. Berthier-Vergnes, B. de Saint-Vis, C. Caux, C. Dezutter-Dambuyant, S. Lebecque, and J. Valladeau, Human Langerhans cells express a specific TLR profile and differentially respond to viruses and Gram-positive bacteria. *J Immunol*, 2006. 177(11): p. 7959-67.
55. Ito, T., R. Amakawa, T. Kaisho, H. Hemmi, K. Tajima, K. Uehira, Y. Ozaki, H. Tomizawa, S. Akira, and S. Fukuhara, Interferon- α and interleukin-12 are induced differentially by Toll-like receptor 7 ligands in human blood dendritic cell subsets. *J Exp Med*, 2002. 195(11): p. 1507-12.

- 56.** Lindstedt, M., K. Lundberg, and C.A. Borrebaeck, Gene family clustering identifies functionally associated subsets of human in vivo blood and tonsillar dendritic cells. *J Immunol*, 2005. 175(8): p. 4839-46.
- 57.** Jarrossay, D., G. Napolitani, M. Colonna, F. Sallusto, and A. Lanzavecchia, Specialization and complementarity in microbial molecule recognition by human myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *Eur J Immunol*, 2001. 31(11): p. 3388-93.
- 58.** Izaguirre, A., B.J. Barnes, S. Amrute, W.S. Yeow, N. Megjugorac, J. Dai, D. Feng, E. Chung, P.M. Pitha, and P. Fitzgerald-Bocarsly, Comparative analysis of IRF and IFN- α expression in human plasmacytoid and monocyte-derived dendritic cells. *J Leukoc Biol*, 2003. 74(6): p. 1125-38.
- 59.** Dai, J., N.J. Megjugorac, S.B. Amrute, and P. Fitzgerald-Bocarsly, Regulation of IFN regulatory factor-7 and IFN- α production by enveloped virus and lipopolysaccharide in human plasmacytoid dendritic cells. *J Immunol*, 2004. 173(3): p. 1535-48.
- 60.** O'Brien, M., O. Manches, R.L. Sabado, S.J. Baranda, Y. Wang, I. Marie, L. Rolnitzky, M. Markowitz, D.M. Margolis, D. Levy, and N. Bhardwaj, Spatiotemporal trafficking of HIV in human plasmacytoid dendritic cells defines a persistently IFN- α -producing and partially matured phenotype. *J Clin Invest*, 2011. 121(3): p. 1088-101.
- 61.** Kadowaki, N., S. Ho, S. Antonenko, R.W. Malefyt, R.A. Kastelein, F. Bazan, and Y.J. Liu, Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *J Exp Med*, 2001. 194(6): p. 863-9.
- 62.** Schlee, M., A. Roth, V. Hornung, C.A. Hagmann, V. Wimmenauer, W. Barchet, C. Coch, M. Janke, A. Mihailovic, G. Wardle, S. Juraneck, H. Kato, T. Kawai, H. Poeck, K.A. Fitzgerald, et al., Recognition of 5' triphosphate by RIG-I helicase requires short blunt double-stranded RNA as contained in panhandle of negative-strand virus. *Immunity*, 2009. 31(1): p. 25-34.
- 63.** Fugier-Vivier, I., C. Servet-Delprat, P. Rivaller, M.C. Rissoan, Y.J. Liu, and C. Roubourdin-Combe, Measles virus suppresses cell-mediated immunity by interfering with the survival and functions of dendritic and T cells. *J Exp Med*, 1997. 186(6): p. 813-23.
- 64.** Druelle, J., C.I. Sellin, D. Waku-Kouomou, B. Horvat, and F.T. Wild, Wild type measles virus attenuation independent of type I IFN. *Virol J*, 2008. 5: p. 22.
- 65.** Schlender, J., V. Hornung, S. Finke, M. Gunthner-Biller, S. Marozin, K. Brzozka, S. Moghim, S. Endres, G. Hartmann, and K.K. Conzelmann, Inhibition of toll-like receptor 7- and 9-mediated α/β interferon production in human plasmacytoid dendritic cells by respiratory syncytial virus and measles virus. *J Virol*, 2005. 79(9): p. 5507-15.

- 66.** Naniche, D., A. Yeh, D. Eto, M. Manchester, R.M. Friedman, and M.B. Oldstone, Evasion of host defenses by measles virus: wild-type measles virus infection interferes with induction of Alpha/Beta interferon production. *J Virol*, 2000. 74(16): p. 7478-84.
- 67.** Joubert, P.E., G. Meiffren, I.P. Gregoire, G. Pontini, C. Richetta, M. Flacher, O. Azocar, P.O. Vidalain, M. Vidal, V. Lotteau, P. Codogno, C. Rabourdin-Combe, and M. Faure, Autophagy induction by the pathogen receptor CD46. *Cell Host Microbe*, 2009. 6(4): p. 354-66.
- 68.** Stary, G., C. Bangert, M. Tauber, R. Strohal, T. Kopp, and G. Stingl, Tumoricidal activity of TLR7/8-activated inflammatory dendritic cells. *J Exp Med*, 2007. 204(6): p. 1441-51.
- 69.** Susanto, O., J.A. Trapani, and D. Brasacchio, Controversies in granzyme biology. *Tissue Antigens*, 2012. 80(6): p. 477-87.
- 70.** Prakash, M.D., M.A. Munoz, R. Jain, P.L. Tong, A. Koskinen, M. Regner, O. Kleinfeld, B. Ho, M. Olson, S.J. Turner, P. Mrass, W. Weninger, and P.I. Bird, Granzyme B promotes cytotoxic lymphocyte transmigration via basement membrane remodeling. *Immunity*, 2014. 41(6): p. 960-72.
- 71.** Amarante-Mendes, G.P. and T.S. Griffith, Therapeutic applications of TRAIL receptor agonists in cancer and beyond. *Pharmacol Ther*, 2015. 155: p. 117-31.
- 72.** Palamara, F., S. Meindl, M. Holcmann, P. Luhrs, G. Stingl, and M. Sibilía, Identification and characterization of pDC-like cells in normal mouse skin and melanomas treated with imiquimod. *J Immunol*, 2004. 173(5): p. 3051-61.
- 73.** Drobits, B., M. Holcmann, N. Amberg, M. Swiecki, R. Grundtner, M. Hammer, M. Colonna, and M. Sibilía, Imiquimod clears tumors in mice independent of adaptive immunity by converting pDCs into tumor-killing effector cells. *J Clin Invest*, 2012. 122(2): p. 575-85.
- 74.** Achard, C., N. Boisgerault, T. Delaunay, F. Tangy, M. Gregoire, and J.F. Fonteneau, Induction of immunogenic tumor cell death by attenuated oncolytic measles virus *J Clin Cell Immunol*, 2015. 6(1).
- 75.** Zitvogel, L., L. Galluzzi, O. Kepp, M.J. Smyth, and G. Kroemer, Type I interferons in anticancer immunity. *Nat Rev Immunol*, 2015. 15(7): p. 405-14.
- 76.** Shigeno, M., K. Nakao, T. Ichikawa, K. Suzuki, A. Kawakami, S. Abiru, S. Miyazoe, Y. Nakagawa, H. Ishikawa, K. Hamasaki, K. Nakata, N. Ishii, and K. Eguchi, Interferon-alpha sensitizes human hepatoma cells to TRAIL-induced apoptosis through DR5 upregulation and NF-kappa B inactivation. *Oncogene*, 2003. 22(11): p. 1653-62.

77. Coulais, D., C. Panterne, J.F. Fonteneau, and M. Gregoire, Purification of circulating plasmacytoid dendritic cells using counterflow centrifugal elutriation and immunomagnetic beads. *Cytotherapy*, 2012. 14(7): p. 887-96.
78. Combredet, C., V. Labrousse, L. Mollet, C. Lorin, F. Delebecque, B. Hurtrel, H. McClure, M.B. Feinberg, M. Brahic, and F. Tangy, A molecularly cloned Schwarz strain of measles virus vaccine induces strong immune responses in macaques and transgenic mice. *J Virol*, 2003. 77(21): p. 11546-54.

DISCUSSION

La virothérapie anti-tumorale est une stratégie thérapeutique novatrice en plein essor qui utilise les propriétés oncolytiques de certains virus pour lyser spécifiquement les cellules tumorales en épargnant les tissus sains [113]. Alors que la capacité naturelle de certains virus à se répliquer préférentiellement ou exclusivement dans les cellules tumorales a été exploitée, d'autres ont été génétiquement modifiés afin de restreindre leur réplication au tissu tumoral [115]. L'accumulation de connaissances sur la biologie des virus et des tumeurs a également permis d'améliorer l'efficacité oncolytique des virus ces dernières années [116].

Parmi l'arsenal des virus oncolytiques, les souches atténuées du virus de la rougeole (MV) sont des candidats prometteurs. En effet, le MV fait preuve d'un pouvoir oncolytique naturel intéressant mais il est également facile de le modifier afin d'optimiser ses performances [168, 560]. Son efficacité a été démontrée envers de nombreux types de cancers *in vitro* et *in vivo* dans des modèles de xénogreffes de cellules tumorales humaines chez des souris immunodéficientes [168]. Cette approche thérapeutique basée sur l'utilisation du MV a ainsi été transférée en clinique pour le traitement de différents cancers [331]. Des essais cliniques de phase I ont évalué l'efficacité du MV envers le lymphome T cutané [173], le cancer de l'ovaire chimiorésistant [238, 243] et le myélome multiple disséminé [246]. Suite aux résultats encourageants obtenus, des essais de phase II sont en cours de recrutement à la Mayo Clinic (Rochester, MN, USA) pour le cancer de l'ovaire et le myélome multiple. D'autres essais cliniques de phase I sont menés à la Mayo Clinic, testant l'efficacité oncolytique du MV contre le mésothéliome pleural malin (MPM), le cancer squameux de la tête et du cou récurrent ou métastatique et le glioblastome multiforme récurrent.

Le MPM est un cancer particulièrement agressif, principalement dû à une exposition prolongée aux fibres d'amiante, et représente un enjeu de santé publique étant donné son incidence croissante et la difficulté de sa prise en charge [3]. En effet, le traitement chimiothérapeutique de référence, associant le cisplatine et le pémétrexed, apporte un bénéfice de survie limité [63]. Bien que la meilleure compréhension de la maladie ait permis de proposer de nouveaux traitements, ces derniers n'ont malheureusement pas amélioré le sort des patients [74]. Face au besoin urgent de solutions thérapeutiques, l'équipe du Dr Marc Grégoire, en collaboration avec le Dr Frédéric Tangy de l'Institut Pasteur de Paris, s'intéresse à l'utilisation du MV Schwarz pour le traitement de ce cancer. Des résultats obtenus en 2008 au sein de l'équipe ont mis en évidence la sensibilité de certaines lignées de MPM à ce virus oncolytique [169].

En vue du développement d'un essai clinique de phase I/II en collaboration avec les CHU de Nantes et Lille, mon travail de thèse a consisté dans un premier temps à évaluer la

sensibilité au MV d'un grand nombre de lignées de MPM, que nous avons établies dans notre collection d'échantillons biologiques à partir de liquides pleuraux, permettant d'estimer la fraction de patients qui seraient sensibles à cette modalité thérapeutique. Sur les 22 lignées de MPM testées, nous avons déterminé que 15 d'entre elles sont sensibles à la réplication du MV et à son effet cytopathique. Ainsi, 70% des lignées de MPM testées sont sensibles à l'activité oncolytique du MV. Les 4 types de cellules saines (cellules mésothéliales, cellules épithéliales bronchiques, fibroblastes pulmonaires et cellules endothéliales pulmonaires), testées en parallèle afin de valider l'innocuité du MV, ne sont pas ou très peu sensibles à la réplication du MV, de même que les 7 lignées de MPM restantes. Cependant, parmi ces 7 lignées résistantes, nous avons observé la mort de 2 lignées après exposition au virus, portant à 77% la fraction de lignées de MPM testées sensibles à la mort induite par le MV.

Les souches atténuées du MV se lient préférentiellement à la protéine CD46 [153], surexprimée à la surface de nombreux types de cellules tumorales qui possèdent ainsi un avantage sélectif en devenant moins sensibles à la lyse médiée par le complément [158, 159]. Il a été mis en évidence que l'infection des cellules tumorales par le MV, ainsi que son effet lytique, dépendent d'un seuil d'expression de CD46 à leur surface [161]. Les tissus sains dans lesquels les cellules expriment faiblement CD46 ne constituent donc pas un lieu de réplication adéquat pour le MV. Contrairement à ce qui est décrit dans la littérature, nous avons montré que la différence de sensibilité au MV que nous observons entre les lignées de MPM ne corrèle pas avec le niveau d'expression de CD46 à leur surface. Cependant, sa présence est nécessaire pour permettre l'entrée du MV dans les cellules. Ainsi, nos résultats montrent que le MV entre dans toutes les cellules quel que soit le niveau d'expression de CD46.

Afin d'expliquer la différence de sensibilité des lignées de MPM, nous avons analysé les réponses anti-virales déclenchées dans les cellules tumorales en réponse au MV. En effet, les cellules de notre organisme ont la capacité de détecter rapidement les virus et de contrôler l'infection grâce à la production d'IFN de type I, responsables d'un état anti-viral. Cependant, la signalisation dépendante des IFN de type I a également des effets incompatibles avec le développement tumoral (arrêt du cycle cellulaire, inhibition des synthèses protéiques, pouvoir pro-apoptotique et anti-angiogénique, immunostimulation) et il n'est pas surprenant que de nombreuses cellules tumorales deviennent insensibles aux IFN de type I ou incapables de les produire [114]. On peut alors exploiter ces défauts grâce à certains virus oncolytiques [342]. Nous avons démontré que les lignées de MPM insensibles au MV, ainsi que les cellules saines, expriment les gènes codants pour les IFN- α et - β et sécrètent ces cytokines en réponse au MV. De plus, nous avons mis en évidence la présence de la protéine anti-virale Mx1 dans

le cytoplasme de l'ensemble des cellules insensibles suite à l'exposition au MV, corrélant avec le profil d'expression de l'ISG codant pour cette protéine. En revanche, la majorité des lignées de MPM sensibles (11 sur les 15) ne produisent pas d'IFN de type I et n'expriment pas Mx1 en réponse au MV. Nous avons cependant observé que certaines lignées (4 sur les 15) développent une réponse IFN de type I qui semble complète, caractérisée par la sécrétion des IFN- α et - β et l'expression de Mx1, et sont néanmoins sensibles à l'activité oncolytique du MV. Cela suggère que si Mx1 est capable d'inhiber la réplication du MV, elle n'agit pas seule et nécessite l'expression d'autres protéines anti-virales n'étant peut-être pas exprimées dans ces 4 lignées de MPM. L'implication de Mx1 dans la réplication du MV a été décrite par peu d'études, suite à des transfections stables, et semble être dépendante du type cellulaire [301, 302]. Une étude de Schoggins et ses collaborateurs, testant l'effet de plus de 350 ISG sur la réplication de 14 virus, n'a pas mis en évidence l'inhibition de la réplication du MV par l'ISG Mx1, bien que cette protéine seule inhibe fortement la réplication des virus influenza A et NDV [561]. Ils ont démontré que la plupart des ISG ne sont pas capables d'inhiber seuls plus de 50% de l'infection par certains virus, dont le MV. Ceci suggère donc que les ISG doivent agir de concert pour inhiber totalement la réplication virale. Il a en effet été décrit que l'expression combinée de plusieurs ISG augmente l'activité anti-virale observée [288]. Enfin, contrairement aux IFN de type I, l'ensemble des cellules expriment le gène codant pour l'IFN- λ 1, un IFN de type III (IL-29), en réponse au MV. Notre étude suggère donc que la sensibilité des lignées de MPM à l'activité oncolytique du MV dépend des défauts de la réponse anti-virale IFN de type I des cellules tumorales plutôt que de la surexpression de CD46 à leur surface.

Récemment, Berchtold et ses collaborateurs ont également étudié l'impact de la réponse anti-virale IFN de type I sur la sensibilité des cellules de sarcome à l'infection par le MV Schwarz [358]. Sur les 8 lignées testées, 5 sont sensibles à l'infection. Les auteurs ont observé que les 3 lignées résistantes expriment un plus faible niveau d'expression de CD46 par rapport aux lignées sensibles, contrairement à nos résultats ne montrant aucune corrélation. L'analyse de la réponse IFN de type I a révélé une expression basale et fortement induite par le MV des ISG codant pour RIG-I, Mda5 et IFIT1 dans les lignées résistantes. Dans cette étude, aucune corrélation significative n'a été mise en évidence entre la sensibilité des lignées au MV et l'expression du gène codant pour l'IFN- β , cependant une sécrétion d'IFN- β est mesurée pour 2 lignées résistantes sur 3. On retrouve également quelques exceptions comme dans notre étude, à savoir une lignée sensible au MV qui exprime IFIT1 et 3 lignées sur les 5 sensibles qui sécrètent de l'IFN- β suite à l'infection par le MV.

L'inhibition de l'expression d'IFIT1 dans les lignées résistantes a permis de rétablir l'infection par le MV d'une lignée sur 3, indiquant qu'IFIT1 peut inhiber la réplication du MV, mais n'est pas le seul facteur jouant un rôle dans la résistance à l'infection des cellules de sarcome. La même équipe a confirmé ces résultats en étudiant les mécanismes de résistance au MV de 5 lignées tumorales provenant du panel NCI-60 [359]. Pour 4 lignées résistantes, l'altération de la réplication du MV est due à l'expression de l'ISG IFIT1, tandis qu'une lignée résistante ne développe aucune réponse IFN de type I suite à l'infection par le MV, comme la lignée sensible testée en parallèle. Nous avons également analysé l'expression du gène codant pour IFIT1 par l'ensemble des lignées de MPM en réponse au MV, et aucune corrélation n'a pu être effectuée avec leur sensibilité à l'infection. En effet, IFIT1 est exprimé par toutes les lignées en présence du MV. De plus, IFIT1 ne figure pas parmi les ISG impliqués dans l'inhibition de la réplication du MV dans l'étude de Schoggins et ses collaborateurs [561]. Notre étude, réalisée sur un grand nombre de lignées tumorales et différents types de cellules saines, a permis d'établir un lien plus robuste statistiquement que dans les autres études entre les défauts de la réponse anti-virale IFN de type I et la sensibilité des cellules à l'infection par le MV.

Suite à l'ajout d'IFN de type I (α et β) exogènes sur les 15 lignées de MPM sensibles au MV, nous avons mis en évidence une réduction de la réplication du MV dans 12 lignées, dépendante de la dose d'IFN de type I. Ce résultat suggère que la transduction du signal par la voie JAK/STAT, en aval du récepteur aux IFN de type I, est fonctionnelle dans ces cellules. Nous avons d'ailleurs observé la présence de la protéine Mx1 dans le cytoplasme de toutes les lignées de MPM sensibles au MV exposées aux IFN de type I. D'autre part, l'hypothèse d'un défaut de détection du MV dans les lignées sensibles est écartée par nos résultats qui démontrent que certains gènes, codant pour RIG-I, Mda5 et IFIT1, sont exprimés en réponse au virus dans toutes les lignées. Il est en effet reconnu que ces gènes, qui sont des ISG, peuvent également être exprimés suite à la détection des virus indépendamment de la liaison des IFN de type I sur leur récepteur, permettant ainsi une amplification rapide de la réponse anti-virale [285]. Corrélant avec nos résultats, l'ajout d'IFN- β sur les lignées de sarcome sensibles au MV a permis pour certaines d'entre elles l'inhibition de la réplication du virus, une augmentation de la survie, ainsi que l'expression d'IFIT1 et la phosphorylation de STAT1, participant à la signalisation du récepteur IFNAR aux IFN de type I [358]. L'ensemble de ces résultats suggère que les défauts de la réponse IFN de type I présents dans la majorité des cellules tumorales sensibles au MV se trouvent en amont de l'étape de production des IFN de type I. Cependant, une étude évaluant l'efficacité du VSV codant pour

l'IFN- β envers des lignées de MPM a mis en évidence que les lignées sensibles à ce virus sont celles possédant des défauts en aval du récepteur IFNAR, tels que l'absence de la protéine p48 [356]. Enfin, dans notre étude, l'ajout d'IFN de type I sur 3 lignées de MPM sur les 4 faisant exception n'a eu en revanche que peu d'effet inhibiteur sur la réplication du MV. Cela confirme notre hypothèse que certains ISG, interférant avec la réplication du MV, sont manquants dans ces lignées.

Les défauts de la réponse IFN de type I permettant la sensibilité des cellules tumorales au MV peuvent donc intervenir à différents niveaux. Les cellules tumorales présentent en effet de nombreuses mutations dans cette voie de signalisation qui a des conséquences physiologiques souvent incompatibles avec la progression tumorale [114, 286, 341]. Ainsi, il a été observé dans certaines cellules tumorales une perte homozygote d'un cluster de gènes impliqués dans cette réponse anti-virale [340] ou encore une délétion d'éléments intervenant dans la signalisation des IFN de type I tels que STAT1 [335, 336]. De plus, de nombreux gènes mis sous silence dans les cellules tumorales, par des modifications épigénétiques telles que la méthylation, sont ceux régulés par la signalisation des IFN de type I [562]. Des mutations génétiques et épigénétiques altérant les fonctions de certains IRF, régulateurs transcriptionnels intervenant dans de multiples fonctions biologiques, sont observées dans de nombreux types de cancers et participent à la progression tumorale [333, 563, 564].

D'autre part, il a été rapporté que la sécrétion d'IFN de type I en réponse aux virus n'est pas seulement due à la voie dite classique, déclenchée par la détection des acides nucléiques viraux par les récepteurs cytosoliques ou endosomaux. Diverses modifications cellulaires induites par les virus, telles que leur fusion avec la membrane de la cellule, une perturbation du cytosquelette ainsi que le stress mitochondrial et endosomal, interviennent dans la sécrétion d'IFN de type I ou l'expression d'ISG indépendamment des IFN de type I [565]. Noyce et ses collaborateurs ont montré que la perturbation de la membrane, induite par une protéine de fusion d'origine virale, permet l'expression d'ISG suite à l'activation d'IRF3, en absence d'IFN de type I, assurant un état anti-viral [566]. D'autre part, dans une autre étude, Holm et ses collègues ont montré que des particules virales fusogènes, dépourvues d'acide nucléique viral, induisent l'expression d'ISG grâce à la production d'IFN de type I [567, 568]. Ils ont démontré que la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane cellulaire active la réponse anti-virale IFN de type I de manière indépendante de la détection d'acides nucléiques viraux, grâce à l'activation de STING, protéine située dans la membrane du réticulum endoplasmique menant à l'activation d'IRF3. STING est une protéine également impliquée dans la transduction du signal menant à la production d'IFN de type I suite à la

détection de molécules d'ADN dans le cytosol, provenant de parasites ou du soi dans certaines circonstances [569, 570]. Une étude très récente, réalisée dans l'équipe de Glen Barber, a mis en évidence des défauts de la voie de signalisation STING dans des lignées de cancer colorectal, dus à une hyperméthylation de régions promotrices de certains gènes intervenant dans cette voie [571]. Ainsi, les molécules d'ADN qui ont fui le noyau des cellules ayant subi des dommages ne peuvent plus activer la voie STING pour induire la production de cytokines pro-inflammatoires. La perte de cette voie de signalisation dans les cellules tumorales peut ainsi favoriser le développement de la tumeur et empêcher l'alerte du système immunitaire [571]. Le MV est un virus enveloppé entrant dans les cellules par un processus de fusion et peut donc probablement induire l'activation de STING et la sécrétion d'IFN de type I dans les cellules résistantes à la réplication du virus. L'équipe a commencé à étudier l'implication de STING dans la réponse IFN de type I induite par le MV. La fusion pourrait en partie être responsable de l'expression de certains ISG dans l'ensemble des cellules testées dans notre étude, indépendamment des IFN de type I. D'autre part, des défauts dans la voie de signalisation impliquant STING pourraient être présents dans les lignées sensibles au MV.

Dans le but de caractériser les défauts de la réponse IFN de type I fréquemment trouvés dans les cellules de MPM, permettant leur sensibilité au MV, et expliquer les comportements particuliers observés pour certaines lignées, nous avons décidé de réaliser une étude transcriptomique avec la plateforme de génomique de l'Université de Nantes. Ce projet est mené par Tiphaine Delaunay, doctorante dans l'équipe sous la direction du Dr Jean-François Fonteneau. Le profil d'expression génique des cellules saines, de certaines lignées de MPM résistantes ou sensibles au MV et des lignées exceptions, a été analysé à l'état basal, en réponse au MV ou en réponse aux IFN de type I exogènes. Tiphaine a analysé l'expression des gènes impliqués dans les réponses anti-virales ainsi que ceux impliqués dans la mort cellulaire. Les résultats ont confirmé les profils d'expression des différents gènes que j'ai testés dans mon étude et ont permis d'émettre de nouvelles hypothèses qui sont en cours de validation.

Nous avons observé que les lignées de MPM résistantes à la réplication du MV expriment la protéine Mx1 dans leur cytoplasme à un niveau basal élevé. De la même façon, Berchtold et ses collègues ont rapporté une expression constitutive d'IFIT1 par les lignées de sarcome résistantes [358]. Ces données suggèrent que le niveau basal d'expression élevé de certains ISG pourrait conférer aux cellules tumorales une résistance au MV et devenir une information prédictive de la sensibilité au MV. Evanthia Galanis (Mayo Clinic) mène une

étude sur des échantillons de tumeurs, provenant de patients atteints d'un cancer de l'ovaire ou d'un glioblastome et ayant été traités par le MV lors d'essais cliniques. Dans un résumé soumis pour le congrès de l'ASGCT 2015 (American Society of Gene and Cell Therapy) qui a eu lieu à la Nouvelle-Orléans en Mai 2015, Evanthia Galanis et son équipe ont révélé, grâce au séquençage à haut débit effectué sur les échantillons de tumeurs des patients traités par le MV, que l'expression d'ISG tels qu'IFI44, IFI27, RSAD2 (Radical S-Adenosyl Methionine Domain Containing 2) ainsi que Mx1 et Mx2, est négativement corrélée à la sensibilité de la tumeur à l'infection par le MV et avec le résultat clinique. Cette étude rétrospective a permis d'émettre l'hypothèse qu'une forte expression basale de ces ISG pourrait être responsable de la résistance au MV de certains cancers de l'ovaire et glioblastomes, et dans ce cas représenter des marqueurs prédictifs de la réponse des patients à cette thérapie. Afin de tester leur hypothèse, ils ont évalué le niveau d'expression basal des ISG dans 27 lignées primaires de glioblastome dérivées de patients, avant l'injection du MV, et ont montré que 4 lignées sur 27 présentent une forte expression basale d'ISG. Alors que des lignées ayant une faible expression basale d'ISG sont efficacement infectées par le MV, produisent de nombreuses particules virales et meurent suite à l'infection, 3 des 4 lignées exprimant les ISG de manière constitutive produisent moins de particules virales et résistent à la mort induite par le MV. Concernant le cancer de l'ovaire, 57 lignées primaires dérivées de patientes avant l'injection du MV sur les 118 testées expriment fortement les ISG. Des expériences *in vivo* sur des modèles orthotopiques de cancer de l'ovaire chez la souris vont évaluer l'efficacité du MV selon les niveaux d'expression variables des ISG. Les résultats pourraient ainsi élucider le rôle du niveau basal d'expression d'ISG dans la réponse clinique au MV.

Sachant que le statut de la réponse IFN de type I peut conditionner l'efficacité de certains virus oncolytiques, des travaux ont été menés afin d'identifier des moyens de lever la résistance des cellules tumorales. Ainsi, le virus oncolytique VSV est connu pour être naturellement sensible aux IFN de type I. Compte tenu du risque de neurotoxicité associé à l'utilisation de ce virus, une nouvelle souche davantage sensible aux IFN de type I a été générée afin de renforcer sa sécurité d'utilisation [343, 344]. Bien que des défauts de la réponse anti-virale IFN de type I, fréquents dans les cellules tumorales, favorisent la réplication de ce VSV, celle-ci est compromise dans les cellules tumorales ayant préservé une réponse fonctionnelle. Certains agents pharmacologiques ont donc été testés pour leur capacité à améliorer la réplication du VSV dans les cellules tumorales résistantes, en agissant sur la réponse IFN de type I. Il a été démontré que l'utilisation d'inhibiteurs d'histones déacétylases (iHDAC) tels que le Vorinostat (SAHA) ou l'Entinostat (MS-275), connus pour

diminuer la réponse anti-virale [572], sensibilise les cellules tumorales réfractaires à l'activité oncolytique du VSV. En effet, le traitement par les iHDAC diminue le niveau d'ARN messagers codants pour l'IFN- β , Mx1 ou encore pour le facteur de transcription IRF7 dans une lignée de cancer de la prostate, en présence du VSV. Chez la souris, la co-administration du MS-275 avec le VSV permet la réduction du volume tumoral, grâce à la réplication du virus, par rapport au VSV seul. Cette étude a montré, grâce aux expériences menées chez la souris et sur des explants de tumeurs humaines, que la combinaison d'un iHDAC avec le VSV permet d'améliorer spécifiquement la destruction de la tumeur, sans augmenter l'infection des tissus sains par le VSV. Très récemment, il est ressorti d'un criblage d'une banque de petites molécules que les agents déstabilisants les microtubules (MDA, microtubule-destabilizing agents) tels que la colchicine améliorent l'activité oncolytique du VSV envers les cellules tumorales *in vitro* et *in vivo*, et non envers les cellules saines [573]. La colchicine empêche la traduction des ARN messagers codant pour l'IFN- β , induits par le VSV, en entraînant leur distribution vers les monosomes, dans lesquels la traduction est moins importante que dans les polysomes. De plus, la combinaison de la colchicine avec le VSV favorise la polynucléation et la mort des cellules tumorales, principalement induites par des cytokines telles que le TNF- α . Enfin, une étude *in vitro* a décrit que la résistance au VSV de lignées de cancer de la tête et du cou peut être levée grâce au Ruxolitinib, un inhibiteur des kinases JAK1 et 2, qui bloque la signalisation du récepteur aux IFN de type I [574]. Le pré-traitement d'une lignée résistante avec le Ruxolitinib permet ainsi une diminution de l'expression constitutive de certains ISG (IRF7 et IRF9) et de la forme phosphorylée constitutivement active de STAT1, rendant possible l'activité oncolytique du VSV.

Les différents agents pharmacologiques présentés, capables d'empêcher la résistance au VSV, ont l'avantage d'être approuvés pour leur utilisation clinique. Ainsi, les iHDAC possèdent une activité anti-tumorale, le Vorinostat étant approuvé par la FDA et le MS-275 ayant montré des résultats précliniques encourageants [575, 576]. La colchicine, composé naturel aux propriétés anti-inflammatoires et anti-prolifératives, est utilisée pour le traitement des maladies auto-inflammatoires [577]. Certains MDA sont connus pour induire une catastrophe mitotique et une polynucléation, entraînant la mort des cellules se répliquant vite et ayant perdu le contrôle de leur cycle cellulaire, caractéristiques des cellules tumorales [578]. Enfin, le Ruxolitinib, connu aussi sous le nom de Jakafi, a été approuvé récemment pour le traitement de syndromes myéloprolifératifs [579]. Ayant prouvé leur sécurité d'utilisation chez l'homme, ces composés pourraient ainsi rapidement être testés au niveau

clinique en combinaison avec certains virus oncolytiques. Il sera cependant nécessaire de s'assurer qu'ils ne rendent pas les cellules saines sensibles aux virus oncolytiques.

Ces approches de combinaison du VSV avec des inhibiteurs de la voie IFN de type I sont également à l'étude pour le MV. Il a été ainsi mis en évidence une potentialisation de la réplication du MV *in vitro* en présence du Ruxolitinib [580]. Nous venons également de réaliser des expériences démontrant que le pré-traitement de lignées de MPM résistantes au MV avec le Ruxolitinib permet de les rendre sensibles à l'infection. De plus, Evanthia Galanis a indiqué dans son résumé pour l'ASGCT 2015 que le traitement avec le Ruxolitinib, 48 heures avant l'infection par le MV, augmente significativement la production de nouveaux virus et l'activité oncolytique du MV envers une lignée de glioblastome normalement résistante. Le Ruxolitinib a eu pour effet de diminuer l'expression basale des ISG et d'empêcher leur induction en réponse au MV, et son association avec le MV est actuellement en cours d'évaluation *in vivo* chez la souris. D'autre part, il est reconnu que les souches atténuées du virus de la rougeole sont moins efficaces que le virus sauvage pour contrer la réponse anti-virale IFN de type I. Certaines équipes ont alors testé l'efficacité de souches vaccinales du MV modifiées pour exprimer certains gènes du virus sauvage. Ainsi, le remplacement du gène P conduit à l'expression des protéines sauvages P, C et V, codées par ce gène, qui interfèrent principalement avec la transduction du signal déclenché par les IFN de type I [322, 323, 326], empêchant la réponse anti-virale d'aller à son terme ainsi que la sécrétion optimale d'IFN de type I par des cellules de lymphome et de myélome [581]. Ce MV chimérique infecte plus efficacement les cellules tumorales *in vitro* ainsi que des xénogreffes de myélome multiple chez la souris par rapport au MV. De la même façon, l'activité oncolytique du MV est améliorée par le remplacement des gènes N, P et L par leurs homologues provenant du virus sauvage [210]. Il a donc été démontré que les MV chimériques, armés avec des protéines du virus sauvage leur permettant de contrer la réponse anti-virale IFN de type I, possèdent une activité oncolytique pouvant apporter un meilleur bénéfice thérapeutique. Cependant, nous avons montré que le MV peut entrer dans les cellules saines, bien que celles-ci se protègent de l'infection grâce à la réponse IFN de type I induite. Les protéines du MV sauvage étant plus efficaces pour bloquer rapidement cette réponse anti-virale, il est nécessaire de vérifier l'effet des MV chimériques sur les cellules saines. Il serait plus prudent de renforcer le ciblage des cellules tumorales grâce aux diverses modifications évoquées dans mon introduction, afin d'assurer la sécurité d'utilisation de ces MV chimériques. Enfin, Berchtold et ses collaborateurs ont utilisé un MV codant pour l'enzyme SCD pour induire la mort de certaines lignées de sarcome résistantes à l'infection par le MV

[358]. Malgré une très faible réplication de ce MV-SCD dans certaines lignées résistantes, la SCD peut convertir la prodrogue 5-FC en agent chimiothérapeutique 5-FU, puis en 5-FUMP qui interfère avec les synthèses d'ADN, d'ARN et des protéines, conduisant ainsi à la mort des cellules [231].

Au regard des résultats obtenus dans notre étude sur les lignées de MPM, on peut cependant se demander s'il est réellement nécessaire de bloquer la réponse IFN de type I dans le cadre de l'utilisation du MV et si ce n'est pas dans une certaine mesure contre-productif. En effet, la mort des deux lignées de MPM ne répliquant pas le MV est possiblement due à la forte sécrétion d'IFN de type I induite par le virus, connus pour provoquer l'arrêt du cycle cellulaire, inhiber les synthèses protéiques et promouvoir l'apoptose des cellules tumorales [331]. Des vidéos de l'infection de ces 2 lignées, suivie par microscopie grâce à un virus codant pour la protéine fluorescente GFP (Green Fluorescent Protein), permettent de visualiser la mort de cellules tumorales non infectées, voisines des cellules ayant très faiblement répliqué le MV. De plus, la sécrétion d'IFN de type I dans l'environnement tumoral par certaines lignées de MPM peut être bénéfique pour le patient, car ces cytokines peuvent jouer un rôle crucial dans les réponses immunitaires anti-tumorales en étant notamment médiatrices entre l'immunité innée et adaptative [372, 513].

Bien qu'à l'origine l'efficacité des virus oncolytiques était considérée comme étant basée uniquement sur l'infection et la lyse des cellules tumorales, de plus en plus d'études attirent désormais l'attention sur leur capacité à initier des réponses immunitaires anti-tumorales [399]. Les virus oncolytiques sont de ce fait considérés comme de nouveaux agents immunothérapeutiques et il a été décidé lors du congrès sur les virus oncolytiques qui s'est tenu à Boston en juin 2015 (OVC 2015), auquel j'ai eu la chance d'assister, que l'approche de virothérapie anti-tumorale soit renommée "immunothérapie oncolytique" [247, 582] (Annexe n°1).

Notre équipe, dirigée par le Dr Marc Grégoire, a d'ailleurs abordé l'étude du MV sous cet angle depuis de nombreuses années en démontrant sa capacité à induire la mort immunogène des cellules tumorales [501, 583] (Annexe n°3). Des travaux précédents de l'équipe ont démontré que l'infection des cellules tumorales par le MV entraîne la libération de signaux de danger, les DAMP, tels qu'HSP70 et gp96 [169], HMGB1, ainsi que l'expression de la calréticuline à leur surface (données non montrées). Il a été décrit que des cellules de MPM infectées par le MV induisent la maturation de DC dérivées de monocytes (Mo-DC) ainsi que la production de cytokines pro-inflammatoires [169]. De plus, les Mo-DC

ayant internalisé des fragments de cellules tumorales infectées effectuent la présentation croisée de l'antigène de tumeur mésothéline à des lymphocytes T CD8⁺ naïfs spécifiques. En revanche, la mort induite par l'irradiation des cellules tumorales aux UV-B, qui n'est pas immunogène, ne permet pas la maturation des Mo-DC ni l'activation d'une réponse immunitaire anti-tumorale spécifique. Des résultats similaires ont été rapportés par Donnelly et ses collaborateurs suite à l'infection de cellules de mélanome par le MV [208]. D'autre part, les travaux de Jean-Baptiste Guillerme réalisés dans l'équipe ont mis en évidence la capacité des cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) du sang, exposées à des cellules tumorales infectées par le MV, à produire d'importantes quantités d'IFN- α suite à la reconnaissance de l'ARN simple brin du MV par le récepteur endosomal TLR7 [171]. Les pDC internalisent les cellules tumorales infectées par le MV, deviennent matures et réalisent la présentation croisée de l'antigène de tumeur NY-ESO-1 à un clone de lymphocyte T CD8⁺ spécifique. De même que pour les Mo-DC, les pDC exposées à des cellules tumorales irradiées aux UV-B restent immatures et ne présentent pas l'antigène. Ainsi, la mort immunogène des cellules tumorales induite par le MV active *in vitro* le programme de maturation des Mo-DC et des pDC ainsi que la présentation croisée d'antigènes de tumeur, permettant l'activation de réponses immunitaires anti-tumorales spécifiques.

Les DC sont spécialisées dans la présentation d'antigènes et tiennent donc une place centrale dans l'établissement des réponses immunitaires [414]. Chez l'homme, différentes populations de DC ont été mises en évidence et se distinguent par leur phénotype, leur localisation et leur fonction [441, 444]. Dans le sang, on retrouve trois populations : les DC myéloïdes CD1c⁺ et CD141⁺ ainsi que les pDC [445, 446]. Grâce à leur expression spécifique des TLR7 et 9, les pDC sont reconnues comme étant spécialisées dans les réponses immunitaires anti-virales, capables de sécréter d'importantes quantités d'IFN- α [464], ce qui ne signifie toutefois pas que les autres DC ne soient pas également impliquées. En plus de leur capacité de présentation des antigènes, il a été montré que les DC sont capables d'exercer une fonction cytotoxique envers des cellules cibles suite à une activation appropriée [539]. En effet, il est notamment décrit que la protéine TRAIL, exprimée à la surface des DC, induit la mort des cellules exprimant le récepteur de TRAIL, telles que des cellules infectées par un virus ou des cellules tumorales [540, 541, 543, 545]. Les Mo-DC infectées par le virus sauvage de la rougeole [548, 549], les pDC exposées au virus Influenza [550] ou les pDC provenant de patients atteints du HIV [552, 553], expriment TRAIL suite à leur sécrétion d'IFN- α et sont responsables de la lyse de cellules sensibles à TRAIL. De plus, l'exposition *in*

vitro des pDC à des agonistes de TLR7/8 et TLR9 induit l'expression de TRAIL à leur surface, les dotant d'une activité cytotoxique envers des cellules tumorales [542, 550, 551].

Une partie de mon travail de thèse a donc été consacrée à l'étude de la capacité du MV Schwarz à induire l'acquisition de propriétés cytotoxiques par les DC myéloïdes CD1c⁺ et les pDC du sang. Dans cette étude, nous avons pu mettre en évidence que le MV induit l'expression de TRAIL à la surface des DC CD1c⁺ et des pDC, ainsi que la production d'IFN- α par les deux types de DC. Nous obtenons les mêmes résultats lorsque les DC sont stimulées avec des cellules tumorales infectées par le MV. Grâce au Ruxolitinib inhibant la signalisation des IFN de type I, nous avons démontré que la sécrétion d'IFN- α en réponse au MV est responsable de l'expression de TRAIL. Ces résultats concordent avec d'autres études démontrant que l'expression de TRAIL sur les Mo-DC et les pDC dépend de l'IFN- α produit suite à leur stimulation [542, 549, 550, 553]. D'autre part, il est décrit que le gène codant pour TRAIL est un ISG, dont l'expression est induite par les IFN de type I [332]. Cependant, une étude a suggéré que TRAIL peut être exprimée sur les pDC suite la phosphorylation de STAT1 induite par la stimulation du TLR7 avec différents ligands, indépendamment de l'IFN- α [584].

Nous avons ensuite voulu déterminer les senseurs impliqués dans la détection du MV dans les DC CD1c⁺ et dans les pDC, menant à la sécrétion d'IFN- α et à l'expression de TRAIL. Nous avons démontré que dans les pDC, le MV n'est pas reconnu seulement par le TLR7 comme nous le pensions au moment de la publication des travaux de Jean-Baptiste Guillaume [171]. Les voies de signalisation dépendantes des RLR, impliquant RIG-I et Mda5, sont également activées par le MV dans les pDC et sont responsables de la sécrétion d'une partie de l'IFN- α permettant l'expression de TRAIL. En revanche, dans les DC CD1c⁺, la production d'IFN- α et l'expression de TRAIL sont induites uniquement par la voie des RLR. La quantité d'IFN- α produite par les DC CD1c⁺ en réponse au MV (de l'ordre du pg/mL) est inférieure à celle observée pour les pDC (de l'ordre du ng/mL) mais est néanmoins suffisante pour induire l'expression de TRAIL.

Plusieurs études ont été menées afin d'identifier les voies de signalisation impliquées dans la détection des virus à ARN et l'activation subséquente des pDC et des DC myéloïdes. Ainsi, des expériences ont été réalisées à partir de DC provenant de souris déficientes pour différents composants de la voie des RLR, tels que RIG-I [585], les kinases TBK-1 et IKK- ϵ [586], ou la protéine adaptatrice MAVS [281], ou provenant de souris déficientes pour TLR7 ou MyD88, impliquée dans la signalisation du TLR7 [585]. Ces études ont suggéré que la voie de signalisation des RLR est exploitée par les DC myéloïdes afin de répondre aux virus à

ARN, tandis que les pDC détectent ces virus exclusivement par TLR7. Cependant, ce modèle de reconnaissance exclusive des virus à ARN par TLR7 dans les pDC a été reconsidéré. En effet, Kato et ses collaborateurs ont noté que la sécrétion d'IFN- α par les pDC issues de souris déficientes pour MyD88, stimulées par un virus à ARN NDV, est perturbée mais pas complètement abolie [585]. Cela suggère l'implication d'une autre voie de signalisation dans les pDC responsable de la sécrétion d'IFN- α en réponse à un virus à ARN. Une autre étude a démontré que des virus à ARN simple brin tels que les paramyxovirus, entrant dans les pDC par fusion avec la membrane, induisent la sécrétion d'IFN- α indépendamment de la détection par TLR7, mais suite à la réplication virale [587]. Enfin, très récemment, Bruni et ses collaborateurs ont mis en évidence l'engagement de la signalisation des RLR dans les pDC en réponse à la souche vaccinale du virus de la fièvre jaune (YFV, Yellow Fever Virus) qui possède un génome à ARN positif [588]. Les auteurs ont démontré que ce virus est capable de stimuler TLR7 ou RIG-I, selon sa voie d'entrée dans la cellule. Dans ce modèle, la sécrétion d'IFN- α dépendante de TLR7 est déclenchée lorsque les pDC entrent en contact avec des cellules infectées, tandis que les particules virales libres stimulent RIG-I suite à la réplication du virus dans la cellule. Les auteurs ont inhibé l'expression des protéines RIG-I ou TLR7 grâce à des shRNA spécifiques (ARN short-hairpin) dans les cellules Gen2.2, lignée dérivant d'une leucémie à pDC qui partage les caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles avec les pDC normales [550], et ont ainsi confirmé les résultats obtenus avec des inhibiteurs spécifiques de ces voies de signalisation. Dans notre étude, nous montrons que le MV active les RLR en plus de TLR7 dans les pDC, étant donné que l'utilisation d'un inhibiteur spécifique de TLR7 (IRS661) ne suffit pas pour empêcher la sécrétion d'IFN- α et l'expression de TRAIL, l'inhibition simultanée des voies TLR7 et RLR étant requise.

Les voies de signalisation des RLR et des TLR étant supposées être distinctes, nous ne nous attendions pas à obtenir une aussi forte réduction de la sécrétion d'IFN- α et de l'expression de TRAIL suite au traitement des pDC avec l'inhibiteur spécifique des RLR (MRT67307), bloquant les kinases TBK-1 et IKK- ϵ . Cependant, une étude a montré qu'un agoniste de TLR7, le R837, induit l'activation de TBK-1 via sa phosphorylation dans des macrophages obtenus *in vitro* à partir de cellules de moelle osseuse de souris (BMDM, Bone Marrow-Derived Macrophages) [589]. De plus, deux rapports ont démontré simultanément que la protéine TRAF3 (TNF Receptor-Associated Factor 3), liant les protéines adaptatrices des TLR aux kinases en aval et menant ainsi à l'activation de TBK-1 et IKK- ϵ , est impliquée dans la production d'IFN- α dépendante du TLR7 dans les pDC [590] et les BMDM [591]. Il

est donc possible que l'inhibiteur MRT67307, qui inhibe la voie des RLR, inhibe également une partie de la signalisation induite par le TLR7.

En ce qui concerne les DC CD1c⁺, nous avons démontré que seule la voie des RLR est responsable de leur production d'IFN- α et de l'expression de TRAIL en réponse au MV. Il existe une controverse dans la littérature concernant l'expression de TLR7 par les DC CD1c⁺, certains travaux indiquant que ces DC expriment ce TLR [459, 462, 463], bien que beaucoup plus faiblement que les pDC, tandis que d'autres études ont montré une expression de TLR7 restreinte aux pDC [448, 460, 592]. Nous observons dans notre étude que l'agoniste de TLR7, R837, induit la maturation des DC CD1c⁺ qui expriment CD83, suggérant que ces DC expriment TLR7, mais n'induit pas la production d'IFN- α . Cette absence d'IFN- α pourrait s'expliquer par le fait que les DC myéloïdes expriment faiblement TLR7 et le facteur de transcription IRF7 impliqué dans sa production, contrairement aux pDC qui l'expriment fortement de manière constitutive et sont ainsi spécialisées dans la production d'une importante quantité d'IFN- α [470, 593, 594]. De plus, nous avons pu valider l'implication des RLR dans les DC CD1c⁺ grâce à l'irradiation du MV aux UV, qui affecte la réplication du MV et donc l'apparition d'intermédiaires de réplication, ligands des RLR, et empêche ainsi la sécrétion d'IFN- α et l'expression de TRAIL. De plus, l'irradiation aux UV peut perturber la structure du génome du MV et empêcher sa détection par RIG-I [270]. Une étude menée par Perrot et ses collaborateurs a également démontré la capacité des DC myéloïdes du sang à sécréter des IFN de type I suite à l'activation des RLR par des ligands synthétiques ARN double brin [595].

Des études ont mis en évidence que les souches atténuées du virus de la rougeole infectent et se répliquent dans les Mo-DC [596, 597] et les pDC [596, 598, 599], bien que la réplication dans les pDC soit beaucoup plus faible que dans d'autres cellules. Dans notre équipe, nous n'avons d'ailleurs pas réussi à mesurer la réplication du MV dans les pDC, certainement à cause d'un manque de sensibilité du test effectué, qui permettait néanmoins de visualiser la réplication dans les Mo-DC [171]. Le génome du MV et les intermédiaires de réplication sont ainsi susceptibles d'être reconnus par RIG-I et Mda5 dans le cytoplasme des DC. Dans les pDC, il a été démontré que l'ARN viral situé dans le cytoplasme peut atteindre les compartiments endosomaux et lysosomaux par le processus d'autophagie [600]. Etant donné que les pDC expriment CD46 à leur surface [596] et que le MV est capable d'induire une autophagie dépendante de CD46 [601], ce phénomène pourrait expliquer un des moyens d'accès de l'ARN du MV au TLR7, en plus de la voie d'endocytose.

Dans notre étude, nous démontrons que l'expression de la protéine TRAIL à la surface des DC, induite par le MV, les rend fonctionnellement cytotoxiques puisque nous mettons en évidence la lyse des cellules Jurkat qui sont sensibles à la mort induite par TRAIL [542, 551, 553]. Il serait intéressant de tester l'efficacité cytotoxique des DC stimulées par le MV envers des cellules tumorales exprimant le récepteur de TRAIL. L'activité cytotoxique des DC est moins élevée que l'activité lytique d'un lymphocyte T cytotoxique ou d'une cellule NK activée. Ceci est probablement dû au fait que l'arsenal des protéines impliquées dans l'activité cytotoxique est plus riche dans ces dernières que dans les DC. En effet, contrairement à une étude ayant identifié des DC myéloïdes CD11c⁺ sécrétant la perforine et le granzyme B suite à une stimulation par un ligand TLR7/8 [559], nous n'avons pas observé la sécrétion de ces protéines par les DC CD1c⁺ en réponse au MV. Les pDC, quant à elles, sécrètent le granzyme B en réponse au MV, mais pas de perforine. On peut d'ailleurs s'interroger sur l'implication du granzyme B dans l'activité cytotoxique des pDC puisque cette protéine est sécrétée seule sans perforine. De plus en plus d'études montrent toutefois que le granzyme B peut avoir une action anti-tumorale [554] et peut faciliter la transmigration des lymphocytes cytotoxiques en remodelant la matrice extracellulaire [602].

Nous avons ainsi démontré que le MV permet aux DC CD1c⁺ et aux pDC du sang d'acquérir une activité cytotoxique grâce à l'expression de TRAIL. Il serait intéressant de déterminer si dans la tumeur, les mêmes DC pourraient devenir dans un premier temps cytotoxiques en réponse au MV, pour induire la mort des cellules tumorales, qu'elles phagocyteraient dans un second temps afin de réaliser la présentation croisée d'antigènes de tumeur et induire une réponse anti-tumorale spécifique.

L'équipe a pour projet de comparer la capacité de présentation croisée d'antigènes par les 3 types de DC du sang : les DC CD1c⁺, les DC CD141⁺ et les pDC. Pour le moment, la présentation croisée d'antigène de tumeur effectuée par les Mo-DC et les pDC du sang à partir de cellules tumorales infectées par le MV a été étudiée [169, 171, 603] (Annexe n°5). Il serait donc intéressant d'étendre cette étude aux DC myéloïdes du sang, et plus particulièrement aux DC CD141⁺. Il a en effet été décrit que les DC CD141⁺ seraient spécialisées dans la présentation croisée d'antigènes [447, 461, 474, 475], bien que cela soit sujet à controverse [476-478]. Grâce au modèle de présentation croisée de l'antigène de tumeur NY-ESO-1 à un clone de lymphocyte T CD8⁺ spécifique que nous possédons dans l'équipe, il sera possible d'évaluer les propriétés de présentation croisée d'antigène des 3 types de DC du sang exposées aux cellules tumorales infectées par le MV.

Les DC sont très efficaces pour induire des réponses immunitaires anti-tumorales. Cependant, une fois sur le site tumoral, elles subissent souvent des modifications les dotant de fonctions immunorégulatrices favorisant le développement tumoral. De nombreux facteurs comme le VEGF, la PGE2 (Prostaglandine E2), le TGF- β , l'IL-10, l'IL-6 ou encore le M-CSF (Macrophage Colony-Stimulating Factor) sont sécrétés par les cellules tumorales elles-mêmes et par certaines cellules présentes dans l'environnement tumoral, comme les macrophages associés aux tumeurs et les lymphocytes T régulateurs [382]. Ces facteurs empêchent la différenciation et la maturation correctes des DC myéloïdes, induisant alors l'activation de lymphocytes T régulateurs. De plus, on retrouve dans l'environnement tumoral et les ganglions drainants la tumeur des DC myéloïdes exprimant IDO, enzyme catabolisant le tryptophane et qui prive ainsi les lymphocytes T d'un acide aminé essentiel à leur prolifération et leur différenciation [604]. En induisant l'apoptose ou l'anergie des lymphocytes T, IDO est un agent immunosuppresseur puissant. De nombreux mécanismes convertissent également les pDC en cellules immunosuppressives [605]. Ainsi, on peut noter la présence de pDC exprimant IDO dans les ganglions drainant la tumeur [606]. D'autre part, les pDC associées aux tumeurs expriment ICOSL (Inducible Costimulator Ligand), se liant à son récepteur ICOS présent sur les lymphocytes T CD4⁺ naïfs pour générer des lymphocytes T régulateurs exprimant la cytokine IL-10 [607]. Cette fonction suppressive des pDC a été observée chez des patientes atteintes de cancer de l'ovaire et de cancer du sein [608, 609]. Il a également été rapporté que la PGE2 ainsi que le TGF- β présents dans l'environnement tumoral inhibent la sécrétion d'IFN- α et de TNF- α par les pDC stimulées par des ligands de TLR7 et 9, et empêchent la migration des pDC dans les ganglions drainant la tumeur [610]. Il faut donc développer des agents thérapeutiques capables de stimuler et de réorienter les fonctions des DC présentes dans les tumeurs.

La stratégie d'immunothérapie anti-tumorale consistant à injecter des DC activées *ex vivo* présente certaines limites. Les DC peuvent être chargées en antigènes avec des longs peptides contenant des épitopes connus d'antigènes de tumeur, des protéines complètes ou encore des ARN messagers codant pour un antigène de tumeur [395]. Cependant, ces protocoles de chargement ne permettent l'induction de réponses immunitaires qu'envers un nombre restreint d'antigènes, et il est nécessaire d'identifier ceux présents chez la majorité des patients. De plus, il peut être difficile d'atteindre certains variants tumoraux présentant des mutations ou des défauts d'expression des antigènes de tumeur. La solution de chargement des DC à partir d'un lysat de cellules tumorales autologues permettrait l'établissement de réponses spécifiques d'antigènes de tumeur du patient, mais cette

procédure est difficile à mettre en place. Une autre limitation de cette stratégie réside dans la méthode d'injection des DC. En effet, la migration des DC dans les ganglions lymphatiques et l'induction de réponses lymphocytaires T anti-tumorales dépendent du site d'injection des DC. Tandis que l'injection intraganglionnaire permet une meilleure migration des DC dans les ganglions adjacents par rapport à l'injection intradermique, cette dernière permet une meilleure induction de lymphocytes T anti-tumoraux [611]. Enfin, cette stratégie immunothérapeutique est lourde à réaliser, coûteuse, difficile à standardiser et à optimiser, ce qui a certainement contribué à son succès limité [395]. Il semble donc préférable d'activer les DC *in situ* en utilisant des activateurs adéquats. Dans un modèle de cancer du sein chez la souris, il a été notamment montré *in vivo* que l'injection intratumorale d'un ligand de TLR7 permet de restaurer les propriétés anti-tumorales des pDC, accumulées sous forme immature dans la tumeur et participant au développement tumoral, en induisant leur sécrétion d'IFN- α [612].

La stratégie d'immunothérapie oncolytique basée sur l'utilisation du MV apparaît donc optimale pour activer les DC. En effet, en induisant la mort immunogène des cellules tumorales, le MV permet la libération d'antigènes de tumeur accompagnés de DAMP et de PAMP. Ces signaux pourraient permettre le recrutement de nouvelles DC dans la tumeur, ou permettre une activation adéquate des DC déjà présentes grâce au reconditionnement du microenvironnement tumoral. Dans cet environnement, la maturation des DC associée à l'acquisition d'antigènes propres à la tumeur du patient traité, pourraient être favorisées et provoquer leur migration vers les ganglions lymphatiques pour une présentation efficace des antigènes de tumeur aux lymphocytes. De plus, le MV pourrait avoir la capacité d'induire *in vivo* des pDC et des DC myéloïdes cytotoxiques, pouvant participer à l'éradication de la tumeur. En effet, il a été montré chez l'homme que l'application d'une crème contenant de l'imiquimod (ligand de TLR7) sur des lésions de carcinome basocellulaire induit un infiltrat immunitaire, contenant des pDC et des DC myéloïdes cytotoxiques, qui est associé à leur régression complète [559].

De nombreuses preuves pré-cliniques chez la souris ont mis en évidence l'intervention de lymphocytes T CD8⁺ dans l'élimination de tumeurs suite à l'injection de divers virus oncolytiques [397, 400]. Chez l'homme, les résultats de l'essai clinique de phase I évaluant l'efficacité du MV pour le traitement du cancer de l'ovaire chimiorésistant a révélé la présence de lymphocytes T CD8⁺ spécifiques d'antigènes de tumeur dans le sang des patientes [243]. De même, chez des patients atteints de mélanome métastatique traités par le virus de l'herpes T-Vec, des lymphocytes T CD8⁺ spécifiques de l'antigène de tumeur

MART-1 ont été observés dans les lésions injectées ainsi que dans les lésions non injectées [259]. Cependant, l'activation ainsi que l'activité cytotoxique de ces lymphocytes T spécifiques d'antigènes de tumeur peuvent être altérées par certaines molécules appelées "checkpoints" immunitaires, intervenant normalement pour le maintien de la tolérance du soi et le contrôle de l'amplitude de la réponse immunitaire dans les tissus périphériques [613]. Une de ces molécules est CTLA-4, exprimée par les lymphocytes T et qui intervient dans la régulation de leur première phase d'activation. Il est reconnu que CTLA-4 entre en compétition avec la molécule co-stimulatrice CD28 et influence négativement la signalisation du TCR des lymphocytes T spécifiques de l'antigène présenté par les DC. Cette molécule ayant un rôle physiologique important et n'étant pas spécifiquement régulée par la tumeur, on pouvait initialement s'interroger sur l'intérêt de la bloquer. Cependant, suite à des études pré-cliniques ayant prouvé un effet anti-tumoral du blocage de CTLA-4 [614], des anticorps monoclonaux ont été testés en clinique, et en 2010 l'ipilimumab a été approuvé par la FDA pour le traitement du mélanome métastatique, permettant une amélioration de la survie des patients [615]. Un autre récepteur inhibiteur, PD-1 est exprimé sur les lymphocytes T activés, afin de limiter l'activité de ces cellules dans les tissus périphériques inflammés et éviter les phénomènes d'autoimmunité [616]. Cependant, il est maintenant clairement établi que les tumeurs utilisent ce mécanisme pour résister à l'action des lymphocytes T cytotoxiques [378]. En effet, grâce à l'expression du ligand de PD-1, PD-L1, les cellules tumorales induisent l'apoptose ou l'anergie des lymphocytes T cytotoxiques. De plus, une forte expression de PD-1 par les lymphocytes infiltrant les tumeurs a été observée, notamment dans le mélanome [617]. Il est donc apparu intéressant de bloquer cette interaction entre PD-1 et PD-L1 grâce à des anticorps bloquants afin de restaurer les fonctions de la réponse immunitaire anti-tumorale effectrice [618]. Des anticorps sont évalués dans des essais cliniques, ciblant PD-1 ou PD-L1 [619]. Le nivolumab, ciblant PD-1, a été approuvé récemment pour le traitement du mélanome métastatique et du cancer bronchique non à petites cellules [620, 621].

Il est donc intéressant d'envisager l'utilisation de ces anticorps bloquants en association avec la virothérapie anti-tumorale, pouvant favoriser l'activation et l'activité cytotoxique des lymphocytes T CD8⁺ anti-tumoraux, générés grâce à l'action des virus oncolytiques. Une étude pré-clinique vient d'évaluer l'efficacité de MV codant pour des anticorps anti-CTLA-4 ou anti-PD-L1 et de l'association du MV avec l'injection systémique de ces anticorps bloquants [622]. Afin d'étudier les effets immunothérapeutiques, un modèle murin immunocompétent est nécessaire. Etant donné que les cellules murines ne possèdent pas les récepteurs du MV, un modèle de mélanome murin B16, modifié pour exprimer la

molécule CD20 à sa surface, a été généré chez la souris immunocompétente et les cellules tumorales peuvent ainsi être infectées par un MV redirigé vers ce récepteur. Cette étude a mis en évidence une efficacité thérapeutique des virus MV codant pour les anticorps anti-CTLA-4 ou anti-PD-L1. L'analyse des lymphocytes infiltrant la tumeur après le traitement par ces virus a révélé un profil immunitaire favorable par rapport au MV contrôle, avec une augmentation du nombre total de lymphocytes, une réduction du nombre de lymphocytes T régulateurs et un ratio lymphocytes CD8⁺/lymphocytes T régulateurs élevé. Le traitement des souris par une injection intra-tumorale du MV contrôle suivie de l'injection systémique d'anticorps anti-CTLA-4 prolonge la survie par rapport à l'injection intra-tumorale du MV codant pour cet anticorps. CTLA-4 intervient au cours des premières phases d'activation des lymphocytes T dans les ganglions lymphatiques et une injection systémique des anticorps bloquants est préférable à son expression locale induite dans la tumeur par le MV recombinant. En revanche, concernant l'anticorps anti-PD-L1, l'efficacité obtenue suite à son injection systémique est comparable à celle obtenue suite à son expression localisée dans la tumeur, ce qui concorde avec le fait que la signalisation PD-1/PD-L1 est importante dans le microenvironnement tumoral, lors de la phase effectrice des lymphocytes activés. Il apparaît donc important d'identifier la meilleure fenêtre d'injection des différents anticorps bloquants pour obtenir une réponse immunitaire anti-tumorale optimale. Le virus oncolytique T-Vec, récemment approuvé par la FDA, est actuellement évalué en association avec l'ipilimumab dans un essai clinique de phase I/II pour le traitement du mélanome métastatique. Lors du congrès OVC 2015, Robert Andtbacka a révélé que les résultats cliniques obtenus avec cette combinaison sont meilleurs que ceux obtenus avec le T-Vec seul [247] (Annexe n°1). Une phase II est en cours afin de comparer l'association du T-Vec avec l'ipilimumab à l'ipilimumab seul. Ainsi, l'association de l'immunothérapie oncolytique avec les thérapies ciblant les "checkpoints" immunitaires pourrait apporter un meilleur bénéfice thérapeutique.

En plus de leur pouvoir anti-viral et de leurs fonctions anti-tumorales directes, il est reconnu que les IFN de type I jouent un rôle crucial dans l'établissement des réponses immunitaires anti-tumorales. Ils activent les propriétés de différentes cellules immunitaires telles que la cytotoxicité des NK, la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires par les macrophages, la capacité de présentation croisée et la maturation des cellules dendritiques ainsi que la cytotoxicité des lymphocytes T CD8⁺ [372, 526]. Gajewski et ses collaborateurs ont mis en évidence des réponses lymphocytaires T anti-tumorales spontanées chez certains patients, corrélant avec une signature IFN de type I [529]. Il a été décrit que l'ADN des cellules tumorales mourant par nécrose active la voie de signalisation STING dans les DC

CD11c⁺ présentes dans l'environnement tumoral, qui produisent alors de l'IFN- β potentialisant la capacité de présentation croisée d'antigènes de tumeur par les DC CD8 α ⁺ aux lymphocytes T CD8⁺ [529, 531]. L'implication de STING et la signalisation IFN de type I étant nécessaires à l'établissement des réponses lymphocytaires T CD8⁺ anti-tumorales spontanées, des stratégies thérapeutiques ciblant STING par l'injection intra-tumorale d'agonistes ont été envisagées [532]. Dans une revue récente, Laurence Zitvogel met en avant l'importance de la signalisation IFN de type I dans le succès de nombreuses thérapies anti-tumorales [372]. La présence d'IFN de type I et l'expression d'ISG dans la tumeur ont d'ailleurs été corrélées à un meilleur pronostic chez les patients. Il a été rapporté que l'efficacité de la doxorubicine, une anthracycline, dépend de la sécrétion d'IFN de type I par les cellules tumorales [623]. L'analyse de biopsies de patientes souffrant de cancer du sein, traitées par la doxorubicine, a d'ailleurs mis en évidence que la signature IFN de type I pourrait prédire la réponse clinique au traitement [623]. D'autre part, très récemment, deux groupes ont décrit que l'inhibition de la méthylation de l'ADN entraîne une réponse IFN de type I ayant un effet anti-tumoral [624-626]. Roulois et ses collaborateurs ont notamment démontré que le traitement de cellules initiatrices de cancer colorectal par une faible dose de 5-aza-2'-deoxycytidine, un agent déméthylant l'ADN, induit des ARN double brin, pouvant provenir de l'expression de séquences rétrovirales latentes présentes dans le génome, menant à la production d'IFN de type I par la voie Mda5/MAVS/IRF7 [624]. L'injection systémique d'IFN de type I étant accompagnée d'effets indésirables, l'objectif est d'induire leur production dans la tumeur, par les cellules tumorales elles-mêmes ou les cellules immunitaires infiltrantes telles que les DC. Les études précédemment décrites ont mis en évidence un bénéfice à induire la réponse IFN de type I en mimant une infection virale [623-625]. Parmi les stratégies proposées, certaines consistent donc à injecter des ligands synthétiques de PRR tels que RIG-I, Mda5 et TLR3, pour induire la production d'IFN de type I [372, 627]. Le MV présente ainsi l'avantage d'induire la sécrétion d'IFN de type I dans l'environnement tumoral suite à sa détection par des récepteurs spécifiques dans les cellules saines environnantes, les cellules tumorales si elles possèdent une signalisation IFN de type I totalement ou partiellement intacte, mais également dans les pDC, qui produisent une importante quantité d'IFN- α , et les DC myéloïdes.

La stratégie de virothérapie anti-tumorale basée sur l'utilisation du MV représente ainsi une modalité thérapeutique très attractive. En effet, en plus d'être un agent lytique efficace ciblant spécifiquement les cellules tumorales, le MV possède des propriétés immunostimulatrices. Grâce à la mort immunogène des cellules tumorales, la libération

d'antigènes de tumeur et l'importante sécrétion d'IFN de type I qu'il induit, le MV peut établir un environnement favorable à l'activation des DC et à l'initiation de réponses immunitaires anti-tumorales efficaces. Le MV est un agent idéal pour générer des lymphocytes T CD8⁺ spécifiques d'antigènes de tumeur et il peut être envisagé de le coupler à des thérapies appropriées, telles que les inhibiteurs des "checkpoints" immunitaires, visant ainsi à bloquer certains mécanismes d'échappement de la tumeur vis-à-vis du système immunitaire dans le but d'obtenir une efficacité thérapeutique optimale.

RÉFÉRENCES

1. Neumann, V., S. Loseke, D. Nowak, F.J. Herth, and A. Tannapfel, *Malignant pleural mesothelioma: incidence, etiology, diagnosis, treatment, and occupational health*. Dtsch Arztebl Int, 2013. **110**(18): p. 319-26.
2. Bianchi, C. and T. Bianchi, *Malignant mesothelioma: global incidence and relationship with asbestos*. Ind Health, 2007. **45**(3): p. 379-87.
3. Scherpereel, A., P. Astoul, P. Baas, T. Berghmans, H. Clayson, P. de Vuyst, H. Dienemann, F. Galateau-Salle, C. Hennequin, G. Hillerdal, C. Le Pechoux, L. Mutti, J.C. Pairon, R. Stahel, P. van Houtte, et al., *Guidelines of the European Respiratory Society and the European Society of Thoracic Surgeons for the management of malignant pleural mesothelioma*. Eur Respir J, 2010. **35**(3): p. 479-95.
4. Carbone, M., R.A. Kratzke, and J.R. Testa, *The pathogenesis of mesothelioma*. Semin Oncol, 2002. **29**(1): p. 2-17.
5. Wagner, J.C., C.A. Sleggs, and P. Marchand, *Diffuse pleural mesothelioma and asbestos exposure in the North Western Cape Province*. Br J Ind Med, 1960. **17**: p. 260-71.
6. Sporn, T.A., *Mineralogy of asbestos*. Recent Results Cancer Res, 2011. **189**: p. 1-11.
7. Nasreen, N., N. Khodayari, and K.A. Mohammed, *Advances in malignant pleural mesothelioma therapy: targeting EphA2 a novel approach*. Am J Cancer Res, 2012. **2**(2): p. 222-34.
8. Delgermaa, V., K. Takahashi, E.K. Park, G.V. Le, T. Hara, and T. Sorahan, *Global mesothelioma deaths reported to the World Health Organization between 1994 and 2008*. Bull World Health Organ, 2011. **89**(10): p. 716-24, 724A-724C.
9. Rodelsperger, K., H.J. Woitowitz, B. Bruckel, R. Arhelger, H. Pohlabeln, and K.H. Jockel, *Dose-response relationship between amphibole fiber lung burden and mesothelioma*. Cancer Detect Prev, 1999. **23**(3): p. 183-93.
10. Davis, J.M., J. Addison, R.E. Bolton, K. Donaldson, A.D. Jones, and T. Smith, *The pathogenicity of long versus short fibre samples of amosite asbestos administered to rats by inhalation and intraperitoneal injection*. Br J Exp Pathol, 1986. **67**(3): p. 415-30.
11. Donaldson, K. and N. Golyasnya, *Cytogenetic and pathogenic effects of long and short amosite asbestos*. J Pathol, 1995. **177**(3): p. 303-7.
12. Miserocchi, G., G. Sancini, F. Mantegazza, and G. Chiappino, *Translocation pathways for inhaled asbestos fibers*. Environ Health, 2008. **7**: p. 4.
13. Donaldson, K., F.A. Murphy, R. Duffin, and C.A. Poland, *Asbestos, carbon nanotubes and the pleural mesothelium: a review of the hypothesis regarding the role of long fibre retention in the parietal pleura, inflammation and mesothelioma*. Part Fibre Toxicol, 2010. **7**: p. 5.
14. Boutin, C., P. Dumortier, F. Rey, J.R. Viallat, and P. De Vuyst, *Black spots concentrate oncogenic asbestos fibers in the parietal pleura. Thoracoscopic and mineralogic study*. Am J Respir Crit Care Med, 1996. **153**(1): p. 444-9.
15. Robinson, B.W., A.W. Musk, and R.A. Lake, *Malignant mesothelioma*. Lancet, 2005. **366**(9483): p. 397-408.
16. Jaurand, M.C., H. Kaplan, J. Thiollot, M.C. Pinchon, J.F. Bernaudin, and J. Bignon, *Phagocytosis of chrysotile fibers by pleural mesothelial cells in culture*. Am J Pathol, 1979. **94**(3): p. 529-38.
17. Liu, W., J.D. Ernst, and V.C. Broaddus, *Phagocytosis of crocidolite asbestos induces oxidative stress, DNA damage, and apoptosis in mesothelial cells*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2000. **23**(3): p. 371-8.

18. Yegles, M., L. Saint-Etienne, A. Renier, X. Janson, and M.C. Jaurand, *Induction of metaphase and anaphase/telophase abnormalities by asbestos fibers in rat pleural mesothelial cells in vitro*. Am J Respir Cell Mol Biol, 1993. **9**(2): p. 186-91.
19. Chew, S.H. and S. Toyokuni, *Malignant mesothelioma as an oxidative stress-induced cancer: An update*. Free Radic Biol Med, 2015. **86**: p. 166-78.
20. Xu, A., H. Zhou, D.Z. Yu, and T.K. Hei, *Mechanisms of the genotoxicity of crocidolite asbestos in mammalian cells: implication from mutation patterns induced by reactive oxygen species*. Environ Health Perspect, 2002. **110**(10): p. 1003-8.
21. Yang, H., M. Bocchetta, B. Kroczyńska, A.G. Elmishad, Y. Chen, Z. Liu, C. Bubici, B.T. Mossman, H.I. Pass, J.R. Testa, G. Franzoso, and M. Carbone, *TNF-alpha inhibits asbestos-induced cytotoxicity via a NF-kappaB-dependent pathway, a possible mechanism for asbestos-induced oncogenesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(27): p. 10397-402.
22. Zucali, P.A., G.L. Ceresoli, F. De Vincenzo, M. Simonelli, E. Lorenzi, L. Gianoncelli, and A. Santoro, *Advances in the biology of malignant pleural mesothelioma*. Cancer Treat Rev, 2011. **37**(7): p. 543-58.
23. Yang, H., Z. Rivera, S. Jube, M. Nasu, P. Bertino, C. Goparaju, G. Franzoso, M.T. Lotze, T. Krausz, H.I. Pass, M.E. Bianchi, and M. Carbone, *Programmed necrosis induced by asbestos in human mesothelial cells causes high-mobility group box 1 protein release and resultant inflammation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(28): p. 12611-6.
24. Carbone, M., B.H. Ly, R.F. Dodson, I. Pagano, P.T. Morris, U.A. Dogan, A.F. Gazdar, H.I. Pass, and H. Yang, *Malignant mesothelioma: facts, myths, and hypotheses*. J Cell Physiol, 2012. **227**(1): p. 44-58.
25. Qi, F., G. Okimoto, S. Jube, A. Napolitano, H.I. Pass, R. Laczko, R.M. Demay, G. Khan, M. Tiirikainen, C. Rinaudo, A. Croce, H. Yang, G. Gaudino, and M. Carbone, *Continuous exposure to chrysotile asbestos can cause transformation of human mesothelial cells via HMGB1 and TNF-alpha signaling*. Am J Pathol, 2013. **183**(5): p. 1654-66.
26. Robinson, B.W. and R.A. Lake, *Advances in malignant mesothelioma*. N Engl J Med, 2005. **353**(15): p. 1591-603.
27. Carbone, M., H.I. Pass, L. Miele, and M. Bocchetta, *New developments about the association of SV40 with human mesothelioma*. Oncogene, 2003. **22**(33): p. 5173-80.
28. Cutrone, R., J. Lednický, G. Dunn, P. Rizzo, M. Bocchetta, K. Chumakov, P. Minor, and M. Carbone, *Some oral poliovirus vaccines were contaminated with infectious SV40 after 1961*. Cancer Res, 2005. **65**(22): p. 10273-9.
29. Carbone, M., H.I. Pass, P. Rizzo, M. Marinetti, M. Di Muzio, D.J. Mew, A.S. Levine, and A. Procopio, *Simian virus 40-like DNA sequences in human pleural mesothelioma*. Oncogene, 1994. **9**(6): p. 1781-90.
30. Rivera, Z., O. Strianese, P. Bertino, H. Yang, H. Pass, and M. Carbone, *The relationship between simian virus 40 and mesothelioma*. Curr Opin Pulm Med, 2008. **14**(4): p. 316-21.
31. Bocchetta, M., I. Di Resta, A. Powers, R. Fresco, A. Tosolini, J.R. Testa, H.I. Pass, P. Rizzo, and M. Carbone, *Human mesothelial cells are unusually susceptible to simian virus 40-mediated transformation and asbestos cocarcinogenicity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(18): p. 10214-9.
32. Gazdar, A.F., J.S. Butel, and M. Carbone, *SV40 and human tumours: myth, association or causality?* Nat Rev Cancer, 2002. **2**(12): p. 957-64.

33. Bocchetta, M., S. Eliaz, M.A. De Marco, J. Rudzinski, L. Zhang, and M. Carbone, *The SV40 large T antigen-p53 complexes bind and activate the insulin-like growth factor-I promoter stimulating cell growth*. Cancer Res, 2008. **68**(4): p. 1022-9.
34. Kroczyńska, B., R. Cutrone, M. Bocchetta, H. Yang, A.G. Elmishad, P. Vacek, M. Ramos-Nino, B.T. Mossman, H.I. Pass, and M. Carbone, *Crocidolite asbestos and SV40 are cocarcinogens in human mesothelial cells and in causing mesothelioma in hamsters*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(38): p. 14128-33.
35. Cristaudo, A., R. Foddis, A. Vivaldi, R. Buselli, V. Gattini, G. Guglielmi, F. Cosentino, F. Ottenga, E. Ciancia, R. Libener, R. Filiberti, M. Neri, P. Betta, M. Tognon, L. Mutti, et al., *SV40 enhances the risk of malignant mesothelioma among people exposed to asbestos: a molecular epidemiologic case-control study*. Cancer Res, 2005. **65**(8): p. 3049-52.
36. Eibel, R., S. Tuengerthal, and S.O. Schoenberg, *The role of new imaging techniques in diagnosis and staging of malignant pleural mesothelioma*. Curr Opin Oncol, 2003. **15**(2): p. 131-8.
37. Gill, R.R., *Imaging of mesothelioma*. Recent Results Cancer Res, 2011. **189**: p. 27-43.
38. Wang, Z.J., G.P. Reddy, M.B. Gotway, C.B. Higgins, D.M. Jablons, M. Ramaswamy, R.A. Hawkins, and W.R. Webb, *Malignant pleural mesothelioma: evaluation with CT, MR imaging, and PET*. Radiographics, 2004. **24**(1): p. 105-19.
39. Henderson, D.W., G. Reid, S.C. Kao, N. van Zandwijk, and S. Klebe, *Challenges and controversies in the diagnosis of mesothelioma: Part 1. Cytology-only diagnosis, biopsies, immunohistochemistry, discrimination between mesothelioma and reactive mesothelial hyperplasia, and biomarkers*. J Clin Pathol, 2013. **66**(10): p. 847-53.
40. Rakha, E.A., S. Patil, K. Abdulla, M. Abdulkader, Z. Chaudry, and I.N. Soomro, *The sensitivity of cytologic evaluation of pleural fluid in the diagnosis of malignant mesothelioma*. Diagn Cytopathol, 2010. **38**(12): p. 874-9.
41. Yaziji, H., H. Battifora, T.S. Barry, H.C. Hwang, C.E. Bacchi, M.W. McIntosh, S.J. Kussick, and A.M. Gown, *Evaluation of 12 antibodies for distinguishing epithelioid mesothelioma from adenocarcinoma: identification of a three-antibody immunohistochemical panel with maximal sensitivity and specificity*. Mod Pathol, 2006. **19**(4): p. 514-23.
42. Klebe, S., M. Nurminen, J. Leigh, and D.W. Henderson, *Diagnosis of epithelial mesothelioma using tree-based regression analysis and a minimal panel of antibodies*. Pathology, 2009. **41**(2): p. 140-8.
43. Husain, A.N., T. Colby, N. Ordonez, T. Krausz, R. Attanoos, M.B. Beasley, A.C. Borczuk, K. Butnor, P.T. Cagle, L.R. Chirieac, A. Churg, S. Dacic, A. Fraire, F. Galateau-Salle, A. Gibbs, et al., *Guidelines for pathologic diagnosis of malignant mesothelioma: 2012 update of the consensus statement from the International Mesothelioma Interest Group*. Arch Pathol Lab Med, 2013. **137**(5): p. 647-67.
44. Sapede, C., A. Gauvrit, I. Barbieux, M. Padieu, L. Cellerin, C. Sagan, A. Scherpereel, G. Dabouis, and M. Gregoire, *Aberrant splicing and protease involvement in mesothelin release from epithelioid mesothelioma cells*. Cancer Sci, 2008. **99**(3): p. 590-4.
45. Robinson, B.W., J. Creaney, R. Lake, A. Nowak, A.W. Musk, N. de Klerk, P. Winzell, K.E. Hellstrom, and I. Hellstrom, *Mesothelin-family proteins and diagnosis of mesothelioma*. Lancet, 2003. **362**(9396): p. 1612-6.
46. Creaney, J., D. Yeoman, L.K. Naumoff, M. Hof, A. Segal, A.W. Musk, N. De Klerk, N. Horick, S.J. Skates, and B.W. Robinson, *Soluble mesothelin in effusions: a useful tool for the diagnosis of malignant mesothelioma*. Thorax, 2007. **62**(7): p. 569-76.

47. Hollevoet, K., J.B. Reitsma, J. Creaney, B.D. Grigoriu, B.W. Robinson, A. Scherpereel, A. Cristaudo, H.I. Pass, K. Nackaerts, J.A. Rodriguez Portal, J. Schneider, T. Muley, F. Di Serio, P. Baas, M. Tomasetti, et al., *Serum mesothelin for diagnosing malignant pleural mesothelioma: an individual patient data meta-analysis*. J Clin Oncol, 2012. **30**(13): p. 1541-9.
48. Cui, A., X.G. Jin, K. Zhai, Z.H. Tong, and H.Z. Shi, *Diagnostic values of soluble mesothelin-related peptides for malignant pleural mesothelioma: updated meta-analysis*. BMJ Open, 2014. **4**(2): p. e004145.
49. Grigoriu, B.D., A. Scherpereel, P. Devos, B. Chahine, M. Letourneux, P. Lebailly, M. Gregoire, H. Porte, M.C. Copin, and P. Lassalle, *Utility of osteopontin and serum mesothelin in malignant pleural mesothelioma diagnosis and prognosis assessment*. Clin Cancer Res, 2007. **13**(10): p. 2928-35.
50. Hollevoet, K., K. Nackaerts, J. Thimpont, P. Germonpre, L. Bosquee, P. De Vuyst, C. Legrand, E. Kellen, Y. Kishi, J.R. Delanghe, and J.P. van Meerbeeck, *Diagnostic performance of soluble mesothelin and megakaryocyte potentiating factor in mesothelioma*. Am J Respir Crit Care Med, 2010. **181**(6): p. 620-5.
51. Creaney, J., D. Yeoman, Y. Demelker, A. Segal, A.W. Musk, S.J. Skates, and B.W. Robinson, *Comparison of osteopontin, megakaryocyte potentiating factor, and mesothelin proteins as markers in the serum of patients with malignant mesothelioma*. J Thorac Oncol, 2008. **3**(8): p. 851-7.
52. Pass, H.I., S.M. Levin, M.R. Harbut, J. Melamed, L. Chiriboga, J. Donington, M. Huflejt, M. Carbone, D. Chia, L. Goodglick, G.E. Goodman, M.D. Thornquist, G. Liu, M. de Perrot, M.S. Tsao, et al., *Fibulin-3 as a blood and effusion biomarker for pleural mesothelioma*. N Engl J Med, 2012. **367**(15): p. 1417-27.
53. Gueugnon, F., S. Leclercq, C. Blanquart, C. Sagan, L. Cellerin, M. Padieu, C. Perigaud, A. Scherpereel, and M. Gregoire, *Identification of novel markers for the diagnosis of malignant pleural mesothelioma*. Am J Pathol, 2011. **178**(3): p. 1033-42.
54. Blanquart, C., F. Gueugnon, J.M. Nguyen, D. Roulois, L. Cellerin, C. Sagan, C. Perigaud, A. Scherpereel, and M. Gregoire, *CCL2, galectin-3, and SMRP combination improves the diagnosis of mesothelioma in pleural effusions*. J Thorac Oncol, 2012. **7**(5): p. 883-9.
55. Hollevoet, K., K. Nackaerts, R. Gosselin, W. De Wever, L. Bosquee, P. De Vuyst, P. Germonpre, E. Kellen, C. Legrand, Y. Kishi, J.R. Delanghe, and J.P. van Meerbeeck, *Soluble mesothelin, megakaryocyte potentiating factor, and osteopontin as markers of patient response and outcome in mesothelioma*. J Thorac Oncol, 2011. **6**(11): p. 1930-7.
56. Meyerhoff, R.R., C.F. Yang, P.J. Speicher, B.C. Gulack, M.G. Hartwig, T.A. D'Amico, D.H. Harpole, and M.F. Berry, *Impact of mesothelioma histologic subtype on outcomes in the Surveillance, Epidemiology, and End Results database*. J Surg Res, 2015. **196**(1): p. 23-32.
57. Mansfield, A.S., J.T. Symanowski, and T. Peikert, *Systematic review of response rates of sarcomatoid malignant pleural mesotheliomas in clinical trials*. Lung Cancer, 2014. **86**(2): p. 133-6.
58. Flores, R.M., E. Riedel, J.S. Donington, W. Alago, U. Ihekweazu, L. Krug, K. Rosenzweig, P.S. Adusumilli, M. Carbone, and H.I. Pass, *Frequency of use and predictors of cancer-directed surgery in the management of malignant pleural mesothelioma in a community-based (Surveillance, Epidemiology, and End Results [SEER]) population*. J Thorac Oncol, 2010. **5**(10): p. 1649-54.
59. Lang-Lazdunski, L., *Surgery for malignant pleural mesothelioma: why, when and what?* Lung Cancer, 2014. **84**(2): p. 103-9.

60. Sugarbaker, D.J. and A.S. Wolf, *Surgery for malignant pleural mesothelioma*. Expert Rev Respir Med, 2010. **4**(3): p. 363-72.
61. Rice, D., *Surgical therapy of mesothelioma*. Recent Results Cancer Res, 2011. **189**: p. 97-125.
62. Muers, M.F., R.J. Stephens, P. Fisher, L. Darlison, C.M. Higgs, E. Lowry, A.G. Nicholson, M. O'Brien, M. Peake, R. Rudd, M. Snee, J. Steele, D.J. Girling, M. Nankivell, C. Pugh, et al., *Active symptom control with or without chemotherapy in the treatment of patients with malignant pleural mesothelioma (MS01): a multicentre randomised trial*. Lancet, 2008. **371**(9625): p. 1685-94.
63. Vogelzang, N.J., J.J. Rusthoven, J. Symanowski, C. Denham, E. Kaukel, P. Ruffie, U. Gatzemeier, M. Boyer, S. Emri, C. Manegold, C. Niyikiza, and P. Paoletti, *Phase III study of pemetrexed in combination with cisplatin versus cisplatin alone in patients with malignant pleural mesothelioma*. J Clin Oncol, 2003. **21**(14): p. 2636-44.
64. Chatelut, E., *[Pharmacology of platinum compounds: differences between the three molecules and factors of interpatient variability]*. Bull Cancer, 2011. **98**(11): p. 1253-61.
65. Chattopadhyay, S., R.G. Moran, and I.D. Goldman, *Pemetrexed: biochemical and cellular pharmacology, mechanisms, and clinical applications*. Mol Cancer Ther, 2007. **6**(2): p. 404-17.
66. Scherpereel, A., *Guidelines of the French Speaking Society for Chest Medicine for management of malignant pleural mesothelioma*. Respir Med, 2007. **101**(6): p. 1265-76.
67. van Meerbeeck, J.P., R. Gaafar, C. Manegold, R.J. Van Klaveren, E.A. Van Marck, M. Vincent, C. Legrand, A. Bottomley, C. Debruyne, and G. Giaccone, *Randomized phase III study of cisplatin with or without raltitrexed in patients with malignant pleural mesothelioma: an intergroup study of the European Organisation for Research and Treatment of Cancer Lung Cancer Group and the National Cancer Institute of Canada*. J Clin Oncol, 2005. **23**(28): p. 6881-9.
68. Manegold, C., J. Symanowski, U. Gatzemeier, M. Reck, J. von Pawel, C. Kortsik, K. Nackaerts, P. Lianes, and N.J. Vogelzang, *Second-line (post-study) chemotherapy received by patients treated in the phase III trial of pemetrexed plus cisplatin versus cisplatin alone in malignant pleural mesothelioma*. Ann Oncol, 2005. **16**(6): p. 923-7.
69. Price, A., *What is the role of radiotherapy in malignant pleural mesothelioma?* Oncologist, 2011. **16**(3): p. 359-65.
70. Dhalluin, X. and A. Scherpereel, *Chemotherapy and radiotherapy for mesothelioma*. Recent Results Cancer Res, 2011. **189**: p. 127-47.
71. Krug, L.M., H.I. Pass, V.W. Rusch, H.L. Kindler, D.J. Sugarbaker, K.E. Rosenzweig, R. Flores, J.S. Friedberg, K. Pisters, M. Monberg, C.K. Obasaju, and N.J. Vogelzang, *Multicenter phase II trial of neoadjuvant pemetrexed plus cisplatin followed by extrapleural pneumonectomy and radiation for malignant pleural mesothelioma*. J Clin Oncol, 2009. **27**(18): p. 3007-13.
72. Bolukbas, S., C. Manegold, M. Eberlein, T. Bergmann, A. Fisseler-Eckhoff, and J. Schirren, *Survival after trimodality therapy for malignant pleural mesothelioma: Radical Pleurectomy, chemotherapy with Cisplatin/Pemetrexed and radiotherapy*. Lung Cancer, 2011. **71**(1): p. 75-81.
73. Van Schil, P.E., P. Baas, R. Gaafar, A.P. Maat, M. Van de Pol, B. Hasan, H.M. Klomp, A.M. Abdelrahman, J. Welch, and J.P. van Meerbeeck, *Trimodality therapy for malignant pleural mesothelioma: results from an EORTC phase II multicentre trial*. Eur Respir J, 2010. **36**(6): p. 1362-9.

74. Kotova, S., R.M. Wong, and R.B. Cameron, *New and emerging therapeutic options for malignant pleural mesothelioma: review of early clinical trials*. Cancer Manag Res, 2015. 7: p. 51-63.
75. Pinton, G., A.G. Manente, D. Tavian, L. Moro, and L. Mutti, *Therapies currently in Phase II trials for malignant pleural mesothelioma*. Expert Opin Investig Drugs, 2013. 22(10): p. 1255-63.
76. Christoph, D.C. and W.E. Eberhardt, *Systemic treatment of malignant pleural mesothelioma: new agents in clinical trials raise hope of relevant improvements*. Curr Opin Oncol, 2014. 26(2): p. 171-81.
77. Liu, Z. and J. Klominek, *Inhibition of proliferation, migration, and matrix metalloprotease production in malignant mesothelioma cells by tyrosine kinase inhibitors*. Neoplasia, 2004. 6(6): p. 705-12.
78. Govindan, R., R.A. Kratzke, J.E. Herndon, 2nd, G.A. Niehans, R. Vollmer, D. Watson, M.R. Green, and H.L. Kindler, *Gefitinib in patients with malignant mesothelioma: a phase II study by the Cancer and Leukemia Group B*. Clin Cancer Res, 2005. 11(6): p. 2300-4.
79. Garland, L.L., C. Rankin, D.R. Gandara, S.E. Rivkin, K.M. Scott, R.B. Nagle, A.J. Klein-Szanto, J.R. Testa, D.A. Altomare, and E.C. Borden, *Phase II study of erlotinib in patients with malignant pleural mesothelioma: a Southwest Oncology Group Study*. J Clin Oncol, 2007. 25(17): p. 2406-13.
80. Strizzi, L., A. Catalano, G. Vianale, S. Orecchia, A. Casalini, G. Tassi, R. Puntoni, L. Mutti, and A. Procopio, *Vascular endothelial growth factor is an autocrine growth factor in human malignant mesothelioma*. J Pathol, 2001. 193(4): p. 468-75.
81. Yasumitsu, A., C. Tabata, R. Tabata, N. Hirayama, A. Murakami, S. Yamada, T. Terada, S. Iida, K. Tamura, K. Fukuoka, K. Kuribayashi, and T. Nakano, *Clinical significance of serum vascular endothelial growth factor in malignant pleural mesothelioma*. J Thorac Oncol, 2010. 5(4): p. 479-83.
82. Hirayama, N., C. Tabata, R. Tabata, R. Maeda, A. Yasumitsu, S. Yamada, K. Kuribayashi, K. Fukuoka, and T. Nakano, *Pleural effusion VEGF levels as a prognostic factor of malignant pleural mesothelioma*. Respir Med, 2011. 105(1): p. 137-42.
83. Masood, R., A. Kundra, S. Zhu, G. Xia, P. Scalia, D.L. Smith, and P.S. Gill, *Malignant mesothelioma growth inhibition by agents that target the VEGF and VEGF-C autocrine loops*. Int J Cancer, 2003. 104(5): p. 603-10.
84. Kindler, H.L., T.G. Karrison, D.R. Gandara, C. Lu, L.M. Krug, J.P. Stevenson, P.A. Janne, D.I. Quinn, M.N. Koczywas, J.R. Brahmer, K.S. Albain, D.A. Taber, S.G. Armato, 3rd, N.J. Vogelzang, H.X. Chen, et al., *Multicenter, double-blind, placebo-controlled, randomized phase II trial of gemcitabine/cisplatin plus bevacizumab or placebo in patients with malignant mesothelioma*. J Clin Oncol, 2012. 30(20): p. 2509-15.
85. Dowell, J.E., F.R. Dunphy, R.N. Taub, D.E. Gerber, L. Ngov, J. Yan, Y. Xie, and H.L. Kindler, *A multicenter phase II study of cisplatin, pemetrexed, and bevacizumab in patients with advanced malignant mesothelioma*. Lung Cancer, 2012. 77(3): p. 567-71.
86. Ceresoli, G.L., P.A. Zucali, M. Mencoboni, M. Botta, F. Grossi, D. Cortinovis, N. Zilembo, C. Ripa, M. Tiseo, A.G. Favaretto, H. Soto-Parra, F. De Vincenzo, A. Bruzzone, E. Lorenzi, L. Gianoncelli, et al., *Phase II study of pemetrexed and carboplatin plus bevacizumab as first-line therapy in malignant pleural mesothelioma*. Br J Cancer, 2013. 109(3): p. 552-8.

87. Goto, Y., K. Shinjo, Y. Kondo, L. Shen, M. Toyota, H. Suzuki, W. Gao, B. An, M. Fujii, H. Murakami, H. Osada, T. Taniguchi, N. Usami, M. Kondo, Y. Hasegawa, et al., *Epigenetic profiles distinguish malignant pleural mesothelioma from lung adenocarcinoma*. *Cancer Res*, 2009. **69**(23): p. 9073-82.
88. Vandermeers, F., S. Neelature Sriramareddy, C. Costa, R. Hubaux, J.P. Cosse, and L. Willems, *The role of epigenetics in malignant pleural mesothelioma*. *Lung Cancer*, 2013. **81**(3): p. 311-8.
89. Marks, P.A., V.M. Richon, R. Breslow, and R.A. Rifkind, *Histone deacetylase inhibitors as new cancer drugs*. *Curr Opin Oncol*, 2001. **13**(6): p. 477-83.
90. Krug, L.M., H.L. Kindler, H. Calvert, C. Manegold, A.S. Tsao, D. Fennell, R. Ohman, R. Plummer, W.E. Eberhardt, K. Fukuoka, R.M. Gaafar, J.J. Lafitte, G. Hillerdal, Q. Chu, W.A. Buikhuisen, et al., *Vorinostat in patients with advanced malignant pleural mesothelioma who have progressed on previous chemotherapy (VANTAGE-014): a phase 3, double-blind, randomised, placebo-controlled trial*. *Lancet Oncol*, 2015. **16**(4): p. 447-56.
91. Ramalingam, S.S., C.P. Belani, C. Ruel, P. Frankel, B. Gitlitz, M. Koczywas, I. Espinoza-Delgado, and D. Gandara, *Phase II study of belinostat (PXD101), a histone deacetylase inhibitor, for second line therapy of advanced malignant pleural mesothelioma*. *J Thorac Oncol*, 2009. **4**(1): p. 97-101.
92. Scherpereel, A., T. Berghmans, J.J. Lafitte, B. Colinet, M. Richez, Y. Bonduelle, A.P. Meert, X. Dhalluin, N. Leclercq, M. Paesmans, L. Willems, and J.P. Sculier, *Valproate-doxorubicin: promising therapy for progressing mesothelioma. A phase II study*. *Eur Respir J*, 2011. **37**(1): p. 129-35.
93. Vandermeers, F., P. Hubert, P. Delvenne, C. Mascaux, B. Grigoriu, A. Burny, A. Scherpereel, and L. Willems, *Valproate, in combination with pemetrexed and cisplatin, provides additional efficacy to the treatment of malignant mesothelioma*. *Clin Cancer Res*, 2009. **15**(8): p. 2818-28.
94. Delatouche, R., I. Denis, M. Grinda, F. El Bahhaj, E. Baucher, F. Collette, V. Heroguez, M. Gregoire, C. Blanquart, and P. Bertrand, *Design of pH responsive clickable prodrugs applied to histone deacetylase inhibitors: a new strategy for anticancer therapy*. *Eur J Pharm Biopharm*, 2013. **85**(3 Pt B): p. 862-72.
95. Denis, I., F. El Bahhaj, F. Collette, R. Delatouche, F. Gueugnon, D. Pouliquen, L. Pichavant, V. Heroguez, M. Gregoire, P. Bertrand, and C. Blanquart, *Vorinostat-polymer conjugate nanoparticles for Acid-responsive delivery and passive tumor targeting*. *Biomacromolecules*, 2014. **15**(12): p. 4534-43.
96. Leclercq, S., F. Gueugnon, B. Boutin, F. Guillot, C. Blanquart, A. Rogel, M. Padieu, D. Pouliquen, J.F. Fonteneau, and M. Gregoire, *A 5-aza-2'-deoxycytidine/valproate combination induces cytotoxic T-cell response against mesothelioma*. *Eur Respir J*, 2011. **38**(5): p. 1105-16.
97. Robinson, B.W., C. Robinson, and R.A. Lake, *Localised spontaneous regression in mesothelioma -- possible immunological mechanism*. *Lung Cancer*, 2001. **32**(2): p. 197-201.
98. Yamada, N., S. Oizumi, E. Kikuchi, N. Shinagawa, J. Konishi-Sakakibara, A. Ishimine, K. Aoe, K. Gemba, T. Kishimoto, T. Torigoe, and M. Nishimura, *CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes predict favorable prognosis in malignant pleural mesothelioma after resection*. *Cancer Immunol Immunother*, 2010. **59**(10): p. 1543-9.
99. Hegmans, J.P., A. Hemmes, H. Hammad, L. Boon, H.C. Hoogsteden, and B.N. Lambrecht, *Mesothelioma environment comprises cytokines and T-regulatory cells that suppress immune responses*. *Eur Respir J*, 2006. **27**(6): p. 1086-95.

100. Roulois, D., V. Vignard, F. Gueugnon, N. Labarriere, M. Gregoire, and J.F. Fonteneau, *Recognition of pleural mesothelioma by mucin-1(950-958)/human leukocyte antigen A*0201-specific CD8+ T-cells*. Eur Respir J, 2011. **38**(5): p. 1117-26.
101. Gregoire, M., *What's the place of immunotherapy in malignant mesothelioma treatments?* Cell Adh Migr, 2010. **4**(1): p. 153-61.
102. Bograd, A.J., K. Suzuki, E. Vertes, C. Colovos, E.A. Morales, M. Sadelain, and P.S. Adusumilli, *Immune responses and immunotherapeutic interventions in malignant pleural mesothelioma*. Cancer Immunol Immunother, 2011. **60**(11): p. 1509-27.
103. Stahel, R.A., W. Weder, E. Felley-Bosco, U. Petrausch, A. Curioni-Fontecedro, I. Schmitt-Opitz, and S. Peters, *Searching for targets for the systemic therapy of mesothelioma*. Ann Oncol, 2015. **26**(8): p. 1649-60.
104. Stermann, D.H., A. Recio, A.R. Haas, A. Vachani, S.I. Katz, C.T. Gillespie, G. Cheng, J. Sun, E. Moon, L. Pereira, X. Wang, D.F. Heitjan, L. Litzky, C.H. June, R.H. Vonderheide, et al., *A phase I trial of repeated intrapleural adenoviral-mediated interferon-beta gene transfer for mesothelioma and metastatic pleural effusions*. Mol Ther, 2010. **18**(4): p. 852-60.
105. Stermann, D.H., A. Haas, E. Moon, A. Recio, D. Schwed, A. Vachani, S.I. Katz, C.T. Gillespie, G. Cheng, J. Sun, E. Papasavvas, L.J. Montaner, D.F. Heitjan, L. Litzky, J. Friedberg, et al., *A trial of intrapleural adenoviral-mediated Interferon-alpha2b gene transfer for malignant pleural mesothelioma*. Am J Respir Crit Care Med, 2011. **184**(12): p. 1395-9.
106. Stevenson, J.P., H.L. Kindler, E. Papasavvas, J. Sun, M. Jacobs-Small, J. Hull, D. Schwed, A. Ranganathan, K. Newick, D.F. Heitjan, C.J. Langer, J.M. McPherson, L.J. Montaner, and S.M. Albelda, *Immunological effects of the TGFbeta-blocking antibody GC1008 in malignant pleural mesothelioma patients*. Oncoimmunology, 2013. **2**(8): p. e26218.
107. Hegmans, J.P., J.D. Veltman, M.E. Lambers, I.J. de Vries, C.G. Figdor, R.W. Hendriks, H.C. Hoogsteden, B.N. Lambrecht, and J.G. Aerts, *Consolidative dendritic cell-based immunotherapy elicits cytotoxicity against malignant mesothelioma*. Am J Respir Crit Care Med, 2010. **181**(12): p. 1383-90.
108. Krug, L.M., T. Dao, A.B. Brown, P. Maslak, W. Travis, S. Bekele, T. Korontsvit, V. Zakhaleva, J. Wolchok, J. Yuan, H. Li, L. Tyson, and D.A. Scheinberg, *WT1 peptide vaccinations induce CD4 and CD8 T cell immune responses in patients with mesothelioma and non-small cell lung cancer*. Cancer Immunol Immunother, 2010. **59**(10): p. 1467-79.
109. Hassan, R., H.L. Kindler, T. Jahan, L. Bazhenova, M. Reck, A. Thomas, I. Pastan, J. Parno, D.J. O'Shannessy, P. Fatato, J.D. Maltzman, and B.A. Wallin, *Phase II clinical trial of amatuximab, a chimeric antimesothelin antibody with pemetrexed and cisplatin in advanced unresectable pleural mesothelioma*. Clin Cancer Res, 2014. **20**(23): p. 5927-36.
110. Calabro, L., A. Morra, E. Fonsatti, O. Cutaia, G. Amato, D. Giannarelli, A.M. Di Giacomo, R. Danielli, M. Altomonte, L. Mutti, and M. Maio, *Tremelimumab for patients with chemotherapy-resistant advanced malignant mesothelioma: an open-label, single-arm, phase 2 trial*. Lancet Oncol, 2013. **14**(11): p. 1104-11.
111. Kelly, E. and S.J. Russell, *History of oncolytic viruses: genesis to genetic engineering*. Mol Ther, 2007. **15**(4): p. 651-9.
112. Moore, A.E., *Viruses with oncolytic properties and their adaptation to tumors*. Ann N Y Acad Sci, 1952. **54**(6): p. 945-52.

113. Russell, S.J. and K.W. Peng, *Viruses as anticancer drugs*. Trends Pharmacol Sci, 2007. **28**(7): p. 326-33.
114. Parato, K.A., D. Senger, P.A. Forsyth, and J.C. Bell, *Recent progress in the battle between oncolytic viruses and tumours*. Nat Rev Cancer, 2005. **5**(12): p. 965-76.
115. Cattaneo, R., T. Miest, E.V. Shashkova, and M.A. Barry, *Reprogrammed viruses as cancer therapeutics: targeted, armed and shielded*. Nat Rev Microbiol, 2008. **6**(7): p. 529-40.
116. Miest, T.S. and R. Cattaneo, *New viruses for cancer therapy: meeting clinical needs*. Nat Rev Microbiol, 2014. **12**(1): p. 23-34.
117. Delpeut, S., R.S. Noyce, R.W. Siu, and C.D. Richardson, *Host factors and measles virus replication*. Curr Opin Virol, 2012. **2**(6): p. 773-83.
118. Patterson, J.B., D. Thomas, H. Lewicki, M.A. Billeter, and M.B. Oldstone, *V and C proteins of measles virus function as virulence factors in vivo*. Virology, 2000. **267**(1): p. 80-9.
119. Schneider-Schaulies, J., V. ter Meulen, and S. Schneider-Schaulies, *Measles virus interactions with cellular receptors: consequences for viral pathogenesis*. J Neurovirol, 2001. **7**(5): p. 391-9.
120. Tatsuo, H., N. Ono, K. Tanaka, and Y. Yanagi, *SLAM (CDw150) is a cellular receptor for measles virus*. Nature, 2000. **406**(6798): p. 893-7.
121. Cocks, B.G., C.C. Chang, J.M. Carballido, H. Yssel, J.E. de Vries, and G. Aversa, *A novel receptor involved in T-cell activation*. Nature, 1995. **376**(6537): p. 260-3.
122. Kruse, M., E. Meinel, G. Henning, C. Kuhnt, S. Berchtold, T. Berger, G. Schuler, and A. Steinkasserer, *Signaling lymphocytic activation molecule is expressed on mature CD83+ dendritic cells and is up-regulated by IL-1 beta*. J Immunol, 2001. **167**(4): p. 1989-95.
123. Punnonen, J., B.G. Cocks, J.M. Carballido, B. Bennett, D. Peterson, G. Aversa, and J.E. de Vries, *Soluble and membrane-bound forms of signaling lymphocytic activation molecule (SLAM) induce proliferation and Ig synthesis by activated human B lymphocytes*. J Exp Med, 1997. **185**(6): p. 993-1004.
124. Muhlebach, M.D., M. Mateo, P.L. Sinn, S. Prufer, K.M. Uhlig, V.H. Leonard, C.K. Navaratnarajah, M. Frenzke, X.X. Wong, B. Sawatsky, S. Ramachandran, P.B. McCray, Jr., K. Cichutek, V. von Messling, M. Lopez, et al., *Adherens junction protein nectin-4 is the epithelial receptor for measles virus*. Nature, 2011. **480**(7378): p. 530-3.
125. Noyce, R.S., D.G. Bondre, M.N. Ha, L.T. Lin, G. Sisson, M.S. Tsao, and C.D. Richardson, *Tumor cell marker PVRL4 (nectin 4) is an epithelial cell receptor for measles virus*. PLoS Pathog, 2011. **7**(8): p. e1002240.
126. Lemon, K., R.D. de Vries, A.W. Mesman, S. McQuaid, G. van Amerongen, S. Yuksel, M. Ludlow, L.J. Rennick, T. Kuiken, B.K. Rima, T.B. Geijtenbeek, A.D. Osterhaus, W.P. Duprex, and R.L. de Swart, *Early target cells of measles virus after aerosol infection of non-human primates*. PLoS Pathog, 2011. **7**(1): p. e1001263.
127. Ferreira, C.S., M. Frenzke, V.H. Leonard, G.G. Welstead, C.D. Richardson, and R. Cattaneo, *Measles virus infection of alveolar macrophages and dendritic cells precedes spread to lymphatic organs in transgenic mice expressing human signaling lymphocytic activation molecule (SLAM, CD150)*. J Virol, 2010. **84**(6): p. 3033-42.
128. Avota, E., E. Gulbins, and S. Schneider-Schaulies, *DC-SIGN mediated sphingomyelinase-activation and ceramide generation is essential for enhancement of viral uptake in dendritic cells*. PLoS Pathog, 2011. **7**(2): p. e1001290.

129. de Witte, L., M. Abt, S. Schneider-Schaulies, Y. van Kooyk, and T.B. Geijtenbeek, *Measles virus targets DC-SIGN to enhance dendritic cell infection*. J Virol, 2006. **80**(7): p. 3477-86.
130. de Vries, R.D., A.W. Mesman, T.B. Geijtenbeek, W.P. Duprex, and R.L. de Swart, *The pathogenesis of measles*. Curr Opin Virol, 2012. **2**(3): p. 248-55.
131. Racaniello, V., *Virology. An exit strategy for measles virus*. Science, 2011. **334**(6063): p. 1650-1.
132. Leonard, V.H., P.L. Sinn, G. Hodge, T. Miest, P. Devaux, N. Oezguen, W. Braun, P.B. McCray, Jr., M.B. McChesney, and R. Cattaneo, *Measles virus blind to its epithelial cell receptor remains virulent in rhesus monkeys but cannot cross the airway epithelium and is not shed*. J Clin Invest, 2008. **118**(7): p. 2448-58.
133. Moss, W.J. and D.E. Griffin, *Global measles elimination*. Nat Rev Microbiol, 2006. **4**(12): p. 900-8.
134. de Vries, R.D., S. Yuksel, A.D. Osterhaus, and R.L. de Swart, *Specific CD8(+) T-lymphocytes control dissemination of measles virus*. Eur J Immunol, 2010. **40**(2): p. 388-95.
135. Permar, S.R., S.A. Klumpp, K.G. Mansfield, W.K. Kim, D.A. Gorgone, M.A. Lifton, K.C. Williams, J.E. Schmitz, K.A. Reimann, M.K. Axthelm, F.P. Polack, D.E. Griffin, and N.L. Letvin, *Role of CD8(+) lymphocytes in control and clearance of measles virus infection of rhesus monkeys*. J Virol, 2003. **77**(7): p. 4396-400.
136. de Vries, R.D. and R.L. de Swart, *Measles immune suppression: functional impairment or numbers game?* PLoS Pathog, 2014. **10**(12): p. e1004482.
137. Schneider-Schaulies, S. and J. Schneider-Schaulies, *Measles virus-induced immunosuppression*. Curr Top Microbiol Immunol, 2009. **330**: p. 243-69.
138. Young, V.A. and G.F. Rall, *Making it to the synapse: measles virus spread in and among neurons*. Curr Top Microbiol Immunol, 2009. **330**: p. 3-30.
139. Enders, J.F. and T.C. Peebles, *Propagation in tissue cultures of cytopathogenic agents from patients with measles*. Proc Soc Exp Biol Med, 1954. **86**(2): p. 277-86.
140. Gerlier, D. and H. Valentin, *Measles virus interaction with host cells and impact on innate immunity*. Curr Top Microbiol Immunol, 2009. **329**: p. 163-91.
141. Bankamp, B., M. Takeda, Y. Zhang, W. Xu, and P.A. Rota, *Genetic characterization of measles vaccine strains*. J Infect Dis, 2011. **204** Suppl 1: p. S533-48.
142. Parks, C.L., R.A. Lerch, P. Walpita, H.P. Wang, M.S. Sidhu, and S.A. Udem, *Comparison of predicted amino acid sequences of measles virus strains in the Edmonston vaccine lineage*. J Virol, 2001. **75**(2): p. 910-20.
143. Schwarz, A.J., *Preliminary tests of a highly attenuated measles vaccine*. Am J Dis Child, 1962. **103**: p. 386-9.
144. Moss, W.J. and D.E. Griffin, *Measles*. Lancet, 2012. **379**(9811): p. 153-64.
145. Griffin, D.E., C.H. Pan, and W.J. Moss, *Measles vaccines*. Front Biosci, 2008. **13**: p. 1352-70.
146. Gay, N.J., *The theory of measles elimination: implications for the design of elimination strategies*. J Infect Dis, 2004. **189** Suppl 1: p. S27-35.
147. Wolfson, L.J., P.M. Strebel, M. Gacic-Dobo, E.J. Hoekstra, J.W. McFarland, and B.S. Hersh, *Has the 2005 measles mortality reduction goal been achieved? A natural history modelling study*. Lancet, 2007. **369**(9557): p. 191-200.
148. Jansen, V.A., N. Stollenwerk, H.J. Jensen, M.E. Ramsay, W.J. Edmunds, and C.J. Rhodes, *Measles outbreaks in a population with declining vaccine uptake*. Science, 2003. **301**(5634): p. 804.
149. Bluming, A.Z. and J.L. Ziegler, *Regression of Burkitt's lymphoma in association with measles infection*. Lancet, 1971. **2**(7715): p. 105-6.

150. Gross, S., *Measles and leukaemia*. Lancet, 1971. **1**(7695): p. 397-8.
151. Pasquinucci, G., *Possible effect of measles on leukaemia*. Lancet, 1971. **1**(7690): p. 136.
152. Zygiert, Z., *Hodgkin's disease: remissions after measles*. Lancet, 1971. **1**(7699): p. 593.
153. Dorig, R.E., A. Marcil, A. Chopra, and C.D. Richardson, *The human CD46 molecule is a receptor for measles virus (Edmonston strain)*. Cell, 1993. **75**(2): p. 295-305.
154. Naniche, D., G. Varior-Krishnan, F. Cervoni, T.F. Wild, B. Rossi, C. Rabourdin-Combe, and D. Gerlier, *Human membrane cofactor protein (CD46) acts as a cellular receptor for measles virus*. J Virol, 1993. **67**(10): p. 6025-32.
155. Dhiman, N., R.M. Jacobson, and G.A. Poland, *Measles virus receptors: SLAM and CD46*. Rev Med Virol, 2004. **14**(4): p. 217-29.
156. Liszewski, M.K., T.W. Post, and J.P. Atkinson, *Membrane cofactor protein (MCP or CD46): newest member of the regulators of complement activation gene cluster*. Annu Rev Immunol, 1991. **9**: p. 431-55.
157. Adams, E.M., M.C. Brown, M. Nunge, M. Krych, and J.P. Atkinson, *Contribution of the repeating domains of membrane cofactor protein (CD46) of the complement system to ligand binding and cofactor activity*. J Immunol, 1991. **147**(9): p. 3005-11.
158. Fishelson, Z., N. Donin, S. Zell, S. Schultz, and M. Kirschfink, *Obstacles to cancer immunotherapy: expression of membrane complement regulatory proteins (mCRPs) in tumors*. Mol Immunol, 2003. **40**(2-4): p. 109-23.
159. Gancz, D. and Z. Fishelson, *Cancer resistance to complement-dependent cytotoxicity (CDC): Problem-oriented research and development*. Mol Immunol, 2009. **46**(14): p. 2794-800.
160. Beyer, I., H. Cao, J. Persson, H. Wang, Y. Liu, R. Yumul, Z. Li, D. Woodle, R. Manger, M. Gough, D. Rocha, J. Bogue, A. Baldessari, R. Berenson, D. Carter, et al., *Transient removal of CD46 is safe and increases B-cell depletion by rituximab in CD46 transgenic mice and macaques*. Mol Ther, 2013. **21**(2): p. 291-9.
161. Anderson, B.D., T. Nakamura, S.J. Russell, and K.W. Peng, *High CD46 receptor density determines preferential killing of tumor cells by oncolytic measles virus*. Cancer Res, 2004. **64**(14): p. 4919-26.
162. Delpeut, S., R.S. Noyce, and C.D. Richardson, *The tumor-associated marker, PVRL4 (nectin-4), is the epithelial receptor for morbilliviruses*. Viruses, 2014. **6**(6): p. 2268-86.
163. Reymond, N., S. Fabre, E. Lecocq, J. Adelaide, P. Dubreuil, and M. Lopez, *Nectin4/PRR4, a new afadin-associated member of the nectin family that trans-interacts with nectin1/PRR1 through V domain interaction*. J Biol Chem, 2001. **276**(46): p. 43205-15.
164. Derycke, M.S., S.E. Pambuccian, C.B. Gilks, S.E. Kalloger, A. Ghidouche, M. Lopez, R.L. Bliss, M.A. Geller, P.A. Argenta, K.M. Harrington, and A.P. Skubitz, *Nectin 4 overexpression in ovarian cancer tissues and serum: potential role as a serum biomarker*. Am J Clin Pathol, 2010. **134**(5): p. 835-45.
165. Fabre-Lafay, S., F. Monville, S. Garrido-Urbani, C. Berruyer-Pouyet, C. Ginestier, N. Reymond, P. Finetti, R. Sauvan, J. Adelaide, J. Geneix, E. Lecocq, C. Popovici, P. Dubreuil, P. Viens, A. Goncalves, et al., *Nectin-4 is a new histological and serological tumor associated marker for breast cancer*. BMC Cancer, 2007. **7**: p. 73.
166. Takano, A., N. Ishikawa, R. Nishino, K. Masuda, W. Yasui, K. Inai, H. Nishimura, H. Ito, H. Nakayama, Y. Miyagi, E. Tsuchiya, N. Kohno, Y. Nakamura, and Y. Daigo, *Identification of nectin-4 oncoprotein as a diagnostic and therapeutic target for lung cancer*. Cancer Res, 2009. **69**(16): p. 6694-703.

167. Pavlova, N.N., C. Pallasch, A.E. Elia, C.J. Braun, T.F. Westbrook, M. Hemann, and S.J. Elledge, *A role for PVRL4-driven cell-cell interactions in tumorigenesis*. Elife, 2013. **2**: p. e00358.
168. Msaouel, P., M. Opyrchal, E. Domingo Musibay, and E. Galanis, *Oncolytic measles virus strains as novel anticancer agents*. Expert Opin Biol Ther, 2013. **13**(4): p. 483-502.
169. Gauvrit, A., S. Brandler, C. Sapède-Pero, N. Boisgerault, F. Tangy, and M. Gregoire, *Measles virus induces oncolysis of mesothelioma cells and allows dendritic cells to cross-prime tumor-specific CD8 response*. Cancer Res, 2008. **68**(12): p. 4882-92.
170. Boisgerault, N., J.B. Guillaume, D. Pouliquen, M. Mesel-Lemoine, C. Achard, C. Combredet, J.F. Fonteneau, F. Tangy, and M. Gregoire, *Natural oncolytic activity of live-attenuated measles virus against human lung and colorectal adenocarcinomas*. Biomed Res Int, 2013. **2013**: p. 387362.
171. Guillaume, J.B., N. Boisgerault, D. Roulois, J. Menager, C. Combredet, F. Tangy, J.F. Fonteneau, and M. Gregoire, *Measles virus vaccine-infected tumor cells induce tumor antigen cross-presentation by human plasmacytoid dendritic cells*. Clin Cancer Res, 2013. **19**(5): p. 1147-58.
172. Grote, D., S.J. Russell, T.I. Cornu, R. Cattaneo, R. Vile, G.A. Poland, and A.K. Fielding, *Live attenuated measles virus induces regression of human lymphoma xenografts in immunodeficient mice*. Blood, 2001. **97**(12): p. 3746-54.
173. Heinzerling, L., V. Kunzi, P.A. Oberholzer, T. Kundig, H. Naim, and R. Dummer, *Oncolytic measles virus in cutaneous T-cell lymphomas mounts antitumor immune responses in vivo and targets interferon-resistant tumor cells*. Blood, 2005. **106**(7): p. 2287-94.
174. Kunzi, V., P.A. Oberholzer, L. Heinzerling, R. Dummer, and H.Y. Naim, *Recombinant measles virus induces cytolysis of cutaneous T-cell lymphoma in vitro and in vivo*. J Invest Dermatol, 2006. **126**(11): p. 2525-32.
175. Yaiw, K.C., T.S. Miest, M. Frenzke, M. Timm, P.B. Johnston, and R. Cattaneo, *CD20-targeted measles virus shows high oncolytic specificity in clinical samples from lymphoma patients independent of prior rituximab therapy*. Gene Ther, 2011. **18**(3): p. 313-7.
176. Peng, K.W., G.J. Ahmann, L. Pham, P.R. Greipp, R. Cattaneo, and S.J. Russell, *Systemic therapy of myeloma xenografts by an attenuated measles virus*. Blood, 2001. **98**(7): p. 2002-7.
177. Peng, K.W., K.A. Donovan, U. Schneider, R. Cattaneo, J.A. Lust, and S.J. Russell, *Oncolytic measles viruses displaying a single-chain antibody against CD38, a myeloma cell marker*. Blood, 2003. **101**(7): p. 2557-62.
178. Ong, H.T., M.M. Timm, P.R. Greipp, T.E. Witzig, A. Dispenzieri, S.J. Russell, and K.W. Peng, *Oncolytic measles virus targets high CD46 expression on multiple myeloma cells*. Exp Hematol, 2006. **34**(6): p. 713-20.
179. Hummel, H.D., G. Kuntz, S.J. Russell, T. Nakamura, A. Greiner, H. Einsele, and M.S. Topp, *Genetically engineered attenuated measles virus specifically infects and kills primary multiple myeloma cells*. J Gen Virol, 2009. **90**(Pt 3): p. 693-701.
180. Sugiyama, T., M. Yoneda, T. Kuraishi, S. Hattori, Y. Inoue, H. Sato, and C. Kai, *Measles virus selectively blind to signaling lymphocyte activation molecule as a novel oncolytic virus for breast cancer treatment*. Gene Ther, 2013. **20**(3): p. 338-47.
181. McDonald, C.J., C. Erlichman, J.N. Ingle, G.A. Rosales, C. Allen, S.M. Greiner, M.E. Harvey, P.J. Zollman, S.J. Russell, and E. Galanis, *A measles virus vaccine strain derivative as a novel oncolytic agent against breast cancer*. Breast Cancer Res Treat, 2006. **99**(2): p. 177-84.

182. Iankov, I.D., P. Msaouel, C. Allen, M.J. Federspiel, P.A. Bulur, A.B. Dietz, D. Gastineau, Y. Ikeda, J.N. Ingle, S.J. Russell, and E. Galanis, *Demonstration of anti-tumor activity of oncolytic measles virus strains in a malignant pleural effusion breast cancer model*. Breast Cancer Res Treat, 2010. **122**(3): p. 745-54.
183. Peng, K.W., C.J. TenEyck, E. Galanis, K.R. Kalli, L.C. Hartmann, and S.J. Russell, *Intraperitoneal therapy of ovarian cancer using an engineered measles virus*. Cancer Res, 2002. **62**(16): p. 4656-62.
184. Hasegawa, K., L. Pham, M.K. O'Connor, M.J. Federspiel, S.J. Russell, and K.W. Peng, *Dual therapy of ovarian cancer using measles viruses expressing carcinoembryonic antigen and sodium iodide symporter*. Clin Cancer Res, 2006. **12**(6): p. 1868-75.
185. Hasegawa, K., T. Nakamura, M. Harvey, Y. Ikeda, A. Oberg, M. Figini, S. Canevari, L.C. Hartmann, and K.W. Peng, *The use of a tropism-modified measles virus in folate receptor-targeted virotherapy of ovarian cancer*. Clin Cancer Res, 2006. **12**(20 Pt 1): p. 6170-8.
186. Hartkopf, A.D., S. Bossow, J. Lampe, M. Zimmermann, F.A. Taran, D. Wallwiener, T. Fehm, M. Bitzer, and U.M. Lauer, *Enhanced killing of ovarian carcinoma using oncolytic measles vaccine virus armed with a yeast cytosine deaminase and uracil phosphoribosyltransferase*. Gynecol Oncol, 2013. **130**(2): p. 362-8.
187. Msaouel, P., I.D. Iankov, C. Allen, J.C. Morris, V. von Messling, R. Cattaneo, M. Koutsilieris, S.J. Russell, and E. Galanis, *Engineered measles virus as a novel oncolytic therapy against prostate cancer*. Prostate, 2009. **69**(1): p. 82-91.
188. Liu, C., K. Hasegawa, S.J. Russell, M. Sadelain, and K.W. Peng, *Prostate-specific membrane antigen retargeted measles virotherapy for the treatment of prostate cancer*. Prostate, 2009. **69**(10): p. 1128-41.
189. Msaouel, P., I.D. Iankov, C. Allen, I. Aderca, M.J. Federspiel, D.J. Tindall, J.C. Morris, M. Koutsilieris, S.J. Russell, and E. Galanis, *Noninvasive imaging and radiovirotherapy of prostate cancer using an oncolytic measles virus expressing the sodium iodide symporter*. Mol Ther, 2009. **17**(12): p. 2041-8.
190. Fujiyuki, T., M. Yoneda, Y. Amagai, K. Obayashi, F. Ikeda, K. Shoji, Y. Murakami, H. Sato, and C. Kai, *A measles virus selectively blind to signaling lymphocytic activation molecule shows anti-tumor activity against lung cancer cells*. Oncotarget, 2015. **6**(28): p. 24895-903.
191. Patel, M.R., B.A. Jacobson, H. Belgu, A. Raza, A. Sadiq, J. Drees, H. Wang, J. Jay-Dixon, R. Etchison, M.J. Federspiel, S.J. Russell, and R.A. Kratzke, *Measles vaccine strains for virotherapy of non-small-cell lung carcinoma*. J Thorac Oncol, 2014. **9**(8): p. 1101-10.
192. Li, H., K.W. Peng, D. Dingli, R.A. Kratzke, and S.J. Russell, *Oncolytic measles viruses encoding interferon beta and the thyroidal sodium iodide symporter gene for mesothelioma virotherapy*. Cancer Gene Ther, 2010. **17**(8): p. 550-8.
193. Ungerechts, G., C. Springfield, M.E. Frenzke, J. Lampe, W.B. Parker, E.J. Sorscher, and R. Cattaneo, *An immunocompetent murine model for oncolysis with an armed and targeted measles virus*. Mol Ther, 2007. **15**(11): p. 1991-7.
194. Muhlebach, M.D., T. Schaser, M. Zimmermann, S. Armeanu, K.M. Hanschmann, R. Cattaneo, M. Bitzer, U.M. Lauer, K. Cichutek, and C.J. Buchholz, *Liver cancer protease activity profiles support therapeutic options with matrix metalloproteinase-activatable oncolytic measles virus*. Cancer Res, 2010. **70**(19): p. 7620-9.
195. Blechacz, B., P.L. Splinter, S. Greiner, R. Myers, K.W. Peng, M.J. Federspiel, S.J. Russell, and N.F. LaRusso, *Engineered measles virus as a novel oncolytic viral therapy system for hepatocellular carcinoma*. Hepatology, 2006. **44**(6): p. 1465-77.

196. Zimmermann, M., S. Armeanu, I. Smirnow, S. Kupka, S. Wagner, M. Wehrmann, M.G. Rots, G.M. Groothuis, T.S. Weiss, A. Konigsrainer, M. Gregor, M. Bitzer, and U.M. Lauer, *Human precision-cut liver tumor slices as a tumor patient-individual predictive test system for oncolytic measles vaccine viruses*. *Int J Oncol*, 2009. **34**(5): p. 1247-56.
197. Bossow, S., C. Grossardt, A. Temme, M.F. Leber, S. Sawall, E.P. Rieber, R. Cattaneo, C. von Kalle, and G. Ungerechts, *Armed and targeted measles virus for chemovirotherapy of pancreatic cancer*. *Cancer Gene Ther*, 2011. **18**(8): p. 598-608.
198. Penheiter, A.R., T.R. Wegman, K.L. Classic, D. Dingli, C.E. Bender, S.J. Russell, and S.K. Carlson, *Sodium iodide symporter (NIS)-mediated radiovirotherapy for pancreatic cancer*. *AJR Am J Roentgenol*, 2010. **195**(2): p. 341-9.
199. Allen, C., G. Paraskevaki, I. Iankov, C. Giannini, M. Schroeder, J. Sarkaria, R.K. Puri, S.J. Russell, and E. Galanis, *Interleukin-13 displaying retargeted oncolytic measles virus strains have significant activity against gliomas with improved specificity*. *Mol Ther*, 2008. **16**(9): p. 1556-64.
200. Phuong, L.K., C. Allen, K.W. Peng, C. Giannini, S. Greiner, C.J. TenEyck, P.K. Mishra, S.I. Macura, S.J. Russell, and E.C. Galanis, *Use of a vaccine strain of measles virus genetically engineered to produce carcinoembryonic antigen as a novel therapeutic agent against glioblastoma multiforme*. *Cancer Res*, 2003. **63**(10): p. 2462-9.
201. Opyrchal, M., C. Allen, I. Iankov, I. Aderca, M. Schroeder, J. Sarkaria, and E. Galanis, *Effective radiovirotherapy for malignant gliomas by using oncolytic measles virus strains encoding the sodium iodide symporter (MV-NIS)*. *Hum Gene Ther*, 2012. **23**(4): p. 419-27.
202. Allen, C., M. Opyrchal, I. Aderca, M.A. Schroeder, J.N. Sarkaria, E. Domingo, M.J. Federspiel, and E. Galanis, *Oncolytic measles virus strains have significant antitumor activity against glioma stem cells*. *Gene Ther*, 2013. **20**(4): p. 444-9.
203. Studebaker, A.W., C.R. Kreofsky, C.R. Pierson, S.J. Russell, E. Galanis, and C. Raffel, *Treatment of medulloblastoma with a modified measles virus*. *Neuro Oncol*, 2010. **12**(10): p. 1034-42.
204. Studebaker, A.W., B. Hutzen, C.R. Pierson, S.J. Russell, E. Galanis, and C. Raffel, *Oncolytic measles virus prolongs survival in a murine model of cerebral spinal fluid-disseminated medulloblastoma*. *Neuro Oncol*, 2012. **14**(4): p. 459-70.
205. Hutzen, B., H.K. Bid, P.J. Houghton, C.R. Pierson, K. Powell, A. Bratasz, C. Raffel, and A.W. Studebaker, *Treatment of medulloblastoma with oncolytic measles viruses expressing the angiogenesis inhibitors endostatin and angiostatin*. *BMC Cancer*, 2014. **14**: p. 206.
206. Li, H., K.W. Peng, and S.J. Russell, *Oncolytic measles virus encoding thyroidal sodium iodide symporter for squamous cell cancer of the head and neck radiovirotherapy*. *Hum Gene Ther*, 2012. **23**(3): p. 295-301.
207. Zaoui, K., S. Bossow, C. Grossardt, M.F. Leber, C. Springfield, P.K. Plinkert, C. Kalle, and G. Ungerechts, *Chemovirotherapy for head and neck squamous cell carcinoma with EGFR-targeted and CD/UPRT-armed oncolytic measles virus*. *Cancer Gene Ther*, 2012. **19**(3): p. 181-91.
208. Donnelly, O.G., F. Errington-Mais, L. Steele, E. Hadac, V. Jennings, K. Scott, H. Peach, R.M. Phillips, J. Bond, H. Pandha, K. Harrington, R. Vile, S. Russell, P. Selby, and A.A. Melcher, *Measles virus causes immunogenic cell death in human melanoma*. *Gene Ther*, 2013. **20**(1): p. 7-15.
209. Kaufmann, J.K., S. Bossow, C. Grossardt, S. Sawall, J. Kupsch, P. Erbs, J.C. Hassel, C. von Kalle, A.H. Enk, D.M. Nettelbeck, and G. Ungerechts, *Chemovirotherapy of*

- malignant melanoma with a targeted and armed oncolytic measles virus*. J Invest Dermatol, 2013. **133**(4): p. 1034-42.
210. Meng, X., T. Nakamura, T. Okazaki, H. Inoue, A. Takahashi, S. Miyamoto, G. Sakaguchi, M. Eto, S. Naito, M. Takeda, Y. Yanagi, and K. Tani, *Enhanced antitumor effects of an engineered measles virus Edmonston strain expressing the wild-type N, P, L genes on human renal cell carcinoma*. Mol Ther, 2010. **18**(3): p. 544-51.
 211. Domingo-Musibay, E., C. Allen, C. Kurokawa, J.J. Hardcastle, I. Aderca, P. Msaouel, A. Bansal, H. Jiang, T.R. DeGrado, and E. Galanis, *Measles Edmonston vaccine strain derivatives have potent oncolytic activity against osteosarcoma*. Cancer Gene Ther, 2014. **21**(11): p. 483-90.
 212. Reddi, H.V., P. Madde, S.J. McDonough, M.A. Trujillo, J.C. Morris, 3rd, R.M. Myers, K.W. Peng, S.J. Russell, B. McIver, and N.L. Eberhardt, *Preclinical efficacy of the oncolytic measles virus expressing the sodium iodide symporter in iodine non-avid anaplastic thyroid cancer: a novel therapeutic agent allowing noninvasive imaging and radioiodine therapy*. Cancer Gene Ther, 2012. **19**(9): p. 659-65.
 213. Radecke, F., P. Spielhofer, H. Schneider, K. Kaelin, M. Huber, C. Dotsch, G. Christiansen, and M.A. Billeter, *Rescue of measles viruses from cloned DNA*. EMBO J, 1995. **14**(23): p. 5773-84.
 214. Nakamura, T., K.W. Peng, M. Harvey, S. Greiner, I.A. Lorimer, C.D. James, and S.J. Russell, *Rescue and propagation of fully retargeted oncolytic measles viruses*. Nat Biotechnol, 2005. **23**(2): p. 209-14.
 215. Vongpunsawad, S., N. Oezgun, W. Braun, and R. Cattaneo, *Selectively receptor-blind measles viruses: Identification of residues necessary for SLAM- or CD46-induced fusion and their localization on a new hemagglutinin structural model*. J Virol, 2004. **78**(1): p. 302-13.
 216. Bucheit, A.D., S. Kumar, D.M. Grote, Y. Lin, V. von Messling, R.B. Cattaneo, and A.K. Fielding, *An oncolytic measles virus engineered to enter cells through the CD20 antigen*. Mol Ther, 2003. **7**(1): p. 62-72.
 217. Friedrich, K., J.R. Hanauer, S. Pruffer, R.C. Munch, I. Volker, C. Filippis, C. Jost, K.M. Hanschmann, R. Cattaneo, K.W. Peng, A. Pluckthun, C.J. Buchholz, K. Cichutek, and M.D. Muhlebach, *DARPin-targeting of measles virus: unique bispecificity, effective oncolysis, and enhanced safety*. Mol Ther, 2013. **21**(4): p. 849-59.
 218. Boersma, Y.L. and A. Pluckthun, *DARPins and other repeat protein scaffolds: advances in engineering and applications*. Curr Opin Biotechnol, 2011. **22**(6): p. 849-57.
 219. Stefan, N., P. Martin-Killias, S. Wyss-Stoeckle, A. Honegger, U. Zangemeister-Wittke, and A. Pluckthun, *DARPins recognizing the tumor-associated antigen EpCAM selected by phage and ribosome display and engineered for multivalency*. J Mol Biol, 2011. **413**(4): p. 826-43.
 220. Maisner, A., B. Mrkic, G. Herrler, M. Moll, M.A. Billeter, R. Cattaneo, and H.D. Klenk, *Recombinant measles virus requiring an exogenous protease for activation of infectivity*. J Gen Virol, 2000. **81**(Pt 2): p. 441-9.
 221. Springfield, C., V. von Messling, M. Frenzke, G. Ungerechts, C.J. Buchholz, and R. Cattaneo, *Oncolytic efficacy and enhanced safety of measles virus activated by tumor-secreted matrix metalloproteinases*. Cancer Res, 2006. **66**(15): p. 7694-700.
 222. Bartel, D.P., *MicroRNAs: target recognition and regulatory functions*. Cell, 2009. **136**(2): p. 215-33.
 223. Acunzo, M., G. Romano, D. Wernicke, and C.M. Croce, *MicroRNA and cancer--a brief overview*. Adv Biol Regul, 2015. **57**: p. 1-9.

224. Lu, J., G. Getz, E.A. Miska, E. Alvarez-Saavedra, J. Lamb, D. Peck, A. Sweet-Cordero, B.L. Ebert, R.H. Mak, A.A. Ferrando, J.R. Downing, T. Jacks, H.R. Horvitz, and T.R. Golub, *MicroRNA expression profiles classify human cancers*. *Nature*, 2005. **435**(7043): p. 834-8.
225. Ruiz, A.J. and S.J. Russell, *MicroRNAs and oncolytic viruses*. *Curr Opin Virol*, 2015. **13**: p. 40-8.
226. Kefas, B., J. Godlewski, L. Comeau, Y. Li, R. Abounader, M. Hawkinson, J. Lee, H. Fine, E.A. Chiocca, S. Lawler, and B. Purow, *microRNA-7 inhibits the epidermal growth factor receptor and the Akt pathway and is down-regulated in glioblastoma*. *Cancer Res*, 2008. **68**(10): p. 3566-72.
227. Leber, M.F., S. Bossow, V.H. Leonard, K. Zaoui, C. Grossardt, M. Frenzke, T. Miest, S. Sawall, R. Cattaneo, C. von Kalle, and G. Ungerechts, *MicroRNA-sensitive oncolytic measles viruses for cancer-specific vector tropism*. *Mol Ther*, 2011. **19**(6): p. 1097-106.
228. Dingli, D., K.W. Peng, M.E. Harvey, P.R. Greipp, M.K. O'Connor, R. Cattaneo, J.C. Morris, and S.J. Russell, *Image-guided radiovirotherapy for multiple myeloma using a recombinant measles virus expressing the thyroidal sodium iodide symporter*. *Blood*, 2004. **103**(5): p. 1641-6.
229. Parker, W.B., P.W. Allan, S.C. Shaddix, L.M. Rose, H.F. Speegle, G.Y. Gillespie, and L.L. Bennett, Jr., *Metabolism and metabolic actions of 6-methylpurine and 2-fluoroadenine in human cells*. *Biochem Pharmacol*, 1998. **55**(10): p. 1673-81.
230. Gadi, V.K., S.D. Alexander, J.E. Kudlow, P. Allan, W.B. Parker, and E.J. Sorscher, *In vivo sensitization of ovarian tumors to chemotherapy by expression of E. coli purine nucleoside phosphorylase in a small fraction of cells*. *Gene Ther*, 2000. **7**(20): p. 1738-43.
231. Erbs, P., E. Regulier, J. Kintz, P. Leroy, Y. Poitevin, F. Exinger, R. Jund, and M. Mehtali, *In vivo cancer gene therapy by adenovirus-mediated transfer of a bifunctional yeast cytosine deaminase/uracil phosphoribosyltransferase fusion gene*. *Cancer Res*, 2000. **60**(14): p. 3813-22.
232. Lampe, J., S. Bossow, T. Weiland, I. Smirnow, R. Lehmann, W. Neubert, M. Bitzer, and U.M. Lauer, *An armed oncolytic measles vaccine virus eliminates human hepatoma cells independently of apoptosis*. *Gene Ther*, 2013. **20**(11): p. 1033-41.
233. Ungerechts, G., M.E. Frenzke, K.C. Yaiw, T. Miest, P.B. Johnston, and R. Cattaneo, *Mantle cell lymphoma salvage regimen: synergy between a reprogrammed oncolytic virus and two chemotherapeutics*. *Gene Ther*, 2010. **17**(12): p. 1506-16.
234. Bracarda, S., A.M. Eggermont, and J. Samuelsson, *Redefining the role of interferon in the treatment of malignant diseases*. *Eur J Cancer*, 2010. **46**(2): p. 284-97.
235. Amedei, A., A. Cappon, G. Codolo, A. Cabrelle, A. Polenghi, M. Benagiano, E. Tasca, A. Azzurri, M.M. D'Elis, G. Del Prete, and M. de Bernard, *The neutrophil-activating protein of Helicobacter pylori promotes Th1 immune responses*. *J Clin Invest*, 2006. **116**(4): p. 1092-101.
236. Iankov, I.D., C. Allen, M.J. Federspiel, R.M. Myers, K.W. Peng, J.N. Ingle, S.J. Russell, and E. Galanis, *Expression of immunomodulatory neutrophil-activating protein of Helicobacter pylori enhances the antitumor activity of oncolytic measles virus*. *Mol Ther*, 2012. **20**(6): p. 1139-47.
237. Grossardt, C., C.E. Engeland, S. Bossow, N. Halama, K. Zaoui, M.F. Leber, C. Springfield, D. Jaeger, C. von Kalle, and G. Ungerechts, *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-armed oncolytic measles virus is an effective therapeutic cancer vaccine*. *Hum Gene Ther*, 2013. **24**(7): p. 644-54.

238. Galanis, E., L.C. Hartmann, W.A. Cliby, H.J. Long, P.P. Peethambaram, B.A. Barrette, J.S. Kaur, P.J. Haluska, Jr., I. Aderca, P.J. Zollman, J.A. Sloan, G. Keeney, P.J. Atherton, K.C. Podratz, S.C. Dowdy, et al., *Phase I trial of intraperitoneal administration of an oncolytic measles virus strain engineered to express carcinoembryonic antigen for recurrent ovarian cancer*. *Cancer Res*, 2010. **70**(3): p. 875-82.
239. Iankov, I.D., M.L. Hillestad, A.B. Dietz, S.J. Russell, and E. Galanis, *Converting tumor-specific markers into reporters of oncolytic virus infection*. *Mol Ther*, 2009. **17**(8): p. 1395-403.
240. Penheiter, A.R., S.J. Russell, and S.K. Carlson, *The sodium iodide symporter (NIS) as an imaging reporter for gene, viral, and cell-based therapies*. *Curr Gene Ther*, 2012. **12**(1): p. 33-47.
241. Dingli, D., S.J. Russell, and J.C. Morris, 3rd, *In vivo imaging and tumor therapy with the sodium iodide symporter*. *J Cell Biochem*, 2003. **90**(6): p. 1079-86.
242. Garber, K., *China approves world's first oncolytic virus therapy for cancer treatment*. *J Natl Cancer Inst*, 2006. **98**(5): p. 298-300.
243. Galanis, E., P.J. Atherton, M.J. Maurer, K.L. Knutson, S.C. Dowdy, W.A. Cliby, P. Haluska, Jr., H.J. Long, A. Oberg, I. Aderca, M.S. Block, J. Bakkum-Gamez, M.J. Federspiel, S.J. Russell, K.R. Kalli, et al., *Oncolytic measles virus expressing the sodium iodide symporter to treat drug-resistant ovarian cancer*. *Cancer Res*, 2015. **75**(1): p. 22-30.
244. Markman, M., K. Webster, K. Zanotti, G. Peterson, B. Kulp, and J. Belinson, *Survival following the documentation of platinum and taxane resistance in ovarian cancer: a single institution experience involving multiple phase 2 clinical trials*. *Gynecol Oncol*, 2004. **93**(3): p. 699-701.
245. Burger, R.A., M.W. Sill, B.J. Monk, B.E. Greer, and J.I. Sorosky, *Phase II trial of bevacizumab in persistent or recurrent epithelial ovarian cancer or primary peritoneal cancer: a Gynecologic Oncology Group Study*. *J Clin Oncol*, 2007. **25**(33): p. 5165-71.
246. Russell, S.J., M.J. Federspiel, K.W. Peng, C. Tong, D. Dingli, W.G. Morice, V. Lowe, M.K. O'Connor, R.A. Kyle, N. Leung, F.K. Buadi, S.V. Rajkumar, M.A. Gertz, M.Q. Lacy, and A. Dispenzieri, *Remission of disseminated cancer after systemic oncolytic virotherapy*. *Mayo Clin Proc*, 2014. **89**(7): p. 926-33.
247. Fonteneau, J.F., C. Achard, C. Zaupa, J. Foloppe, and P. Erbs, *Oncolytic immunotherapy: the new clinical outbreak*. *Oncoimmunology*, 2016. **5**(1).
248. Hengstschlager, M., M. Pfeilstocker, and E. Wawra, *Thymidine kinase expression. A marker for malignant cells*. *Adv Exp Med Biol*, 1998. **431**: p. 455-60.
249. Parato, K.A., C.J. Breitbach, F. Le Boeuf, J. Wang, C. Storbeck, C. Ilkow, J.S. Diallo, T. Falls, J. Burns, V. Garcia, F. Kanji, L. Evgin, K. Hu, F. Paradis, S. Knowles, et al., *The oncolytic poxvirus JX-594 selectively replicates in and destroys cancer cells driven by genetic pathways commonly activated in cancers*. *Mol Ther*, 2012. **20**(4): p. 749-58.
250. Kirn, D.H. and S.H. Thorne, *Targeted and armed oncolytic poxviruses: a novel multi-mechanistic therapeutic class for cancer*. *Nat Rev Cancer*, 2009. **9**(1): p. 64-71.
251. Park, B.H., T. Hwang, T.C. Liu, D.Y. Sze, J.S. Kim, H.C. Kwon, S.Y. Oh, S.Y. Han, J.H. Yoon, S.H. Hong, A. Moon, K. Speth, C. Park, Y.J. Ahn, M. Daneshmand, 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): p. 533-42.
252. Heo, J., T. Reid, L. Ruo, C.J. Breitbach, S. Rose, M. Bloomston, M. Cho, H.Y. Lim, H.C. Chung, C.W. Kim, J. Burke, R. Lencioni, T. Hickman, A. Moon, Y.S. Lee, et al.,

- Randomized dose-finding clinical trial of oncolytic immunotherapeutic vaccinia JX-594 in liver cancer.* Nat Med, 2013. **19**(3): p. 329-36.
253. Cheng, A.L., Y.K. Kang, Z. Chen, C.J. Tsao, S. Qin, J.S. Kim, R. Luo, J. Feng, S. Ye, T.S. Yang, J. Xu, Y. Sun, H. Liang, J. Liu, J. Wang, et al., *Efficacy and safety of sorafenib in patients in the Asia-Pacific region with advanced hepatocellular carcinoma: a phase III randomised, double-blind, placebo-controlled trial.* Lancet Oncol, 2009. **10**(1): p. 25-34.
 254. Breitbach, C.J., J. Burke, D. Jonker, J. Stephenson, A.R. Haas, L.Q. Chow, J. Nieva, T.H. Hwang, A. Moon, R. Patt, A. Pelusio, F. Le Boeuf, J. Burns, L. Evgin, N. De Silva, et al., *Intravenous delivery of a multi-mechanistic cancer-targeted oncolytic poxvirus in humans.* Nature, 2011. **477**(7362): p. 99-102.
 255. Breitbach, C.J., R. Arulanandam, N. De Silva, S.H. Thorne, R. Patt, M. Daneshmand, A. Moon, C. Ilkow, J. Burke, T.H. Hwang, J. Heo, M. Cho, H. Chen, F.A. Angarita, C. Addison, et al., *Oncolytic vaccinia virus disrupts tumor-associated vasculature in humans.* Cancer Res, 2013. **73**(4): p. 1265-75.
 256. Liu, B.L., M. Robinson, Z.Q. Han, R.H. Branston, C. English, P. Reay, Y. McGrath, S.K. Thomas, M. Thornton, P. Bullock, C.A. Love, and R.S. Coffin, *ICP34.5 deleted herpes simplex virus with enhanced oncolytic, immune stimulating, and anti-tumour properties.* Gene Ther, 2003. **10**(4): p. 292-303.
 257. Goldsmith, K., W. Chen, D.C. Johnson, and R.L. Hendricks, *Infected cell protein (ICP)47 enhances herpes simplex virus neurovirulence by blocking the CD8+ T cell response.* J Exp Med, 1998. **187**(3): p. 341-8.
 258. Senzer, N.N., H.L. Kaufman, T. Amatruda, M. Nemunaitis, T. Reid, G. Daniels, R. Gonzalez, J. Glaspy, E. Whitman, K. Harrington, H. Goldsweig, T. Marshall, C. Love, R. Coffin, and J.J. Nemunaitis, *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): p. 5763-71.
 259. Kaufman, H.L., D.W. Kim, G. DeRaffele, J. Mitcham, R.S. Coffin, and S. Kim-Schulze, *Local and distant immunity induced by intralesional vaccination with an oncolytic herpes virus encoding GM-CSF in patients with stage IIIc and IV melanoma.* Ann Surg Oncol, 2010. **17**(3): p. 718-30.
 260. Kaufman, H.L. and S.D. Bines, *OPTIM trial: a Phase III trial of an oncolytic herpes virus encoding GM-CSF for unresectable stage III or IV melanoma.* Future Oncol, 2010. **6**(6): p. 941-9.
 261. Andtbacka, R.H., H.L. Kaufman, F. Collichio, T. Amatruda, N. Senzer, J. Chesney, K.A. Delman, L.E. Spitler, I. Puzanov, S.S. Agarwala, M. Milhem, L. Cranmer, B. Curti, K. Lewis, M. Ross, et al., *Talimogene Laherparepvec Improves Durable Response Rate in Patients With Advanced Melanoma.* J Clin Oncol, 2015. **33**(25): p. 2780-8.
 262. Kaufman, H.L., C.E. Ruby, T. Hughes, and C.L. Slingluff, Jr., *Current status of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in the immunotherapy of melanoma.* J Immunother Cancer, 2014. **2**: p. 11.
 263. Boisgerault, N., C. Achard, T. Delaunay, L. Cellerin, F. Tangy, M. Gregoire, and J.F. Fonteneau, *Oncolytic virotherapy for human malignant mesothelioma: recent advances.* Oncolytic Virotherapy, 2015. **4**: p. 133-140.
 264. Isaacs, A. and J. Lindenmann, *Virus interference. I. The interferon.* Proc R Soc Lond B Biol Sci, 1957. **147**(927): p. 258-67.
 265. Yoneyama, M., M. Kikuchi, T. Natsukawa, N. Shinobu, T. Imaizumi, M. Miyagishi, K. Taira, S. Akira, and T. Fujita, *The RNA helicase RIG-I has an essential function in*

- double-stranded RNA-induced innate antiviral responses*. Nat Immunol, 2004. **5**(7): p. 730-7.
266. Andrejeva, J., K.S. Childs, D.F. Young, T.S. Carlos, N. Stock, S. Goodbourn, and R.E. Randall, *The V proteins of paramyxoviruses bind the IFN-inducible RNA helicase, mda-5, and inhibit its activation of the IFN-beta promoter*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(49): p. 17264-9.
 267. Goubau, D., S. Deddouche, and C. Reis e Sousa, *Cytosolic sensing of viruses*. Immunity, 2013. **38**(5): p. 855-69.
 268. Hornung, V., J. Ellegast, S. Kim, K. Brzozka, A. Jung, H. Kato, H. Poeck, S. Akira, K.K. Conzelmann, M. Schlee, S. Endres, and G. Hartmann, *5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I*. Science, 2006. **314**(5801): p. 994-7.
 269. Pichlmair, A., O. Schulz, C.P. Tan, T.I. Naslund, P. Liljestrom, F. Weber, and C. Reis e Sousa, *RIG-I-mediated antiviral responses to single-stranded RNA bearing 5'-phosphates*. Science, 2006. **314**(5801): p. 997-1001.
 270. Schlee, M., A. Roth, V. Hornung, C.A. Hagmann, V. Wimmenauer, W. Barchet, C. Coch, M. Janke, A. Mihailovic, G. Wardle, S. Juranek, H. Kato, T. Kawai, H. Poeck, K.A. Fitzgerald, et al., *Recognition of 5' triphosphate by RIG-I helicase requires short blunt double-stranded RNA as contained in panhandle of negative-strand virus*. Immunity, 2009. **31**(1): p. 25-34.
 271. Schmidt, A., T. Schwerdt, W. Hamm, J.C. Hellmuth, S. Cui, M. Wenzel, F.S. Hoffmann, M.C. Michallet, R. Besch, K.P. Hopfner, S. Endres, and S. Rothenfusser, *5'-triphosphate RNA requires base-paired structures to activate antiviral signaling via RIG-I*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(29): p. 12067-72.
 272. Yoo, J.S., H. Kato, and T. Fujita, *Sensing viral invasion by RIG-I like receptors*. Curr Opin Microbiol, 2014. **20**: p. 131-8.
 273. Plumet, S., F. Herschke, J.M. Bourhis, H. Valentin, S. Longhi, and D. Gerlier, *Cytosolic 5'-triphosphate ended viral leader transcript of measles virus as activator of the RIG I-mediated interferon response*. PLoS One, 2007. **2**(3): p. e279.
 274. Weber, M., A. Gawanbacht, M. Habjan, A. Rang, C. Borner, A.M. Schmidt, S. Veitinger, R. Jacob, S. Devignot, G. Kochs, A. Garcia-Sastre, and F. Weber, *Incoming RNA virus nucleocapsids containing a 5'-triphosphorylated genome activate RIG-I and antiviral signaling*. Cell Host Microbe, 2013. **13**(3): p. 336-46.
 275. Rehwinkel, J., C.P. Tan, D. Goubau, O. Schulz, A. Pichlmair, K. Bier, N. Robb, F. Vreede, W. Barclay, E. Fodor, and C. Reis e Sousa, *RIG-I detects viral genomic RNA during negative-strand RNA virus infection*. Cell, 2010. **140**(3): p. 397-408.
 276. Kato, H., O. Takeuchi, E. Mikamo-Satoh, R. Hirai, T. Kawai, K. Matsushita, A. Hiiragi, T.S. Dermody, T. Fujita, and S. Akira, *Length-dependent recognition of double-stranded ribonucleic acids by retinoic acid-inducible gene-I and melanoma differentiation-associated gene 5*. J Exp Med, 2008. **205**(7): p. 1601-10.
 277. Feng, Q., S.V. Hato, M.A. Langereis, J. Zoll, R. Virgen-Slane, A. Peisley, S. Hur, B.L. Semler, R.P. van Rij, and F.J. van Kuppeveld, *MDA5 detects the double-stranded RNA replicative form in picornavirus-infected cells*. Cell Rep, 2012. **2**(5): p. 1187-96.
 278. Pichlmair, A., O. Schulz, C.P. Tan, J. Rehwinkel, H. Kato, O. Takeuchi, S. Akira, M. Way, G. Schiavo, and C. Reis e Sousa, *Activation of MDA5 requires higher-order RNA structures generated during virus infection*. J Virol, 2009. **83**(20): p. 10761-9.
 279. Bruns, A.M. and C.M. Horvath, *Activation of RIG-I-like receptor signal transduction*. Crit Rev Biochem Mol Biol, 2012. **47**(2): p. 194-206.
 280. Seth, R.B., L. Sun, C.K. Ea, and Z.J. Chen, *Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signaling protein that activates NF-kappaB and IRF 3*. Cell, 2005. **122**(5): p. 669-82.

281. Sun, Q., L. Sun, H.H. Liu, X. Chen, R.B. Seth, J. Forman, and Z.J. Chen, *The specific and essential role of MAVS in antiviral innate immune responses*. Immunity, 2006. **24**(5): p. 633-42.
282. Kumar, H., T. Kawai, H. Kato, S. Sato, K. Takahashi, C. Coban, M. Yamamoto, S. Uematsu, K.J. Ishii, O. Takeuchi, and S. Akira, *Essential role of IPS-1 in innate immune responses against RNA viruses*. J Exp Med, 2006. **203**(7): p. 1795-803.
283. Hou, F., L. Sun, H. Zheng, B. Skaug, Q.X. Jiang, and Z.J. Chen, *MAVS forms functional prion-like aggregates to activate and propagate antiviral innate immune response*. Cell, 2011. **146**(3): p. 448-61.
284. Honda, K., A. Takaoka, and T. Taniguchi, *Type I interferon [corrected] gene induction by the interferon regulatory factor family of transcription factors*. Immunity, 2006. **25**(3): p. 349-60.
285. Schneider, W.M., M.D. Chevillotte, and C.M. Rice, *Interferon-stimulated genes: a complex web of host defenses*. Annu Rev Immunol, 2014. **32**: p. 513-45.
286. de Veer, M.J., M. Holko, M. Frevel, E. Walker, S. Der, J.M. Paranjape, R.H. Silverman, and B.R. Williams, *Functional classification of interferon-stimulated genes identified using microarrays*. J Leukoc Biol, 2001. **69**(6): p. 912-20.
287. Schoggins, J.W., *Interferon-stimulated genes: roles in viral pathogenesis*. Curr Opin Virol, 2014. **6**: p. 40-6.
288. Schoggins, J.W., S.J. Wilson, M. Panis, M.Y. Murphy, C.T. Jones, P. Bieniasz, and C.M. Rice, *A diverse range of gene products are effectors of the type I interferon antiviral response*. Nature, 2011. **472**(7344): p. 481-5.
289. Holzinger, D., C. Jorns, S. Stertz, S. Boisson-Dupuis, R. Thimme, M. Weidmann, J.L. Casanova, O. Haller, and G. Kochs, *Induction of MxA gene expression by influenza A virus requires type I or type III interferon signaling*. J Virol, 2007. **81**(14): p. 7776-85.
290. Lindenmann, J., *Resistance of mice to mouse-adapted influenza A virus*. Virology, 1962. **16**: p. 203-4.
291. Verhelst, J., P. Hulpiau, and X. Saelens, *Mx proteins: antiviral gatekeepers that restrain the uninvited*. Microbiol Mol Biol Rev, 2013. **77**(4): p. 551-66.
292. Gao, S., A. von der Malsburg, A. Dick, K. Faelber, G.F. Schroder, O. Haller, G. Kochs, and O. Daumke, *Structure of myxovirus resistance protein a reveals intra- and intermolecular domain interactions required for the antiviral function*. Immunity, 2011. **35**(4): p. 514-25.
293. Gao, S., A. von der Malsburg, S. Paeschke, J. Behlke, O. Haller, G. Kochs, and O. Daumke, *Structural basis of oligomerization in the stalk region of dynamin-like MxA*. Nature, 2010. **465**(7297): p. 502-6.
294. Kochs, G. and O. Haller, *GTP-bound human MxA protein interacts with the nucleocapsids of Thogoto virus (Orthomyxoviridae)*. J Biol Chem, 1999. **274**(7): p. 4370-6.
295. Verhelst, J., E. Parthoens, B. Schepens, W. Fiers, and X. Saelens, *Interferon-inducible protein Mx1 inhibits influenza virus by interfering with functional viral ribonucleoprotein complex assembly*. J Virol, 2012. **86**(24): p. 13445-55.
296. Daumke, O., S. Gao, A. von der Malsburg, O. Haller, and G. Kochs, *Structure of the MxA stalk elucidates the assembly of ring-like units of an antiviral module*. Small GTPases, 2010. **1**(1): p. 62-64.
297. Xiao, H., M.J. Killip, P. Staeheli, R.E. Randall, and D. Jackson, *The human interferon-induced MxA protein inhibits early stages of influenza A virus infection by retaining the incoming viral genome in the cytoplasm*. J Virol, 2013. **87**(23): p. 13053-8.

298. Haller, O., P. Staeheli, M. Schwemmler, and G. Kochs, *Mx GTPases: dynamin-like antiviral machines of innate immunity*. Trends Microbiol, 2015. **23**(3): p. 154-63.
299. Reichelt, M., S. Stertz, J. Krijnse-Locker, O. Haller, and G. Kochs, *Missorting of LaCrosse virus nucleocapsid protein by the interferon-induced MxA GTPase involves smooth ER membranes*. Traffic, 2004. **5**(10): p. 772-84.
300. Accola, M.A., B. Huang, A. Al Masri, and M.A. McNiven, *The antiviral dynamin family member, MxA, tubulates lipids and localizes to the smooth endoplasmic reticulum*. J Biol Chem, 2002. **277**(24): p. 21829-35.
301. Schnorr, J.J., S. Schneider-Schaulies, A. Simon-Jodicke, J. Pavlovic, M.A. Horisberger, and V. ter Meulen, *MxA-dependent inhibition of measles virus glycoprotein synthesis in a stably transfected human monocytic cell line*. J Virol, 1993. **67**(8): p. 4760-8.
302. Schneider-Schaulies, S., J. Schneider-Schaulies, A. Schuster, M. Bayer, J. Pavlovic, and V. ter Meulen, *Cell type-specific MxA-mediated inhibition of measles virus transcription in human brain cells*. J Virol, 1994. **68**(11): p. 6910-7.
303. Kane, M., S.S. Yadav, J. Bitzegeio, S.B. Kutluay, T. Zang, S.J. Wilson, J.W. Schoggins, C.M. Rice, M. Yamashita, T. Hatzioannou, and P.D. Bieniasz, *MX2 is an interferon-induced inhibitor of HIV-1 infection*. Nature, 2013. **502**(7472): p. 563-6.
304. Zhao, C., M.N. Collins, T.Y. Hsiang, and R.M. Krug, *Interferon-induced ISG15 pathway: an ongoing virus-host battle*. Trends Microbiol, 2013. **21**(4): p. 181-6.
305. Zhao, C., C. Denison, J.M. Huibregtse, S. Gygi, and R.M. Krug, *Human ISG15 conjugation targets both IFN-induced and constitutively expressed proteins functioning in diverse cellular pathways*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(29): p. 10200-5.
306. Morales, D.J. and D.J. Lenschow, *The antiviral activities of ISG15*. J Mol Biol, 2013. **425**(24): p. 4995-5008.
307. Durfee, L.A., N. Lyon, K. Seo, and J.M. Huibregtse, *The ISG15 conjugation system broadly targets newly synthesized proteins: implications for the antiviral function of ISG15*. Mol Cell, 2010. **38**(5): p. 722-32.
308. Shi, H.X., K. Yang, X. Liu, X.Y. Liu, B. Wei, Y.F. Shan, L.H. Zhu, and C. Wang, *Positive regulation of interferon regulatory factor 3 activation by Herc5 via ISG15 modification*. Mol Cell Biol, 2010. **30**(10): p. 2424-36.
309. Lu, G., J.T. Reinert, I. Pitha-Rowe, A. Okumura, M. Kellum, K.P. Knobeloch, B. Hassel, and P.M. Pitha, *ISG15 enhances the innate antiviral response by inhibition of IRF-3 degradation*. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand), 2006. **52**(1): p. 29-41.
310. Okumura, F., W. Zou, and D.E. Zhang, *ISG15 modification of the eIF4E cognate 4EHP enhances cap structure-binding activity of 4EHP*. Genes Dev, 2007. **21**(3): p. 255-60.
311. Bogunovic, D., S. Boisson-Dupuis, and J.L. Casanova, *ISG15: leading a double life as a secreted molecule*. Exp Mol Med, 2013. **45**: p. e18.
312. Sadler, A.J. and B.R. Williams, *Interferon-inducible antiviral effectors*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(7): p. 559-68.
313. Silverman, R.H., *Fascination with 2-5A-dependent RNase: a unique enzyme that functions in interferon action*. J Interferon Res, 1994. **14**(3): p. 101-4.
314. Malathi, K., B. Dong, M. Gale, Jr., and R.H. Silverman, *Small self-RNA generated by RNase L amplifies antiviral innate immunity*. Nature, 2007. **448**(7155): p. 816-9.
315. Nallagatla, S.R., J. Hwang, R. Toroney, X. Zheng, C.E. Cameron, and P.C. Bevilacqua, *5'-triphosphate-dependent activation of PKR by RNAs with short stem-loops*. Science, 2007. **318**(5855): p. 1455-8.

316. Munir, M. and M. Berg, *The multiple faces of protein kinase R in antiviral defense*. Virulence, 2013. **4**(1): p. 85-9.
317. Ikegame, S., M. Takeda, S. Ohno, Y. Nakatsu, Y. Nakanishi, and Y. Yanagi, *Both RIG-I and MDA5 RNA helicases contribute to the induction of alpha/beta interferon in measles virus-infected human cells*. J Virol, 2010. **84**(1): p. 372-9.
318. Runge, S., K.M. Sparrer, C. Lassig, K. Hembach, A. Baum, A. Garcia-Sastre, J. Soding, K.K. Conzelmann, and K.P. Hopfner, *In vivo ligands of MDA5 and RIG-I in measles virus-infected cells*. PLoS Pathog, 2014. **10**(4): p. e1004081.
319. Haller, O., G. Kochs, and F. Weber, *The interferon response circuit: induction and suppression by pathogenic viruses*. Virology, 2006. **344**(1): p. 119-30.
320. Audsley, M.D. and G.W. Moseley, *Paramyxovirus evasion of innate immunity: Diverse strategies for common targets*. World J Virol, 2013. **2**(2): p. 57-70.
321. Childs, K., N. Stock, C. Ross, J. Andrejeva, L. Hilton, M. Skinner, R. Randall, and S. Goodbourn, *mda-5, but not RIG-I, is a common target for paramyxovirus V proteins*. Virology, 2007. **359**(1): p. 190-200.
322. Caignard, G., M. Guerbois, J.L. Labernardiere, Y. Jacob, L.M. Jones, F. Wild, F. Tangy, and P.O. Vidalain, *Measles virus V protein blocks Jak1-mediated phosphorylation of STAT1 to escape IFN-alpha/beta signaling*. Virology, 2007. **368**(2): p. 351-62.
323. Devaux, P., V. von Messling, W. Songsunthong, C. Springfield, and R. Cattaneo, *Tyrosine 110 in the measles virus phosphoprotein is required to block STAT1 phosphorylation*. Virology, 2007. **360**(1): p. 72-83.
324. Palosaari, H., J.P. Parisien, J.J. Rodriguez, C.M. Ulane, and C.M. Horvath, *STAT protein interference and suppression of cytokine signal transduction by measles virus V protein*. J Virol, 2003. **77**(13): p. 7635-44.
325. Yokota, S., H. Saito, T. Kubota, N. Yokosawa, K. Amano, and N. Fujii, *Measles virus suppresses interferon-alpha signaling pathway: suppression of Jak1 phosphorylation and association of viral accessory proteins, C and V, with interferon-alpha receptor complex*. Virology, 2003. **306**(1): p. 135-46.
326. Shaffer, J.A., W.J. Bellini, and P.A. Rota, *The C protein of measles virus inhibits the type I interferon response*. Virology, 2003. **315**(2): p. 389-97.
327. Takayama, I., H. Sato, A. Watanabe, M. Omi-Furutani, A. Sugai, K. Kanki, M. Yoneda, and C. Kai, *The nucleocapsid protein of measles virus blocks host interferon response*. Virology, 2012. **424**(1): p. 45-55.
328. Ohno, S., N. Ono, M. Takeda, K. Takeuchi, and Y. Yanagi, *Dissection of measles virus V protein in relation to its ability to block alpha/beta interferon signal transduction*. J Gen Virol, 2004. **85**(Pt 10): p. 2991-9.
329. Takeda, M., A. Kato, F. Kobune, H. Sakata, Y. Li, T. Shioda, Y. Sakai, M. Asakawa, and Y. Nagai, *Measles virus attenuation associated with transcriptional impediment and a few amino acid changes in the polymerase and accessory proteins*. J Virol, 1998. **72**(11): p. 8690-6.
330. Shingai, M., T. Ebihara, N.A. Begum, A. Kato, T. Honma, K. Matsumoto, H. Saito, H. Ogura, M. Matsumoto, and T. Seya, *Differential type I IFN-inducing abilities of wild-type versus vaccine strains of measles virus*. J Immunol, 2007. **179**(9): p. 6123-33.
331. Russell, S.J., K.W. Peng, and J.C. Bell, *Oncolytic virotherapy*. Nat Biotechnol, 2012. **30**(7): p. 658-70.
332. Chawla-Sarkar, M., D.J. Lindner, Y.F. Liu, B.R. Williams, G.C. Sen, R.H. Silverman, and E.C. Borden, *Apoptosis and interferons: role of interferon-stimulated genes as mediators of apoptosis*. Apoptosis, 2003. **8**(3): p. 237-49.

333. Bidwell, B.N., C.Y. Slaney, N.P. Withana, S. Forster, Y. Cao, S. Loi, D. Andrews, T. Mikeska, N.E. Mangan, S.A. Samarajiw, N.A. de Weerd, J. Gould, P. Argani, A. Moller, M.J. Smyth, et al., *Silencing of Irf7 pathways in breast cancer cells promotes bone metastasis through immune escape*. Nat Med, 2012. **18**(8): p. 1224-31.
334. Adamkova, L., K. Souckova, and J. Kovarik, *Transcription protein STAT1: biology and relation to cancer*. Folia Biol (Praha), 2007. **53**(1): p. 1-6.
335. Wong, L.H., K.G. Krauer, I. Hatzinisiriou, M.J. Estcourt, P. Hersey, N.D. Tam, S. Edmondson, R.J. Devenish, and S.J. Ralph, *Interferon-resistant human melanoma cells are deficient in ISGF3 components, STAT1, STAT2, and p48-ISGF3gamma*. J Biol Chem, 1997. **272**(45): p. 28779-85.
336. Sun, W.H., C. Pabon, Y. Alsayed, P.P. Huang, S. Jandeska, S. Uddin, L.C. Platani, and S.T. Rosen, *Interferon-alpha resistance in a cutaneous T-cell lymphoma cell line is associated with lack of STAT1 expression*. Blood, 1998. **91**(2): p. 570-6.
337. Chan, S.R., C.G. Rickert, W. Vermi, K.C. Sheehan, C. Arthur, J.A. Allen, J.M. White, J. Archambault, S. Lonardi, T.M. McDevitt, D. Bhattacharya, M.V. Lorenzi, D.C. Allred, and R.D. Schreiber, *Dysregulated STAT1-SOCS1 control of JAK2 promotes mammary luminal progenitor cell survival and drives ERalpha(+) tumorigenesis*. Cell Death Differ, 2014. **21**(2): p. 234-46.
338. Fountain, J.W., M. Karayiorgou, M.S. Ernstoff, J.M. Kirkwood, D.R. Vlock, L. Titus-Ernstoff, B. Bouchard, S. Vijayasathadi, A.N. Houghton, J. Lahti, and et al., *Homozygous deletions within human chromosome band 9p21 in melanoma*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(21): p. 10557-61.
339. Lydiatt, W.M., B.J. Davidson, S.P. Schantz, S. Caruana, and R.S. Chaganti, *9p21 deletion correlates with recurrence in head and neck cancer*. Head Neck, 1998. **20**(2): p. 113-8.
340. Linsley, P.S., C. Speake, E. Whalen, and D. Chaussabel, *Copy number loss of the interferon gene cluster in melanomas is linked to reduced T cell infiltrate and poor patient prognosis*. PLoS One, 2014. **9**(10): p. e109760.
341. Leonova, K.I., L. Brodsky, B. Lipchick, M. Pal, L. Novototskaya, A.A. Chenchik, G.C. Sen, E.A. Komarova, and A.V. Gudkov, *p53 cooperates with DNA methylation and a suicidal interferon response to maintain epigenetic silencing of repeats and noncoding RNAs*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(1): p. E89-98.
342. Naik, S. and S.J. Russell, *Engineering oncolytic viruses to exploit tumor specific defects in innate immune signaling pathways*. Expert Opin Biol Ther, 2009. **9**(9): p. 1163-76.
343. Stojdl, D.F., B. Lichty, S. Knowles, R. Marius, H. Atkins, N. Sonenberg, and J.C. Bell, *Exploiting tumor-specific defects in the interferon pathway with a previously unknown oncolytic virus*. Nat Med, 2000. **6**(7): p. 821-5.
344. Stojdl, D.F., B.D. Lichty, B.R. tenOever, J.M. Paterson, A.T. Power, S. Knowles, R. Marius, J. Reynard, L. Poliquin, H. Atkins, E.G. Brown, R.K. Durbin, J.E. Durbin, J. Hiscott, and J.C. Bell, *VSV strains with defects in their ability to shutdown innate immunity are potent systemic anti-cancer agents*. Cancer Cell, 2003. **4**(4): p. 263-75.
345. Lun, X., D.L. Senger, T. Alain, A. Oprea, K. Parato, D. Stojdl, B. Lichty, A. Power, R.N. Johnston, M. Hamilton, I. Parney, J.C. Bell, and P.A. Forsyth, *Effects of intravenously administered recombinant vesicular stomatitis virus (VSV(deltaM51)) on multifocal and invasive gliomas*. J Natl Cancer Inst, 2006. **98**(21): p. 1546-57.
346. Ebert, O., S. Harbaran, K. Shinozaki, and S.L. Woo, *Systemic therapy of experimental breast cancer metastases by mutant vesicular stomatitis virus in immune-competent mice*. Cancer Gene Ther, 2005. **12**(4): p. 350-8.

347. Hadaschik, B.A., K. Zhang, A.I. So, L. Fazli, W. Jia, J.C. Bell, M.E. Gleave, and P.S. Rennie, *Oncolytic vesicular stomatitis viruses are potent agents for intravesical treatment of high-risk bladder cancer*. Cancer Res, 2008. **68**(12): p. 4506-10.
348. Goel, A., S.K. Carlson, K.L. Classic, S. Greiner, S. Naik, A.T. Power, J.C. Bell, and S.J. Russell, *Radioiodide imaging and radiovirotherapy of multiple myeloma using VSV(Delta51)-NIS, an attenuated vesicular stomatitis virus encoding the sodium iodide symporter gene*. Blood, 2007. **110**(7): p. 2342-50.
349. Obuchi, M., M. Fernandez, and G.N. Barber, *Development of recombinant vesicular stomatitis viruses that exploit defects in host defense to augment specific oncolytic activity*. J Virol, 2003. **77**(16): p. 8843-56.
350. Kurisetty, V.V., J. Heiber, R. Myers, G.S. Pereira, J.W. Goodwin, M.J. Federspiel, S.J. Russell, K.W. Peng, G. Barber, and J.R. Merchan, *Preclinical safety and activity of recombinant VSV-IFN-beta in an immunocompetent model of squamous cell carcinoma of the head and neck*. Head Neck, 2014. **36**(11): p. 1619-27.
351. Patel, M.R., B.A. Jacobson, Y. Ji, J. Drees, S. Tang, K. Xiong, H. Wang, J.E. Prigge, A.S. Dash, A.K. Kratzke, E. Mesev, R. Etchison, M.J. Federspiel, S.J. Russell, and R.A. Kratzke, *Vesicular stomatitis virus expressing interferon-beta is oncolytic and promotes antitumor immune responses in a syngeneic murine model of non-small cell lung cancer*. Oncotarget, 2015. **6**(32): p. 33165-77.
352. Willmon, C.L., V. Saloura, Z.G. Fridlender, P. Wongthida, R.M. Diaz, J. Thompson, T. Kottke, M. Federspiel, G. Barber, S.M. Albelda, and R.G. Vile, *Expression of IFN-beta enhances both efficacy and safety of oncolytic vesicular stomatitis virus for therapy of mesothelioma*. Cancer Res, 2009. **69**(19): p. 7713-20.
353. Blackham, A.U., S.A. Northrup, M. Willingham, R.B. D'Agostino, Jr., D.S. Lyles, and J.H.t. Stewart, *Variation in susceptibility of human malignant melanomas to oncolytic vesicular stomatitis virus*. Surgery, 2013. **153**(3): p. 333-43.
354. Carey, B.L., M. Ahmed, S. Puckett, and D.S. Lyles, *Early steps of the virus replication cycle are inhibited in prostate cancer cells resistant to oncolytic vesicular stomatitis virus*. J Virol, 2008. **82**(24): p. 12104-15.
355. Moerdyk-Schauwecker, M., N.R. Shah, A.M. Murphy, E. Hastie, P. Mukherjee, and V.Z. Grdzlishvili, *Resistance of pancreatic cancer cells to oncolytic vesicular stomatitis virus: role of type I interferon signaling*. Virology, 2013. **436**(1): p. 221-34.
356. Saloura, V., L.C. Wang, Z.G. Fridlender, J. Sun, G. Cheng, V. Kapoor, D.H. Stermann, R.N. Harty, A. Okumura, G.N. Barber, R.G. Vile, M.J. Federspiel, S.J. Russell, L. Litzky, and S.M. Albelda, *Evaluation of an attenuated vesicular stomatitis virus vector expressing interferon-beta for use in malignant pleural mesothelioma: heterogeneity in interferon responsiveness defines potential efficacy*. Hum Gene Ther, 2010. **21**(1): p. 51-64.
357. MC, M.P., S.A. Fernandez, K. Landes, D. Huey, M. Lairmore, and S. Niewiesk, *Success of measles virotherapy in ATL depends on type I interferon secretion and responsiveness*. Virus Res, 2014. **189**: p. 206-13.
358. Berchtold, S., J. Lampe, T. Weiland, I. Smirnow, S. Schleicher, R. Handgretinger, H.G. Kopp, J. Reiser, F. Stubenrauch, N. Mayer, N.P. Malek, M. Bitzer, and U.M. Lauer, *Innate immune defense defines susceptibility of sarcoma cells to measles vaccine virus-based oncolysis*. J Virol, 2013. **87**(6): p. 3484-501.
359. Noll, M., S. Berchtold, J. Lampe, N.P. Malek, M. Bitzer, and U.M. Lauer, *Primary resistance phenomena to oncolytic measles vaccine viruses*. Int J Oncol, 2013. **43**(1): p. 103-12.
360. Burnet, M., *Cancer; a biological approach. I. The processes of control*. Br Med J, 1957. **1**(5022): p. 779-86.

361. Burnet, M., *Immunological Factors in the Process of Carcinogenesis*. Br Med Bull, 1964. **20**: p. 154-8.
362. Stutman, O., *Tumor development after 3-methylcholanthrene in immunologically deficient athymic-nude mice*. Science, 1974. **183**(4124): p. 534-6.
363. Stutman, O., *Chemical carcinogenesis in nude mice: comparison between nude mice from homozygous matings and heterozygous matings and effect of age and carcinogen dose*. J Natl Cancer Inst, 1979. **62**(2): p. 353-8.
364. Ikehara, S., R.N. Pahwa, G. Fernandes, C.T. Hansen, and R.A. Good, *Functional T cells in athymic nude mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1984. **81**(3): p. 886-8.
365. Maleckar, J.R. and L.A. Sherman, *The composition of the T cell receptor repertoire in nude mice*. J Immunol, 1987. **138**(11): p. 3873-6.
366. Shankaran, V., H. Ikeda, A.T. Bruce, J.M. White, P.E. Swanson, L.J. Old, and R.D. Schreiber, *IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity*. Nature, 2001. **410**(6832): p. 1107-11.
367. Birkeland, S.A., H.H. Storm, L.U. Lamm, L. Barlow, I. Blohme, B. Forsberg, B. Eklund, O. Fjeldborg, M. Friedberg, L. Frodin, and et al., *Cancer risk after renal transplantation in the Nordic countries, 1964-1986*. Int J Cancer, 1995. **60**(2): p. 183-9.
368. Dunn, G.P., L.J. Old, and R.D. Schreiber, *The three Es of cancer immunoediting*. Annu Rev Immunol, 2004. **22**: p. 329-60.
369. Stockert, E., E. Jager, Y.T. Chen, M.J. Scanlan, I. Gout, J. Karbach, M. Arand, A. Knuth, and L.J. Old, *A survey of the humoral immune response of cancer patients to a panel of human tumor antigens*. J Exp Med, 1998. **187**(8): p. 1349-54.
370. Knuth, A., B. Danowski, H.F. Oettgen, and L.J. Old, *T-cell-mediated cytotoxicity against autologous malignant melanoma: analysis with interleukin 2-dependent T-cell cultures*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1984. **81**(11): p. 3511-5.
371. Dunn, G.P., C.M. Koebel, and R.D. Schreiber, *Interferons, immunity and cancer immunoediting*. Nat Rev Immunol, 2006. **6**(11): p. 836-48.
372. Zitvogel, L., L. Galluzzi, O. Kepp, M.J. Smyth, and G. Kroemer, *Type I interferons in anticancer immunity*. Nat Rev Immunol, 2015. **15**(7): p. 405-14.
373. Khong, H.T. and N.P. Restifo, *Natural selection of tumor variants in the generation of "tumor escape" phenotypes*. Nat Immunol, 2002. **3**(11): p. 999-1005.
374. Groh, V., J. Wu, C. Yee, and T. Spies, *Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation*. Nature, 2002. **419**(6908): p. 734-8.
375. Garrido, F., F. Ruiz-Cabello, T. Cabrera, J.J. Perez-Villar, M. Lopez-Botet, M. Duggan-Keen, and P.L. Stern, *Implications for immunosurveillance of altered HLA class I phenotypes in human tumours*. Immunol Today, 1997. **18**(2): p. 89-95.
376. Medema, J.P., J. de Jong, L.T. Peltenburg, E.M. Verdegaal, A. Gorter, S.A. Bres, K.L. Franken, M. Hahne, J.P. Albar, C.J. Melief, and R. Offringa, *Blockade of the granzyme B/perforin pathway through overexpression of the serine protease inhibitor PI-9/SPI-6 constitutes a mechanism for immune escape by tumors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(20): p. 11515-20.
377. Uyttenhove, C., L. Pilotte, I. Theate, V. Stroobant, D. Colau, N. Parmentier, T. Boon, and B.J. Van den Eynde, *Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase*. Nat Med, 2003. **9**(10): p. 1269-74.
378. Dong, H., S.E. Strome, D.R. Salomao, H. Tamura, F. Hirano, D.B. Flies, P.C. Roche, J. Lu, G. Zhu, K. Tamada, V.A. Lennon, E. Celis, and L. Chen, *Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion*. Nat Med, 2002. **8**(8): p. 793-800.

379. Zitvogel, L., A. Tesniere, and G. Kroemer, *Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion*. Nat Rev Immunol, 2006. **6**(10): p. 715-27.
380. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer*. Cell, 2000. **100**(1): p. 57-70.
381. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-74.
382. Zou, W., *Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance*. Nat Rev Cancer, 2005. **5**(4): p. 263-74.
383. Mihm, M.C., Jr., C.G. Clemente, and N. Cascinelli, *Tumor infiltrating lymphocytes in lymph node melanoma metastases: a histopathologic prognostic indicator and an expression of local immune response*. Lab Invest, 1996. **74**(1): p. 43-7.
384. Nakano, O., M. Sato, Y. Naito, K. Suzuki, S. Orikasa, M. Aizawa, Y. Suzuki, I. Shintaku, H. Nagura, and H. Ohtani, *Proliferative activity of intratumoral CD8(+) T-lymphocytes as a prognostic factor in human renal cell carcinoma: clinicopathologic demonstration of antitumor immunity*. Cancer Res, 2001. **61**(13): p. 5132-6.
385. Zhang, L., J.R. Conejo-Garcia, D. Katsaros, P.A. Gimotty, M. Massobrio, G. Regnani, A. Makrigiannakis, H. Gray, K. Schlienger, M.N. Liebman, S.C. Rubin, and G. Coukos, *Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer*. N Engl J Med, 2003. **348**(3): p. 203-13.
386. Ahn, S.G., J. Jeong, S. Hong, and W.H. Jung, *Current Issues and Clinical Evidence in Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Breast Cancer*. J Pathol Transl Med, 2015. **49**(5): p. 355-63.
387. Galon, J., A. Costes, F. Sanchez-Cabo, A. Kirilovsky, B. Mlecnik, C. Lagorce-Pages, M. Tosolini, M. Camus, A. Berger, P. Wind, F. Zinzindohoue, P. Bruneval, P.H. Cugnenc, Z. Trajanoski, W.H. Fridman, et al., *Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome*. Science, 2006. **313**(5795): p. 1960-4.
388. Gooden, M.J., G.H. de Bock, N. Leffers, T. Daemen, and H.W. Nijman, *The prognostic influence of tumour-infiltrating lymphocytes in cancer: a systematic review with meta-analysis*. Br J Cancer, 2011. **105**(1): p. 93-103.
389. Sato, E., S.H. Olson, J. Ahn, B. Bundy, H. Nishikawa, F. Qian, A.A. Jungbluth, D. Frosina, S. Gnjjatic, C. Ambrosone, J. Kepner, T. Odunsi, G. Ritter, S. Lele, Y.T. Chen, et al., *Intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8+/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(51): p. 18538-43.
390. Galluzzi, L., E. Vacchelli, J.M. Bravo-San Pedro, A. Buque, L. Senovilla, E.E. Baracco, N. Bloy, F. Castoldi, J.P. Abastado, P. Agostinis, R.N. Apte, F. Aranda, M. Ayyoub, P. Beckhove, J.Y. Blay, et al., *Classification of current anticancer immunotherapies*. Oncotarget, 2014. **5**(24): p. 12472-508.
391. Rosenberg, S.A., J.C. Yang, R.M. Sherry, U.S. Kammula, M.S. Hughes, G.Q. Phan, D.E. Citrin, N.P. Restifo, P.F. Robbins, J.R. Wunderlich, K.E. Morton, C.M. Laurencot, S.M. Steinberg, D.E. White, and M.E. Dudley, *Durable complete responses in heavily pretreated patients with metastatic melanoma using T-cell transfer immunotherapy*. Clin Cancer Res, 2011. **17**(13): p. 4550-7.
392. Restifo, N.P., M.E. Dudley, and S.A. Rosenberg, *Adoptive immunotherapy for cancer: harnessing the T cell response*. Nat Rev Immunol, 2012. **12**(4): p. 269-81.
393. Aranda, F., E. Vacchelli, F. Obrist, A. Eggermont, J. Galon, W. Herve Fridman, I. Cremer, E. Tartour, L. Zitvogel, G. Kroemer, and L. Galluzzi, *Trial Watch: Adoptive cell transfer for anticancer immunotherapy*. Oncoimmunology, 2014. **3**: p. e28344.

394. Palucka, K. and J. Banchereau, *Cancer immunotherapy via dendritic cells*. Nat Rev Cancer, 2012. **12**(4): p. 265-77.
395. Sabado, R.L. and N. Bhardwaj, *Dendritic cell immunotherapy*. Ann N Y Acad Sci, 2013. **1284**: p. 31-45.
396. Palucka, K. and J. Banchereau, *Dendritic-cell-based therapeutic cancer vaccines*. Immunity, 2013. **39**(1): p. 38-48.
397. Prestwich, R.J., K.J. Harrington, R.G. Vile, and A.A. Melcher, *Immunotherapeutic potential of oncolytic virotherapy*. Lancet Oncol, 2008. **9**(7): p. 610-2.
398. Prestwich, R.J., K.J. Harrington, H.S. Pandha, R.G. Vile, A.A. Melcher, and F. Errington, *Oncolytic viruses: a novel form of immunotherapy*. Expert Rev Anticancer Ther, 2008. **8**(10): p. 1581-8.
399. Lichty, B.D., C.J. Breitbach, D.F. Stojdl, and J.C. Bell, *Going viral with cancer immunotherapy*. Nat Rev Cancer, 2014. **14**(8): p. 559-67.
400. Melcher, A., K. Parato, C.M. Rooney, and J.C. Bell, *Thunder and lightning: immunotherapy and oncolytic viruses collide*. Mol Ther, 2011. **19**(6): p. 1008-16.
401. Todo, T., S.D. Rabkin, P. Sundaresan, A. Wu, K.R. Meehan, H.B. Herscowitz, and R.L. Martuza, *Systemic antitumor immunity in experimental brain tumor therapy using a multimutated, replication-competent herpes simplex virus*. Hum Gene Ther, 1999. **10**(17): p. 2741-55.
402. Toda, M., S.D. Rabkin, H. Kojima, and R.L. Martuza, *Herpes simplex virus as an in situ cancer vaccine for the induction of specific anti-tumor immunity*. Hum Gene Ther, 1999. **10**(3): p. 385-93.
403. Prestwich, R.J., E.J. Ilett, F. Errington, R.M. Diaz, L.P. Steele, T. Kottke, J. Thompson, F. Galivo, K.J. Harrington, H.S. Pandha, P.J. Selby, R.G. Vile, and A.A. Melcher, *Immune-mediated antitumor activity of reovirus is required for therapy and is independent of direct viral oncolysis and replication*. Clin Cancer Res, 2009. **15**(13): p. 4374-81.
404. Apostolidis, L., V. Schirmacher, and P. Fournier, *Host mediated anti-tumor effect of oncolytic Newcastle disease virus after locoregional application*. Int J Oncol, 2007. **31**(5): p. 1009-19.
405. Diaz, R.M., F. Galivo, T. Kottke, P. Wongthida, J. Qiao, J. Thompson, M. Valdes, G. Barber, and R.G. Vile, *Oncolytic immunovirotherapy for melanoma using vesicular stomatitis virus*. Cancer Res, 2007. **67**(6): p. 2840-8.
406. Workenhe, S.T., M.L. Verschoor, and K.L. Mossman, *The role of oncolytic virus immunotherapies to subvert cancer immune evasion*. Future Oncol, 2015. **11**(4): p. 675-89.
407. Steinman, R.M. and Z.A. Cohn, *Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution*. J Exp Med, 1973. **137**(5): p. 1142-62.
408. Steinman, R.M. and Z.A. Cohn, *Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. II. Functional properties in vitro*. J Exp Med, 1974. **139**(2): p. 380-97.
409. Steinman, R.M., D.S. Lustig, and Z.A. Cohn, *Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. 3. Functional properties in vivo*. J Exp Med, 1974. **139**(6): p. 1431-45.
410. Mueller, D.L., *Mechanisms maintaining peripheral tolerance*. Nat Immunol, 2010. **11**(1): p. 21-7.
411. Steinman, R.M., S. Turley, I. Mellman, and K. Inaba, *The induction of tolerance by dendritic cells that have captured apoptotic cells*. J Exp Med, 2000. **191**(3): p. 411-6.

412. Steinman, R.M., D. Hawiger, and M.C. Nussenzweig, *Tolerogenic dendritic cells*. *Annu Rev Immunol*, 2003. **21**: p. 685-711.
413. Dhodapkar, M.V., R.M. Steinman, J. Krasovsky, C. Munz, and N. Bhardwaj, *Antigen-specific inhibition of effector T cell function in humans after injection of immature dendritic cells*. *J Exp Med*, 2001. **193**(2): p. 233-8.
414. Banchereau, J. and R.M. Steinman, *Dendritic cells and the control of immunity*. *Nature*, 1998. **392**(6673): p. 245-52.
415. Fritz, J.H., R.L. Ferrero, D.J. Philpott, and S.E. Girardin, *Nod-like proteins in immunity, inflammation and disease*. *Nat Immunol*, 2006. **7**(12): p. 1250-7.
416. Stetson, D.B. and R. Medzhitov, *Recognition of cytosolic DNA activates an IRF3-dependent innate immune response*. *Immunity*, 2006. **24**(1): p. 93-103.
417. Hornung, V. and E. Latz, *Intracellular DNA recognition*. *Nat Rev Immunol*, 2010. **10**(2): p. 123-30.
418. Takaoka, A., Z. Wang, M.K. Choi, H. Yanai, H. Negishi, T. Ban, Y. Lu, M. Miyagishi, T. Kodama, K. Honda, Y. Ohba, and T. Taniguchi, *DAI (DLM-1/ZBP1) is a cytosolic DNA sensor and an activator of innate immune response*. *Nature*, 2007. **448**(7152): p. 501-5.
419. Ishikawa, H., Z. Ma, and G.N. Barber, *STING regulates intracellular DNA-mediated, type I interferon-dependent innate immunity*. *Nature*, 2009. **461**(7265): p. 788-92.
420. Paludan, S.R. and A.G. Bowie, *Immune sensing of DNA*. *Immunity*, 2013. **38**(5): p. 870-80.
421. Rathinam, V.A., Z. Jiang, S.N. Waggoner, S. Sharma, L.E. Cole, L. Waggoner, S.K. Vanaja, B.G. Monks, S. Ganesan, E. Latz, V. Hornung, S.N. Vogel, E. Szomolanyi-Tsuda, and K.A. Fitzgerald, *The AIM2 inflammasome is essential for host defense against cytosolic bacteria and DNA viruses*. *Nat Immunol*, 2010. **11**(5): p. 395-402.
422. Sun, L., J. Wu, F. Du, X. Chen, and Z.J. Chen, *Cyclic GMP-AMP synthase is a cytosolic DNA sensor that activates the type I interferon pathway*. *Science*, 2013. **339**(6121): p. 786-91.
423. Wu, J., L. Sun, X. Chen, F. Du, H. Shi, C. Chen, and Z.J. Chen, *Cyclic GMP-AMP is an endogenous second messenger in innate immune signaling by cytosolic DNA*. *Science*, 2013. **339**(6121): p. 826-30.
424. Kawai, T. and S. Akira, *The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors*. *Nat Immunol*, 2010. **11**(5): p. 373-84.
425. Akira, S., S. Uematsu, and O. Takeuchi, *Pathogen recognition and innate immunity*. *Cell*, 2006. **124**(4): p. 783-801.
426. Akashi-Takamura, S. and K. Miyake, *TLR accessory molecules*. *Curr Opin Immunol*, 2008. **20**(4): p. 420-5.
427. Jin, M.S., S.E. Kim, J.Y. Heo, M.E. Lee, H.M. Kim, S.G. Paik, H. Lee, and J.O. Lee, *Crystal structure of the TLR1-TLR2 heterodimer induced by binding of a tri-acylated lipopeptide*. *Cell*, 2007. **130**(6): p. 1071-82.
428. Kang, J.Y., X. Nan, M.S. Jin, S.J. Youn, Y.H. Ryu, S. Mah, S.H. Han, H. Lee, S.G. Paik, and J.O. Lee, *Recognition of lipopeptide patterns by Toll-like receptor 2-Toll-like receptor 6 heterodimer*. *Immunity*, 2009. **31**(6): p. 873-84.
429. Kim, Y.M., M.M. Brinkmann, M.E. Paquet, and H.L. Ploegh, *UNC93B1 delivers nucleotide-sensing toll-like receptors to endolysosomes*. *Nature*, 2008. **452**(7184): p. 234-8.
430. Beignon, A.S., K. McKenna, M. Skoberne, O. Manches, I. DaSilva, D.G. Kavanagh, M. Larsson, R.J. Gorelick, J.D. Lifson, and N. Bhardwaj, *Endocytosis of HIV-1 activates plasmacytoid dendritic cells via Toll-like receptor-viral RNA interactions*. *J Clin Invest*, 2005. **115**(11): p. 3265-75.

431. Wei, J., J. Waithman, R. Lata, N.A. Mifsud, J. Cebon, T. Kay, M.J. Smyth, A.J. Sadler, and W. Chen, *Influenza A infection enhances cross-priming of CD8+ T cells to cell-associated antigens in a TLR7- and type I IFN-dependent fashion*. J Immunol, 2010. **185**(10): p. 6013-22.
432. Hochrein, H., B. Schlatter, M. O'Keeffe, C. Wagner, F. Schmitz, M. Schiemann, S. Bauer, M. Suter, and H. Wagner, *Herpes simplex virus type-1 induces IFN-alpha production via Toll-like receptor 9-dependent and -independent pathways*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(31): p. 11416-21.
433. Lund, J., A. Sato, S. Akira, R. Medzhitov, and A. Iwasaki, *Toll-like receptor 9-mediated recognition of Herpes simplex virus-2 by plasmacytoid dendritic cells*. J Exp Med, 2003. **198**(3): p. 513-20.
434. Krug, A., S. Rothenfusser, V. Hornung, B. Jahrsdorfer, S. Blackwell, Z.K. Ballas, S. Endres, A.M. Krieg, and G. Hartmann, *Identification of CpG oligonucleotide sequences with high induction of IFN-alpha/beta in plasmacytoid dendritic cells*. Eur J Immunol, 2001. **31**(7): p. 2154-63.
435. Akira, S. and K. Takeda, *Toll-like receptor signalling*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(7): p. 499-511.
436. O'Neill, L.A., D. Golenbock, and A.G. Bowie, *The history of Toll-like receptors - redefining innate immunity*. Nat Rev Immunol, 2013. **13**(6): p. 453-60.
437. Honda, K., H. Yanai, T. Mizutani, H. Negishi, N. Shimada, N. Suzuki, Y. Ohba, A. Takaoka, W.C. Yeh, and T. Taniguchi, *Role of a transductional-transcriptional processor complex involving MyD88 and IRF-7 in Toll-like receptor signaling*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(43): p. 15416-21.
438. Kawai, T., S. Sato, K.J. Ishii, C. Coban, H. Hemmi, M. Yamamoto, K. Terai, M. Matsuda, J. Inoue, S. Uematsu, O. Takeuchi, and S. Akira, *Interferon-alpha induction through Toll-like receptors involves a direct interaction of IRF7 with MyD88 and TRAF6*. Nat Immunol, 2004. **5**(10): p. 1061-8.
439. Fitzgerald, K.A., S.M. McWhirter, K.L. Faia, D.C. Rowe, E. Latz, D.T. Golenbock, A.J. Coyle, S.M. Liao, and T. Maniatis, *IKKepsilon and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway*. Nat Immunol, 2003. **4**(5): p. 491-6.
440. Fitzgerald, K.A., D.C. Rowe, B.J. Barnes, D.R. Caffrey, A. Visintin, E. Latz, B. Monks, P.M. Pitha, and D.T. Golenbock, *LPS-TLR4 signaling to IRF-3/7 and NF-kappaB involves the toll adapters TRAM and TRIF*. J Exp Med, 2003. **198**(7): p. 1043-55.
441. Merad, M., P. Sathe, J. Helft, J. Miller, and A. Mortha, *The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting*. Annu Rev Immunol, 2013. **31**: p. 563-604.
442. Crozat, K., R. Guiton, M. Guillemins, S. Henri, T. Baranek, I. Schwartz-Cornil, B. Malissen, and M. Dalod, *Comparative genomics as a tool to reveal functional equivalences between human and mouse dendritic cell subsets*. Immunol Rev, 2010. **234**(1): p. 177-98.
443. Robbins, S.H., T. Walzer, D. Dembele, C. Thibault, A. Defays, G. Bessou, H. Xu, E. Vivier, M. Sellars, P. Pierre, F.R. Sharp, S. Chan, P. Kastner, and M. Dalod, *Novel insights into the relationships between dendritic cell subsets in human and mouse revealed by genome-wide expression profiling*. Genome Biol, 2008. **9**(1): p. R17.
444. Durand, M. and E. Segura, *The known unknowns of the human dendritic cell network*. Front Immunol, 2015. **6**: p. 129.
445. Dzionek, A., A. Fuchs, P. Schmidt, S. Cremer, M. Zysk, S. Miltenyi, D.W. Buck, and J. Schmitz, *BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood*. J Immunol, 2000. **165**(11): p. 6037-46.

446. Ziegler-Heitbrock, L., P. Ancuta, S. Crowe, M. Dalod, V. Grau, D.N. Hart, P.J. Leenen, Y.J. Liu, G. MacPherson, G.J. Randolph, J. Scherberich, J. Schmitz, K. Shortman, S. Sozzani, H. Strobl, et al., *Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood*. Blood, 2010. **116**(16): p. e74-80.
447. Bachem, A., S. Guttler, E. Hartung, F. Ebstein, M. Schaefer, A. Tannert, A. Salama, K. Movassaghi, C. Opitz, H.W. Mages, V. Henn, P.M. Kloetzel, S. Gurka, and R.A. Kroczeck, *Superior antigen cross-presentation and XCR1 expression define human CD11c+CD141+ cells as homologues of mouse CD8+ dendritic cells*. J Exp Med, 2010. **207**(6): p. 1273-81.
448. Lindstedt, M., K. Lundberg, and C.A. Borrebaeck, *Gene family clustering identifies functionally associated subsets of human in vivo blood and tonsillar dendritic cells*. J Immunol, 2005. **175**(8): p. 4839-46.
449. Segura, E., J. Valladeau-Guilemond, M.H. Donnadieu, X. Sastre-Garau, V. Soumelis, and S. Amigorena, *Characterization of resident and migratory dendritic cells in human lymph nodes*. J Exp Med, 2012. **209**(4): p. 653-60.
450. Nestle, F.O., X.G. Zheng, C.B. Thompson, L.A. Turka, and B.J. Nickoloff, *Characterization of dermal dendritic cells obtained from normal human skin reveals phenotypic and functionally distinctive subsets*. J Immunol, 1993. **151**(11): p. 6535-45.
451. Klechevsky, E., R. Morita, M. Liu, Y. Cao, S. Coquery, L. Thompson-Snipes, F. Briere, D. Chaussabel, G. Zurawski, A.K. Palucka, Y. Reiter, J. Banchereau, and H. Ueno, *Functional specializations of human epidermal Langerhans cells and CD14+ dermal dendritic cells*. Immunity, 2008. **29**(3): p. 497-510.
452. Segura, E. and S. Amigorena, *Inflammatory dendritic cells in mice and humans*. Trends Immunol, 2013. **34**(9): p. 440-5.
453. Segura, E., M. Touzot, A. Bohineust, A. Cappuccio, G. Chiochia, A. Hosmalin, M. Dalod, V. Soumelis, and S. Amigorena, *Human inflammatory dendritic cells induce Th17 cell differentiation*. Immunity, 2013. **38**(2): p. 336-48.
454. Vu Manh, T.P., N. Bertho, A. Hosmalin, I. Schwartz-Cornil, and M. Dalod, *Investigating Evolutionary Conservation of Dendritic Cell Subset Identity and Functions*. Front Immunol, 2015. **6**: p. 260.
455. Geissmann, F., M.G. Manz, S. Jung, M.H. Sieweke, M. Merad, and K. Ley, *Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells*. Science, 2010. **327**(5966): p. 656-61.
456. Lee, J., G. Breton, T.Y. Oliveira, Y.J. Zhou, A. Aljoufi, S. Puhr, M.J. Cameron, R.P. Sekaly, M.C. Nussenzweig, and K. Liu, *Restricted dendritic cell and monocyte progenitors in human cord blood and bone marrow*. J Exp Med, 2015. **212**(3): p. 385-99.
457. Breton, G., J. Lee, Y.J. Zhou, J.J. Schreiber, T. Keler, S. Puhr, N. Anandasabapathy, S. Schlesinger, M. Caskey, K. Liu, and M.C. Nussenzweig, *Circulating precursors of human CD1c+ and CD141+ dendritic cells*. J Exp Med, 2015. **212**(3): p. 401-13.
458. Breton, G., J. Lee, K. Liu, and M.C. Nussenzweig, *Defining human dendritic cell progenitors by multiparametric flow cytometry*. Nat Protoc, 2015. **10**(9): p. 1407-22.
459. Hemont, C., A. Neel, M. Heslan, C. Braudeau, and R. Josien, *Human blood mDC subsets exhibit distinct TLR repertoire and responsiveness*. J Leukoc Biol, 2013. **93**(4): p. 599-609.
460. Jarrossay, D., G. Napolitani, M. Colonna, F. Sallusto, and A. Lanzavecchia, *Specialization and complementarity in microbial molecule recognition by human myeloid and plasmacytoid dendritic cells*. Eur J Immunol, 2001. **31**(11): p. 3388-93.
461. Jongbloed, S.L., A.J. Kassianos, K.J. McDonald, G.J. Clark, X. Ju, C.E. Angel, C.J. Chen, P.R. Dunbar, R.B. Wadley, V. Jeet, A.J. Vulink, D.N. Hart, and K.J. Radford,

- Human CD141+ (BDCA-3)+ dendritic cells (DCs) represent a unique myeloid DC subset that cross-presents necrotic cell antigens.* J Exp Med, 2010. **207**(6): p. 1247-60.
462. Flacher, V., M. Bouschbacher, E. Verronese, C. Massacrier, V. Sisirak, O. Berthier-Vergnes, B. de Saint-Vis, C. Caux, C. Dezutter-Dambuyant, S. Lebecque, and J. Valladeau, *Human Langerhans cells express a specific TLR profile and differentially respond to viruses and Gram-positive bacteria.* J Immunol, 2006. **177**(11): p. 7959-67.
 463. Ito, T., R. Amakawa, T. Kaisho, H. Hemmi, K. Tajima, K. Uehira, Y. Ozaki, H. Tomizawa, S. Akira, and S. Fukuhara, *Interferon-alpha and interleukin-12 are induced differentially by Toll-like receptor 7 ligands in human blood dendritic cell subsets.* J Exp Med, 2002. **195**(11): p. 1507-12.
 464. Gilliet, M., W. Cao, and Y.J. Liu, *Plasmacytoid dendritic cells: sensing nucleic acids in viral infection and autoimmune diseases.* Nat Rev Immunol, 2008. **8**(8): p. 594-606.
 465. Nizzoli, G., J. Krietsch, A. Weick, S. Steinfelder, F. Facciotti, P. Gruarin, A. Bianco, B. Steckel, M. Moro, M. Crosti, C. Romagnani, K. Stolzel, S. Torretta, L. Pignataro, C. Scheibenbogen, et al., *Human CD1c+ dendritic cells secrete high levels of IL-12 and potently prime cytotoxic T-cell responses.* Blood, 2013. **122**(6): p. 932-42.
 466. Meixlsperger, S., C.S. Leung, P.C. Ramer, M. Pack, L.D. Vanoaica, G. Breton, S. Pascolo, A.M. Salazar, A. Dzionek, J. Schmitz, R.M. Steinman, and C. Munz, *CD141+ dendritic cells produce prominent amounts of IFN-alpha after dsRNA recognition and can be targeted via DEC-205 in humanized mice.* Blood, 2013. **121**(25): p. 5034-44.
 467. Lauterbach, H., B. Bathke, S. Gilles, C. Traidl-Hoffmann, C.A. Lubet, G. Fejer, M.A. Freudenberg, G.M. Davey, D. Vremec, A. Kallies, L. Wu, K. Shortman, P. Chaplin, M. Suter, M. O'Keefe, et al., *Mouse CD8alpha+ DCs and human BDCA3+ DCs are major producers of IFN-lambda in response to poly IC.* J Exp Med, 2010. **207**(12): p. 2703-17.
 468. Zhang, S., K. Kodys, K. Li, and G. Szabo, *Human type 2 myeloid dendritic cells produce interferon-lambda and amplify interferon-alpha in response to hepatitis C virus infection.* Gastroenterology, 2013. **144**(2): p. 414-425 e7.
 469. Colonna, M., G. Trinchieri, and Y.J. Liu, *Plasmacytoid dendritic cells in immunity.* Nat Immunol, 2004. **5**(12): p. 1219-26.
 470. O'Brien, M., O. Manches, R.L. Sabado, S.J. Baranda, Y. Wang, I. Marie, L. Rolnitzky, M. Markowitz, D.M. Margolis, D. Levy, and N. Bhardwaj, *Spatiotemporal trafficking of HIV in human plasmacytoid dendritic cells defines a persistently IFN-alpha-producing and partially matured phenotype.* J Clin Invest, 2011. **121**(3): p. 1088-101.
 471. Jaehn, P.S., K.S. Zaenker, J. Schmitz, and A. Dzionek, *Functional dichotomy of plasmacytoid dendritic cells: antigen-specific activation of T cells versus production of type I interferon.* Eur J Immunol, 2008. **38**(7): p. 1822-32.
 472. Kerkmann, M., S. Rothenfusser, V. Hornung, A. Towarowski, M. Wagner, A. Sarris, T. Giese, S. Endres, and G. Hartmann, *Activation with CpG-A and CpG-B oligonucleotides reveals two distinct regulatory pathways of type I IFN synthesis in human plasmacytoid dendritic cells.* J Immunol, 2003. **170**(9): p. 4465-74.
 473. Segura, E. and S. Amigorena, *Cross-presentation by human dendritic cell subsets.* Immunol Lett, 2014. **158**(1-2): p. 73-8.
 474. Poulin, L.F., M. Salio, E. Griessinger, F. Anjos-Afonso, L. Craciun, J.L. Chen, A.M. Keller, O. Joffre, S. Zelenay, E. Nye, A. Le Moine, F. Faure, V. Donckier, D. Sancho, V. Cerundolo, et al., *Characterization of human DNGR-1+ BDCA3+ leukocytes as putative equivalents of mouse CD8alpha+ dendritic cells.* J Exp Med, 2010. **207**(6): p. 1261-71.

475. Crozat, K., R. Guiton, V. Contreras, V. Feuillet, C.A. Dutertre, E. Ventre, T.P. Vu Manh, T. Baranek, A.K. Storset, J. Marvel, P. Boudinot, A. Hosmalin, I. Schwartz-Cornil, and M. Dalod, *The XC chemokine receptor 1 is a conserved selective marker of mammalian cells homologous to mouse CD8alpha+ dendritic cells*. J Exp Med, 2010. **207**(6): p. 1283-92.
476. Segura, E., M. Durand, and S. Amigorena, *Similar antigen cross-presentation capacity and phagocytic functions in all freshly isolated human lymphoid organ-resident dendritic cells*. J Exp Med, 2013. **210**(5): p. 1035-47.
477. Cohn, L., B. Chatterjee, F. Esselborn, A. Smed-Sorensen, N. Nakamura, C. Chalouni, B.C. Lee, R. Vandlen, T. Keler, P. Lauer, D. Brockstedt, I. Mellman, and L. Delamarre, *Antigen delivery to early endosomes eliminates the superiority of human blood BDCA3+ dendritic cells at cross presentation*. J Exp Med, 2013. **210**(5): p. 1049-63.
478. Tel, J., G. Schreibelt, S.P. Sittig, T.S. Mathan, S.I. Buschow, L.J. Cruz, A.J. Lambeck, C.G. Figdor, and I.J. de Vries, *Human plasmacytoid dendritic cells efficiently cross-present exogenous Ags to CD8+ T cells despite lower Ag uptake than myeloid dendritic cell subsets*. Blood, 2013. **121**(3): p. 459-67.
479. Matzinger, P., *Tolerance, danger, and the extended family*. Annu Rev Immunol, 1994. **12**: p. 991-1045.
480. Pradeu, T. and E.L. Cooper, *The danger theory: 20 years later*. Front Immunol, 2012. **3**: p. 287.
481. Bergsbaken, T., S.L. Fink, and B.T. Cookson, *Pyroptosis: host cell death and inflammation*. Nat Rev Microbiol, 2009. **7**(2): p. 99-109.
482. Kaczmarek, A., P. Vandenabeele, and D.V. Krysko, *Necroptosis: the release of damage-associated molecular patterns and its physiological relevance*. Immunity, 2013. **38**(2): p. 209-23.
483. Udono, H., T. Ichihanagi, S. Mizukami, and T. Imai, *Heat shock proteins in antigen trafficking--implications on antigen presentation to T cells*. Int J Hyperthermia, 2009. **25**(8): p. 617-25.
484. Ahrens, S., S. Zelenay, D. Sancho, P. Hanc, S. Kjaer, C. Feest, G. Fletcher, C. Durkin, A. Postigo, M. Skehel, F. Batista, B. Thompson, M. Way, C. Reis e Sousa, and O. Schulz, *F-actin is an evolutionarily conserved damage-associated molecular pattern recognized by DNGR-1, a receptor for dead cells*. Immunity, 2012. **36**(4): p. 635-45.
485. Tesniere, A., L. Apetoh, F. Ghiringhelli, N. Joza, T. Panaretakis, O. Kepp, F. Schlemmer, L. Zitvogel, and G. Kroemer, *Immunogenic cancer cell death: a key-lock paradigm*. Curr Opin Immunol, 2008. **20**(5): p. 504-11.
486. Kroemer, G., L. Galluzzi, O. Kepp, and L. Zitvogel, *Immunogenic cell death in cancer therapy*. Annu Rev Immunol, 2013. **31**: p. 51-72.
487. Galluzzi, L., C. Brenner, E. Morselli, Z. Touat, and G. Kroemer, *Viral control of mitochondrial apoptosis*. PLoS Pathog, 2008. **4**(5): p. e1000018.
488. Krysko, D.V., A.D. Garg, A. Kaczmarek, O. Krysko, P. Agostinis, and P. Vandenabeele, *Immunogenic cell death and DAMPs in cancer therapy*. Nat Rev Cancer, 2012. **12**(12): p. 860-75.
489. Obeid, M., A. Tesniere, F. Ghiringhelli, G.M. Fimia, L. Apetoh, J.L. Perfettini, M. Castedo, G. Mignot, T. Panaretakis, N. Casares, D. Metivier, N. Larochette, P. van Endert, F. Ciccosanti, M. Piacentini, et al., *Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death*. Nat Med, 2007. **13**(1): p. 54-61.
490. Panaretakis, T., O. Kepp, U. Brockmeier, A. Tesniere, A.C. Bjorklund, D.C. Chapman, M. Durchschlag, N. Joza, G. Pierron, P. van Endert, J. Yuan, L. Zitvogel, F.

- Madeo, D.B. Williams, and G. Kroemer, *Mechanisms of pre-apoptotic calreticulin exposure in immunogenic cell death*. EMBO J, 2009. **28**(5): p. 578-90.
491. Gardai, S.J., K.A. McPhillips, S.C. Frasch, W.J. Janssen, A. Starefeldt, J.E. Murphy-Ullrich, D.L. Bratton, P.A. Oldenborg, M. Michalak, and P.M. Henson, *Cell-surface calreticulin initiates clearance of viable or apoptotic cells through trans-activation of LRP on the phagocyte*. Cell, 2005. **123**(2): p. 321-34.
492. Michaud, M., I. Martins, A.Q. Sukkurwala, S. Adjemian, Y. Ma, P. Pellegatti, S. Shen, O. Kepp, M. Scoazec, G. Mignot, S. Rello-Varona, M. Tailler, L. Menger, E. Vacchelli, L. Galluzzi, et al., *Autophagy-dependent anticancer immune responses induced by chemotherapeutic agents in mice*. Science, 2011. **334**(6062): p. 1573-7.
493. Elliott, M.R., F.B. Chekeni, P.C. Trampont, E.R. Lazarowski, A. Kadl, S.F. Walk, D. Park, R.I. Woodson, M. Ostankovich, P. Sharma, J.J. Lysiak, T.K. Harden, N. Leitinger, and K.S. Ravichandran, *Nucleotides released by apoptotic cells act as a find-me signal to promote phagocytic clearance*. Nature, 2009. **461**(7261): p. 282-6.
494. Martins, I., A. Tesniere, O. Kepp, M. Michaud, F. Schlemmer, L. Senovilla, C. Seror, D. Metivier, J.L. Perfettini, L. Zitvogel, and G. Kroemer, *Chemotherapy induces ATP release from tumor cells*. Cell Cycle, 2009. **8**(22): p. 3723-8.
495. Ghiringhelli, F., L. Apetoh, A. Tesniere, L. Aymeric, Y. Ma, C. Ortiz, K. Vermaelen, T. Panaretakis, G. Mignot, E. Ullrich, J.L. Perfettini, F. Schlemmer, E. Tasdemir, M. Uhl, P. Genin, et al., *Activation of the NLRP3 inflammasome in dendritic cells induces IL-1beta-dependent adaptive immunity against tumors*. Nat Med, 2009. **15**(10): p. 1170-8.
496. Ma, Y., L. Aymeric, C. Locher, S.R. Mattarollo, N.F. Delahaye, P. Pereira, L. Boucontet, L. Apetoh, F. Ghiringhelli, N. Casares, J.J. Lasarte, G. Matsuzaki, K. Ikuta, B. Ryffel, K. Benlagha, et al., *Contribution of IL-17-producing gamma delta T cells to the efficacy of anticancer chemotherapy*. J Exp Med, 2011. **208**(3): p. 491-503.
497. Bell, C.W., W. Jiang, C.F. Reich, 3rd, and D.S. Pisetsky, *The extracellular release of HMGB1 during apoptotic cell death*. Am J Physiol Cell Physiol, 2006. **291**(6): p. C1318-25.
498. Apetoh, L., F. Ghiringhelli, A. Tesniere, M. Obeid, C. Ortiz, A. Criollo, G. Mignot, M.C. Maiuri, E. Ullrich, P. Saulnier, H. Yang, S. Amigorena, B. Ryffel, F.J. Barrat, P. Saftig, et al., *Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy*. Nat Med, 2007. **13**(9): p. 1050-9.
499. Apetoh, L., F. Ghiringhelli, A. Tesniere, A. Criollo, C. Ortiz, R. Lidereau, C. Mariette, N. Chaput, J.P. Mira, S. Delaloge, F. Andre, T. Tursz, G. Kroemer, and L. Zitvogel, *The interaction between HMGB1 and TLR4 dictates the outcome of anticancer chemotherapy and radiotherapy*. Immunol Rev, 2007. **220**: p. 47-59.
500. Kepp, O., L. Senovilla, I. Vitale, E. Vacchelli, S. Adjemian, P. Agostinis, L. Apetoh, F. Aranda, V. Barnaba, N. Bloy, L. Bracci, K. Breckpot, D. Brough, A. Buque, M.G. Castro, et al., *Consensus guidelines for the detection of immunogenic cell death*. Oncoimmunology, 2014. **3**(9): p. e955691.
501. Achard, C., N. Boisgerault, T. Delaunay, F. Tangy, M. Gregoire, and J.F. Fonteneau, *Induction of immunogenic tumor cell death by attenuated oncolytic measles virus* J Clin Cell Immunol, 2015. **6**(1).
502. Trombetta, E.S. and I. Mellman, *Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo*. Annu Rev Immunol, 2005. **23**: p. 975-1028.
503. Vyas, J.M., A.G. Van der Veen, and H.L. Ploegh, *The known unknowns of antigen processing and presentation*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(8): p. 607-18.
504. Joffre, O.P., E. Segura, A. Savina, and S. Amigorena, *Cross-presentation by dendritic cells*. Nat Rev Immunol, 2012. **12**(8): p. 557-69.

505. Segura, E. and J.A. Villadangos, *A modular and combinatorial view of the antigen cross-presentation pathway in dendritic cells*. Traffic, 2011. **12**(12): p. 1677-85.
506. Delamarre, L., M. Pack, H. Chang, I. Mellman, and E.S. Trombetta, *Differential lysosomal proteolysis in antigen-presenting cells determines antigen fate*. Science, 2005. **307**(5715): p. 1630-4.
507. Fonteneau, J.F., D.G. Kavanagh, M. Lirvall, C. Sanders, T.L. Cover, N. Bhardwaj, and M. Larsson, *Characterization of the MHC class I cross-presentation pathway for cell-associated antigens by human dendritic cells*. Blood, 2003. **102**(13): p. 4448-55.
508. Huppa, J.B. and M.M. Davis, *T-cell-antigen recognition and the immunological synapse*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(12): p. 973-83.
509. Reis e Sousa, C., *Dendritic cells in a mature age*. Nat Rev Immunol, 2006. **6**(6): p. 476-83.
510. Kurts, C., B.W. Robinson, and P.A. Knolle, *Cross-priming in health and disease*. Nat Rev Immunol, 2010. **10**(6): p. 403-14.
511. Lanzavecchia, A., *Immunology. Licence to kill*. Nature, 1998. **393**(6684): p. 413-4.
512. Andersen, M.H., D. Schrama, P. Thor Straten, and J.C. Becker, *Cytotoxic T cells*. J Invest Dermatol, 2006. **126**(1): p. 32-41.
513. Le Bon, A. and D.F. Tough, *Links between innate and adaptive immunity via type I interferon*. Curr Opin Immunol, 2002. **14**(4): p. 432-6.
514. Biron, C.A., K.B. Nguyen, G.C. Pien, L.P. Cousens, and T.P. Salazar-Mather, *Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines*. Annu Rev Immunol, 1999. **17**: p. 189-220.
515. Nguyen, K.B., T.P. Salazar-Mather, M.Y. Dalod, J.B. Van Deusen, X.Q. Wei, F.Y. Liew, M.A. Caligiuri, J.E. Durbin, and C.A. Biron, *Coordinated and distinct roles for IFN-alpha beta, IL-12, and IL-15 regulation of NK cell responses to viral infection*. J Immunol, 2002. **169**(8): p. 4279-87.
516. Dalod, M., T. Hamilton, R. Salomon, T.P. Salazar-Mather, S.C. Henry, J.D. Hamilton, and C.A. Biron, *Dendritic cell responses to early murine cytomegalovirus infection: subset functional specialization and differential regulation by interferon alpha/beta*. J Exp Med, 2003. **197**(7): p. 885-98.
517. Swann, J.B., Y. Hayakawa, N. Zerafa, K.C. Sheehan, B. Scott, R.D. Schreiber, P. Hertzog, and M.J. Smyth, *Type I IFN contributes to NK cell homeostasis, activation, and antitumor function*. J Immunol, 2007. **178**(12): p. 7540-9.
518. Liu, C., Y. Lou, G. Lizée, H. Qin, S. Liu, B. Rabinovich, G.J. Kim, Y.H. Wang, Y. Ye, A.G. Sikora, W.W. Overwijk, Y.J. Liu, G. Wang, and P. Hwu, *Plasmacytoid dendritic cells induce NK cell-dependent, tumor antigen-specific T cell cross-priming and tumor regression in mice*. J Clin Invest, 2008. **118**(3): p. 1165-75.
519. Marrack, P., J. Kappler, and T. Mitchell, *Type I interferons keep activated T cells alive*. J Exp Med, 1999. **189**(3): p. 521-30.
520. Curtsinger, J.M., J.O. Valenzuela, P. Agarwal, D. Lins, and M.F. Mescher, *Type I IFNs provide a third signal to CD8 T cells to stimulate clonal expansion and differentiation*. J Immunol, 2005. **174**(8): p. 4465-9.
521. Havenar-Daughton, C., G.A. Kolumam, and K. Murali-Krishna, *Cutting Edge: The direct action of type I IFN on CD4 T cells is critical for sustaining clonal expansion in response to a viral but not a bacterial infection*. J Immunol, 2006. **176**(6): p. 3315-9.
522. Kolumam, G.A., S. Thomas, L.J. Thompson, J. Sprent, and K. Murali-Krishna, *Type I interferons act directly on CD8 T cells to allow clonal expansion and memory formation in response to viral infection*. J Exp Med, 2005. **202**(5): p. 637-50.

523. Le Bon, A., V. Durand, E. Kamphuis, C. Thompson, S. Bulfone-Paus, C. Rossmann, U. Kalinke, and D.F. Tough, *Direct stimulation of T cells by type I IFN enhances the CD8⁺ T cell response during cross-priming*. J Immunol, 2006. **176**(8): p. 4682-9.
524. Le Bon, A., N. Etchart, C. Rossmann, M. Ashton, S. Hou, D. Gewert, P. Borrow, and D.F. Tough, *Cross-priming of CD8⁺ T cells stimulated by virus-induced type I interferon*. Nat Immunol, 2003. **4**(10): p. 1009-15.
525. Spadaro, F., C. Lapenta, S. Donati, L. Abalsamo, V. Barnaba, F. Belardelli, S.M. Santini, and M. Ferrantini, *IFN-alpha enhances cross-presentation in human dendritic cells by modulating antigen survival, endocytic routing, and processing*. Blood, 2012. **119**(6): p. 1407-17.
526. Beignon, A.S., M. Skoberne, and N. Bhardwaj, *Type I interferons promote cross-priming: more functions for old cytokines*. Nat Immunol, 2003. **4**(10): p. 939-41.
527. Gajewski, T.F., M.B. Fuertes, and S.R. Woo, *Innate immune sensing of cancer: clues from an identified role for type I IFNs*. Cancer Immunol Immunother, 2012. **61**(8): p. 1343-7.
528. Harlin, H., Y. Meng, A.C. Peterson, Y. Zha, M. Tretiakova, C. Slingluff, M. McKee, and T.F. Gajewski, *Chemokine expression in melanoma metastases associated with CD8⁺ T-cell recruitment*. Cancer Res, 2009. **69**(7): p. 3077-85.
529. Fuertes, M.B., A.K. Kacha, J. Kline, S.R. Woo, D.M. Kranz, K.M. Murphy, and T.F. Gajewski, *Host type I IFN signals are required for antitumor CD8⁺ T cell responses through CD8{alpha}⁺ dendritic cells*. J Exp Med, 2011. **208**(10): p. 2005-16.
530. Diamond, M.S., M. Kinder, H. Matsushita, M. Mashayekhi, G.P. Dunn, J.M. Archambault, H. Lee, C.D. Arthur, J.M. White, U. Kalinke, K.M. Murphy, and R.D. Schreiber, *Type I interferon is selectively required by dendritic cells for immune rejection of tumors*. J Exp Med, 2011. **208**(10): p. 1989-2003.
531. Woo, S.R., M.B. Fuertes, L. Corrales, S. Spranger, M.J. Furdyna, M.Y. Leung, R. Duggan, Y. Wang, G.N. Barber, K.A. Fitzgerald, M.L. Alegre, and T.F. Gajewski, *STING-dependent cytosolic DNA sensing mediates innate immune recognition of immunogenic tumors*. Immunity, 2014. **41**(5): p. 830-42.
532. Corrales, L. and T.F. Gajewski, *Molecular Pathways: Targeting the Stimulator of Interferon Genes (STING) in the Immunotherapy of Cancer*. Clin Cancer Res, 2015. **21**(21): p. 4774-9.
533. Chan, C.W., E. Crafton, H.N. Fan, J. Flook, K. Yoshimura, M. Skarica, D. Brockstedt, T.W. Dubensky, M.F. Stins, L.L. Lanier, D.M. Pardoll, and F. Housseau, *Interferon-producing killer dendritic cells provide a link between innate and adaptive immunity*. Nat Med, 2006. **12**(2): p. 207-13.
534. Taieb, J., N. Chaput, C. Menard, L. Apetoh, E. Ullrich, M. Bonmort, M. Pequignot, N. Casares, M. Terme, C. Flament, P. Opolon, Y. Lecluse, D. Metivier, E. Tomasello, E. Vivier, et al., *A novel dendritic cell subset involved in tumor immunosurveillance*. Nat Med, 2006. **12**(2): p. 214-9.
535. Pillarisetty, V.G., S.C. Katz, J.I. Bleier, A.B. Shah, and R.P. Dematteo, *Natural killer dendritic cells have both antigen presenting and lytic function and in response to CpG produce IFN-gamma via autocrine IL-12*. J Immunol, 2005. **174**(5): p. 2612-8.
536. Blasius, A.L., W. Barchet, M. Cella, and M. Colonna, *Development and function of murine B220⁺CD11c⁺NK1.1⁺ cells identify them as a subset of NK cells*. J Exp Med, 2007. **204**(11): p. 2561-8.
537. Vosshenrich, C.A., S. Lesjean-Pottier, M. Hasan, O. Richard-Le Goff, E. Corcuff, O. Mandelboim, and J.P. Di Santo, *CD11c⁺B220⁺ interferon-producing killer dendritic cells are activated natural killer cells*. J Exp Med, 2007. **204**(11): p. 2569-78.

538. Caminschi, I., F. Ahmet, K. Heger, J. Brady, S.L. Nutt, D. Vremec, S. Pietersz, M.H. Lahoud, L. Schofield, D.S. Hansen, M. O'Keeffe, M.J. Smyth, S. Bedoui, G.M. Davey, J.A. Villadangos, et al., *Putative IKDCs are functionally and developmentally similar to natural killer cells, but not to dendritic cells*. J Exp Med, 2007. **204**(11): p. 2579-90.
539. Tel, J., S. Anguille, C.E. Waterborg, E.L. Smits, C.G. Figdor, and I.J. de Vries, *Tumoricidal activity of human dendritic cells*. Trends Immunol, 2014. **35**(1): p. 38-46.
540. Gonzalez, F. and A. Ashkenazi, *New insights into apoptosis signaling by Apo2L/TRAIL*. Oncogene, 2010. **29**(34): p. 4752-65.
541. Kemp, T.J., J.S. Kim, S.A. Crist, and T.S. Griffith, *Induction of necrotic tumor cell death by TRAIL/Apo-2L*. Apoptosis, 2003. **8**(6): p. 587-99.
542. Kalb, M.L., A. Glaser, G. Stary, F. Koszik, and G. Stingl, *TRAIL(+) human plasmacytoid dendritic cells kill tumor cells in vitro: mechanisms of imiquimod- and IFN-alpha-mediated antitumor reactivity*. J Immunol, 2012. **188**(4): p. 1583-91.
543. Johnstone, R.W., A.J. Frew, and M.J. Smyth, *The TRAIL apoptotic pathway in cancer onset, progression and therapy*. Nat Rev Cancer, 2008. **8**(10): p. 782-98.
544. Sedger, L.M., D.M. Shows, R.A. Blanton, J.J. Peschon, R.G. Goodwin, D. Cosman, and S.R. Wiley, *IFN-gamma mediates a novel antiviral activity through dynamic modulation of TRAIL and TRAIL receptor expression*. J Immunol, 1999. **163**(2): p. 920-6.
545. Fanger, N.A., C.R. Maliszewski, K. Schooley, and T.S. Griffith, *Human dendritic cells mediate cellular apoptosis via tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)*. J Exp Med, 1999. **190**(8): p. 1155-64.
546. Liu, S., Y. Yu, M. Zhang, W. Wang, and X. Cao, *The involvement of TNF-alpha-related apoptosis-inducing ligand in the enhanced cytotoxicity of IFN-beta-stimulated human dendritic cells to tumor cells*. J Immunol, 2001. **166**(9): p. 5407-15.
547. Servet-Delprat, C., P.O. Vidalain, O. Azocar, F. Le Deist, A. Fischer, and C. Rouboudin-Combe, *Consequences of Fas-mediated human dendritic cell apoptosis induced by measles virus*. J Virol, 2000. **74**(9): p. 4387-93.
548. Vidalain, P.O., O. Azocar, B. Lamouille, A. Astier, C. Rouboudin-Combe, and C. Servet-Delprat, *Measles virus induces functional TRAIL production by human dendritic cells*. J Virol, 2000. **74**(1): p. 556-9.
549. Vidalain, P.O., O. Azocar, C. Rouboudin-Combe, and C. Servet-Delprat, *Measle virus-infected dendritic cells develop immunosuppressive and cytotoxic activities*. Immunobiology, 2001. **204**(5): p. 629-38.
550. Chaperot, L., A. Blum, O. Manches, G. Lui, J. Angel, J.P. Molens, and J. Plumas, *Virus or TLR agonists induce TRAIL-mediated cytotoxic activity of plasmacytoid dendritic cells*. J Immunol, 2006. **176**(1): p. 248-55.
551. Tel, J., E.L. Smits, S. Anguille, R.N. Joshi, C.G. Figdor, and I.J. de Vries, *Human plasmacytoid dendritic cells are equipped with antigen-presenting and tumoricidal capacities*. Blood, 2012. **120**(19): p. 3936-44.
552. Hardy, A.W., D.R. Graham, G.M. Shearer, and J.P. Herbeuval, *HIV turns plasmacytoid dendritic cells (pDC) into TRAIL-expressing killer pDC and down-regulates HIV coreceptors by Toll-like receptor 7-induced IFN-alpha*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(44): p. 17453-8.
553. Stary, G., I. Klein, S. Kohlhofer, F. Koszik, T. Scherzer, L. Mullauer, H. Quendler, N. Kohrgruber, and G. Stingl, *Plasmacytoid dendritic cells express TRAIL and induce CD4+ T-cell apoptosis in HIV-1 viremic patients*. Blood, 2009. **114**(18): p. 3854-63.
554. Susanto, O., J.A. Trapani, and D. Brasacchio, *Controversies in granzyme biology*. Tissue Antigens, 2012. **80**(6): p. 477-87.

555. Amarante-Mendes, G.P. and T.S. Griffith, *Therapeutic applications of TRAIL receptor agonists in cancer and beyond*. Pharmacol Ther, 2015. **155**: p. 117-31.
556. Palamara, F., S. Meindl, M. Holcmann, P. Luhers, G. Stingl, and M. Sibilía, *Identification and characterization of pDC-like cells in normal mouse skin and melanomas treated with imiquimod*. J Immunol, 2004. **173**(5): p. 3051-61.
557. Drobits, B., M. Holcmann, N. Amberg, M. Swiecki, R. Grundtner, M. Hammer, M. Colonna, and M. Sibilía, *Imiquimod clears tumors in mice independent of adaptive immunity by converting pDCs into tumor-killing effector cells*. J Clin Invest, 2012. **122**(2): p. 575-85.
558. Jimenez-Baranda, S., I.P. Silva, and N. Bhardwaj, *Plasmacytoid dendritic cells lead the charge against tumors*. J Clin Invest, 2012. **122**(2): p. 481-4.
559. Stary, G., C. Bangert, M. Tauber, R. Strohal, T. Kopp, and G. Stingl, *Tumoricidal activity of TLR7/8-activated inflammatory dendritic cells*. J Exp Med, 2007. **204**(6): p. 1441-51.
560. Guillerme, J.B., M. Gregoire, F. Tangy, and J.F. Fonteneau, *Antitumor Virotherapy by Attenuated Measles Virus (MV)*. Biology (Basel), 2013. **2**(2): p. 587-602.
561. Schoggins, J.W., D.A. MacDuff, N. Imanaka, M.D. Gainey, B. Shrestha, J.L. Eitson, K.B. Mar, R.B. Richardson, A.V. Ratushny, V. Litvak, R. Dabelic, B. Manicassamy, J.D. Aitchison, A. Aderem, R.M. Elliott, et al., *Pan-viral specificity of IFN-induced genes reveals new roles for cGAS in innate immunity*. Nature, 2014. **505**(7485): p. 691-5.
562. Kulaeva, O.I., S. Draghici, L. Tang, J.M. Kraniak, S.J. Land, and M.A. Tainsky, *Epigenetic silencing of multiple interferon pathway genes after cellular immortalization*. Oncogene, 2003. **22**(26): p. 4118-27.
563. Yanai, H., H. Negishi, and T. Taniguchi, *The IRF family of transcription factors: Inception, impact and implications in oncogenesis*. Oncoimmunology, 2012. **1**(8): p. 1376-1386.
564. Li, Q. and M.A. Tainsky, *Epigenetic silencing of IRF7 and/or IRF5 in lung cancer cells leads to increased sensitivity to oncolytic viruses*. PLoS One, 2011. **6**(12): p. e28683.
565. Hare, D. and K.L. Mossman, *Novel paradigms of innate immune sensing of viral infections*. Cytokine, 2013. **63**(3): p. 219-24.
566. Noyce, R.S., K. Taylor, M. Ciechonska, S.E. Collins, R. Duncan, and K.L. Mossman, *Membrane perturbation elicits an IRF3-dependent, interferon-independent antiviral response*. J Virol, 2011. **85**(20): p. 10926-31.
567. Holm, C.K., S.B. Jensen, M.R. Jakobsen, N. Cheshenko, K.A. Horan, H.B. Moeller, R. Gonzalez-Dosal, S.B. Rasmussen, M.H. Christensen, T.O. Yarovsky, F.J. Rixon, B.C. Herold, K.A. Fitzgerald, and S.R. Paludan, *Virus-cell fusion as a trigger of innate immunity dependent on the adaptor STING*. Nat Immunol, 2012. **13**(8): p. 737-43.
568. Olagnier, D. and J. Hiscott, *Breaking the barrier: membrane fusion triggers innate antiviral immunity*. Nat Immunol, 2012. **13**(8): p. 713-5.
569. Barber, G.N., *STING-dependent cytosolic DNA sensing pathways*. Trends Immunol, 2014. **35**(2): p. 88-93.
570. Ahn, J. and G.N. Barber, *Self-DNA, STING-dependent signaling and the origins of autoinflammatory disease*. Curr Opin Immunol, 2014. **31**: p. 121-6.
571. Xia, T., H. Konno, J. Ahn, and G.N. Barber, *Deregulation of STING Signaling in Colorectal Carcinoma Constrains DNA Damage Responses and Correlates With Tumorigenesis*. Cell Rep, 2016. **14**(2): p. 282-297.

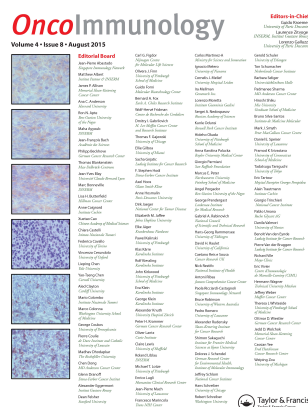
572. Chang, H.M., M. Paulson, M. Holko, C.M. Rice, B.R. Williams, I. Marie, and D.E. Levy, *Induction of interferon-stimulated gene expression and antiviral responses require protein deacetylase activity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(26): p. 9578-83.
573. Arulanandam, R., C. Batenchuk, O. Varette, C. Zakaria, V. Garcia, N.E. Forbes, C. Davis, R. Krishnan, R. Karmacharya, J. Cox, A. Sinha, A. Babawy, K. Waite, E. Weinstein, T. Falls, et al., *Microtubule disruption synergizes with oncolytic virotherapy by inhibiting interferon translation and potentiating bystander killing*. Nat Commun, 2015. **6**: p. 6410.
574. Escobar-Zarate, D., Y.P. Liu, L. Suksanpaisan, S.J. Russell, and K.W. Peng, *Overcoming cancer cell resistance to VSV oncolysis with JAK1/2 inhibitors*. Cancer Gene Ther, 2013. **20**(10): p. 582-9.
575. Mann, B.S., J.R. Johnson, M.H. Cohen, R. Justice, and R. Pazdur, *FDA approval summary: vorinostat for treatment of advanced primary cutaneous T-cell lymphoma*. Oncologist, 2007. **12**(10): p. 1247-52.
576. Hess-Stumpp, H., T.U. Bracker, D. Henderson, and O. Politz, *MS-275, a potent orally available inhibitor of histone deacetylases--the development of an anticancer agent*. Int J Biochem Cell Biol, 2007. **39**(7-8): p. 1388-405.
577. Terkeltaub, R.A., *Colchicine update: 2008*. Semin Arthritis Rheum, 2009. **38**(6): p. 411-9.
578. Jordan, M.A. and L. Wilson, *Microtubules as a target for anticancer drugs*. Nat Rev Cancer, 2004. **4**(4): p. 253-65.
579. Mascarenhas, J. and R. Hoffman, *Ruxolitinib: the first FDA approved therapy for the treatment of myelofibrosis*. Clin Cancer Res, 2012. **18**(11): p. 3008-14.
580. Stewart, C.E., R.E. Randall, and C.S. Adamson, *Inhibitors of the interferon response enhance virus replication in vitro*. PLoS One, 2014. **9**(11): p. e112014.
581. Haralambieva, I., I. Iankov, K. Hasegawa, M. Harvey, S.J. Russell, and K.W. Peng, *Engineering oncolytic measles virus to circumvent the intracellular innate immune response*. Mol Ther, 2007. **15**(3): p. 588-97.
582. Coffin, R.S., *From virotherapy to oncolytic immunotherapy: where are we now?* Curr Opin Virol, 2015. **13**: p. 93-100.
583. Boisgerault, N., F. Tangy, and M. Gregoire, *New perspectives in cancer virotherapy: bringing the immune system into play*. Immunotherapy, 2010. **2**(2): p. 185-99.
584. Di Domizio, J., A. Blum, M. Gallagher-Gambarelli, J.P. Molens, L. Chaperot, and J. Plumas, *TLR7 stimulation in human plasmacytoid dendritic cells leads to the induction of early IFN-inducible genes in the absence of type I IFN*. Blood, 2009. **114**(9): p. 1794-802.
585. Kato, H., S. Sato, M. Yoneyama, M. Yamamoto, S. Uematsu, K. Matsui, T. Tsujimura, K. Takeda, T. Fujita, O. Takeuchi, and S. Akira, *Cell type-specific involvement of RIG-I in antiviral response*. Immunity, 2005. **23**(1): p. 19-28.
586. Matsui, K., Y. Kumagai, H. Kato, S. Sato, T. Kawagoe, S. Uematsu, O. Takeuchi, and S. Akira, *Cutting edge: Role of TANK-binding kinase 1 and inducible IkappaB kinase in IFN responses against viruses in innate immune cells*. J Immunol, 2006. **177**(9): p. 5785-9.
587. Hornung, V., J. Schlender, M. Guenther-Biller, S. Rothenfusser, S. Endres, K.K. Conzelmann, and G. Hartmann, *Replication-dependent potent IFN-alpha induction in human plasmacytoid dendritic cells by a single-stranded RNA virus*. J Immunol, 2004. **173**(10): p. 5935-43.

588. Bruni, D., M. Chazal, L. Sinigaglia, L. Chauveau, O. Schwartz, P. Despres, and N. Jouvenet, *Viral entry route determines how human plasmacytoid dendritic cells produce type I interferons*. *Sci Signal*, 2015. **8**(366): p. ra25.
589. Clark, K., M. Peggie, L. Plater, R.J. Sorcek, E.R. Young, J.B. Madwed, J. Hough, E.G. McIver, and P. Cohen, *Novel cross-talk within the IKK family controls innate immunity*. *Biochem J*, 2011. **434**(1): p. 93-104.
590. Oganessian, G., S.K. Saha, B. Guo, J.Q. He, A. Shahangian, B. Zarnegar, A. Perry, and G. Cheng, *Critical role of TRAF3 in the Toll-like receptor-dependent and -independent antiviral response*. *Nature*, 2006. **439**(7073): p. 208-11.
591. Hacker, H., V. Redecke, B. Blagojev, I. Kratchmarova, L.C. Hsu, G.G. Wang, M.P. Kamps, E. Raz, H. Wagner, G. Hacker, M. Mann, and M. Karin, *Specificity in Toll-like receptor signalling through distinct effector functions of TRAF3 and TRAF6*. *Nature*, 2006. **439**(7073): p. 204-7.
592. Kadowaki, N., S. Ho, S. Antonenko, R.W. Malefyt, R.A. Kastelein, F. Bazan, and Y.J. Liu, *Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens*. *J Exp Med*, 2001. **194**(6): p. 863-9.
593. Izaguirre, A., B.J. Barnes, S. Amrute, W.S. Yeow, N. Megjugorac, J. Dai, D. Feng, E. Chung, P.M. Pitha, and P. Fitzgerald-Bocarsly, *Comparative analysis of IRF and IFN-alpha expression in human plasmacytoid and monocyte-derived dendritic cells*. *J Leukoc Biol*, 2003. **74**(6): p. 1125-38.
594. Dai, J., N.J. Megjugorac, S.B. Amrute, and P. Fitzgerald-Bocarsly, *Regulation of IFN regulatory factor-7 and IFN-alpha production by enveloped virus and lipopolysaccharide in human plasmacytoid dendritic cells*. *J Immunol*, 2004. **173**(3): p. 1535-48.
595. Perrot, I., F. Deauvieu, C. Massacrier, N. Hughes, P. Garrone, I. Durand, O. Demaria, N. Viaud, L. Gauthier, M. Blery, N. Bonnefoy-Berard, Y. Morel, J. Tschopp, L. Alexopoulou, G. Trinchieri, et al., *TLR3 and Rig-like receptor on myeloid dendritic cells and Rig-like receptor on human NK cells are both mandatory for production of IFN-gamma in response to double-stranded RNA*. *J Immunol*, 2010. **185**(4): p. 2080-8.
596. Duhen, T., F. Herschke, O. Azocar, J. Druelle, S. Plumet, C. Delprat, S. Schicklin, T.F. Wild, C. Rabourdin-Combe, D. Gerlier, and H. Valentin, *Cellular receptors, differentiation and endocytosis requirements are key factors for type I IFN response by human epithelial, conventional and plasmacytoid dendritic infected cells by measles virus*. *Virus Res*, 2010. **152**(1-2): p. 115-25.
597. Fugier-Vivier, I., C. Servet-Delprat, P. Rivailler, M.C. Rissoan, Y.J. Liu, and C. Rabourdin-Combe, *Measles virus suppresses cell-mediated immunity by interfering with the survival and functions of dendritic and T cells*. *J Exp Med*, 1997. **186**(6): p. 813-23.
598. Druelle, J., C.I. Sellin, D. Waku-Kouomou, B. Horvat, and F.T. Wild, *Wild type measles virus attenuation independent of type I IFN*. *Virol J*, 2008. **5**: p. 22.
599. Schlender, J., V. Hornung, S. Finke, M. Gunthner-Biller, S. Marozin, K. Brzozka, S. Moghim, S. Endres, G. Hartmann, and K.K. Conzelmann, *Inhibition of toll-like receptor 7- and 9-mediated alpha/beta interferon production in human plasmacytoid dendritic cells by respiratory syncytial virus and measles virus*. *J Virol*, 2005. **79**(9): p. 5507-15.
600. Lee, H.K., J.M. Lund, B. Ramanathan, N. Mizushima, and A. Iwasaki, *Autophagy-dependent viral recognition by plasmacytoid dendritic cells*. *Science*, 2007. **315**(5817): p. 1398-401.
601. Joubert, P.E., G. Meiffren, I.P. Gregoire, G. Pontini, C. Richetta, M. Flacher, O. Azocar, P.O. Vidalain, M. Vidal, V. Lotteau, P. Codogno, C. Rabourdin-Combe, and

- M. Faure, *Autophagy induction by the pathogen receptor CD46*. Cell Host Microbe, 2009. **6**(4): p. 354-66.
602. Prakash, M.D., M.A. Munoz, R. Jain, P.L. Tong, A. Koskinen, M. Regner, O. Kleinfeld, B. Ho, M. Olson, S.J. Turner, P. Mrass, W. Weninger, and P.I. Bird, *Granzyme B promotes cytotoxic lymphocyte transmigration via basement membrane remodeling*. Immunity, 2014. **41**(6): p. 960-72.
 603. Deauvieu, F., V. Ollion, A.C. Doffin, C. Achard, J.F. Fonteneau, E. Verronese, I. Durand, R. Ghittoni, J. Marvel, C. Dezutter-Dambuyant, T. Walzer, H. Vie, I. Perrot, N. Goutagny, C. Caux, et al., *Human natural killer cells promote cross-presentation of tumor cell-derived antigens by dendritic cells*. Int J Cancer, 2015. **136**(5): p. 1085-94.
 604. Munn, D.H., M.D. Sharma, J.R. Lee, K.G. Jhaver, T.S. Johnson, D.B. Keskin, B. Marshall, P. Chandler, S.J. Antonia, R. Burgess, C.L. Slingluff, Jr., and A.L. Mellor, *Potential regulatory function of human dendritic cells expressing indoleamine 2,3-dioxygenase*. Science, 2002. **297**(5588): p. 1867-70.
 605. Demoulin, S., M. Herfs, P. Delvenne, and P. Hubert, *Tumor microenvironment converts plasmacytoid dendritic cells into immunosuppressive/tolerogenic cells: insight into the molecular mechanisms*. J Leukoc Biol, 2013. **93**(3): p. 343-52.
 606. Gerlini, G., P. Di Gennaro, G. Mariotti, C. Urso, A. Chiarugi, N. Pimpinelli, and L. Borgognoni, *Indoleamine 2,3-dioxygenase+ cells correspond to the BDCA2+ plasmacytoid dendritic cells in human melanoma sentinel nodes*. J Invest Dermatol, 2010. **130**(3): p. 898-901.
 607. Ito, T., M. Yang, Y.H. Wang, R. Lande, J. Gregorio, O.A. Perng, X.F. Qin, Y.J. Liu, and M. Gilliet, *Plasmacytoid dendritic cells prime IL-10-producing T regulatory cells by inducible costimulator ligand*. J Exp Med, 2007. **204**(1): p. 105-15.
 608. Conrad, C., J. Gregorio, Y.H. Wang, T. Ito, S. Meller, S. Hanabuchi, S. Anderson, N. Atkinson, P.T. Ramirez, Y.J. Liu, R. Freedman, and M. Gilliet, *Plasmacytoid dendritic cells promote immunosuppression in ovarian cancer via ICOS costimulation of Foxp3(+) T-regulatory cells*. Cancer Res, 2012. **72**(20): p. 5240-9.
 609. Faget, J., N. Bendriss-Vermare, M. Gobert, I. Durand, D. Olive, C. Biota, T. Bachelot, I. Treilleux, S. Goddard-Leon, E. Lavergne, S. Chabaud, J.Y. Blay, C. Caux, and C. Menetrier-Caux, *ICOS-ligand expression on plasmacytoid dendritic cells supports breast cancer progression by promoting the accumulation of immunosuppressive CD4+ T cells*. Cancer Res, 2012. **72**(23): p. 6130-41.
 610. Bekeradjian-Ding, I., M. Schafer, E. Hartmann, R. Pries, M. Parcina, P. Schneider, T. Giese, S. Endres, B. Wollenberg, and G. Hartmann, *Tumour-derived prostaglandin E and transforming growth factor-beta synergize to inhibit plasmacytoid dendritic cell-derived interferon-alpha*. Immunology, 2009. **128**(3): p. 439-50.
 611. Lesterhuis, W.J., I.J. de Vries, G. Schreibelt, A.J. Lambeck, E.H. Aarntzen, J.F. Jacobs, N.M. Scharenborg, M.W. van de Rakt, A.J. de Boer, S. Croockewit, M.M. van Rossum, R. Mus, W.J. Oyen, O.C. Boerman, S. Lucas, et al., *Route of administration modulates the induction of dendritic cell vaccine-induced antigen-specific T cells in advanced melanoma patients*. Clin Cancer Res, 2011. **17**(17): p. 5725-35.
 612. Le Mercier, I., D. Poujol, A. Sanlaville, V. Sisirak, M. Gobert, I. Durand, B. Dubois, I. Treilleux, J. Marvel, J. Vlach, J.Y. Blay, N. Bendriss-Vermare, C. Caux, I. Puisieux, and N. Goutagny, *Tumor promotion by intratumoral plasmacytoid dendritic cells is reversed by TLR7 ligand treatment*. Cancer Res, 2013. **73**(15): p. 4629-40.
 613. Pardoll, D.M., *The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy*. Nat Rev Cancer, 2012. **12**(4): p. 252-64.
 614. Leach, D.R., M.F. Krummel, and J.P. Allison, *Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade*. Science, 1996. **271**(5256): p. 1734-6.

615. Hodi, F.S., S.J. O'Day, D.F. McDermott, R.W. Weber, J.A. Sosman, J.B. Haanen, R. Gonzalez, C. Robert, D. Schadendorf, J.C. Hassel, W. Akerley, A.J. van den Eertwegh, J. Lutzky, P. Lorigan, J.M. Vaubel, et al., *Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma*. N Engl J Med, 2010. **363**(8): p. 711-23.
616. Freeman, G.J., A.J. Long, Y. Iwai, K. Bourque, T. Chernova, H. Nishimura, L.J. Fitz, N. Malenkovich, T. Okazaki, M.C. Byrne, H.F. Horton, L. Fouser, L. Carter, V. Ling, M.R. Bowman, et al., *Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation*. J Exp Med, 2000. **192**(7): p. 1027-34.
617. Ahmadzadeh, M., L.A. Johnson, B. Heemskerk, J.R. Wunderlich, M.E. Dudley, D.E. White, and S.A. Rosenberg, *Tumor antigen-specific CD8 T cells infiltrating the tumor express high levels of PD-1 and are functionally impaired*. Blood, 2009. **114**(8): p. 1537-44.
618. Topalian, S.L., C.G. Drake, and D.M. Pardoll, *Targeting the PD-1/B7-H1(PD-L1) pathway to activate anti-tumor immunity*. Curr Opin Immunol, 2012. **24**(2): p. 207-12.
619. Philips, G.K. and M. Atkins, *Therapeutic uses of anti-PD-1 and anti-PD-L1 antibodies*. Int Immunol, 2015. **27**(1): p. 39-46.
620. Brahmer, J., K.L. Reckamp, P. Baas, L. Crino, W.E. Eberhardt, E. Poddubskaya, S. Antonia, A. Pluzanski, E.E. Vokes, E. Holgado, D. Waterhouse, N. Ready, J. Gainor, O. Aren Frontera, L. Havel, et al., *Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Squamous-Cell Non-Small-Cell Lung Cancer*. N Engl J Med, 2015. **373**(2): p. 123-35.
621. Weber, J.S., S.P. D'Angelo, D. Minor, F.S. Hodi, R. Gutzmer, B. Neyns, C. Hoeller, N.I. Khushalani, W.H. Miller, Jr., C.D. Lao, G.P. Linette, L. Thomas, P. Lorigan, K.F. Grossmann, J.C. Hassel, et al., *Nivolumab versus chemotherapy in patients with advanced melanoma who progressed after anti-CTLA-4 treatment (CheckMate 037): a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial*. Lancet Oncol, 2015. **16**(4): p. 375-84.
622. Engeland, C.E., C. Grossardt, R. Veinalde, S. Bossow, D. Lutz, J.K. Kaufmann, I. Shevchenko, V. Umansky, D.M. Nettelbeck, W. Weichert, D. Jager, C. von Kalle, and G. Ungerechts, *CTLA-4 and PD-L1 checkpoint blockade enhances oncolytic measles virus therapy*. Mol Ther, 2014. **22**(11): p. 1949-59.
623. Sistigu, A., T. Yamazaki, E. Vacchelli, K. Chaba, D.P. Enot, J. Adam, I. Vitale, A. Goubar, E.E. Baracco, C. Remedios, L. Fend, D. Hannani, L. Aymeric, Y. Ma, M. Niso-Santano, et al., *Cancer cell-autonomous contribution of type I interferon signaling to the efficacy of chemotherapy*. Nat Med, 2014. **20**(11): p. 1301-9.
624. Roulois, D., H. Loo Yau, R. Singhanian, Y. Wang, A. Danesh, S.Y. Shen, H. Han, G. Liang, P.A. Jones, T.J. Pugh, C. O'Brien, and D.D. De Carvalho, *DNA-Demethylating Agents Target Colorectal Cancer Cells by Inducing Viral Mimicry by Endogenous Transcripts*. Cell, 2015. **162**(5): p. 961-73.
625. Chiappinelli, K.B., P.L. Strissel, A. Desrichard, H. Li, C. Henke, B. Akman, A. Hein, N.S. Rote, L.M. Cope, A. Snyder, V. Makarov, S. Buhu, D.J. Slamon, J.D. Wolchok, D.M. Pardoll, et al., *Inhibiting DNA Methylation Causes an Interferon Response in Cancer via dsRNA Including Endogenous Retroviruses*. Cell, 2015. **162**(5): p. 974-86.
626. Licht, J.D., *DNA Methylation Inhibitors in Cancer Therapy: The Immunity Dimension*. Cell, 2015. **162**(5): p. 938-9.
627. Poeck, H., R. Besch, C. Maihoefer, M. Renn, D. Tormo, S.S. Morskaya, S. Kirschnek, E. Gaffal, J. Landsberg, J. Hellmuth, A. Schmidt, D. Anz, M. Bscheider, T. Schwerdt, C. Berking, et al., *5'-Triphosphate-siRNA: turning gene silencing and Rig-I activation against melanoma*. Nat Med, 2008. **14**(11): p. 1256-63.

ANNEXES



OncoImmunology

Publication details, including instructions for authors and subscription information:
<http://www.tandfonline.com/loi/koni20>

Oncolytic immunotherapy: the new clinical outbreak

Jean-François Fonteneau^a, Carole Achard^a, Cécile Zaupa^b, Johann Follope^b & Philippe Erbs^b

^a INSERM UMR892, CNRS UMR6299, Université de Nantes, 44007 Nantes.

^b TRANSGENE SA, 67400 Illkirch-Graffenstaden.

Accepted author version posted online: 12 Aug 2015.



[Click for updates](#)

To cite this article: Jean-François Fonteneau, Carole Achard, Cécile Zaupa, Johann Follope & Philippe Erbs (2015): Oncolytic immunotherapy: the new clinical outbreak, OncoImmunology, DOI: [10.1080/2162402X.2015.1066961](https://doi.org/10.1080/2162402X.2015.1066961)

To link to this article: <http://dx.doi.org/10.1080/2162402X.2015.1066961>

Disclaimer: This is a version of an unedited manuscript that has been accepted for publication. As a service to authors and researchers we are providing this version of the accepted manuscript (AM). Copyediting, typesetting, and review of the resulting proof will be undertaken on this manuscript before final publication of the Version of Record (VoR). During production and pre-press, errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal relate to this version also.

PLEASE SCROLL DOWN FOR ARTICLE

Taylor & Francis makes every effort to ensure the accuracy of all the information (the "Content") contained in the publications on our platform. However, Taylor & Francis, our agents, and our licensors make no representations or warranties whatsoever as to the accuracy, completeness, or suitability for any purpose of the Content. Any opinions and views expressed in this publication are the opinions and views of the authors, and are not the views of or endorsed by Taylor & Francis. The accuracy of the Content should not be relied upon and should be independently verified with primary sources of information. Taylor and Francis shall not be liable for any losses, actions, claims, proceedings, demands, costs, expenses, damages, and other liabilities whatsoever or howsoever caused arising directly or indirectly in connection with, in relation to or arising out of the use of the Content.

This article may be used for research, teaching, and private study purposes. Any substantial or systematic reproduction, redistribution, reselling, loan, sub-licensing, systematic supply, or distribution in any form to anyone is expressly forbidden. Terms & Conditions of access and use can be found at <http://www.tandfonline.com/page/terms-and-conditions>

Oncolytic immunotherapy: the new clinical outbreak

Jean-François Fonteneau¹, Carole Achard¹, Cécile Zaupa², Johann Foloppe², and Philippe Erbs².

1. INSERM UMR892, CNRS UMR6299, Université de Nantes, 44007 Nantes.
2. TRANSGENE SA, 67400 Illkirch-Graffenstaden.

Corresponding author: JF Fonteneau, INSERM UMR892, CNRS UMR6299, Institut de Recherche Thérapeutique de l'Université de Nantes, 8 quai Moncousu, BP70721, 44007 Nantes Cedex1, France.
E-mail: jean-francois.fonteneau@inserm.fr

This last year was productive for the oncolytic viruses (OV) field with numerous advancements. The 9th international conference on oncolytic virus therapeutics, that has been held in Boston, USA, from the 13th to the 16th of June 2015, was the opportunity to discuss these progresses (OVC Boston 2015: the conference program with abstracts and the list of participants is available at this address: <http://ovcboston.com/final-program/>). It was locally organized by Nino Chiocca from Brigham and Women's Hospital and Samuel Rabkin from Massachusetts General Hospital. OV are viruses that infect preferentially or exclusively cancer cells and cause immunogenic cell death which induces or stimulates an anti-tumor immune response in patients ^{1, 2}. During this congress, many encouraging clinical results were presented.

T-vec from Amgen Inc. is a strain of Herpes simplex type I virus that was selected to infect tumor cells. It is modified to encode the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) to stimulate immunity and is deleted for two virulence factors, ICP47 and ICP34.5. Results of a phase III clinical trial where T-vec was used to treat metastatic melanoma patients were recently published in the *Journal of Clinical Oncology* ³. At the end of May 2015, the positive clinical benefits observed in this study led a panel of experts of the food and drugs administration (FDA) to vote for the use of T-vec in the treatment of metastatic melanoma with a large majority (22 against 1). T-vec may be soon the first FDA approved oncolytic virus.

These last years, immunotherapy of cancer has been improved by the use of checkpoint inhibitors (CPI) that are targeted therapies directed against molecules such as CTLA-4 or PD1 that inhibit the tumor cell recognition and lysis by cytotoxic T cells ⁴. At the conference, Robert Andtbacka presented preliminary results of a phase I clinical trial where T-vec is associated with ipilimumab, a CPI targeting CTLA-4, in the treatment of metastatic melanoma. Clinical responses are better than that would be expected from the individual treatments. A Phase II comparing ipilimumab plus T-vec with ipilimumab alone is started.

Attenuated strain of measles viruses (MV) are also promising OV ⁵. MV infects and kills tumor cells that express the entry receptor CD46 and that are deficient in the antiviral type I IFN response. The use of Edmonston strain of MV is evaluated for the treatment of several malignancies at the Mayo Clinic in Rochester, USA, by the teams of Eva Galanis and Stephen Russell. Eva Galanis presented results of phase I clinical trials for the treatment of ovarian cancer using either MV encoding the sodium/iodide symporter (MV-NIS) or the carcinoembryonic antigen (MV-CEA) ⁶. MV-NIS or MV-CEA were injected repeatedly in the peritoneal cavity of MV-seropositive patients. Replication of MV-NIS is followed by ¹²³I SPECT/CT imaging after ¹²³I injection. Replication of MV-CEA is monitored by RT-PCR against CEA on peritoneal fluid samples. Replication of both viruses was observed after injections. Median overall survival of patients receiving low doses of MV-CEA was 10.6 months compared to 29.3 months for those receiving high doses of MV-CEA or MV-NIS. Furthermore, in this study, an induction of a T cell response against tumor antigens was observed after treatment. A phase II is now started comparing MV-NIS to chemotherapy.

Stephen Russell presented an update of the phase I clinical trial for the treatment of MV-seronegative patients with metastatic multiple myeloma. The patient he described in its paper of May 2014 ⁷, who was alive 6 months after the treatment, is still alive today, 24 months after treatment. Stephen Russell also discussed the use of a vesicular stomatitis virus (VSV) encoding IFN- β .

Hardev Pandha provided an update on the clinical phase I/II of CAVATAK CVA21, an oncolytic coxsackievirus, positive-sense single-stranded RNA picornavirus that binds to the N-terminal domain of ICAM-1, which is highly expressed on many solid tumors ⁸. This phase I/II study is investigating the tolerance of multiple escalating intravenous doses of CVA21 in advanced cancer patients. To date, multiple CVA21 infusions have been generally well tolerated, and preliminary data indicate possible viral replication within tumor. Gough Au presented significant anti-tumor activity mediated by the combination of CVA21 and CPI (anti-PD1 and anti-CTLA4) in the murine B16 melanoma model and clinical evaluation of CVA21 in combination with anti-CTLA4 in advanced melanoma patients is currently underway.

Preclinical results suggest that combination of PD-1 inhibition therapy with Reolysin, that is an oncolytic reovirus evaluated in ongoing Phase III clinical trial ⁹, confers significant survival benefit in a subcutaneous B16 melanoma model, by augmenting tumor-specific NK responses and specifically attenuating tumor-specific immunosuppression.

JX594 is a strain of vaccinia poxvirus modified by addition of the GM-CSF gene and deletion of the thymidine kinase gene. The replication of this virus requires a thymidine kinase activity that can be found in tumor cells. A phase III clinical trial for the treatment of hepatocellular carcinoma with JX594 is planned by SillaJen Biotherapeutics and Transgene SA after the encouraging clinical results of the phase II ¹⁰.

Other encouraging clinical results, notably for the treatment of glioblastoma with different OV, were presented at the conference during two sessions dedicated to clinical trials. OV Basic research was also addressed such as the role of the tumor microenvironment on OV efficiency presented by John Bell ¹¹, and the role of the STING pathway in tumor development and the sensitivity of tumor cells to DNA OV presented by Glen Barber ¹². It is not our goal to list all advancements in the OV field that were presented at this conference. We therefore apologize to the authors of all the other studies presented at the conference that are not reviewed here.

To conclude, it is worth noting that all preclinical and clinical studies of combination of OV with CPI (anti-CTLA4, anti-PDL1 and anti-PD1) show a synergy of these two types of treatment. Thus a consensus emerges to claim that OV are good CPI allies. Indeed, OV induce or increase the lymphocytic infiltrates in tumors and CPI treatment improves their cytotoxic activity. It was therefore proposed that, whenever possible, OV would be associated with CPI in clinical trials. Finally, it was also suggested that "oncolytic virotherapy" is renamed "oncolytic immunotherapy", given the importance of the induction/stimulation of an anti-tumor immune response in the OV efficacy.

A new outbreak of good news for the OV field is now expected in Vancouver, Canada, in 2016 for the 10th international conference on oncolytic virus therapeutics.

Acknowledgments:

We thank for their financial support: "la Ligue Régionale Grand Ouest contre le Cancer (CSIRGO : CD16, CD22, CD44, CD49, CD72, CD79 and CD85)", "La Ligue Nationale contre le Cancer", "ARSMESO44 association", "la Fondation du Souffle et le Fonds de Dotation Recherche en Santé Respiratoire", "la Fondation pour la Recherche Médicale (FRM)", and "la Fondation ARC pour la recherche sur le cancer".

References:

1. Pol J, Bloy N, Obrist F, Eggermont A, Galon J, Cremer I, et al. Trial Watch:: Oncolytic viruses for cancer therapy. *Oncoimmunology* 2014; 3:e28694.
2. Russell SJ, Peng KW, Bell JC. Oncolytic virotherapy. *Nat Biotechnol* 2012; 30:658-70.
3. Andtbacka RH, Kaufman HL, Collichio F, Amatruda T, Senzer N, Chesney J, et al. Talimogene Laherparepvec Improves Durable Response Rate in Patients With Advanced Melanoma. *J Clin Oncol* 2015.
4. Sharma P, Allison JP. The future of immune checkpoint therapy. *Science* 2015; 348:56-61.
5. Guillerme JB, Gregoire M, Tangy F, J.F. F. Antitumor virotherapy by attenuated measles virus (MV). *Biology (Basel)* 2013; 2:587-602.
6. Galanis E, Atherton PJ, Maurer MJ, Knutson KL, Dowdy SC, Cliby WA, et al. Oncolytic measles virus expressing the sodium iodide symporter to treat drug-resistant ovarian cancer. *Cancer Res* 2015; 75:22-30.
7. Russell SJ, Federspiel MJ, Peng KW, Tong C, Dingli D, Morice WG, et al. Remission of Disseminated Cancer After Systemic Oncolytic Virotherapy. *Mayo Clin Proc* 2014; 89:926-33.
8. Au GG, Lindberg AM, Barry RD, Shafren DR. Oncolysis of vascular malignant human melanoma tumors by Coxsackievirus A21. *Int J Oncol* 2005; 26:1471-6.
9. Carew JS, Espitia CM, Zhao W, Kelly KR, Coffey M, Freeman JW, et al. Reolysin is a novel reovirus-based agent that induces endoplasmic reticular stress-mediated apoptosis in pancreatic cancer. *Cell Death Dis* 2013; 4:e728.
10. Heo J, Reid T, Ruo L, Breitbach CJ, Rose S, Bloomston M, et al. Randomized dose-finding clinical trial of oncolytic immunotherapeutic vaccinia JX-594 in liver cancer. *Nat Med* 2013; 19:329-36.
11. Ilkow CS, Marguerie M, Batenchuk C, Mayer J, Ben Neriah D, Cousineau S, et al. Reciprocal cellular cross-talk within the tumor microenvironment promotes oncolytic virus activity. *Nat Med* 2015; 21:530-6.
12. Ahn J, Konno H, Barber GN. Diverse roles of STING-dependent signaling on the development of cancer. *Oncogene* 2015.

Oncolytic virotherapy for human malignant mesothelioma: recent advances

Nicolas Boisgerault¹⁻³

Carole Achard¹⁻³

Tiphaine Delaunay¹⁻³

Laurent Cellerin⁴

Frédéric Tangy⁵

Marc Grégoire¹⁻³

Jean-François Fonteneau¹⁻³

¹INSERM, UMR892, ²CNRS, UMR6299, Health Research Institute of the University of Nantes, ³University of Nantes, ⁴Nantes CHU Hospital, Department of Thoracic and Digestive Oncology, ⁵Viral Genomics and Vaccination Unit, Institut Pasteur, Paris, CNRS UMR-3569, France

Abstract: Cancer virotherapy is an attractive alternative to conventional treatments because it offers a wide range of antitumor effects due to 1) the diversity of the oncolytic viruses that are now available and 2) their multifaceted activities against both tumor cells and tumor vessels, in addition to their ability to induce antitumor immune responses. In this review, we summarize preclinical and clinical data regarding the targeting of malignant mesothelioma (MM) by oncolytic viruses. We also discuss the potential of other oncolytic viruses that have already shown antitumor effects against several malignancies in advanced clinical trials but are yet to be tested against MM cells. Finally, we review how the activation of the immune system and combinations with other types of anticancer treatments could support the development of oncolytic virotherapy for the treatment of MM.

Keywords: oncolytic viruses, cancer virotherapy, malignant mesothelioma, antitumor immune responses, immunotherapy

Introduction

Oncolytic viruses are either naturally occurring or genetically engineered viruses that are able to target tumor cells preferentially over healthy cells.¹ Such viruses have been shown to exert antitumor activity against numerous types of human cancers, and several are currently being tested in the final phases of clinical trials. Their ability to not only kill cancer cells specifically but also both impair abnormal vasculature and stimulate different types of immune effectors makes them potent therapeutic agents that are adapted to a variety of clinical situations. One can expect that some of these oncolytic viruses will be routinely used to treat clinically challenging malignancies within a few years.

Questions remain regarding treatment modalities, eg, when deciding the route of administration or the number of injections that would be necessary to achieve significant antitumor responses. One of the major pending issues relates to the ability of the oncolytic vectors to escape from antiviral mechanisms – such as neutralizing antibodies that are present in body fluids or type I interferon pathways – that could dampen their antitumor efficacy. When applicable, the use of intratumor or intracavity injections may be advocated, which are expected to increase the probability of contact between the virus and the tumor cells while limiting neutralization of the viral particles before they reach the tumor site. As an example, patients with advanced ovarian cancers who were immune to measles virus (MV) were shown to be efficiently treated by intraperitoneal injections of an oncolytic strain of MV.^{2,3} Other malignancies that

Correspondence: Nicolas Boisgerault
INSERM, UMR892 - CNRS UMR6299,
Institut de Recherche Thérapeutique de
l'Université de Nantes, 8 quai Moncoussu,
BP70721, 44007 Nantes Cedex I, France
Tel +33 2 2808 0236
Fax +33 2 2808 0204
Email nicolas.boisgerault@inserm.fr

are known to arise in or metastasize to body cavities thus make good candidates for similar approaches.

In this review, we discuss the aspects that make virotherapy a good alternative to conventional treatments for malignant mesothelioma (MM), an aggressive cancer that affects the cells delineating different body cavities and for which an efficient treatment is yet to be designed. We summarize data that have been collated over the past 2 decades in order to support further investments for the development of virotherapeutic strategies for patients with MM.

Malignant mesothelioma

Asbestos exposure has been known for several decades to cause various respiratory diseases. One of the most illustrative pathologies related to occupational asbestos exposure is malignant pleural mesothelioma (MPM), an incurable cancer affecting pleural mesothelial cells.^{4,5} These cells are normally constitutive of the two membranes – the parietal pleura and the visceral pleura – that surround and protect the lungs. MM can also, rarely, arise from mesothelial cells delineating the pericardium (heart), the peritoneum (abdomen), or the tunica vaginalis testis and tunica serosa uteri (reproductive organs).

MPM is characterized by pleural thickening, the formation of pleural plaques and the accumulation of pleural fluid – known as pleural effusion – between the two layers of the pleura. This malignancy is commonly diagnosed several decades after exposure to asbestos, with symptoms that can be mistaken for those of invasive lung cancer or of pleural metastases from other types of cancers.⁶ It is an extremely aggressive neoplasm, resistant to conventional treatments including surgery, chemotherapy, and radiotherapy. Outcomes for this disease are extremely poor, with a survival rate of approximately 40% 1 year after diagnosis and only 10% after 5 years.⁷

These clinical hurdles make MM a suitable candidate for innovative therapeutic approaches such as oncolytic virotherapy, with the aim of improving its clinical management. Because the treatment of pleural effusion indeed requires access to the pleural cavity, local injections of oncolytic viruses into the pleural or the peritoneal cavities could be envisioned.

Herpesvirus

Several DNA viruses from the Herpesviridae family have been investigated for their oncolytic properties.¹ The most advanced, talimogene laherparepvec (T-Vec), previously known as OncoVEX^{GM-CSF}, is an oncolytic herpesvirus (HSV) that showed significant antitumor activity after intratumoral

injection in a recent Phase II clinical trial for the treatment of melanoma.⁸ This virus is currently being tested in a Phase III study and is expected to be shortly approved for clinical use by the US Food and Drug Administration.

T-Vec has not yet been used in patients with MM, but other strains of HSV have been studied for their ability to target and specifically kill mesothelioma cells. In 1997, it was first shown that replication-restricted HSV-1716 could eliminate human MM cells both in vitro and in immunodeficient mice.⁹ In the following years, Adusumilli et al published several articles in which they showed that different oncolytic HSV vectors were relevant therapeutic agents to target human MM, alone or in combination with other types of anticancer treatments.^{10–13} HSV-1716 is currently being investigated in a Phase I/IIa trial to determine the safety and efficacy of single or multiple intrapleural administrations of the virus in patients with MPM (Table 1).

Other strains of oncolytic HSV, such as G207, NV1020, and NV1066, that code for fluorescent proteins have also been used to treat and image primary tumors and metastases of mesothelioma in vivo.^{12–14} This alternative use of oncolytic viruses identified minimal residual disease and lymph node metastases in animal models. Such an approach could participate in improving the clinical management of MM.

Poxvirus

JX-594, also known as pexastimogene devacirepvec (Pexa-Vec), is another oncolytic virus expected to be tested in a Phase III clinical trial for patients with hepatocellular carcinoma. In the prior Phase II study, regression of both the injected tumors and tumors distant from the injection site were observed, suggesting the induction of an antitumor immune response.¹⁵ Interestingly, half the patients were seropositive for vaccinia virus prior to the treatment, but the therapy was efficient in all patients independent of their immune status.

In the corresponding Phase I study that was conducted in patients with different types of solid tumors, a single patient with metastatic MPM was included and showed partial remission for more than 10 weeks after a single intravenous injection of the virus.¹⁶ Another Phase I trial is underway for patients with malignant pleural effusions of different origins, including those with MPM (Table 1). This group of researchers previously showed that such an oncolytic virus could specifically target human MM cells in vitro and in an orthotopic animal model.^{17–19} Another vaccinia virus was also recently shown to treat MM efficiently in vivo in association with cytoreductive surgery.²⁰ In 2000, a first study showed that a recombinant vaccinia virus encoding the interleukin-2

Table I Completed and ongoing clinical trials of virotherapy for malignant mesothelioma treatment

Virus	Phase	Patients	Treatment modalities	Results	Reference
Adenovirus					
Ad.HSVtk	I	21 MPM	No previous therapy Intrapleural injection ($\geq 1.5 \times 10^{13}$ particles) + systemic ganciclovir	Well tolerated Antitumor antibodies 2 long-term survivors (>6.5 years)	55
Ad.hIFN- β (BG00001)	I	7 MPM 3 metastatic pleural effusions (ovary, lung, MPM)	No previous therapy Single intrapleural injection (9×10^{11} – 3×10^{12} particles)	Antitumor immune response in 7/10 patients Clinical response (SD) in 4/10 patients	35
Ad.hIFN- β (BG00001)	I	10 epithelioid MPM 7 metastatic pleural effusions (ovary, lung, breast)	2 intrapleural injections (7-day interval) (3×10^{11} – 1×10^{12} particles)	Well tolerated Antibody responses against tumor antigens 1 PR, 2 SD, 7 with survival >18 months	36
Ad.hIFN- $\alpha 2b$ (SCH 721015)	Pilot	9 MPM	2 intrapleural injections (3-day interval) (3×10^{11} – 1×10^{12} particles)	Well tolerated Neutralizing antibodies 1 PR and 2 SD	34
Ad.hIFN- $\alpha 2b$ (SCH 721015)	I/II	MPM	2 intrapleural injections + 4–6 cycles of chemotherapy	Ongoing	NCT01119664 ^a
Ad.hIFN- $\alpha 2b$ (SCH 721015)	I	MPM	2 intrapleural injections (3-day interval)	Ongoing	NCT01212367 ^a
Ad5-D24-GMCSF	Unspecified	2 MPM	After chemotherapy Single intrapleural injection (2.5×10^{11} – 3×10^{11} particles)	Well tolerated Tumor-specific and virus- specific immunity 1 SD and 1 PD	54
Ad5/3-D24-GMCSF (ONCOS-102)	I	1 MPM	After chemo-/radiotherapy 4 intratumoral injections (3×10^{11} particles) + cyclophosphamide (daily)	T CD8 ⁺ tumor infiltration Th1 polarization	65
Poxvirus					
VV-IL2		6 MPM	Intratumoral injection	Well tolerated No tumor regression PR over 10 weeks	21
JX-594 (pexastimogene devacirepvec)	I	1 metastatic MPM	After chemotherapy Single intravenous injection (1.5×10^7 particles)		16
GL-ONC1	I	Malignant pleural effusions (primary, metastases, and MPM)	Intrapleural injection	Ongoing	NCT01766739 ^a
Reovirus					
Reolysin	I	1 MPM	Pretreatment with docetaxel Intravenous injection (1×10^9 – 3×10^{10} TCID ₅₀) Up to 8 cycles (every 21 days) of 5 daily injections	Minor response 23% size decrease for 1 invaded lymph node	48
Measles virus					
MV-NIS	I	MPM	Intrapleural injections Up to 6 cycles (every 28 days)	Ongoing	NCT01503177 ^a
Herpesvirus					
HSV-1716	I/IIa	MPM	Single/multiple intrapleural injections	Ongoing	NCT01721018 ^a

Note: ^aNCT references can be viewed at <https://clinicaltrials.gov/>

Abbreviations: Ad, adenovirus; GM-CSF, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; IL2, interleukin-2; MPM, malignant pleural mesothelioma; PD, progressive disease; PR, partial remission; SD, stable disease; VV, vaccinia virus; TCID, tissue culture infective dose.

gene could be safely delivered to the pleural cavity to target tumor cells and was then able to attract immune cells to the tumor site.²¹

As with HSVs, oncolytic vaccinia viruses can be used for imaging purposes by using vectors recombinant for

radioelement transporters.^{17,18} This facilitates the detection of orthotopic tumors in mice by scintigraphy, positron emission tomography, or single-photon emission computed tomography. This could be of great value when monitoring tumors in patients treated by virotherapy.

Adenovirus

Adenoviral vectors have been widely used in viral gene therapy experiments because of the possibilities they offer for genetic engineering. As a consequence, oncolytic adenoviruses come in many varieties that were created to display specific antitumor properties against different types of human tumors. The first oncolytic virus to be approved for clinical use was the adenovirus H101 for the treatment of head and neck cancer in the People's Republic of China in 2006.²²

Several approaches have been developed to exploit tumor alterations that could favor specific replication of adenoviruses in MM cells compared with the surrounding healthy tissues. These approaches mainly rely on the use of tumor-specific, promoter-regulated adenoviruses using promoters such as those of the survivin,²³ *CREBBP/EP300 inhibitory protein 1*,²⁴ *telomerase*,²⁵ and *midkine*^{26–28} genes that can be highly active in MM cells. The use of specific promoters guarantees the safety of oncolytic adenoviruses that are then unable to replicate in nonmalignant cells. A similar strategy was used with an adenovirus dependent on a mesothelin promoter that showed specific antitumor activity in ovarian cancer, but to date, this virus has not been tested against mesothelioma cells.²⁹

Other types of viral therapy have been developed against MM, eg, by inserting genes encoding tumor suppressors or immunostimulatory molecules into adenoviral vectors. Some reports show that such vectors can be used to exploit the p53 status of MM cells. An E1B-55 kDa-defective adenovirus can thus activate p53 in p53-mutated MM tumors to promote killing of the tumor cell,³⁰ while an adenovirus encoding p53 was shown to activate apoptotic pathways in MM cells.³¹ Similar strategies were used to reexpress *p14* or *p16* tumor suppressor genes.^{32,33} These do not qualify as “oncolytic virotherapy” per se, but such approaches have allowed scientists and clinicians to test the safety and efficacy of intrapleural gene delivery to treat MM in the clinical setting (Table 1).^{34–36} These different studies showed that intrapleural delivery of viral vectors is well tolerated and also provides specific modes of action that can be beneficial for the treatment of MM, especially by activating the antitumor immune response.³⁷

RNA viruses

Several attenuated RNA viruses have been shown to exert oncolytic activity against a wide variety of human tumor types. Among these, vesicular stomatitis virus (VSV), MV, Sendai virus, Newcastle disease virus, reovirus, and even retroviruses have been specifically investigated for their ability to target and kill human MM cells.

VSV encoding the *IFN-β* gene specifically replicates in tumor cells deficient for the type I interferon pathways and shows anti-MM effects.^{38,39} Alterations of type I interferon pathways in human MM cells should also be considered when planning oncolytic virotherapy strategies with other viruses in patients with MM. Indeed, we recently described – in tumor cells derived from 22 patients with MPM – how type I interferon deficiencies could discriminate between patients who would be susceptible to oncolytic MV virotherapy and those who would be resistant to this type of treatment (Achard et al, unpublished data, 2015). Nonetheless, we had previously shown that MV was able to target and kill human mesothelioma cells,⁴⁰ which was then confirmed by another team at the Mayo Clinic.⁴¹ A Phase I clinical trial is thus in progress to investigate intrapleural delivery of MV in patients with MPM (Table 1).

MV was also shown to be an excellent platform to express different reporter transgenes such as the carcino-embryonic antigen^{3,42} or a sodium–iodide symporter⁴³ that allow for better monitoring of oncolytic MV targeting and replication in patients, which could be applied to MM. Data from MV are believed to be translatable to canine distemper virus, which could be a valuable vector to test oncolytic virotherapy in dog models of MM.⁴⁴ Sendai virus, another paramyxovirus related to MV, has also been shown to specifically target human MM in a xenograft model.⁴⁵ From the same family, Newcastle disease virus showed similar antitumor activity against numerous human MM cell lines.⁴⁶

Reoviruses, in particular Reolysin, which has been successfully tested in a Phase II trial for patients with metastatic melanoma,⁴⁷ are other promising oncolytic agents. So far, only one patient with metastatic MPM has been included in a clinical trial using Reovirus, and this showed that this tumor type could be targeted by the virus. Indeed, infected MPM cells showed strong viral protein production, and a decrease of the size of an invaded lymph node was also observed in this patient after six cycles of docetaxel/reovirus combination.⁴⁸

Finally, retroviral replicating vectors have been shown to efficiently transduce human MM cells both in vitro and in vivo in subcutaneous xenograft models.^{49,50} The vectors that were used in this study encode a prodrug activator gene that sensitizes tumor cells to the prodrug, 5-fluorocytosine. Tumor cells and their healthy counterparts were reported to exhibit different expression levels of the retrovirus receptors, which could account for the oncolytic potential of retroviruses against MM.

Antitumor immune responses

Specific lysis of tumor cells is a fundamental feature of oncolytic viruses. Nevertheless, these viruses can exert their antitumor activity through additional mechanisms such as the targeting of tumor vessels^{51,52} or the activation of immune cells. This ability to induce tumor-specific immune responses is now believed to be essential for the antitumor effects that have been observed in patients.⁵³ Most of the viruses that are currently being tested in advanced clinical trials are thus designed to activate immune responses that can help their antitumor properties. For instance, Pexa-Vec and T-Vec viruses are engineered to express the human granulocyte–macrophage colony-stimulating factor that is necessary for the antitumor effects that have been reported in clinical trials.^{8,15} Likewise, an oncolytic adenovirus coding for human granulocyte–macrophage colony-stimulating factor showed immune activation abilities in a Phase I trial on different types of solid tumors, even though only one of the two patients with MPM included showed disease stabilization, while the other patient exhibited progressive disease.⁵⁴

Back in 2005, Sterman et al hypothesized that the antitumor effects they observed in patients with MPM after intrapleural injection of an oncolytic adenovirus were due to the induction of an antitumor immune response characterized by the production of tumor-specific antibodies.⁵⁵ This was then confirmed with adenoviral vectors encoding the type I interferon genes that were able to activate cytotoxic T cells, natural killer cells, and humoral responses in the pleural cavity.^{34,35} As discussed earlier, activation of the type I interferon response by oncolytic viruses is a double-edged sword; these interferons have a strong antiviral activity, mainly due to their ability to shut down protein synthesis and to activate cell death programs in infected and neighboring cells. However, they are also strong inducers of the innate immune response that can subsequently initiate specific antitumor responses, and thus synergize with the direct cytotoxic effects of the viruses.⁵⁶

VSV is one of the major oncolytic viruses for which the antitumor immune response is believed to have a central role. Actual oncolytic activity (ie, viral replication in tumor cells) of VSV is not always observed after systemic treatment of animals in vivo, but this virus is extremely efficient in activating specific adaptive immune responses when reaching immune cells in the lymphoid organs. It has been shown that VSV-mIFN β encoding the murine *interferon- β* gene is able to induce general CD8 T-cell activation against MPM cells after locoregional delivery of the virus.³⁸ Such a mechanism could be exploited to improve the antitumor efficacy of VSV against MM. However, VSV-induced immune responses will

need further characterization as the same research group subsequently showed that the virus can also induce a transforming growth factor- β -dependent suppressive activity mediated by myeloid-derived suppressor cells in a different tumor model.⁵⁷

A critical feature for oncolytic viruses lies in their ability to kill tumor cells by inducing cell death exhibiting immunogenic properties. Different types of immunogenic cell death have been identified, including programmed necrosis – also known as necroptosis – pyroptosis or a specific type of immunogenic apoptosis, most of which are induced by anticancer treatments.⁵⁸ Oncolytic viruses are powerful inducers of tumor cell death and can definitely provide signals bearing immunogenic properties.^{53,59} As an example, we previously showed that MV was able to induce immunogenic cell death in infected human MPM cells. This allows for the activation of central immune cells such as myeloid⁴⁰ and plasmacytoid⁶⁰ dendritic cells that are then able to cross-prime tumor-specific cytotoxic T-cell responses.⁶¹ There has been a recent interest in stimulating plasmacytoid dendritic cells for the treatment of cancer⁶² that could be largely exploited by developing oncolytic virotherapy for cancers such as MM.

A recent Phase I trial described systemic antitumor effects after MV treatment of two patients with multiple myeloma, which strongly suggests the involvement of the immune system.⁶³ This same group previously reported that MV encoding the *interferon- β* gene induced immune cell infiltration – mainly macrophages – into human MM xenografts and the associated microenvironment.⁴¹ Another study showed that MV is an appropriate vector for immunotherapy when used in combination with anti-PD-L1 or anti-CTLA-4 antibodies.⁶⁴ One recent study also reported the induction of different antitumor immune mechanisms after intratumoral injection of an oncolytic adenovirus (Ad5/3-D24-GMCSF or ONCOS-102) in one patient (Table 1).⁶⁵ These findings require further research to determine how they can be applied to the treatment of MM in patients, but they confirm that viral vectors and oncolytic viruses can be used in antitumor vaccine strategies. One can thus anticipate the use of oncolytic vectors coding for tumor antigens to mount specific immune responses against MM tumors, a strategy that has already been developed for other malignancies.⁶⁶

Treatment combinations

To date, cancer virotherapy has shown extremely promising results both in preclinical studies and in clinical trials. However, further combinations of oncolytic viruses with other types of cancer treatments could again improve its efficacy.

In addition, combination studies are of great value because virotherapy is usually tested as a second-line or third-line therapy and it would be interesting to determine how other anticancer therapies could impact – positively or negatively – on its efficacy in patients.

Combined treatment with cisplatin plus pemetrexed – also known as Alimta – has become the standard of care for MM even though its mild clinical efficacy only accounts for an increased survival of approximately 3 months.⁷ Different studies have been performed to determine whether these chemotherapies can synergize with oncolytic viruses to improve the efficacy of both approaches. It was first shown that the stress response induced by cisplatin in cell lines derived from epithelioid, sarcomatoid, or biphasic MM could potentiate the replication and cytotoxicity of the oncolytic HSVs NV1066 *in vitro*.¹⁰ The same group reported that the DNA damage response induced by radiation could also synergize with NV1066 for increased antitumor activity.¹¹ It was also shown that the use of a replication-competent adenovirus deficient for E1B-55kDa, or encoding p53, sensitized MM cells to apoptosis and cytotoxicity induced by cisplatin or pemetrexed.^{30,31} These results are extremely interesting because they show that oncolytic viruses could benefit from the chemotherapeutics already used in patients with MM to achieve their antitumor effects.

The antitumor effects of epigenetic drugs have been widely demonstrated for the treatment of hematological cancers, but more work is needed to define their use for solid tumors. Nonetheless, this class of drugs has shown promising results for the treatment of MM^{67,68} and also exhibits different types of actions that could enhance or interfere with oncolytic virus activities. Indeed, inhibitors of histone deacetylases have been demonstrated to synergize with certain oncolytic viruses such as VSV to infect refractory primary tumors by dampening the type I interferon response.⁶⁹ Valproic acid was also shown to enhance HSV replication in tumor cells by a similar mechanism.⁷⁰ Analogous studies were carried out with different types of oncolytic viruses and showed a variety of mechanisms, such as anti-angiogenic actions, proapoptotic effects, and upregulation of viral receptors, leading to antitumor activity.^{71,72} Such an approach should thus be considered when designing combinatorial therapeutic strategies using oncolytic viruses for the treatment of MM.

Conclusion

MM is an aggressive cancer for which there is an urgent need for the development of efficient, innovative therapeutic strategies to improve its clinical management. Cancer virotherapy

is currently one of the most promising alternatives, with several studies having already shown that human MM cells are sensitive to many different oncolytic viruses by direct killing or by immune-mediated mechanisms. Nonetheless, extensive research is necessary to better define the modalities of treatment and to anticipate how experimental data can be applied to the clinical situation in patients. There is a critical need for exclusive MM trials in order to clinically address the specificities of this cancer, which is often included in studies for patients with “solid tumor”, with a limited number of actual patients with MM evaluated. Because MM is a relatively rare cancer, it may be difficult to incorporate a large number of patients in a single study, but this effort would ensure the clinical validation of oncolytic virotherapy for this specific malignancy and would hopefully provide a brighter prospect for patients afflicted with this incurable disease.

Acknowledgments

This work has been supported by “La Ligue Nationale Contre le cancer”, “La Ligue Régionale Grand-Ouest Contre le Cancer (CSIRGO)”, the “ARSMESO44 association”, the “Fondation pour la Recherche Médicale (FRM)” and “La Fondation ARC pour la Recherche sur le Cancer”.

Disclosure

FT, MG, and JFF own patents on the use of attenuated MV for antitumor virotherapy. Other authors report no conflicts of interest in this work.

References

1. Russell SJ, Peng KW, Bell JC. Oncolytic virotherapy. *Nat Biotechnol*. 2012;30(7):658–670.
2. Galanis E, Atherton PJ, Maurer MJ, et al. Oncolytic measles virus expressing the sodium iodide symporter to treat drug-resistant ovarian cancer. *Cancer Res*. 2015;75(1):22–30.
3. Galanis E, Hartmann LC, Cliby WA, et al. Phase I trial of intraperitoneal administration of an oncolytic measles virus strain engineered to express carcinoembryonic antigen for recurrent ovarian cancer. *Cancer Res*. 2010;70(3):875–882.
4. Porpodis K, Zarogoulidis P, Boutsikou E, et al. Malignant pleural mesothelioma: current and future perspectives. *J Thorac Dis*. 2013; 5(Suppl 4):S397–S406.
5. Roe OD, Stella GM. Malignant pleural mesothelioma: history, controversy and future of a manmade epidemic. *Eur Respir Rev*. 2015; 24(135):115–131.
6. Husain AN, Colby T, Ordonez N, et al; International Mesothelioma Interest Group. Guidelines for pathologic diagnosis of malignant mesothelioma: 2012 update of the consensus statement from the International Mesothelioma Interest Group. *Arch Pathol Lab Med*. 2013;137(5): 647–667.
7. Scherpereel A, Astoul P, Baas P, et al. Guidelines of the European Respiratory Society and the European Society of Thoracic Surgeons for the management of malignant pleural mesothelioma. *Eur Respir J*. 2010;35(3):479–495.

8. Senzer NN, Kaufman HL, Amatruda T, 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):5763–5771.
9. Kucharczuk JC, Randazzo B, Chang MY, et al. Use of a “replication-restricted” herpes virus to treat experimental human malignant mesothelioma. *Cancer Res*. 1997;57(3):466–471.
10. Adusumilli PS, Chan MK, Chun YS, et al. Cisplatin-induced GADD34 upregulation potentiates oncolytic viral therapy in the treatment of malignant pleural mesothelioma. *Cancer Biol Ther*. 2006;5(1):48–53.
11. Adusumilli PS, Chan MK, Hezel M, 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):258–269.
12. Adusumilli PS, Eisenberg DP, Stiles BM, et al. Intraoperative localization of lymph node metastases with a replication-competent herpes simplex virus. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2006;132(5):1179–1188.
13. Adusumilli PS, Stiles BM, Chan MK, et al. Imaging and therapy of malignant pleural mesothelioma using replication-competent herpes simplex viruses. *J Gene Med*. 2006;8(5):603–615.
14. Adusumilli PS, Eisenberg DP, Chun YS, et al. Vially directed fluorescent imaging improves diagnostic sensitivity in the detection of minimal residual disease after potentially curative cytoreductive surgery. *J Gastrointest Surg*. 2005;9(8):1138–1146. [discussion 1146–1137].
15. Heo J, Reid T, Ruo L, et al. Randomized dose-finding clinical trial of oncolytic immunotherapeutic vaccinia JX-594 in liver cancer. *Nat Med*. 2013;19(3):329–336.
16. Breitbach CJ, Burke J, Jonker D, et al. Intravenous delivery of a multi-mechanistic cancer-targeted oncolytic poxvirus in humans. *Nature*. 2011;477(7362):99–102.
17. Belin LJ, Ady JW, Lewis C, et al. An oncolytic vaccinia virus expressing the human sodium iodine symporter prolongs survival and facilitates SPECT/CT imaging in an orthotopic model of malignant pleural mesothelioma. *Surgery*. 2013;154(3):486–495.
18. Brader P, Kelly KJ, Chen N, et al. Imaging a genetically engineered oncolytic vaccinia virus (GLV-1h99) using a human norepinephrine transporter reporter gene. *Clin Cancer Res*. 2009;15(11):3791–3801.
19. Kelly KJ, Woo Y, Brader P, et al. Novel oncolytic agent GLV-1h68 is effective against malignant pleural mesothelioma. *Hum Gene Ther*. 2008;19(8):774–782.
20. Acuna SA, Ottolino-Perry K, Cako B, Tang N, Angarita FA, McCart JA. Oncolytic vaccinia virus as an adjuvant treatment to cytoreductive surgery for malignant peritoneal mesothelioma. *Ann Surg Oncol*. 2014;21(7):2259–2266.
21. Mukherjee S, Haenel T, Himbeck R, et al. Replication-restricted vaccinia as a cytokine gene therapy vector in cancer: persistent transgene expression despite antibody generation. *Cancer Gene Ther*. 2000;7(5):663–670.
22. Garber K. China approves world’s first oncolytic virus therapy for cancer treatment. *J Natl Cancer Inst*. 2006;98(5):298–300.
23. Zhu ZB, Makhija SK, Lu B, et al. Targeting mesothelioma using an infectivity enhanced survivin-conditionally replicative adenoviruses. *J Thorac Oncol*. 2006;1(7):701–711.
24. Fukazawa T, Matsuoka J, Naomoto Y, Maeda Y, Durbin ML, Tanaka N. Malignant pleural mesothelioma-targeted CREBBP/EP300 inhibitory protein 1 promoter system for gene therapy and virotherapy. *Cancer Res*. 2008;68(17):7120–7129.
25. Watanabe Y, Kojima T, Kagawa S, et al. A novel translational approach for human malignant pleural mesothelioma: heparanase-assisted dual virotherapy. *Oncogene*. 2010;29(8):1145–1154.
26. Gotoh A, Kanno T, Nagaya H, et al. Gene therapy using adenovirus against malignant mesothelioma. *Anticancer Res*. 2012;32(9):3743–3747.
27. Kubo S, Kawasaki Y, Yamaoka N, et al. Complete regression of human malignant mesothelioma xenografts following local injection of midkine promoter-driven oncolytic adenovirus. *J Gene Med*. 2010;12(8):681–692.
28. Takagi-Kimura M, Yamano T, Tamamoto A, et al. Enhanced antitumor efficacy of fiber-modified, midkine promoter-regulated oncolytic adenovirus in human malignant mesothelioma. *Cancer Sci*. 2013;104(11):1433–1439.
29. Tsuruta Y, Pereboeva L, Breidenbach M, et al. A fiber-modified mesothelin promoter-based conditionally replicating adenovirus for treatment of ovarian cancer. *Clin Cancer Res*. 2008;14(11):3582–3588.
30. Yamanaka M, Tada Y, Kawamura K, et al. E1B-55 kDa-defective adenoviruses activate p53 in mesothelioma and enhance cytotoxicity of anticancer agents. *J Thorac Oncol*. 2012;7(12):1850–1857.
31. Li Q, Kawamura K, Yamanaka M, et al. Upregulated p53 expression activates apoptotic pathways in wild-type p53-bearing mesothelioma and enhances cytotoxicity of cisplatin and pemetrexed. *Cancer Gene Ther*. 2012;19(3):218–228.
32. Frizelle SP, Grim J, Zhou J, et al. Re-expression of p16INK4a in mesothelioma cells results in cell cycle arrest, cell death, tumor suppression and tumor regression. *Oncogene*. 1998;16(24):3087–3095.
33. Yang CT, You L, Yeh CC, et al. Adenovirus-mediated p14(ARF) gene transfer in human mesothelioma cells. *J Natl Cancer Inst*. 2000;92(8):636–641.
34. Serman DH, Haas A, Moon E, et al. A trial of intrapleural adenoviral-mediated Interferon-alpha2b gene transfer for malignant pleural mesothelioma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011;184(12):1395–1399.
35. Serman DH, Recio A, Carroll RG, et al. A phase I clinical trial of single-dose intrapleural IFN-beta gene transfer for malignant pleural mesothelioma and metastatic pleural effusions: high rate of antitumor immune responses. *Clin Cancer Res*. 2007;13(15 pt 1):4456–4466.
36. Serman DH, Recio A, Haas AR, et al. A phase I trial of repeated intrapleural adenoviral-mediated interferon-beta gene transfer for mesothelioma and metastatic pleural effusions. *Mol Ther*. 2010;18(4):852–860.
37. Tagawa M, Tada Y, Shimada H, Hiroshima K. Gene therapy for malignant mesothelioma: current prospects and challenges. *Cancer Gene Ther*. 2013;20(3):150–156.
38. Willmon CL, Saloura V, Fridlender ZG, et al. Expression of IFN-beta enhances both efficacy and safety of oncolytic vesicular stomatitis virus for therapy of mesothelioma. *Cancer Res*. 2009;69(19):7713–7720.
39. Saloura V, Wang LC, Fridlender ZG, et al. Evaluation of an attenuated vesicular stomatitis virus vector expressing interferon-beta for use in malignant pleural mesothelioma: heterogeneity in interferon responsiveness defines potential efficacy. *Hum Gene Ther*. 2010;21(1):51–64.
40. Gauvrit A, Brandler S, Sapede-Pero C, Boisgerault N, Tangy F, Gregoire M. Measles virus induces oncolysis of mesothelioma cells and allows dendritic cells to cross-prime tumor-specific CD8 response. *Cancer Res*. 2008;68(12):4882–4892.
41. Li H, Peng KW, Dingli D, Kratzke RA, Russell SJ. Oncolytic measles viruses encoding interferon beta and the thyroidal sodium iodide symporter gene for mesothelioma virotherapy. *Cancer Gene Ther*. 2010;17(8):550–558.
42. Phuong LK, Allen C, Peng KW, et al. Use of a vaccine strain of measles virus genetically engineered to produce carcinoembryonic antigen as a novel therapeutic agent against glioblastoma multiforme. *Cancer Res*. 2003;63(10):2462–2469.
43. Myers RM, Greiner SM, Harvey ME, et al. Preclinical pharmacology and toxicology of intravenous MV-NIS, an oncolytic measles virus administered with or without cyclophosphamide. *Clin Pharmacol Ther*. 2007;82(6):700–710.
44. Lapp S, Pfankuche VM, Baumgartner W, Puff C. Viral oncolysis – can insights from measles be transferred to canine distemper virus? *Viruses*. 2014;6(6):2340–2375.
45. Morodomi Y, Yano T, Kinoh H, et al. BioKnife, a uPA activity-dependent oncolytic Sendai virus, eliminates pleural spread of malignant mesothelioma via simultaneous stimulation of uPA expression. *Mol Ther*. 2012;20(4):769–777.
46. Silberhumer GR, Brader P, Wong J, et al. Genetically engineered oncolytic Newcastle disease virus effectively induces sustained remission of malignant pleural mesothelioma. *Mol Cancer Ther*. 2010;9(10):2761–2769.

47. Galanis E, Markovic SN, Suman VJ, et al. Phase II trial of intravenous administration of Reolysin(R) (Reovirus Serotype-3-dearing Strain) in patients with metastatic melanoma. *Mol Ther.* 2012; 20(10):1998–2003.
48. Comins C, Spicer J, Protheroe A, et al. REO-10: a phase I study of intravenous reovirus and docetaxel in patients with advanced cancer. *Clin Cancer Res.* 2010;16(22):5564–5572.
49. Kawasaki Y, Tamamoto A, Takagi-Kimura M, et al. Replication-competent retrovirus vector-mediated prodrug activator gene therapy in experimental models of human malignant mesothelioma. *Cancer Gene Ther.* 2011;18(8):571–578.
50. Kubo S, Takagi-Kimura M, Logg CR, Kasahara N. Highly efficient tumor transduction and antitumor efficacy in experimental human malignant mesothelioma using replicating gibbon ape leukemia virus. *Cancer Gene Ther.* 2013;20(12):671–677.
51. Breitbach CJ, Arulanandam R, De Silva N, et al. Oncolytic vaccinia virus disrupts tumor-associated vasculature in humans. *Cancer Res.* 2013;73(4):1265–1275.
52. Breitbach CJ, De Silva NS, Falls TJ, et al. Targeting tumor vasculature with an oncolytic virus. *Mol Ther.* 2011;19(5):886–894.
53. Elsedawy NB, Russell SJ. Oncolytic vaccines. *Expert Rev Vaccines.* 2013;12(10):1155–1172.
54. Cerullo V, Pesonen S, Diaconu I, et al. Oncolytic adenovirus coding for granulocyte macrophage colony-stimulating factor induces antitumor immunity in cancer patients. *Cancer Res.* 2010;70(11):4297–4309.
55. Stermann DH, Recio A, Vachani A, et al. Long-term follow-up of patients with malignant pleural mesothelioma receiving high-dose adenovirus herpes simplex thymidine kinase/ganciclovir suicide gene therapy. *Clin Cancer Res.* 2005;11(20):7444–7453.
56. Gajewski TF, Corrales L. New perspectives on type I IFNs in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2015;26(2):175–178.
57. Willmon C, Diaz RM, Wongthida P, et al. Vesicular stomatitis virus-induced immune suppressor cells generate antagonism between intratumoral oncolytic virus and cyclophosphamide. *Mol Ther.* 2011; 19(1):140–149.
58. Inoue H, Tani K. Multimodal immunogenic cancer cell death as a consequence of anticancer cytotoxic treatments. *Cell Death Differ.* 2014;21(1):39–49.
59. Achard C, Boisgerault N, Delaunay T, Tangy F, Gregoire M, Fonteneau JF. Induction of immunogenic tumor cell death by attenuated oncolytic measles virus. *J Clin Cell Immunol.* 2015;6(1):291.
60. Guillaume JB, Boisgerault N, Roulois D, et al. Measles virus vaccine-infected tumor cells induce tumor antigen cross-presentation by human plasmacytoid dendritic cells. *Clin Cancer Res.* 2013;19(5):1147–1158.
61. Fonteneau JF, Guillaume JB, Tangy F, Gregoire M. Attenuated measles virus used as an oncolytic virus activates myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *Oncoimmunology.* 2013;2(5):e24212.
62. Tel J, de Vries IJ. Potential applications for plasmacytoid dendritic cells in cancer immunotherapy. *Immunotherapy.* 2012;4(10):979–982.
63. Russell SJ, Federspiel MJ, Peng KW, et al. Remission of disseminated cancer after systemic oncolytic virotherapy. *Mayo Clinic Proceed.* 2014; 89(7):926–933.
64. Engeland CE, Grossardt C, Veinalde R, et al. CTLA-4 and PD-L1 checkpoint blockade enhances oncolytic measles virus therapy. *Mol Ther.* 2014;22(11):1949–1959.
65. Ranki T, Joensuu T, Jäger E, et al. Local treatment of a pleural mesothelioma tumor with ONCOS-102 induces a systemic antitumor CD8 T-cell response, prominent infiltration of CD8 lymphocytes and Th1 type polarization. *Oncoimmunology.* 2014;3(10):e958937.
66. Rajani K, Alonso-Camino V, Boisgerault N, Vile R. Viral platforms for expression of tumor antigens in cancer immunotherapy. In: Rees RC, editor. *Tumor Immunology and Immunotherapy.* Oxford: Oxford University Press; 2014:217–234.
67. Guillot F, Boutin B, Blanquart C, et al. Vaccination with epigenetically treated mesothelioma cells induces immunisation and blocks tumour growth. *Vaccine.* 2011;29(33):5534–5543.
68. Leclercq S, Gueugnon F, Boutin B, et al. A 5-aza-2'-deoxycytidine/ valproate combination induces cytotoxic T-cell response against mesothelioma. *Eur Respir J.* 2011;38(5):1105–1116.
69. Nguyễn TL, Abdelbary H, Arguello M, et al. Chemical targeting of the innate antiviral response by histone deacetylase inhibitors renders refractory cancers sensitive to viral oncolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(39):14981–14986.
70. Otsuki A, Patel A, Kasai K, et al. Histone deacetylase inhibitors augment antitumor efficacy of herpes-based oncolytic viruses. *Mol Ther.* 2008;16(9):1546–1555.
71. Nguyen TL, Wilson MG, Hiscott J. Oncolytic viruses and histone deacetylase inhibitors – a multi-pronged strategy to target tumor cells. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2010;21(2–3):153–159.
72. Forbes NE, Abdelbary H, Lupien M, Bell JC, Diallo JS. Exploiting tumor epigenetics to improve oncolytic virotherapy. *Front Genet.* 2013;4:184.

Oncolytic Virotherapy

Publish your work in this journal

Oncolytic Virotherapy is an international, peer-reviewed, open access online journal publishing original research, study protocols, reviews, editorials and commentaries on all aspects of oncolytic virology, namely the application of oncolytic viruses for the treatment of cancer. Specific topics in the journal include: Rationale and theoretical aspects of oncolytic virotherapy including in vitro, in vivo and mathematical

Submit your manuscript here: <http://www.dovepress.com/oncolytic-virotherapy-journal>

Dovepress

modeling; and practical application and problem solving in the clinic including identification of potential responders through biomarkers and genetic profiling. The manuscript management system is completely online and includes a very quick and fair peer-review system, which is all easy to use. Visit <http://www.dovepress.com/testimonials.php> to read real quotes from published authors.

Induction of Immunogenic Tumor Cell Death by Attenuated Oncolytic Measles Virus

Carole Achard¹⁻³, Nicolas Boisgerault¹⁻³, Tiphaine Delaunay¹⁻³, Frédéric Tangy⁴, Marc Grégoire¹⁻³ and Jean-François Fonteneau^{1-3*}

¹INSERM, UMR892, Institut de Recherche en Santé de l'Université de Nantes, France

²CNRS, UMR6299, Institut de Recherche en Santé de l'Université de Nantes, France

³Université de Nantes, Nantes, France

⁴CNRS-URA 3015, Unité de Génomique Virale et Vaccination, Institut Pasteur, Paris, France

*Corresponding author: Jean-François Fonteneau, PhD, INSERM UMR892, CNRS UMR6299, Institut de Recherche Thérapeutique de l'Université de Nantes, 8 quai Moncousu, BP70721, 44007 Nantes, Cedex1, France, Tel: +33-228080239; Fax: +33-228080204; E-mail: jean-francois.fonteneau@inserm.fr

Received date: December 18, 2014, Accepted date: January 22, 2015, Published date: January 29, 2015

Copyright: © 2015 Achard C, et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Abstract

Antitumor virotherapy is a developing approach to treat cancer with oncolytic viruses, namely replicative viruses that exclusively or preferentially infect and kill tumor cells. Attenuated strains of Measles Virus (MV) are now being used as oncolytic viruses in clinical trials to treat several types of cancer. The efficacy of oncolytic viruses is mainly due to their capacity to infect and kill tumor cells, but it has also been demonstrated that their capacity to induce immunogenic cell death can activate an antitumor immune response. In this review, we describe the oncolytic capacity of MV and the concept of Immunogenic Cell Death (ICD). We then review how MV induces immunogenic cell death, which can be beneficial for cancer treatment.

Keywords: Measles virus; Virotherapy; Oncolytic viruses; Immunogenic cell death

Introduction

Antitumor virotherapy using replicative oncolytic viruses that exclusively or preferentially infect and kill tumor cells is a field that is growing rapidly, along with progress in molecular biological engineering [1]. These viruses are often derived from attenuated strains that either exhibit a natural tropism against tumor cells or that have been engineered to target tumor cells. Numerous RNA viruses (coxsackievirus, Newcastle Disease Virus (NDV), Vesicular Stomatitis Virus (VSV), Measles Virus (MV), poliovirus, and reovirus) and DNA viruses (adenovirus and vaccinia virus) are now being evaluated in clinical trials against a wide range of malignancies [1]. Adenovirus H101 is now approved in China for the treatment of head and neck cancer, and several other oncolytic viruses, such as HSV, adenovirus, and reovirus have entered phase III clinical trials [1].

Attenuated MV as an Oncolytic Virus

Structure and replication cycle of MV

Among oncolytic viruses, attenuated vaccine strains of MV show an interesting spontaneous tropism for infection and replication in tumor cells, and are now being evaluated for the treatment of several cancers. MV is a Morbillivirus of the Paramyxoviridae family, with an envelope and a negative, non-segmented, single-strand (ss) RNA genome [2]. The World Health Organization (WHO) indexes twenty-four strains of MV, classed into eight clades [3]. The MV RNA genome comprises around 16,000 nucleotides and encodes eight proteins. Two of these are non-structural proteins (V and C), expressed from an alternative RNA transcript encoding the phosphoprotein (P protein). V and C protein are virulence factors, notably implicated in the inhibition of

the innate intracellular immune defense, such as the type I Interferon (IFN) response. P protein, Large protein (L) and Nucleoprotein (N) form the nucleocapsid, which contains the viral ssRNA genome. The matrix (M), fusion (F), and hemagglutinin proteins (H) form the viral envelope with lipids from the infected host cell membrane [2].

The replication cycle starts with the adsorption of MV onto the host cell membrane through the interaction between the H protein and the cell surface molecules, CD150, CD46, and/or Nectin-4 [4]. The F protein mediates the fusion between the viral particle and the host cell membrane, allowing the negative, single-stranded RNA and the associated proteins to penetrate into the cytoplasm. These proteins form a Ribo-Nucleo-Proteic (RNP) complex with the viral polymerase L, which allows replication of the negative ssRNA and transcription of MV genes. The newly assembled viral particles bud from the infected cell plasma membrane, together with the matrix (M) and the envelope glycoproteins (H,F). MV infection is known to induce the formation of syncytia. Indeed, MV-infected cells fuse with neighboring cells, thus forming multinucleated infected cells that increase the efficiency of MV replication.

Oncolytic activity of MV

MV uses several receptors to enter cells. The pathogenic wild-type (wt) strains use the signaling lymphocyte activation molecule (SLAM/CD150), which confers to this virus a natural tropism for T and B lymphocytes and activated monocytes/macrophages [5,6]. This receptor usage explains the reports of spontaneous remission of leukemia and lymphoma in patients who have contracted a wt-MV infection [7-10]. These reports constitute the first proof of concept that MV can be used as a natural oncolytic virus.

Since 2001, the oncolytic activity of attenuated strains of MV has been reported, both in vitro, and in vivo in immunodeficient mice bearing human tumor xenografts. This activity has been demonstrated

against T-cell lymphoma [11,12], myeloma [13], sarcoma [14], pancreatic cancer [15], glioblastoma [16], glioma [17], ovarian carcinoma [18], prostate cancer [19], breast cancer [19-21], melanoma [22], renal cell carcinoma [23], mesothelioma [24,25], medulloblastoma [26,27], hepatoblastoma [28], and lung/colorectal adenocarcinoma [29].

Attenuated vaccine strains of MV, such as Schwarz and Edmonston, which are spontaneously oncolytic, use the CD46 molecule as the major cell receptor [30-32]. The membrane cofactor protein, CD46, is an inhibitory complement receptor. Its expression at low density by healthy cells protects normal tissues from accidental injury by activated complement. Interestingly, many tumor types overexpress CD46 to escape complement-dependent cytotoxicity [33,34]. This selective overexpression by many cancer cell types confers on attenuated MV a natural tropism for tumor cells. Above a certain threshold of CD46 expression, the killing and syncytium formation mediated by MV infection increase dramatically [30], whereas healthy tissues with a low density of CD46 remain unharmed [18].

Recently, Nectin-4 (PVRL4) has been identified as a novel receptor for wild-type and attenuated strains [35,36]. This molecule plays a crucial role in the shedding of MV from the respiratory tract of infected individuals for transmission of the disease [37]. In humans, Nectin-4 is mostly expressed in placenta and trachea, and at a lower level in tonsil epithelial cells, oral mucosa, lung macrophages, and neuronal cells of the cerebral cortex [35]. It is also frequently overexpressed in many adenocarcinomas, such as lung, ovarian, colon, and breast tumors [38-40]. Nectin-4 is used by MV for the infection of breast tumor cells [20].

Overexpression of MV receptors is probably not the only factor that determines the ability of MV to replicate and preferentially kill tumor cells. There is now evidence that host translational control of viral replication, and the incapability of some tumor cells to develop a type I interferon innate immune response, affect the oncolytic activity of MV [14,41,42]. All nucleated cells are equipped with intracytoplasmic sensors that are considered as Pathogen Recognition Receptors (PRR) and are able to detect viral infection [43]. In the case of MV, helicases such as the Retinoic acid-Inducible Gene 1 (RIG-I) and the Melanoma Differentiation-Associated protein 5 (MDA5) detect viral RNA and induce the secretion of type I IFN, which protects infected and neighboring cells from viral replication. Indeed, exposure to type I IFN induces the expression of numerous Interferon Sensitive Genes (ISG) that inhibit several stages of viral replication [44]. However, there are often defects of type I interferon response in tumor cells, to avoid the triggering of this response by frequent aberrant RNA transcripts present in these cells [45,46]. It allows the tumor cells to avoid induction of apoptosis or stimulation of antitumor immune response by the type I IFN.

Clinical trials with oncolytic MV

MV is now being evaluated, in clinical trials being carried out at the Mayo Clinic, for the treatment of several malignancies: ovarian cancer, mesothelioma, multiple myeloma, glioma, and squamous cell carcinoma of the head and neck [1]. A major asset for the clinical use of attenuated MV is its excellent safety profile, proven after the vaccination of millions of children over the past forty years, with no observed reversion to the wt-MV [47]. To date, the results of three clinical trials have been published, for the treatment of cutaneous T-cell lymphoma (CTLC), chemoresistant ovarian cancer, and advanced multiple myeloma, with encouraging results and limited adverse

effects [48-50]. Heinzerling and colleagues carried out the first phase I clinical trial of MV antitumor virotherapy using the Edmonston-Zagreb strain of MV in five patients with CTCL [48]. This clinical study showed that intratumoral injection of MV after systemic treatment with IFN- α (to limit infection of healthy cells) induced local infection and a characteristic cytopathogenic effect of MV on tumor cells, leading to tumor regression in three patients.

MV was also evaluated by intraperitoneal injection for the treatment of patients with taxol- and platinum-refractory ovarian cancers, who were seropositive for measles virus to assure the safety of the trial. In this phase I clinical study, Evanthia Galanis and colleagues used MV-CEA, a modified Edmonston strain that produces the carcinoma embryonic antigen (CEA) as a soluble marker [49]. Indeed, CEA allows the monitoring of MV replication by serum dosage. Escalating doses were given to patients, ranging from 10^3 to 10^9 TCID₅₀, with no observed dose-limiting toxicity. Clinical responses were observed in fourteen of twenty-one patients, notably disease stabilization, with a median duration of 92.5 days. Clinical response was associated with a diminution of the tumor-specific marker, CA-125, in five patients. Median survival time (12.15 months) was increased considerably compared to the expected median survival of the patient population (6 months).

More recently, a third phase I clinical trial was performed in two MV-seronegative patients with relapsing, drug-resistant, metastatic multiple myeloma [50]. These patients were given, by intravenous injection, a high dose (10^{11} TCID₅₀ infectious units) of Edmonston MV recombinant for the sodium/iodide symporter (NIS), which allows viral replication to be followed in vivo by radioiodine Single-Photon Emission Computed Tomography (SPECT)-Computed Tomography (CT) imaging. Both patients responded to the treatment, with one experiencing a complete response during six months that is still on-going at the time of this publication.

Immunogenic Cell Death (ICD)

Discovery of ICD

Until the mid-1990s, it was thought that the major factor that conditions the induction of an immune response was the discrimination between “self” and “non-self”. The presence of Pathogen-Associated Molecular Patterns (PAMPs) was necessary for the induction of an efficient immune response [51]. PAMPs are conserved molecular motifs specific to pathogens that are notably able to activate Antigen-Presenting Cells (APC) such as Dendritic Cells (DC), via PRR such as Toll-Like Receptors (TLR) [52]. When exposed to PAMPs, DC that capture antigens in peripheral tissues migrate to secondary lymphoid organs and initiate an adaptive immune response. PAMPs can also be detected during pathogen infection by intracytoplasmic PRR, which are expressed by all nucleated cells. This detection activates a cellular innate immune defense known as the type I IFN response that leads to secretion of type I IFN. These molecules act by autocrine and paracrine modes to block pathogen replication and eventually induce apoptosis.

The self/non-self-model fails, however, to explain why some microorganisms, such as commensal bacteria, are well tolerated, and why some self-constituents can trigger an immune response without the presence of pathogen, such as in the case of autograft. To take into account these phenomena, Poly Matzinger proposed the “danger theory”, which postulates that the immune system does not concern so

much with self and non-self, but rather detects situations that present danger [53]. Indeed, while apoptosis was considered to be nonimmunogenic, this theory implies that in certain conditions of stress, such as injury by pathogen, cell death can be accompanied by the release of cellular danger signals that are able to activate the immune system. These danger signals released during ICD activate APC, notably DC that, after capturing antigens, migrate to secondary lymphoid organs and initiate an adaptive immune response. Danger signals were later renamed Damage-Associated Molecular Patterns (DAMPs), as opposed to PAMPs [54]. The integration of both types of signals, DAMPs and PAMPs, induces and orients the immune response.

Inducers and types of ICD

Numerous inducers of ICD have now been described. Pathogens such as viruses can induce ICD [55]. Some chemotherapeutic drugs used for the treatment of cancer, such as doxorubicine, have also been shown to induce ICD [56]. In addition, some physical stimuli can induce ICD, such as ionizing radiation used in radiotherapy [57], ultraviolet-C irradiation [58], high hydrostatic pressure [59], hyperthermia [60,61], and freeze/thaw cycles [62].

Different types of ICD have now been described [63]. Indeed, ICD can result from apoptosis accompanied by an endoplasmic reticulum (ER) stress and autophagy [64,65]. This form of apoptosis is characterized by preservation of cell membrane integrity with the formation of blebs, and by the release of DAMPs, such as high-mobility group box 1 (HMGB1) protein and adenosine triphosphate (ATP), and the exposition of calreticulin on the surface of apoptotic cells. ICD can also result from pyroptosis, characterized by activation of the inflammasome that leads to the activation of caspase-1, able, notably, to transform pro-IL-1 β into IL-1 β [66]. Furthermore, pyroptosis is associated with the formation of cell-membrane pores that results in cell lysis. Pyroptosis is especially used by immune cells, such as neutrophils and leads to a rapid induction of inflammation in response to some pathogens. Necroptosis is an active necrosis program that can be induced notably by the presence of Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α) produced in response to a pathogen. TNF- α can trigger its receptor TNFR1 which lead to activation of receptor-interacting protein kinase 1 and 3 (RIPK1 and RIPK3). This signaling pathway will lead to necroptosis. This form of ICD is accompanied by the passive release of DAMPs such as HMGB1 and long genomic DNA, due to the loss of cell membrane integrity [67,68]. Finally, ICD can also result from passive necrosis induced by pathogen infection, toxin exposure, or physical trauma, and accompanied by the passive release of DAMPs such as HMGB1 and Heat Shock Proteins (HSP), and the exposure of F-actin [68,69]. Much work is still needed to understand the regulation of these different cell-death pathways and, importantly, their outcomes regarding the initiation and orientation of the immune response.

DAMPs and ICD

Several DAMPs have now been identified, and they exert various roles. Firstly, cells that undergo ICD expose, on their membrane, “eat-me” signals for phagocytosis by APC. During ICD induced by ER stress and autophagy, calreticulin, which is normally located in the ER membranes, is rapidly exposed at the plasma membrane of apoptotic cells and can be recognized by scavenger receptors on APC [70,71]. During necrosis, F-actin is exposed to the extracellular environment and may also act as an “eat-me” signal for phagocytosis mediated by

DNGR1, also known as Clec9a in humans, a receptor found on DC that is specialized in cross-presentation [69]. Secondly, cells that undergo ICD can release some DAMPs that are implicated in the attraction and activation of immune cells. Among these, the first-described DAMPs that are released during ICD, and that induce DC maturation, were from the HSP family, notably HSP70, HSP90, and gp96 [72]. Later, HMGB1, which is a nuclear protein that binds DNA, was reported as a major DAMP released during ICD that triggers activation of APC by several receptors, such as RAGE, TLR2, TLR4, TLR9, and TIM3 [73,74]. During ICD, ATP is another major DAMP that is released by dying cells and that attracts immune cells by triggering P2Y2 receptors [75] or P2X7 receptors [76]. Furthermore, ATP release during ICD has been shown to play a role in the induction of the antitumor immune response induced by some chemotherapeutic agents [77]. IL-1 β is often considered as a DAMP released during pyroptosis following the activation of the inflammasome and caspase-1 [66]. IL-1 β plays an important role in the inflammatory response.

Oncolytic Measles Viruses and The Induction Of Tumor ICD

Evidence of ICD induction by MV from clinical trials

The induction of immunogenic cell death by oncolytic viruses is probably an important parameter for their efficiency in antitumor virotherapy treatment [1,78,79]. As an example, it has been shown in a phase II clinical trial testing intratumoral injections of a modified oncolytic herpes simplex 1 virus in melanoma patients that tumors distant from the injection sites can regress, notably some visceral metastases [80]. In another phase II trial, injections of the oncolytic JX-594 vaccinia virus into treatment-refractory advanced hepatocellular carcinoma tumors also induced the regression of distant metastases [81]. The authors further showed that such treatment causes neutrophil infiltration into the injected tumor, an antibody response against tumor cells, and evidence of a cytotoxic T-cell response.

In the first phase I clinical trial using oncolytic MV, a positive effect on the antitumor response was reported [48]. In this trial, the Edmonston-Zagreb strain was used to treat five patients with cutaneous T-cell lymphoma. This study showed that intratumoral injections of MV after systemic treatment with IFN- α induced tumor regression in three patients. Interestingly, some regressions of distant lesions where MV was not injected were observed, suggesting that the treatment triggered the activation of an antitumor immune response. Furthermore, in a model of human lymphoma xenografts in immunodeficient mice, the injection of MV has been shown to induce tumor infiltration by activated neutrophils [82]. Altogether, these reports indicate that intratumoral MV injections can stimulate an antitumor immune response.

Interaction of MV infected tumor cells and dendritic cells

Our laboratory and others have been interested in characterizing, in vitro, how MV-infected tumor cells stimulate APC such as DC to induce their capacities to stimulate an adaptive antitumor immune response [22,25,83,84]. We first showed that MV infection of mesothelioma tumor cells induced ICD, in contrast with ultraviolet-B (UV-B) irradiation of tumor cells that undergo a nonimmunogenic cell death [25]. Indeed, MV-infected tumor cells induce the

maturation of monocyte-derived DC, notably by the release of DAMPs such as HSP (HSP70, gp96), whereas apoptotic UV-B-irradiated tumor cells did not stimulate DC. We further showed that DC internalized materials from MV-infected tumor cells, notably tumor antigens such as mesothelin, and induced from naive lymphocytes a T-cell response directed against this tumor antigen. Altogether, these results not only show that MV kills tumor cells, but also that MV induces the release of tumor antigens allowing DC to cross-prime a specific CD8⁺ T-cell response.

In 2011, Donnelly et al. confirmed that MV-infected tumor cells undergo ICD that is able to induce maturation of DC [22]. Furthermore, they identified the immunogenic factors released during ICD. They also showed that DC co-cultured with MV-infected melanoma tumor cells induces cytotoxic T-cell responses against tumor cells. They identified numerous DAMPs and cytokines released by MV-infected tumor cells that make the cell death immunogenic. They showed that MV-infected cells release HMGB1 and numerous inflammatory cytokines, such as type I IFN (IFN- α and IFN- β), IL-6, IL-8, RANTES, and IL-28.

Plasmacytoid DC (pDC) is another type of DC specialized in antiviral immune response. Accumulating evidence suggests that it would be beneficial for cancer patients to stimulate this subset of DC within tumors, as these cells are able to induce an immune response by type I IFN production and antigen presentation, and can exert direct tumoricidal activity [85,86]. Conflicting reports have been published regarding the capacity of attenuated MV strains to stimulate IFN- α production by pDC [87,88]. Duhén et al. reported that attenuated strains of MV induce IFN- α secretion by pDC, whereas Schlender et al. reported that they do not induce this secretion, but on the contrary inhibit it. We explained this discrepancy recently by investigating the activation of pDC in response to MV or MV-infected tumor cells [84]. We showed that pDC exposed to MV without IL-3, a survival factor that is required for in vitro culture of pDC, do not produce IFN- α as reported by Schlender et al. [88], whereas pDC exposed to MV in the presence of IL-3 do produce IFN- α as reported by Duhén et al. [87]. We also observed that pDC exposed to MV-infected tumor cells produce huge amounts of IFN- α due to the triggering of TLR7 in the endosome by MV single-stranded RNA. Finally, we showed that, like monocyte-derived DC, pDC exposed to MV-infected tumor cells are able to internalize and cross-present tumor antigens such as NYESO-1 to CD8⁺ T lymphocytes to induce an antitumor immune response. In contrast, pDC exposed to UV-irradiated tumor cells keep an immature phenotype and are unable to cross-present the tumor antigen. Altogether, these studies show that MV infection of tumor cells induces an ICD that is able to activate tumor antigen cross-presentation function of both myeloid and plasmacytoid DC.

The type of ICD induced by MV

The type of ICD induced by MV infection of tumor cells is not well characterized. It is not yet described whether ICD is associated with ER stress and autophagy, pyroptosis, and/or necroptosis. It is now clear that HMGB1 is released from tumor cells following MV infection [22] (and unpublished personal data). These results suggest that it could be ICD accompanied by ER stress and autophagy or necroptosis. Infection by attenuated MV strains has recently been shown to induce autophagy in several waves [89,90]. The interaction of MV with CD46 receptors induces an early wave of autophagy followed by a second wave dependent on MV replication, and finally a third wave upon syncytium formation [90]. However, it is not clear from this study if

autophagy participates in the induction of apoptosis, since the author states that this sustained autophagy flux is exploited by MV to limit the death of infected cells and to improve viral particle formation. More work is needed to better define which ICD pathways are induced by MV after the infection of tumor cells.

MV is known to trigger the antiviral type I IFN response in nucleated cells [14,91,92]. However, MV has evolved virulence factors, such as the V protein that inhibits type I IFN signaling at the level of STAT1 and STAT2 downstream of the type I IFN receptor, IFNAR [93,94]. The V protein also inhibits MDA5 signaling [95]. Another viral factor, the C protein of MV, blocks type I IFN signaling [96]. In attenuated MV such as Edmonston and Schwarz strains, the V protein carries a mutation that reduces its capacity to inhibit type I IFN signaling [97]. Thus, attenuated strains of MV do not completely inhibit the type I IFN response. Type I IFN produced by infected tumor cells or by pDC exposed to infected cells, can exert a diversity of beneficial effects on the antitumor immune response. IFN- α not only induces an antitumor cytotoxic activity of pDC by an autocrine loop, but can also act directly on tumor cells to induce apoptosis [98]. Type I IFN also play a role in NK activation and are required in a mouse model of NK-cell-dependent tumor rejection [99]. Type I IFN is also known to activate DC and their capacity to induce a cytotoxic T-cell response [100,101]. Thus, the triggering of type I IFN production by MV in infected tumor cells probably participates in the immunogenicity of cell death.

Conclusion

MV is a promising oncolytic virus that is currently being evaluated in phase I/II clinical trials. Its capacity to induce ICD, which probably participates in its oncolytic activity, is now proven. However, more studies are needed to better understand which ICD pathway is induced in tumor cells after infection. Apoptosis induced by oncolytic viruses is very specific to the virus type [1] and may be different from one tumor cell line to another, since these cells accumulate defects in antiviral innate response and apoptosis pathways. Finally, all the studies on MV-induced ICD suggest that it would be of interest to monitor the antitumor immune response after treatment of cancer patients by oncolytic MV to determine its importance in the efficacy of treatment.

Acknowledgement

This work has been supported by « la Ligue Régionale Grand Ouest contre le Cancer (CSIRGO) », « the ARSMESO44 association », « la Fondation du Souffle et le Fonds de Dotation Recherche en Santé Respiratoire », « la Fondation pour la Recherche Médicale (FRM) », and « la Fondation ARC pour la recherche sur le cancer ».

References

1. Russell SJ, Peng KW, Bell JC (2012) Oncolytic virotherapy. *Nat Biotechnol* 30: 658-670.
2. Moss WJ, Griffin DE (2006) Global measles elimination. *Nat Rev Microbiol* 4: 900-908.
3. (2001) Nomenclature for describing the genetic characteristics of wild-type measles viruses (update). *Wkly Epidemiol Rec* 76: 249-251.
4. Bankamp B, Takeda M, Zhang Y, Xu W, Rota PA (2011) Genetic characterization of measles vaccine strains. *J Infect Dis* 204 Suppl 1: S533-548.
5. Hsu EC, Iorio C, Sarangi F, Khine AA, Richardson CD (2001) CDw150(SLAM) is a receptor for a lymphotropic strain of measles virus

- and may account for the immunosuppressive properties of this virus. *Virology* 279: 9-21.
6. Tatsuo H, Ono N, Tanaka K, Yanagi Y (2000) SLAM (CDw150) is a cellular receptor for measles virus. *Nature* 406: 893-897.
 7. Bluming AZ, Ziegler JL (1971) Regression of Burkitt's lymphoma in association with measles infection. *Lancet* 2: 105-106.
 8. Pasquinucci G (1971) Possible effect of measles on leukaemia. *Lancet* 1: 136.
 9. Zygiert Z (1971) Hodgkin's disease: remissions after measles. *Lancet* 1: 593.
 10. Ziegler JL (1976) Spontaneous remission in Burkitt's lymphoma. *Natl Cancer Inst Monogr* 44: 61-65.
 11. Parrula C, Fernandez SA, Zimmerman B, Lairmore M, Niewiesk S (2011) Measles virotherapy in a mouse model of adult T-cell leukaemia/lymphoma. *J Gen Virol* 92: 1458-1466.
 12. Grote D, Russell SJ, Cornu TI, Cattaneo R, Vile R, et al. (2001) Live attenuated measles virus induces regression of human lymphoma xenografts in immunodeficient mice. *Blood* 97: 3746-3754.
 13. Peng KW, Ahmann GJ, Pham L, Greipp PR, Cattaneo R, et al. (2001) Systemic therapy of myeloma xenografts by an attenuated measles virus. *Blood* 98: 2002-2007.
 14. Berchtold S, Lampe J, Weiland T, Smirnow I, Schleicher S, et al. (2013) Innate immune defense defines susceptibility of sarcoma cells to measles vaccine virus-based oncolysis. *J Virol* 87: 3484-3501.
 15. Penheiter AR, Wegman TR, Classic KL, Dingli D, Bender CE, et al. (2010) Sodium iodide symporter (NIS)-mediated radiovirotherapy for pancreatic cancer. *AJR Am J Roentgenol* 195: 341-349.
 16. Phuon LK, Allen C, Peng KW, Giannini C, Greiner S, et al. (2003) Use of a vaccine strain of measles virus genetically engineered to produce carcinoembryonic antigen as a novel therapeutic agent against glioblastoma multiforme. *Cancer Res* 63: 2462-2469.
 17. Allen C, Opyrchal M, Aderca I, Schroeder MA, Sarkaria JN, et al. (2013) Oncolytic measles virus strains have significant antitumor activity against glioma stem cells. *Gene Ther* 20: 444-449.
 18. Peng KW, TenEyck CJ, Galanis E, Kalli KR, Hartmann LC, et al. (2002) Intraperitoneal therapy of ovarian cancer using an engineered measles virus. *Cancer Res* 62: 4656-4662.
 19. Iankov ID, Msaouel P, Allen C, Federspiel MJ, Bulur PA, Dietz AB et al. (2010) Demonstration of anti-tumor activity of oncolytic measles virus strains in a malignant pleural effusion breast cancer model. *Breast Cancer Res Treat* 122: 745-754.
 20. Sugiyama T, Yoneda M, Kuraishi T, Hattori S, Inoue Y, et al. (2013) Measles virus selectively binds to signaling lymphocyte activation molecule as a novel oncolytic virus for breast cancer treatment. *Gene Ther* 20: 338-347.
 21. McDonald CJ, Erlichman C, Ingle JN, Rosales GA, Allen C, et al. (2006) A measles virus vaccine strain derivative as a novel oncolytic agent against breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 99: 177-184.
 22. Donnelly OG, Errington-Mais F, Steele L, Hadac E, Jennings V, et al. (2013) Measles virus causes immunogenic cell death in human melanoma. *Gene Ther* 20: 7-15.
 23. Meng X, Nakamura T, Okazaki T, Inoue H, Takahashi A, et al. (2010) Enhanced antitumor effects of an engineered measles virus Edmonston strain expressing the wild-type N, P, L genes on human renal cell carcinoma. *Mol Ther* 18: 544-551.
 24. Li H, Peng KW, Dingli D, Kratzke RA, Russell SJ (2010) Oncolytic measles viruses encoding interferon beta and the thyroidal sodium iodide symporter gene for mesothelioma virotherapy. *Cancer Gene Ther* 17: 550-558.
 25. Gauvrit A, Brandler S, Sapède-Pérez C, Boisgerault N, Tangy F, et al. (2008) Measles virus induces oncolysis of mesothelioma cells and allows dendritic cells to cross-prime tumor-specific CD8 response. *Cancer Res* 68: 4882-4892.
 26. Hutzen B, Pierson CR, Russell SJ, Galanis E, Raffel C, et al. (2012) Treatment of medulloblastoma using an oncolytic measles virus encoding the thyroidal sodium iodide symporter shows enhanced efficacy with radioiodine. *BMC Cancer* 12: 508.
 27. Studebaker AW, Kreofsky CR, Pierson CR, Russell SJ, Galanis E, et al. (2010) Treatment of medulloblastoma with a modified measles virus. *Neuro Oncol* 12: 1034-1042.
 28. Zhang SC, Wang WL, Cai WS, Jiang KL, Yuan ZW (2012) Engineered measles virus Edmonston strain used as a novel oncolytic viral system against human hepatoblastoma. *BMC Cancer* 12: 427.
 29. Boisgerault N, Guillerme JB, Pouliquen D, Mesel-Lemoine M, Achard C, et al. (2013) Natural oncolytic activity of live-attenuated measles virus against human lung and colorectal adenocarcinomas. *Biomed Res Int* 2013: 387362.
 30. Anderson BD, Nakamura T, Russell SJ, Peng KW (2004) High CD46 receptor density determines preferential killing of tumor cells by oncolytic measles virus. *Cancer Res* 64: 4919-4926.
 31. Dörig RE, Marcil A, Chopra A, Richardson CD (1993) The human CD46 molecule is a receptor for measles virus (Edmonston strain). *Cell* 75: 295-305.
 32. Naniche D, Varior-Krishnan G, Cervoni F, Wild TF, Rossi B, et al. (1993) Human membrane cofactor protein (CD46) acts as a cellular receptor for measles virus. *J Virol* 67: 6025-6032.
 33. Fishelson Z, Donin N, Zell S, Schultz S, Kirschfink M (2003) Obstacles to cancer immunotherapy: expression of membrane complement regulatory proteins (mCRPs) in tumors. *Mol Immunol* 40: 109-123.
 34. Ravindranath NM, Shuler C (2006) Expression of complement restriction factors (CD46, CD55 & CD59) in head and neck squamous cell carcinomas. *J Oral Pathol Med* 35: 560-567.
 35. Noyce RS, Bondre DG, Ha MN, Lin LT, Sisson G, et al. (2011) Tumor cell marker PVRL4 (nectin 4) is an epithelial cell receptor for measles virus. *PLoS Pathog* 7: e1002240.
 36. Mühlebach MD, Mateo M, Sinn PL, Prüfer S, Uhlig KM, et al. (2011) Adherens junction protein nectin-4 is the epithelial receptor for measles virus. *Nature* 480: 530-533.
 37. Racaniello V (2011) *Virology*. An exit strategy for measles virus. *Science* 334: 1650-1651.
 38. Derycke MS, Pambuccian SE, Gilks CB, Kalloger SE, Ghidouche A, et al. (2010) Nectin 4 overexpression in ovarian cancer tissues and serum: potential role as a serum biomarker. *Am J Clin Pathol* 134: 835-845.
 39. Takano A, Ishikawa N, Nishino R, Masuda K, Yasui W, et al. (2009) Identification of nectin-4 oncoprotein as a diagnostic and therapeutic target for lung cancer. *Cancer Res* 69: 6694-6703.
 40. Fabre-Lafay S, Garrido-Urbani S, Reymond N, Gonçalves A, Dubreuil P, et al. (2005) Nectin-4, a new serological breast cancer marker, is a substrate for tumor necrosis factor- α -converting enzyme (TACE)/ADAM-17. *J Biol Chem* 280: 19543-19550.
 41. Patel MR, Jacobson BA, Belgum H, Raza A, Sadiq A, et al. (2014) Measles vaccine strains for virotherapy of non-small-cell lung carcinoma. *J Thorac Oncol* 9: 1101-1110.
 42. Noll M, Berchtold S, Lampe J, Malek NP, Bitzer M, et al. (2013) Primary resistance phenomena to oncolytic measles vaccine viruses. *Int J Oncol* 43: 103-112.
 43. Ivashkiv LB, Donlin LT (2014) Regulation of type I interferon responses. *Nat Rev Immunol* 14: 36-49.
 44. Mitchell PS, Emerman M, Malik HS (2013) An evolutionary perspective on the broad antiviral specificity of MxA. *Curr Opin Microbiol* 16: 493-499.
 45. Katsoulidis E, Kaur S and Plataniias LC (2010) Deregulation of interferon signaling in malignant cells. *Pharmaceuticals* 3: 406-418.
 46. Leonova KI, Brodsky L, Lipchick B, Pal M, Novototskaya L, et al. (2013) p53 cooperates with DNA methylation and a suicidal interferon response to maintain epigenetic silencing of repeats and noncoding RNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: E89-98.
 47. Lievano F, Galea SA, Thornton M, Wiedmann RT, Manoff SB, et al. (2012) Measles, mumps, and rubella virus vaccine (M-M-R_a, $\pm$ II): a

- review of 32 years of clinical and postmarketing experience. *Vaccine* 30: 6918-6926.
48. Heinzerling L, Künzi V, Oberholzer PA, Kündig T, Naim H, et al. (2005) Oncolytic measles virus in cutaneous T-cell lymphomas mounts antitumor immune responses in vivo and targets interferon-resistant tumor cells. *Blood* 106: 2287-2294.
49. Galanis E, Hartmann LC, Cliby WA, Long HJ, Peethambaram PP, et al. (2010) Phase I trial of intraperitoneal administration of an oncolytic measles virus strain engineered to express carcinoembryonic antigen for recurrent ovarian cancer. *Cancer Res* 70: 875-882.
50. Russell SJ, Federspiel MJ, Peng KW, Tong C, Dingli D, et al. (2014) Remission of disseminated cancer after systemic oncolytic virotherapy. *Mayo Clin Proc* 89: 926-933.
51. Janeway C (1989) Immunogenicity signals 1,2,3 ... and 0. *Immunol Today* 10: 283-286.
52. Kawasaki T, Kawai T (2014) Toll-like receptor signaling pathways. *Front Immunol* 5: 461.
53. Matzinger P (1994) Tolerance, danger, and the extended family. *Annu Rev Immunol* 12: 991-1045.
54. Seong SY, Matzinger P (2004) Hydrophobicity: an ancient damage-associated molecular pattern that initiates innate immune responses. *Nat Rev Immunol* 4: 469-478.
55. Guo ZS, Liu ZI, Bartlett DL (2014) Oncolytic Immunotherapy: Dying the Right Way is a Key to Eliciting Potent Antitumor Immunity. *Front Oncol* 4: 74.
56. Casares N, Pequignot MO, Tesniere A, Ghiringhelli F, Roux S, et al. (2005) Caspase-dependent immunogenicity of doxorubicin-induced tumor cell death. *J Exp Med* 202: 1691-1701.
57. Golden EB, Pellicciotta I, Demaria S, Barcellos-Hoff MH, Formenti SC (2012) The convergence of radiation and immunogenic cell death signaling pathways. *Front Oncol* 2: 88.
58. Brusa D, Migliore E, Garetto S, Simone M, Matera L (2009) Immunogenicity of 56 degrees C and UVC-treated prostate cancer is associated with release of HSP70 and HMGB1 from necrotic cells. *Prostate* 69: 1343-1352.
59. Fucikova J, Moserova I, Truxova I, Hermanova I, Vancurova I, et al. (2014) High hydrostatic pressure induces immunogenic cell death in human tumor cells. *Int J Cancer* 135: 1165-1177.
60. Massé D, Ebstein F, Bougras G, Harb J, Meflah K, et al. (2004) Increased expression of inducible HSP70 in apoptotic cells is correlated with their efficacy for antitumor vaccine therapy. *Int J Cancer* 111: 575-583.
61. Shi H, Cao T, Connolly JE, Monnet L, Bennett L, et al. (2006) Hyperthermia enhances CTL cross-priming. *J Immunol* 176: 2134-2141.
62. Scaffidi P, Misteli T, Bianchi ME (2002) Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature* 418: 191-195.
63. Inoue H, Tani K (2014) Multimodal immunogenic cancer cell death as a consequence of anticancer cytotoxic treatments. *Cell Death Differ* 21: 39-49.
64. Kepp O, Menger L, Vacchelli E, Locher C, Adjemian S, et al. (2013) Crosstalk between ER stress and immunogenic cell death. *Cytokine Growth Factor Rev* 24: 311-318.
65. Ma Y, Galluzzi L, Zitvogel L, Kroemer G (2013) Autophagy and cellular immune responses. *Immunity* 39: 211-227.
66. Lamkanfi M, Dixit VM (2014) Mechanisms and functions of inflammasomes. *Cell* 157: 1013-1022.
67. Zou J, Kawai T, Tsuchida T, Kozaki T, Tanaka H, et al. (2013) Poly IC triggers a cathepsin D- and IPS-1-dependent pathway to enhance cytokine production and mediate dendritic cell necroptosis. *Immunity* 38: 717-728.
68. Kaczmarek A, Vandenabeele P, Krysko DV (2013) Necroptosis: the release of damage-associated molecular patterns and its physiological relevance. *Immunity* 38: 209-223.
69. Ahrens S, Zelenay S, Sancho D, HanĀ P, KĳĀr S, et al. (2012) F-actin is an evolutionarily conserved damage-associated molecular pattern recognized by DNGR-1, a receptor for dead cells. *Immunity* 36: 635-645.
70. Kepp O, Gdoura A, Martins I, Panaretakis T, Schlemmer F, et al. (2010) Lysyl tRNA synthetase is required for the translocation of calreticulin to the cell surface in immunogenic death. *Cell Cycle* 9: 3072-3077.
71. Obeid M, Tesniere A, Ghiringhelli F, Fimia GM, Apetoh L, et al. (2007) Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. *Nat Med* 13: 54-61.
72. Parmiani G, Testori A, Maio M, Castelli C, Rivoltini L, et al. (2004) Heat shock proteins and their use as anticancer vaccines. *Clin Cancer Res* 10: 8142-8146.
73. Apetoh L, Ghiringhelli F, Tesniere A, Obeid M, Ortiz C, et al. (2007) Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Nat Med* 13: 1050-1059.
74. Sims GP, Rowe DC, Rietdijk ST, Herbst R, Coyle AJ (2010) HMGB1 and RAGE in inflammation and cancer. *Annu Rev Immunol* 28: 367-388.
75. Elliott MR, Chekeni FB, Trampont PC, Lazarowski ER, Kadl A, et al. (2009) Nucleotides released by apoptotic cells act as a find-me signal to promote phagocytic clearance. *Nature* 461: 282-286.
76. Martins I, Tesniere A, Kepp O, Michaud M, Schlemmer F, et al. (2009) Chemotherapy induces ATP release from tumor cells. *Cell Cycle* 8: 3723-3728.
77. Michaud M, Martins I, Sukkurwala AQ, Adjemian S, Ma Y, et al. (2011) Autophagy-dependent anticancer immune responses induced by chemotherapeutic agents in mice. *Science* 334: 1573-1577.
78. Boisgerault N, Tangy F, Gregoire M (2010) New perspectives in cancer virotherapy: bringing the immune system into play. *Immunotherapy* 2: 185-199.
79. Vacchelli E, Eggermont A, Sautès-Fridman C, Galon J, Zitvogel L, et al. (2013) Trial watch: Oncolytic viruses for cancer therapy. *Oncoimmunology* 2: e24612.
80. Senzer NN, Kaufman HL, Amatruda T, Nemunaitis M, Reid T, et al. (2009) 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* 27: 5763-5771.
81. Heo J, Reid T, Ruo L, Breitbach CJ, Rose S, et al. (2013) Randomized dose-finding clinical trial of oncolytic immunotherapeutic vaccinia JX-594 in liver cancer. *Nat Med* 19: 329-336.
82. Grote D, Cattaneo R and Fielding AK (2003) Neutrophils contribute to the measles virus-induced antitumor effect: enhancement by granulocyte macrophage colony-stimulating factor expression. *Cancer Res* 63: 6463-6468.
83. Fonteneau JF, Guillerme JB, Tangy F, Grégoire M (2013) Attenuated measles virus used as an oncolytic virus activates myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *Oncoimmunology* 2: e24212.
84. Guillerme JB, Boisgerault N, Roulois D, Menager J, Combredet C, et al. (2013) Measles virus vaccine-infected tumor cells induce tumor antigen cross-presentation by human plasmacytoid dendritic cells. *Clin Cancer Res* 19: 1147-1158.
85. Tel J and de Vries IJ (2012) Potential applications for plasmacytoid dendritic cells in cancer immunotherapy. *Immunotherapy* 4: 979-982.
86. Tel J, Anguille S, Waterborg CE, Smits EL, Figdor CG, et al. (2014) Tumoricidal activity of human dendritic cells. *Trends Immunol* 35: 38-46.
87. Duhon T, Herschke F, Azocar O, Druelle J, Plumet S, et al. (2010) Cellular receptors, differentiation and endocytosis requirements are key factors for type I IFN response by human epithelial, conventional and plasmacytoid dendritic infected cells by measles virus. *Virus Res* 152: 115-125.
88. Schlender J, Hornung V, Finke S, Günthner-Biller M, Marozin S, et al. (2005) Inhibition of toll-like receptor 7- and 9-mediated alpha/beta interferon production in human plasmacytoid dendritic cells by respiratory syncytial virus and measles virus. *J Virol* 79: 5507-5515.
89. Joubert PE, Meiffren G, Grégoire IP, Pontini G, Richetta C, et al. (2009) Autophagy induction by the pathogen receptor CD46. *Cell Host Microbe* 6: 354-366.

90. Richetta C, Grégoire IP, Verlhac P, Azocar O, Baguet J, et al. (2013) Sustained autophagy contributes to measles virus infectivity. *PLoS Pathog* 9: e1003599.
91. Delpout S, Noyce RS, Siu RW, Richardson CD (2012) Host factors and measles virus replication. *Curr Opin Virol* 2: 773-783.
92. Naik S, Russell SJ (2009) Engineering oncolytic viruses to exploit tumor specific defects in innate immune signaling pathways. *Expert Opin Biol Ther* 9: 1163-1176.
93. Caignard G, Bouraï M, Jacob Y; Infection-MAPping project I-MAP, Tangy F, Vidalain PO (2009) Inhibition of IFN-alpha/beta signaling by two discrete peptides within measles virus V protein that specifically bind STAT1 and STAT2. *Virology* 383: 112-120.
94. Caignard G, Guerbois M, Labernardière JL, Jacob Y, Jones LM; Infectious Mapping Project I-MAP, et al. (2007) Measles virus V protein blocks Jak1-mediated phosphorylation of STAT1 to escape IFN-alpha/beta signaling. *Virology* 368: 351-362.
95. Andrejeva J, Childs KS, Young DF, Carlos TS, Stock N, et al. (2004) The V proteins of paramyxoviruses bind the IFN-inducible RNA helicase, mda-5, and inhibit its activation of the IFN-beta promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 17264-17269.
96. Shaffer JA, Bellini WJ, Rota PA (2003) The C protein of measles virus inhibits the type I interferon response. *Virology* 315: 389-397.
97. Ohno S, Ono N, Takeda M, Takeuchi K, Yanagi Y (2004) Dissection of measles virus V protein in relation to its ability to block alpha/beta interferon signal transduction. *J Gen Virol* 85: 2991-2999.
98. Thyrell L, Erickson S, Zhivotovsky B, Pokrovskaja K, Sangfelt O, et al. (2002) Mechanisms of Interferon-alpha induced apoptosis in malignant cells. *Oncogene* 21: 1251-1262.
99. Swann JB, Hayakawa Y, Zerafa N, Sheehan KC, Scott B, et al. (2007) Type I IFN contributes to NK cell homeostasis, activation, and antitumor function. *J Immunol* 178: 7540-7549.
100. Diamond MS, Kinder M, Matsushita H, Mashayekhi M, Dunn GP, et al. (2011) Type I interferon is selectively required by dendritic cells for immune rejection of tumors. *J Exp Med* 208: 1989-2003.
101. Fuertes MB, Kacha AK, Kline J, Woo SR, Kranz DM, et al. (2011) Host type I IFN signals are required for antitumor CD8+ T cell responses through CD8{alpha}+ dendritic cells. *J Exp Med* 208: 2005-2016.

Contribution aux Annexes n°4 à 6

Au cours de ma thèse, j'ai participé à la réalisation d'autres projets en collaboration.

Annexe n°4: Natural oncolytic activity of live-attenuated measles virus against human lung and colorectal adenocarcinomas. Biomed Res Int, 2013

J'ai effectué des expériences complémentaires demandées pour la révision de l'article de Nicolas Boisgerault, doctorant dans l'équipe qui était parti du laboratoire pour son post-doctorat. Nicolas étudiait la sensibilité au MV de lignées d'adénocarcinomes pulmonaire et colorectal et avait donc mesuré à la surface de différentes lignées l'expression des récepteurs au MV CD46 et CD150. Il lui a été ensuite demandé par les reviewers de mesurer l'expression de Nectin-4 à la surface des cellules tumorales, protéine nouvellement identifiée comme étant un récepteur du MV. J'ai donc analysé l'expression de Nectin-4 par les lignées d'adénocarcinomes pulmonaire et colorectal utilisées dans l'étude (Annexe n°4, Figure 2).

Annexe n°5: Human natural killer cells promote cross-presentation of tumor cell-derived antigens by dendritic cells. Int J Cancer, 2015

J'ai réalisé des expériences dans le cadre d'une collaboration avec Florence Deauvieux et Jenny Valladeau-Guilemond dans l'équipe de Christophe Caux à Lyon. Ils démontraient dans leur étude que les cellules NK humaines, grâce à leur production de TNF- α et d'IFN- γ , favorisent la présentation croisée d'antigène par les cellules dendritiques myéloïdes. Cependant, ils utilisaient dans leur modèle un antigène transfecté dans des cellules, dont l'expression n'est donc pas physiologique. Pour la révision de leur article, il leur a été demandé de démontrer ce résultat à partir d'un antigène endogène spontanément exprimé. J'ai donc utilisé le modèle de présentation croisée de l'antigène de tumeur NY-ESO-1 développé dans l'équipe par Jean-Baptiste Guillaume (Guillaume JB, Clin Cancer Res, 2013) en utilisant un clone de lymphocyte T CD8⁺ spécifique du complexe HLA-A*0201/NY-ESO-1(157-165). J'ai mesuré la capacité de présentation croisée des DC dérivées de monocytes (Mo-DC) HLA-A*0201⁺ exposées à des cellules tumorales HLA-A*0201⁻ et NY-ESO-1⁺ infectées par le MV, en présence de TNF- α et d'IFN- γ . J'ai pu ainsi démontrer que le TNF- α et l'IFN- γ favorisent la présentation croisée d'antigènes endogènes dans notre modèle (Annexe n°5, Figure 4c).

Annexe n°6: Angiogenesis stimulated by human kallikrein-related peptidase 12 acting via a platelet-derived growth factor B-dependent paracrine pathway. FASEB J, 2014

J'ai participé à la finalisation du projet de Thomas Kryza dans l'équipe de Nathalie Heuzé-Vourc'h à Tours. Leur étude démontrait qu'une kallicréine KLK12 convertit le PDGF-B (platelet-derived growth factor B), normalement associé à la matrice extracellulaire et aux membranes, en forme soluble responsable de la sécrétion de VEGF-A (vascular endothelial growth factor A) par les cellules stromales telles que les fibroblastes pulmonaires, favorisant l'angiogenèse. Il était intéressant d'identifier la cause de la surexpression de KLK12 par les cellules tumorales. J'ai ainsi cultivé des cellules épithéliales saines, des cellules endothéliales et des lignées de cancer pulmonaire en conditions classiques ou hypoxiques, grâce à une hotte à hypoxie présente dans notre unité de recherche à Nantes. J'ai ensuite récupéré les surnageants de culture et extrait les ARN et les protéines pour envoyer les échantillons à analyser à Tours. Il a été démontré que la culture des cellules en conditions hypoxiques favorise l'expression de KLK12 par les cellules tumorales ainsi que le PDGF-B sous forme soluble (Annexe n°6, Figure 6).

Research Article

Natural Oncolytic Activity of Live-Attenuated Measles Virus against Human Lung and Colorectal Adenocarcinomas

Nicolas Boisgerault,^{1,2,3} Jean-Baptiste Guillaume,^{1,2,3} Daniel Pouliquen,^{1,2,3}
Mariana Mesel-Lemoine,⁴ Carole Achard,^{1,2,3} Chantal Combredet,⁴
Jean-François Fonteneau,^{1,2,3} Frédéric Tangy,⁴ and Marc Grégoire^{1,2,3}

¹ INSERM, UMR892, 44000 Nantes, France

² CNRS, UMR6299, 44000 Nantes, France

³ Université de Nantes, 44000 Nantes, France

⁴ Unité de Génomique Virale et Vaccination, CNRS-URA 3015, Institut Pasteur, 75015 Paris, France

Correspondence should be addressed to Marc Grégoire; marc.gregoire@nantes.inserm.fr

Received 11 October 2012; Revised 30 December 2012; Accepted 14 January 2013

Academic Editor: Changqing Su

Copyright © 2013 Nicolas Boisgerault et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Lung and colorectal cancers are responsible for approximately 2 million deaths each year worldwide. Despite continual improvements, clinical management of these diseases remains challenging and development of novel therapies with increased efficacy is critical to address these major public health issues. Oncolytic viruses have shown promising results against cancers that are resistant to conventional anticancer therapies. Vaccine strains of measles virus (MV) exhibit such natural antitumor properties by preferentially targeting cancer cells. We tested the ability of live-attenuated Schwarz strain of MV to specifically infect tumor cells derived from human lung and colorectal adenocarcinomas and demonstrated that live-attenuated MV exhibits oncolytic properties against these two aggressive neoplasms. We also showed that Schwarz MV was able to prevent uncontrollable growth of large, established lung and colorectal adenocarcinoma xenografts in nude mice. Moreover, MV oncolysis is associated with *in vivo* activation of caspase-3 in colorectal cancer model, as shown by immunohistochemical staining. Our results provide new arguments for the use of MV as an antitumor therapy against aggressive human malignancies.

1. Introduction

Lung and colorectal cancers are leading causes of death worldwide with approximately 1.6 million and 1.2 million new cases per year resulting in 1.4 million and 610,000 estimated deaths, respectively [1]. In developed countries, lung cancers rank first for males and second for females in overall cancer-related deaths while colorectal cancers rank second for male and third for female. These cancers are found to be extremely resistant to conventional therapies including surgery, chemotherapy, and radiotherapy with a 5-year survival of only 15% and 50%, respectively.

Difficult clinical management of these two malignancies makes them ideal candidates for development of alternative approaches such as cancer virotherapy [2–5]. Live-attenuated vaccinal strains of measles virus (MV) are of particular

interest due to their ability to specifically target different types of human tumors [6, 7] through recognition of the CD46 membrane complement regulatory molecule [8, 9] which is frequently overexpressed on cancer cells [10]. Oncolytic viruses are also powerful inducers of tumor cell death and thus could help to cure cancers that are refractory to conventional treatments. Furthermore, in addition to inducing cell death, the infection of tumor cells by MV is able to activate components of the antitumor immune response, such as myeloid and plasmacytoid dendritic cells, that may play a role in the efficacy of cancer virotherapy [6, 11].

Several Phase I clinical trials targeting different cancers with MV virotherapy are in progress and two of them have been published. In the initial Phase I clinical trial, intratumoral injection of low doses of MV into five patients with cutaneous-T-cell-lymphoma, patients induced stabilization

of the disease in two patients and a partial response in one [12]. The authors of the second published Phase I clinical trial, carried out in patients with refractory ovarian cancers [13], noticed a dose-dependent biological activity of oncolytic MV. They also reported that the treatment was well tolerated, thus confirming previous reports that demonstrated the safety of using live-attenuated vaccinal strains of MV in the clinical setting.

Sparse data from the literature show that wild-type MV is able to infect some human lung and colorectal adenocarcinoma cells [14, 15]. MV fusogenic membrane glycoproteins by themselves were also demonstrated to improve treatment of human colorectal cancer xenografts when used in combination with chemotherapy or virotherapy [16]. Moreover, urokinase receptor-retargeted MV was shown to display oncolytic activity against murine colorectal cancer cells *in vivo* [17]. However, whereas MV virotherapy has been tested against a wide variety of human cancers, no comprehensive work has been achieved until now to investigate how oncolytic strains of MV target human lung and colorectal adenocarcinomas.

To our knowledge, we demonstrate here for the first time that live-attenuated Schwarz vaccinal strain of MV is able to specifically infect and kill tumor cells derived from human lung and colorectal adenocarcinomas, both *in vitro* and *in vivo* against large tumor burdens. Specifically, these oncolytic properties are associated with *in vivo* activation of caspase-3. Altogether, our results confirm the ability of oncolytic MV to target aggressive neoplasms and thus provide new perspectives for the treatment of two major malignancies.

2. Materials and Methods

2.1. Cell Culture. ADK3, ADK117, and ADK153 lung adenocarcinoma cell lines were established in our laboratory from pleural effusions collected by thoracocentesis of cancer patients, with their informed consent, and genetically characterized [18]. The A549 lung adenocarcinoma, Caco-2, HT29, SW480, and SW620 colorectal adenocarcinoma cell lines were purchased from ATCC. All cell lines were maintained in RPMI-1640 medium (Gibco-Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated fetal calf serum (PAA Laboratories, Les Mureaux, France), 2 mM L-glutamine, 100 U/mL penicillin, and 100 µg/mL streptomycin (all purchased from Gibco). Normal bronchial epithelial cells (BEC) were obtained from a healthy lung graft (Dr Magnan, INSERM UMR 915, Nantes) and cultured in CnT-17 medium (CELLnTEC, Switzerland). Cells were cultured at 37°C in a humidified, 5% CO₂ atmosphere and were routinely checked for *Mycoplasma* contamination by PCR.

2.2. In Vitro Measles Virus Infection. Live-attenuated Schwarz vaccinal strain of measles virus recombinant for enhanced green fluorescent protein (MV-eGFP) was produced as previously described [19] and titrated on Vero cells (TCID₅₀/mL). *In vitro* infections were performed at MOI = 1.0 TCID₅₀ for 2 h at 37°C. Viral inoculum was then replaced by

fresh culture medium with no further renewal during the experiments.

2.3. Time-Lapse Microscopy. All experiments were performed at the Cellular and Tissular Imaging Core Facility (MicroPICell, IFR26, Nantes, France) using a Leica DMI6000B station. Images were acquired every 15 min for 72 hours with MetaMorph Microscopy Automation & Image Analysis Software (Molecular Devices) and further treated with ImageJ (National Institute of Health).

2.4. Cell Death Analysis. Percentages of dying cells were determined 3 days after infection using the Apoptosis Detection Kit (BD Biosciences) following manufacturer's instructions. Briefly, cells were double stained with annexin-V-FITC and propidium iodide (PI) for 15 min and analyzed by flow cytometry within 1 hour.

2.5. Flow Cytometry. Cells were incubated for 30 min with FITC-conjugated anti-CD46, PE-conjugated anti-CD150/SLAM (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France), or PE-conjugated anti-Nectin-4 (R&D Systems Europe, Lille, France) antibodies in PBS/0.1% BSA for extracellular staining. Cells were then washed 3 times with PBS before analysis by flow cytometry (FACSCalibur, BD Biosciences).

2.6. Animal Model and In Vivo Experiments. All *in vivo* experiments complied with European Union regulations on the welfare and use of animals in cancer research. Six-week-old female *RJ:NMRi-nu* nude mice were purchased from Centre d'Élevage Janvier (Le Genest-Saint-Isle, France). Mice were challenged subcutaneously with 10⁶ tumor cells in the left flank. When volumes reached approximately 150–200 mm³ for Caco-2 or 100 mm³ for A549, MV-eGFP (1.5 × 10⁷ TCID₅₀) or saline buffer (PBS) was injected intratumorally (50 µL). Tumors were measured twice weekly with a microcaliper and tumor volumes were calculated using the (length² × breadth)/2 formula. Animals were sacrificed when tumors reached 1–2 cm³ in volume. Tumors were then harvested, fixed in 4% paraformaldehyde (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, USA) and embedded in paraffin wax.

2.7. Immunohistochemistry. Immunohistochemical stainings were performed by the MicroPICell core facility with a Bond Max automaton (Menarini, Rungis, France). Briefly, paraffin-embedded tumor slides were incubated in a demasking citrate buffer (pH = 6.0) before blocking of endogenous peroxidase for 5 min. Slides were then incubated for 1 h with a polyclonal, rabbit antiactive-caspase-3 antibody (Abcam, Paris, France) diluted to 1:50 and subsequently with Histofine Rabbit-to-Mouse secondary antibody (Nichirei Biosciences, Tokyo, Japan). After 10 min 3,3'-Diaminobenzidine (DAB) incubation, tumors were counterstained with hematoxylin. Slides were analyzed using a Leica DM2500 microscope coupled to a Leica DCF295 camera. Images were acquired with Leica Application Suite Version 3 software.

2.8. Statistical Analyses. One-sided, unpaired Mann-Whitney *t*-test was used to compare groups in the *in vivo*

experiments. Differences were considered significant when $*P < 0.05$ or $**P < 0.01$. All data are presented as mean $\pm$ SEM.

3. Results

3.1. Human Adenocarcinoma Cells Are Efficiently Infected by MV. Cancer cells derived from human lung and colorectal adenocarcinomas were first infected with live-attenuated Schwarz strain of MV recombinant for EGFP (MV-eGFP) to test their sensitivity to oncolytic MV. We infected four different colorectal adenocarcinoma cell lines and showed that they were all susceptible to MV infection (Figure 1(a)). Whereas SW480 and metastatic SW620 cells showed high infection yield after 3 days with 87% and 93% of cells infected, respectively, we observed less EGFP⁺ HT29 (51%) and Caco-2 (37%) cells at the same time point. To determine how MV infection spreads in these two cell lines, we further analyzed MV infection by time-lapse microscopy. In Caco-2 culture, infection progressed slowly despite tight cell interactions and typical syncytia formation resulting from fusion of infected tumor cells with neighboring cells (Figures 1(b) and S1). On the other hand, HT29 cells underwent a rapid oncolytic process with infected cells dying shortly after infection (not shown). We observed with fluorescent microscopy that HT29 cell death resulted in the release of EGFP in the extracellular medium, especially at 72 h, thus lowering the amount of EGFP⁺ cells determined by flow cytometry (not shown).

We also tested oncolytic properties of MV against one commercial (A549) and three (ADK3, ADK117, and ADK153) lung adenocarcinoma cell lines obtained in our laboratory. These cell lines exhibited heterogeneous infection rates following exposure to MV-eGFP. While A549 and ADK153 cells were efficiently infected with 88% and 65% EGFP⁺ cells after 72 h, respectively, infection spread slowly in ADK3 cells with only 29% of infected cells at the same time (Figure 1(a)). ADK117 cells were found to be resistant to infection with only 6% of infected cells at 72 h after infection. Time-lapse experiments confirmed efficient infection of A549 cells by MV, even though only minimal syncytia formation was observed (Figures 1(b) and S2). On the contrary, normal bronchial epithelial cells (BEC) were not infected by MV (0.4% at 72 h, MOI = 1, data not shown). Thus, our results show that 4 out of 4 colorectal and 3 out of 4 lung adenocarcinoma tested cell lines, but not normal epithelial cells, are sensitive to live-attenuated MV infection.

3.2. MV Induces Cell Death of Infected Lung and Colorectal Cancer Cells. To further investigate oncolytic properties of MV against lung and colorectal cancer cells, we studied the ability of the virus to induce death of the infected cells. We initially characterized MV-related cytopathic effects by fluorescence microscopy. As expected, MV infection induced the formation of giant, multinucleated cells, namely, syncytia, in colorectal adenocarcinoma cells (Figures 1(b) and S1). Ultimately, MV infection caused detachment of MV-induced syncytia from the plate support, thereby demonstrating the induction of tumor cell death by MV infection. Infected

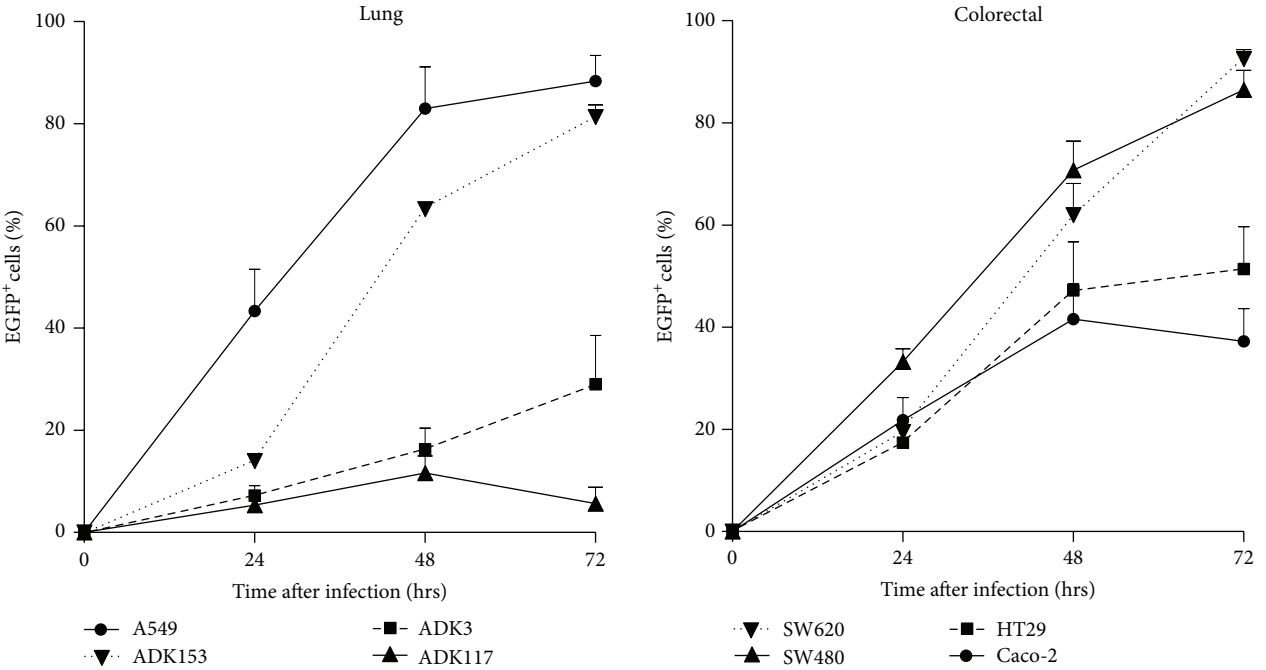
A549 lung adenocarcinoma cells only formed small syncytia resulting from fusion of two to five tumor cells, though these cells were eventually driven to apoptotic-like cell death, as shown by consistent observations of plasma membrane blebbing (Figures 1(b) and S2).

To better characterize the cell death induced after MV infection, we performed annexin-V/propidium iodide double staining (Figure 1(c)). Oncolytic MV infection efficiently induced cell death in A549, ADK153, Caco-2, HT29, SW480, and metastatic SW620 cells as shown by a substantial increase of annexin-V⁺ cell percentages compared to uninfected cells. Conversely, death induction in ADK3 and ADK117 cells was minimal, consistent with the relatively low infection rates observed in previous experiments (Figure 1(a)). Thus, analysis of cell death induction demonstrates that oncolytic MV effectively kills infected cancer cells derived from human lung and colorectal adenocarcinomas through an apoptotic-like process.

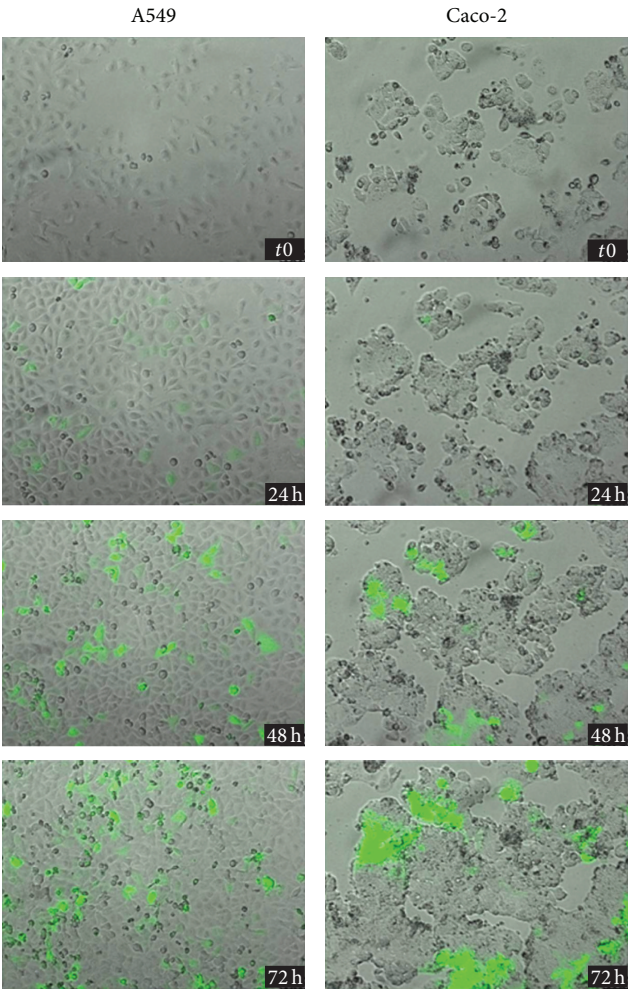
3.3. CD46 Is Highly Expressed in Lung and Colorectal Cancer Cell Lines. Despite recent advances in the identification of MV cellular receptors [14, 20], CD46 is still considered to be critical in determining the sensitivity of tumor cells to oncolytic strains of MV. As expected, a majority of efficiently infected tumor cells exhibited a high CD46 surface level (Figures 2(a) and 2(b)). Indeed, A549 (MFI = 159), Caco-2 (115), HT29 (255), SW480 (227), and SW620 (219) were efficiently infected and killed, which is consistent with their high expression of the CD46 receptor. Interestingly, CD46 expression analysis was not sufficient to predict the infection levels of some lung adenocarcinoma cell lines. For instance, fairly high levels of CD46 were expressed on ADK3 (MFI = 66) and ADK117 (68) but these cells were less efficiently infected than ADK153 cells which exhibit low CD46 expression (MFI = 45). Consistent with their resistance to infection, normal bronchial epithelial cells barely expressed CD46 (MFI = 21).

To better determine which receptor(s) were involved in the infection of these lung adenocarcinoma cell lines, we subsequently screened them for expression of CD150/SLAM (Signaling Lymphocytic Activation Molecule) and Nectin-4 receptors. CD150/SLAM is known to be involved in the infection of immune cells by wild-type MV [21] while Nectin-4 has been recently described as essential for host-to-host spread of MV [20, 22]. None of the tumor cell lines studied in our experiments exhibited CD150/SLAM expression (Figure 2(a)) and Nectin-4 was only found to be weakly expressed on HT29 cells (Figures 2(a) and 2(c)) as determined by flow cytometry.

3.4. In Vivo Oncolytic Activity of MV. To confirm our *in vitro* results regarding oncolytic properties of live-attenuated MV, we studied the ability of the virus to efficiently target and kill human lung and colorectal adenocarcinoma subcutaneous xenografts *in vivo* in nude mice (Figure 3). As our ultimate goal is to develop therapy against aggressive established tumors, we decided to treat large (100 to 200 mm³) A549 and Caco-2 tumors.



(a)



(b)

FIGURE 1: Continued.

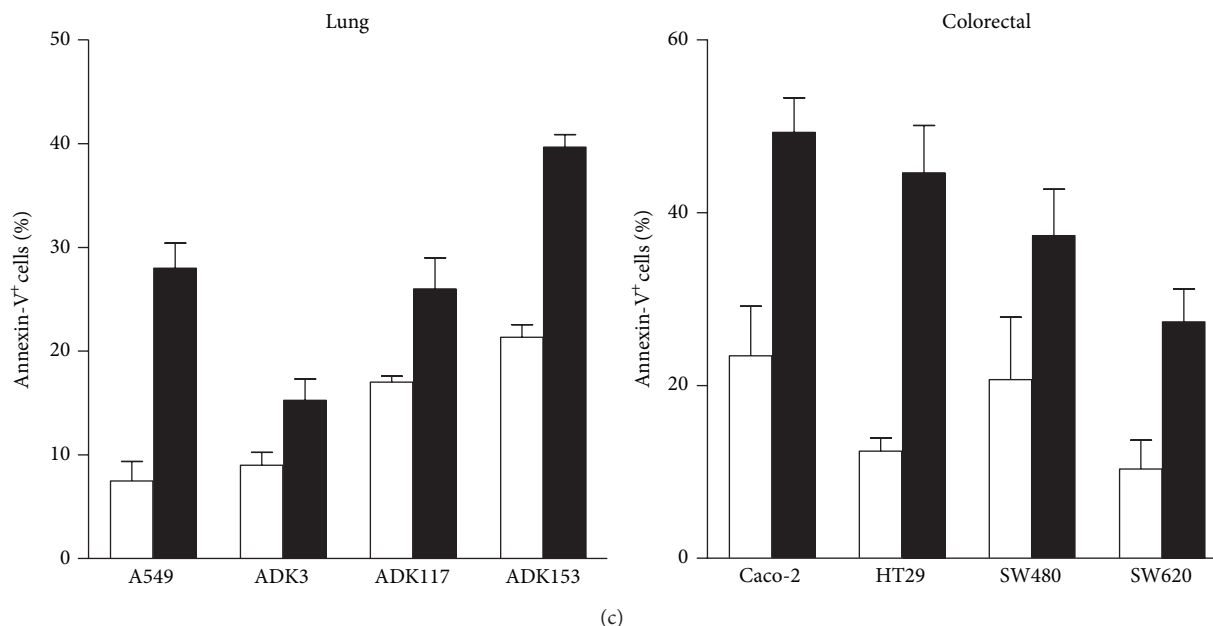


FIGURE 1: *In vitro* oncolytic properties of measles virus against human adenocarcinomas. (a) One million human lung or colorectal adenocarcinoma cells were infected *in vitro* with a live-attenuated strain of MV recombinant for EGFP (MV-eGFP; MOI = 1). Percentages of infected cells (EGFP⁺) were determined by flow cytometry at 24, 48, and 72 h after infection. Data are presented as mean $\pm$ SEM, ($n = 3$). (b) Infected cells were observed for 72 h by time-lapse microscopy to study cytopathic effects of MV infection. Complete experiments are presented in Figures S1 (Caco-2) and S2 (A549) in Supplementary Material available online at <http://dx.doi.org/10.1155/2013/387362>. (c) Human lung and colorectal adenocarcinoma cells were either infected with live-attenuated MV (MOI = 1, black bars) as described above or left uninfected (white bars). Cells were cultured for 72 h without medium renewal. Cells were then double stained with annexin V/propidium Iodide and analyzed by flow cytometry.

Human Caco-2 colorectal adenocarcinomas xenografts were treated by a single intratumoral injection of oncolytic MV (1.5×10^7 TCID₅₀). Whereas we previously observed slow transmission of the virus *in vitro* for this cell line (Figure 1), a single injection of the virus resulted in growth arrest of the tumor for up to 31 days (Figure 3(a)). Conversely, tumor growth was constant in mice treated with control saline buffer (PBS). After 31 days, significant differences were observed between control and MV-treated mice regarding either tumor volumes (1434 ± 246 mm³ versus 403 ± 86 mm³; $P < 0.05$; Figure 3(a)) or tumor weights (960 ± 211 mg versus 347 ± 89 mg; $P < 0.05$; Figure 3(b)).

Treatment of human A549 lung adenocarcinoma xenografts using identical experimental settings was not found to be effective. Indeed, even though MV induced a delayed tumor growth, we did not obtain any significant difference between PBS- (668 ± 147 mm³) and MV-treated (484 ± 154 mm³) mice (Figure 3(a)). This could be explained by the higher proliferation capacities of A549 cells as observed previously by time-lapse microscopy (Figure S2). Considering that steady proliferation of A549 cells could result in reduced viral particles/cells ratio into the tumor, we decided to carry out multiple injections of oncolytic MV by performing three extra intratumoral MV injections at days 22, 28, and 35 after the initial injection. This treatment schedule efficiently stopped tumor growth, as shown by the differences in tumor volumes between control

animals (668 ± 147 mm³) and multiple-injections group (231 ± 36 mm³; $P < 0.05$) at day 42 (Figure 3(a)). At this point, tumors were weighed and tumor masses were found to be significantly different between control and MV-treated mice (350 ± 67 mg versus 169 ± 11 mg; $P < 0.01$; Figure 3(b)).

3.5. MV Infection Induces Caspase-3 Activation in Colorectal Tumor Cells. Cell death triggered by MV infection has been previously described to be apoptosis [23]. Our results above are consistent with these observations as we found increased percentages of annexin-V⁺/PI⁺ lung and colorectal carcinoma cells following MV infection (Figure 1(c)). To investigate induction of apoptotic tumor cell death *in vivo*, we analyzed activation of caspase-3 in MV-treated and PBS-injected tumors by immunohistochemistry (Figure 4). Caspase-3 is involved in late events of apoptosis and thus can be activated by both extrinsic and intrinsic apoptotic pathways.

Caco-2 colorectal tumors grew in a specific way by forming round structures as shown by microscopy (Figures 1(b) and S1). In control mice, we observed minimal caspase-3 activation in the centers of these structures, which could be related to hypoxia or nutrient deprivation (Figure 4). In contrast, we observed strong activation of caspase-3 in MV-treated tumors, likely as a result of *in vivo* oncolytic activity of MV against Caco-2 colorectal adenocarcinoma cells. This

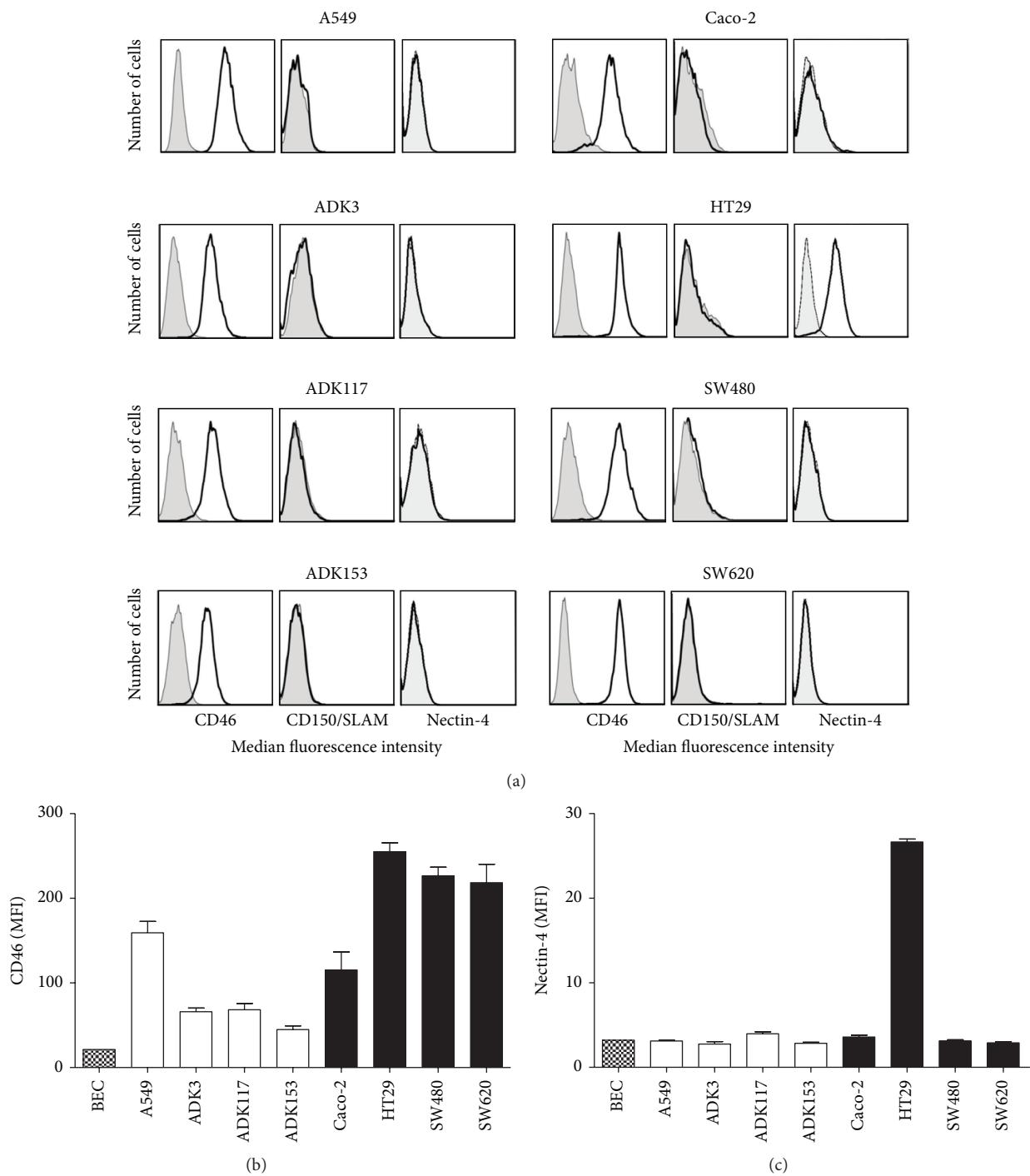


FIGURE 2: Expression of CD46 and CD150/SLAM receptors on human adenocarcinoma cells. (a) Lung (left) and colorectal (right) tumor cell lines were stained with anti-CD46-FITC, anti-CD150/SLAM-PE, and anti-Nectin-4-PE antibodies (thick black lines) in PBS/0.1% BSA for 30 min before analysis by flow cytometry. Isotypic stainings are shown as grey filled curves. (b)-(c) CD46 (b) and Nectin-4 (c) expression levels were determined for each lung (white bars) or colorectal (black bars) tumor cell line in three independent experiments. Expression levels of CD46 and Nectin-4 for normal bronchial epithelial cells (BEC) are indicated. MFI: median fluorescence intensity.

strong and extended activation of caspase-3 throughout the tumor correlates with significant tumor growth arrest (Figure 3(a)). We did not observe any activation of caspase-3 in control and MV-infected A549 tumors (not shown).

4. Discussion

We report here that Schwarz live-attenuated vaccinal strain of measles virus (MV) exhibits both *in vitro* and *in vivo*

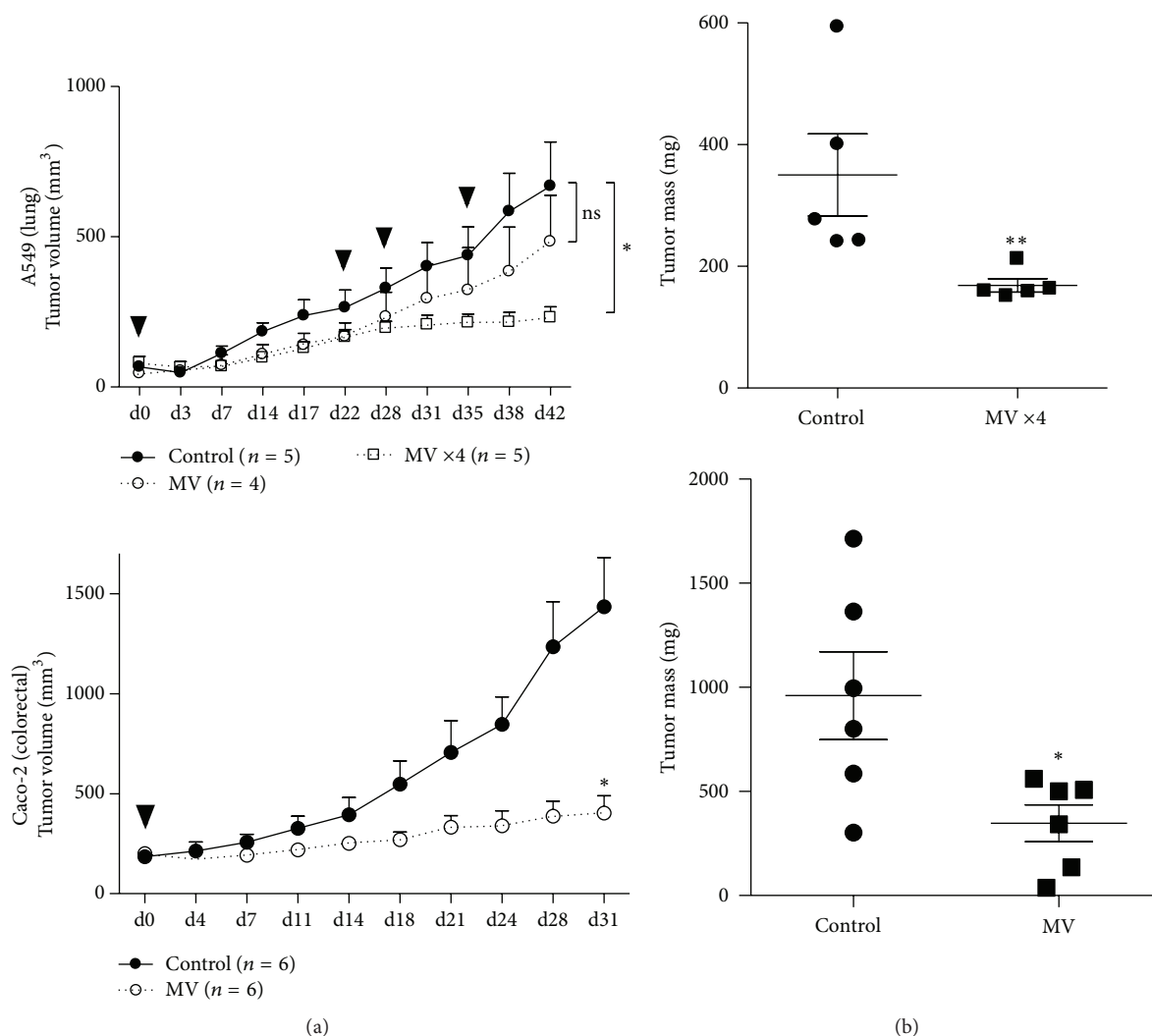


FIGURE 3: Measles virus exhibits oncolytic properties against human adenocarcinomas *in vivo*. (a) Nude mice were challenged subcutaneously with 1 million A549 (lung) or Caco-2 (colorectal) human adenocarcinoma cells. When tumors reached a volume of 100 mm³ for A549 or 150–200 mm³ for Caco-2, MV-eGFP or PBS was injected intratumorally (day 0, 1.5×10^7 TCID₅₀). Tumor volumes were measured twice weekly. Additional intratumoral MV injections were performed with A549 mice at days 22, 28, and 35 after initial injection as indicated by arrowheads. (b) When tumors reach 1–1.5 cm³ or after 31 (Caco-2 tumor) or 42 (A549 tumors) days, animals were sacrificed and tumors were harvested and weighed. (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$).

antitumor activity against human lung and colorectal adenocarcinomas. MV was able to infect and efficiently induce cell death in different cell lines derived from these two types of cancers. Significantly, our *in vivo* experiments showed that MV is able to control the growth of large, established tumors derived from these human malignancies. These findings are of particular interest as lung and colorectal cancers are widespread aggressive diseases which are still in need of innovative antitumor treatments [24, 25]. Our work supports previous studies where oncolytic properties of MV vaccinal strains, derived from Edmonston lineage, have been demonstrated against a wide range of human cancers including lymphoma [26], glioblastoma multiforme [27], multiple myeloma [28], ovarian [29] and breast [30] carcinomas, prostate cancer [31], leukemia [32], and more recently melanoma [33].

MV-induced cell death has been characterized as apoptosis [23] and we regularly observed common features of apoptotic cell death, for example blebbing and early exposure of phosphatidylserine on the outer leaflet of plasma membrane. However, we also repeatedly observed atypical events that could possibly challenge the “apoptosis model”, at least when using live-attenuated MV against malignant cells. Indeed, we previously showed how mesothelioma cells infected with MV were able to induce spontaneous maturation of human monocyte-derived and plasmacytoid dendritic cells and, subsequently, the cross-presentation of tumor antigen to specific CD8⁺ T cells [6, 11]. Here, we observed that some of the infected cells undergoing cell death after syncytia formation showed rapid release of intracellular content into the culture medium, as shown by rapid leakage of cytoplasmic GFP. This could partially explain the

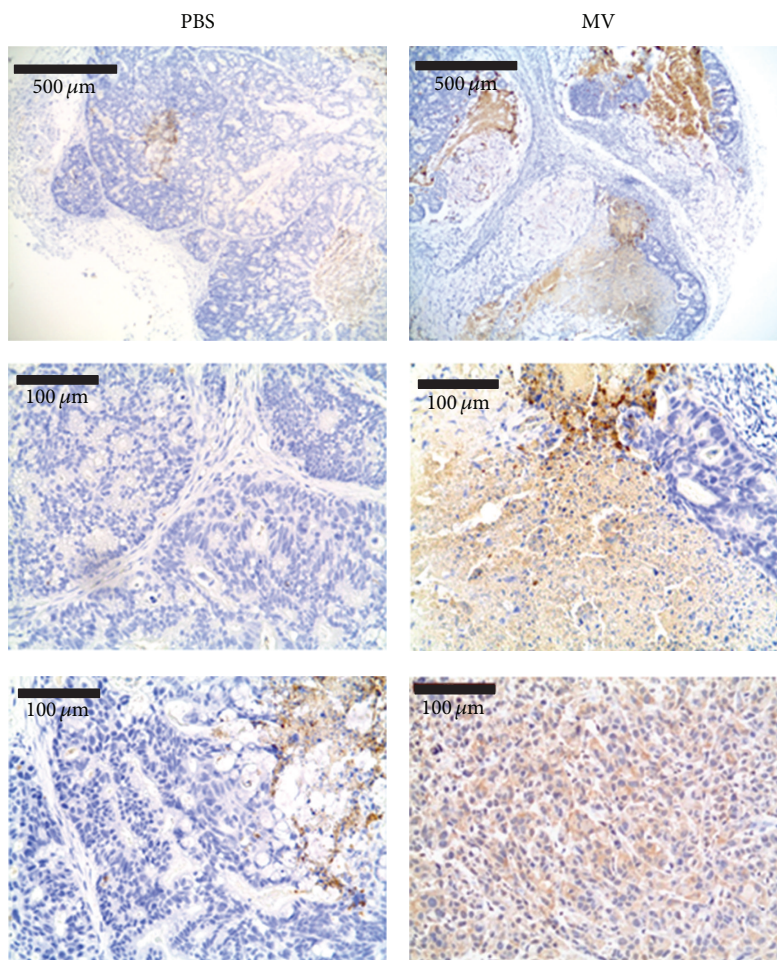


FIGURE 4: Caspase-3 activation in MV-treated colorectal adenocarcinomas. Representative sections of Caco-2 human tumor xenografts, 31 days after PBS or MV treatment. Tumors were analyzed for caspase-3 activation (brown staining) by immunohistochemistry as described in Section 2. Tumors were counterstained with hematoxylin to mark nuclei (blue staining).

immunogenicity of “apoptosis” that we harnessed in our previous work [6]. Recent advances in the characterization of tumor cell death pathways [34]—for instance description of necroptosis—could help to improve our comprehension of oncolytic MV-related cell death. Altered apoptotic pathways in tumor cells could also impact this process, as we observed divergent mechanisms in Caco-2 and A549 regarding syncytia formation *in vitro* and cleavage of caspase-3 *in vivo*. However, the fact that we did not observe activated caspase 3 in A549 tumor in mice could be due to the rapid growth of this cell line compared to Caco-2. It is thus possible that rapidly dividing A549 cells outgrow activated caspase-3 apoptotic tumor cell and are thus more difficult to detect in histologic samples. Since more and more groups now focus on improving proapoptotic capacities of oncolytic viruses to circumvent resistance of tumor cells to cancer therapies [35], such information would be of great interest for clinical utility. Even if viruses are potent inducers of cell death and are often able to demonstrate cytotoxicity even in unfavorable conditions, it has been shown recently, for instance, that overexpression of antiapoptotic molecules from Bcl-2 protein

family can impair MV-induced cell death in leukemia cells [32].

Better understanding of the features of MV-induced cell death will help to design appropriate clinical strategies for targeting aggressive human neoplasms. Antitumor effects of virotherapy have been shown to be enhanced by combination with other antitumor treatments in different models [36]. Combination with chemotherapy, the use of histone deacetylase inhibitors, for example, was found to improve the oncolytic properties of both vesicular stomatitis virus [37] and herpes virus [38]. Combinations with radiotherapy are also now widely described [39, 40]. Associations with immunotherapy, to combine direct oncolysis with an adaptive, antitumor immune response, is also an interesting alternative, with some groups demonstrating a critical role for the immune system in the therapeutic effects of oncolytic viruses [6, 41, 42]. Others have used engineered oncolytic viruses expressing proimmune molecules [5, 43]. Synergistic action of virotherapy and antitumor immune response *in vivo* has been extensively shown for oncolytic VSV [44] and reovirus [45, 46]. *In vitro* studies with MV tend to confirm

this trend even though a suitable immunocompetent model to study interactions between the virus and the immune system is lacking [47]. For example, we (manuscript in preparation) and others [33] have observed the release of danger signals by MV-infected cells *in vitro*, although the *in vivo* consequences remain largely unknown.

Recent identification of Nectin-4 as a new receptor for measles virus has been a major step forward for a better understanding of MV biology [14, 20]. Nonetheless, CD46 membrane complement regulatory protein expression still remains the key determinant for cancer cell sensitivity (i) to primary infection by MV and subsequently (ii) to the efficient transmission of new viruses to neighboring cells by formation of multinucleated syncytia [48]. Overexpression of CD46 had been previously described in human lung and colorectal adenocarcinomas [10, 14] and we were able to confirm these observations in several cell lines derived from these two malignancies. Moreover, we showed that cell lines exhibiting high CD46 expression also displayed high infection rates by oncolytic MV. The virus was also able to induce substantial regressions of these human adenocarcinomas engrafted in nude mice. Surprisingly, one of our lung adenocarcinoma cell lines (ADK153) was found to be efficiently infected by MV while displaying a lower expression level of CD46 receptor (Figures 1 and 2). This unexpected observation supports preliminary experiments in melanoma where low expression of CD46 and the absence of SLAM and Nectin-4 receptors do not correlate with efficient infection by live-attenuated vaccinal MV (manuscript in preparation). This indicates that additional parameters have to be taken into account when tumor cells are screened for their susceptibility to oncolytic MV. Sensitivity to innate antiviral mechanisms—such as the ability to respond to Type-I interferon signaling—should be considered, even if one cannot exclude that, out of CD46, CD150/SLAM, and Nectin-4 receptors, other unidentified surface molecules could play a role in MV infection mechanisms. Nevertheless, the majority of the tumor cell lines we studied showed increase in sensitivity to oncolytic MV infection when overexpressing CD46, thereby showing that lung and colorectal cancers, which are highly resistant to conventional treatments, are suitable targets for MV cancer virotherapy.

5. Conclusions

Our experiments demonstrate that live-attenuated oncolytic MV is able to efficiently target human lung and colorectal carcinomas, thus highlighting novel options for the treatment of these aggressive malignancies. Further studies to better characterize cell death pathways activated by MV infection and parameters involved in MV susceptibility would again reinforce the interest in development of live-attenuated MV for cancer therapy.

Conflict of Interests

The authors declare no competing financial interests.

Acknowledgments

This project was supported by Grants from the Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC), La Ligue contre le Cancer, and ARSMESO44. N. Boisgerault was personally supported by a Grant from the ARC. The author thank Philippe Hulin, Myriam Robard, and Cécile Deleine from the MicroPICell core facility for microscopic and immunohistochemical analyses and Virginie Maurier for animal experiments. The author also thank Kate Vassaux and Diana Rommelfanger for English editing.

References

- [1] A. Jemal, F. Bray, M. M. Center, J. Ferlay, E. Ward, and D. Forman, "Global cancer statistics," *CA Cancer Journal for Clinicians*, vol. 61, no. 2, pp. 69–90, 2011.
- [2] V. Beljanski and J. Hiscott, "The use of oncolytic viruses to overcome lung cancer drug resistance," *Current Opinion in Virology*, vol. 2, no. 5, pp. 629–635, 2012.
- [3] S. Miyamoto, H. Inoue, T. Nakamura et al., "Coxsackievirus B3 is an oncolytic virus with immunostimulatory properties that is active against lung adenocarcinoma," *Cancer Research*, vol. 72, no. 10, pp. 2609–2621, 2012.
- [4] K. B. Stephenson, N. G. Barra, E. Davies, A. A. Ashkar, and B. D. Lichty, "Expressing human interleukin-15 from oncolytic vesicular stomatitis virus improves survival in a murine metastatic colon adenocarcinoma model through the enhancement of anti-tumor immunity," *Cancer Gene Therapy*, vol. 19, no. 4, pp. 238–246, 2012.
- [5] N. Boisgerault, F. Tangy, and M. Gregoire, "New perspectives in cancer virotherapy: bringing the immune system into play," *Immunotherapy*, vol. 2, no. 2, pp. 185–199, 2010.
- [6] A. Gauvrit, S. Brandler, C. Sapède-Pero, N. Boisgerault, F. Tangy, and M. Gregoire, "Measles virus induces oncolysis of mesothelioma cells and allows dendritic cells to cross-prime tumor-specific CD8 response," *Cancer Research*, vol. 68, no. 12, pp. 4882–4892, 2008.
- [7] P. J. Lech and S. J. Russell, "Use of attenuated paramyxoviruses for cancer therapy," *Expert Review of Vaccines*, vol. 9, no. 11, pp. 1275–1302, 2010.
- [8] R. E. Dorig, A. Marcil, A. Chopra, and C. D. Richardson, "The human CD46 molecule is a receptor for measles virus (Edmonston strain)," *Cell*, vol. 75, no. 2, pp. 295–305, 1993.
- [9] D. Naniche, G. Varior-Krishnan, F. Cervoni et al., "Human membrane cofactor protein (CD46) acts as a cellular receptor for measles virus," *Journal of Virology*, vol. 67, no. 10, pp. 6025–6032, 1993.
- [10] Z. Fishelson, N. Donin, S. Zell, S. Schultz, and M. Kirschfink, "Obstacles to cancer immunotherapy: expression of membrane complement regulatory proteins (mCRPs) in tumors," *Molecular Immunology*, vol. 40, no. 2–4, pp. 109–123, 2003.
- [11] J. Guillerme, N. Boisgerault, D. Roulois et al., "Measles virus vaccine-infected tumor cells induce tumor antigen cross-presentation by human plasmacytoid dendritic cells," *Clinical Cancer Research*. In press.
- [12] L. Heinzerling, V. Künzi, P. A. Oberholzer, T. Kündig, H. Naim, and R. Dummer, "Oncolytic measles virus in cutaneous T-cell lymphomas mounts antitumor immune responses *in vivo* and targets interferon-resistant tumor cells," *Blood*, vol. 106, no. 7, pp. 2287–2294, 2005.

- [13] E. Galanis, L. C. Hartmann, W. A. Cliby 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*, vol. 70, no. 3, pp. 875–882, 2010.
- [14] R. S. Noyce, D. G. Bondre, M. N. Ha et al., "Tumor cell marker PVRL4 (nectin 4) is an epithelial cell receptor for measles virus," *PLoS Pathogens*, vol. 7, no. 8, Article ID e1002240, 2011.
- [15] Y. Shirogane, M. Takeda, M. Tahara, S. Ikegame, T. Nakamura, and Y. Yanagi, "Epithelial-mesenchymal transition abolishes the susceptibility of polarized epithelial cell lines to measles virus," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 285, no. 27, pp. 20882–20890, 2010.
- [16] D. Hoffmann, J. M. Bangen, W. Bayer, and O. Wildner, "Synergy between expression of fusogenic membrane proteins, chemotherapy and facultative virotherapy in colorectal cancer," *Gene Therapy*, vol. 13, no. 21, pp. 1534–1544, 2006.
- [17] Y. Jing, C. Tong, J. Zhang et al., "Tumor and vascular targeting of a novel oncolytic measles virus retargeted against the urokinase receptor," *Cancer Research*, vol. 69, no. 4, pp. 1459–1468, 2009.
- [18] F. Gueugnon, S. Leclercq, C. Blanquart et al., "Identification of novel markers for the diagnosis of malignant pleural mesothelioma," *American Journal of Pathology*, vol. 178, no. 3, pp. 1033–1042, 2011.
- [19] C. Combredet, V. Labrousse, L. Mollet et al., "A Molecularly cloned Schwarz strain of measles virus vaccine induces strong immune responses in macaques and transgenic mice," *Journal of Virology*, vol. 77, no. 21, pp. 11546–11554, 2003.
- [20] M. D. Muhlebach, M. Mateo, P. L. Sinn et al., "Adherens junction protein nectin-4 is the epithelial receptor for measles virus," *Nature*, vol. 480, no. 7378, pp. 530–533, 2011.
- [21] G. G. Welstead, C. Iorio, R. Draker et al., "Measles virus replication in lymphatic cells and organs of CD150 (SLAM) transgenic mice," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 102, no. 45, pp. 16415–16420, 2005.
- [22] V. Racaniello, "Virology. An exit strategy for measles virus," *Science*, vol. 334, no. 6063, pp. 1650–1651, 2011.
- [23] L. M. Esolen, S. W. Park, J. M. Hardwick, and D. E. Griffin, "Apoptosis as a cause of death in measles virus-infected cells," *Journal of Virology*, vol. 69, no. 6, pp. 3955–3958, 1995.
- [24] M. A. Bareschino, C. Schettino, A. Rossi et al., "Treatment of advanced non small cell lung cancer," *Journal of Thoracic Disease*, vol. 3, no. 2, pp. 122–133, 2011.
- [25] S. Leong, W. A. Messersmith, A. C. Tan, and S. G. Eckhardt, "Novel agents in the treatment of metastatic colorectal cancer," *Cancer Journal*, vol. 16, no. 3, pp. 273–282, 2010.
- [26] D. Grote, S. J. Russell, T. I. Cornu et al., "Live attenuated measles virus induces regression of human lymphoma xenografts in immunodeficient mice," *Blood*, vol. 97, no. 12, pp. 3746–3754, 2001.
- [27] L. K. Phuong, C. Allen, K. W. Peng et al., "Use of a vaccine strain of measles virus genetically engineered to produce carcinoembryonic antigen as a novel therapeutic agent against glioblastoma multiforme," *Cancer Research*, vol. 63, no. 10, pp. 2462–2469, 2003.
- [28] K. W. Peng, G. J. Ahmann, L. Pham, P. R. Greipp, R. Cattaneo, and S. J. Russell, "Systemic therapy of myeloma xenografts by an attenuated measles virus," *Blood*, vol. 98, no. 7, pp. 2002–2007, 2001.
- [29] K. W. Peng, C. J. TenEyck, E. Galanis, K. R. Kalli, L. C. Hartmann, and S. J. Russell, "Intraperitoneal therapy of ovarian cancer using an engineered measles virus," *Cancer Research*, vol. 62, no. 16, pp. 4656–4662, 2002.
- [30] C. J. McDonald, C. Erlichman, J. N. Ingle et al., "A measles virus vaccine strain derivative as a novel oncolytic agent against breast cancer," *Breast Cancer Research and Treatment*, vol. 99, no. 2, pp. 177–184, 2006.
- [31] P. Msaouel, I. D. Iankov, C. Allen et al., "Engineered measles virus as a novel oncolytic therapy against prostate cancer," *Prostate*, vol. 69, no. 1, pp. 82–91, 2009.
- [32] B. Patel, A. Dey, E. Ghorani et al., "Differential cytopathology and kinetics of measles oncolysis in two primary B-cell malignancies provides mechanistic insights," *Molecular Therapy*, vol. 19, no. 6, pp. 1034–1040, 2011.
- [33] O. G. Donnelly, F. Errington-Mais, L. Steele et al., "Measles virus causes immunogenic cell death in human melanoma," *Gene Therapy*, vol. 20, no. 1, pp. 7–15, 2011.
- [34] P. Kreuzaler and C. J. Watson, "Killing a cancer: what are the alternatives?" *Nature Reviews Cancer*, no. 6, pp. 411–424, 2012.
- [35] T. C. Liu and D. Kirn, "Viruses with deletions in antiapoptotic genes as potential oncolytic agents," *Oncogene*, vol. 24, no. 40, pp. 6069–6079, 2005.
- [36] T. L. A. Nguyen, V. F. Tumilasci, D. Singhroy, M. Arguello, and J. Hiscott, "The emergence of combinatorial strategies in the development of RNA oncolytic virus therapies," *Cellular Microbiology*, vol. 11, no. 6, pp. 889–897, 2009.
- [37] T. L. A. Nguyen, H. Abdelbary, M. Arguello et al., "Chemical targeting of the innate antiviral response by histone deacetylase inhibitors renders refractory cancers sensitive to viral oncolysis," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 105, no. 39, pp. 14981–14986, 2008.
- [38] A. Otsuki, A. Patel, K. Kasai et al., "Histone deacetylase inhibitors augment antitumor efficacy of herpes-based oncolytic viruses," *Molecular Therapy*, vol. 16, no. 9, pp. 1546–1555, 2008.
- [39] M. H. Dai, D. Zamarin, S. P. Gao et al., "Synergistic action of oncolytic herpes simplex virus and radiotherapy in pancreatic cancer cell lines," *British Journal of Surgery*, vol. 97, no. 9, pp. 1385–1394, 2010.
- [40] S. Kuroda, T. Fujiwara, Y. Shirakawa et al., "Telomerase-dependent oncolytic adenovirus sensitizes human cancer cells to ionizing radiation via inhibition of DNA repair machinery," *Cancer Research*, vol. 70, no. 22, pp. 9339–9348, 2010.
- [41] F. Errington, L. Steele, R. Prestwich et al., "Reovirus activates human dendritic cells to promote innate antitumor immunity," *Journal of Immunology*, vol. 180, no. 9, pp. 6018–6026, 2008.
- [42] Z. G. Fridlender, J. Sun, S. Singhal et al., "Chemotherapy delivered after viral immunogene therapy augments antitumor efficacy via multiple immune-mediated mechanisms," *Molecular Therapy*, vol. 18, no. 11, pp. 1947–1959, 2010.
- [43] I. D. Iankov, C. Allen, M. J. Federspiel et al., "Expression of immunomodulatory neutrophil-activating protein of *Helicobacter pylori* enhances the antitumor activity of oncolytic measles virus," *Molecular Therapy*, vol. 20, no. 6, pp. 1139–1147, 2012.
- [44] P. Wongthida, R. M. Diaz, F. Galivo et al., "VSV oncolytic virotherapy in the B16 model depends upon intact MyD88 signaling," *Molecular Therapy*, vol. 19, no. 1, pp. 150–158, 2011.
- [45] S. A. Gujar, P. Marcato, D. Pan, and P. W. K. Lee, "Reovirus virotherapy overrides tumor antigen presentation evasion and promotes protective antitumor immunity," *Molecular Cancer Therapeutics*, vol. 9, no. 11, pp. 2924–2933, 2010.

- [46] R. J. Prestwich, E. J. Ilett, F. Errington et al., "Immune-mediated antitumor activity of reovirus is required for therapy and is independent of direct viral oncolysis and replication," *Clinical Cancer Research*, vol. 15, no. 13, pp. 4374–4381, 2009.
- [47] G. Ungerechts, C. Springfield, M. E. Frenzke et al., "An immuno-competent murine model for oncolysis with an armed and targeted measles virus," *Molecular Therapy*, vol. 15, no. 11, pp. 1991–1997, 2007.
- [48] B. D. Anderson, T. Nakamura, S. J. Russell, and K. W. Peng, "High CD46 receptor density determines preferential killing of tumor cells by oncolytic measles virus," *Cancer Research*, vol. 64, no. 14, pp. 4919–4926, 2004.

Human natural killer cells promote cross-presentation of tumor cell-derived antigens by dendritic cells

Florence Deauvieuau^{1,2,3,4,5}, Vincent Ollion^{1,2,3,4,5,6}, Anne-Claire Doffin^{1,2,3,4,5}, Carole Achard⁷, Jean-François Fonteneau⁷, Estelle Verronese^{1,2,3,4,5}, Isabelle Durand^{1,2,3,4,5}, Raffaella Ghittoni⁸, Jacqueline Marvel⁸, Colette Dezutter-Dambuyant^{1,2,3,4,5}, Thierry Walzer⁸, Henri Vie⁷, Ivan Perrot⁹, Nadège Goutagny^{1,2,3,4,5,6}, Christophe Caux^{1,2,3,4,5,6*} and Jenny Valladeau-Guilemond^{1,2,3,4,5,6*}

¹ Inserm UMR-S1052, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, Lyon, France

² CNRS UMR5286, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, Lyon, France

³ UNIV UMR1052, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, Lyon, France

⁴ Université de Lyon, Lyon, France

⁵ Centre Léon Bérard, Lyon, France

⁶ LabEx DEVweCAN, Lyon, France

⁷ INSERM U892, CNRS UMR6299, Université de Nantes, Nantes, France

⁸ IFR128, INSERM U851, Université de Lyon, Lyon, France

⁹ Innate Pharma, Marseille, France

Dendritic cells (DCs) cross-present antigen (Ag) to initiate T-cell immunity against most infections and tumors. Natural killer (NK) cells are innate cytolytic lymphocytes that have emerged as key modulators of multiple DC functions. Here, we show that human NK cells promote cross-presentation of tumor cell-derived Ag by DC leading to Ag-specific CD8⁺ T-cell activation. Surprisingly, cytotoxic function of NK cells was not required. Instead, we highlight a critical and nonredundant role for IFN- γ and TNF- α production by NK cells to enhance cross-presentation by DC using two different Ag models. Importantly, we observed that NK cells promote cell-associated Ag cross-presentation selectively by monocytes-derived DC (Mo-DC) and CD34-derived CD11b^{neg}CD141^{high} DC subsets but not by myeloid CD11b⁺ DC. Moreover, we demonstrate that triggering NK cell activation by monoclonal antibodies (mAbs)-coated tumor cells leads to efficient DC cross-presentation, supporting the concept that NK cells can contribute to therapeutic mAbs efficiency by inducing downstream adaptive immunity. Taken together, our findings point toward a novel role of human NK cells bridging innate and adaptive immunity through selective induction of cell-associated Ag cross-presentation by CD141^{high} DC, a process that could be exploited to better harness Ag-specific cellular immunity in immunotherapy.

Dendritic cells (DCs) are endowed with the unique ability to present exogenous Ag on MHC class I molecules to activate cytotoxic T cells (CTLs) by a mechanism known as cross-

presentation. This pathway allows DC to induce specific cellular immunity against intracellular pathogens and tumors that do not directly affect DC.¹ Several types of exogenous Ag have been reported to be cross-presented including soluble Ag, immune complexes, Ag associated with chaperones or beads and cell-associated Ag from apoptotic, necrotic and autophagic cells.² Human monocyte-derived DCs (Mo-DC) also acquire Ag from live cells by a mechanism named “nibbling” and process them for subsequent cross-presentation.^{3,4} This pathway leads to an efficient protective antitumor response *in vivo*.^{4,5} Moreover, protective antitumor immunity can be induced in mice by specifically targeting the CD8 α ⁺ DC subset,⁶ which displays a unique ability to cross-present exogenous Ag and activate CD8⁺ T cells.⁷ In this context, many groups have shown that human CD141^{high} DCs, the equivalent of mouse CD8 α ⁺ DC, have a higher capacity for cross-presentation compared to other DC subsets.^{8–12} Nevertheless, the superior cross-presenting capacity of CD141^{high} DC is a matter of debate and may instead rely on the endocytic compartment reached by the Ag and on the Ag form as very recently proposed.^{13,14} Indeed, CD141⁺ DC cross-present cell-derived Ag more efficiently, whereas soluble

Key words: cross-presentation, dendritic cell, NK cell, mAb therapy
Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

Conflict of interest: Nothing to report

*C.C. and J.V.-G. contributed equally to this work

Grant sponsor: Institut National du Cancer; **Grant number:** INCa 2011-155; **Grant sponsors:** Fondation pour la Recherche Médicale (FRM, France), Ligue contre le Cancer (Comité de la Savoie, France), Lyon Biopole (France), ARC (France), the European CHILDOHOPE Project and the LabEx DEVWECAN

DOI: 10.1002/ijc.29087

History: Received 8 Oct 2013; Accepted 18 June 2014; Online 21 July 2014

Correspondence to: Dr Jenny Valladeau-Guilemond, Cancer Research Center of Lyon, Cheney D - Centre Léon Bérard, 28 rue Laennec, 69373 Lyon Cedex 08, France, Tel.: +33-4-78-78-29-64, Fax: +33-4-78-78-27-20, E-mail: jenny.valladeau-guilemond@lyon.unicancer.fr

What's new?

Dendritic cells (DCs) can activate an immune response by 'presenting' specific antigens on their surface. In this study, the authors found that when tumor cells are coated with therapeutic antibodies (mAbs), natural killer (NK) cells are activated to trigger the presentation of tumor antigens by special subsets of DCs. They also found that IFN- γ and TNF- α are crucial to this process. These results support the concept that NK cells can contribute to the efficacy of therapeutic mAbs by inducing anti-tumor adaptive immunity.

Ag may be cross-presented with the same efficacy by BDCA1⁺ CD11b⁺ DC or by CD141^{high} DC.^{13,14}

Natural killer (NK) cells are innate cytotoxic lymphocytes known for their ability to kill infected or tumor cells and produce antiviral/tumoral and "helper" cytokines. Increasing evidence indicates that upon interaction with DC, NK cells may also critically contribute to the shaping of adaptive immunity. Indeed, *in vitro* interactions between human DC and NK cells result in reciprocal activation.^{15,16} DC-derived cytokines such as interleukin (IL)-12 or type I interferon (IFN) strongly enhance IFN- γ production and cytolytic activity of NK cells.¹⁷ Once activated, NK cells promote DC maturation and IL-12 production^{15,18} providing critical "help" for Th1 polarization and CD8⁺ T-cell priming.^{16,19–21} We hypothesized that, upon recognition of tumor target cells, NK cells may also contribute to initiate the antitumor CTL response by favoring Ag capture and/or processing by DC leading to cross-presentation to specific CD8⁺ T cells. In our study, we show that human NK cells trigger efficient cross-presentation of tumor cell-derived Ag by Mo-DC. Unexpectedly, this function does not require cytolytic activity of NK cells but is critically dependent on their production of both IFN- γ and TNF- α . Importantly, we demonstrate that NK cells are also able to promote cell-associated Ag cross-presentation selectively by the CD11b^{neg}CD141^{high} DC subset in contrast to myeloid BDCA1⁺ CD11b⁺ DC generated from CD34⁺ hematopoietic stem cells (HSCs) highlighting a previously unknown specific cross-talk between NK cells and the human cross-presenting DC subset. Finally, we also demonstrate that NK cell activation through therapeutic monoclonal antibodies (mAbs)-coated tumors results in efficient cross-presentation to CD8⁺ T cells. Our data thus define a new NK cell function specifically regulating cell-associated Ag cross-presentation by CD141^{high} DC that could be targeted in immunotherapy to generate polyspecific T-cell immunity.

Material and Methods**Flow cytometry and antibodies**

Following staining with monoclonal Abs recognizing human CD3, CD56, CD11b (Beckman Coulter, Marseille, France), CD141 (Miltenyi Biotec, Paris, France), DC-SIGN, mannose receptor and IFN- γ (Becton Dickinson, Le pont de Claix, France) and dead cell exclusion using propidium iodide (Invitrogen, Saint Aubin, France) or DAPI (4',6'-diamidino-2-phénylindole) (Molecular Probes, Lifetechnologies, Saint Aubin, France), analyses were performed on the DAKO Cytomation Cyan and FlowJo software (Tree Star, OR, USA).

Human cell lines and DC differentiation

Complete medium consisted of RPMI 1640 glutamax with 10% heat-inactivated fetal calf serum (FCS), penicillin-streptomycin and gentamycin (Life technologies). We used lentiviral-based vectors to generate the K562 cell line (ATCC) expressing the N9V epitope of the CMV pp65 fused in frame at the 5' end to cytoplasmic OVA (see Supporting Information Materials). The KHYG1 NK cell line (provided by Masato Yagita, Japan) was stably transduced with either an irrelevant shRNA or shRNA against UNC13D (Sigma Aldrich, Lyon, France) and cultured in complete media supplemented with IL-2 (450 U/ml, Chiron, CA, USA) and puromycin (2 μ g/ml, Invivogen, Toulouse, France) to sustain shRNA expression. Immature DCs (iDCs) were generated from monocytes as described in Supplementary Materials and mature DCs (mDCs) were obtained by exposing cells to 500 ng/ml of LPS (Invivogen) for 24 hr. In some experiments, Mo-DCs were fixed in 4% paraformaldehyde (Sigma-Aldrich) before coculture. CD34⁺-derived DCs were obtained as previously described by Poulin *et al.*¹² The CD141^{high}/CD11b[−] (referred to as "CD141^{high} DC") and the CD141^{low}/CD11b⁺/BDCA1⁺ DC subset (referred to as "CD11b⁺ DC") were cell sorted with a BD FACSaria III SORP (purity > 95%) and used in similar conditions to Mo-DC.

NK cell isolation and culture

NK cells were negatively isolated from human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) (EFS) using the NK cell isolation kit (Miltenyi Biotec, CD56⁺CD3[−] cells, 96.7% $\pm$ 1.7%). NK cells were cultured in complete medium or with 1,000 U/ml of IL-2 or 50 ng/ml of IL-12 (Peprotech) for 18 hr. In some experiments, resting and activated NK cells were treated for 1 hr at 37°C with 50 μ g/ml of chloroquin (Sigma-Aldrich).

Cross-presentation assays

A total of 10⁵ K562 cells expressing the N9V epitope and 0.5 $\times$ 10⁵ DCs were co-cultured with indicated numbers of NK cells (NK:DC ratio from 0:1 to 5:1) for 24–36 hr. When indicated, mixed cultures were exposed to 10 μ g/ml of neutralizing mAbs against TNF- α , IFN- γ or isotype control (R&D Systems, Lille, France). In some experiments, recombinant TNF- α (Cetus Corporation, CA, USA) or IFN- γ (Peprotech, NJ, USA), Poly I:C (HMW, 5 μ g/ml), lipopolysaccharide (LPS) (500 ng/ml) or R848 (5 μ g/ml) (all from Invivogen)

were added 12 hr after the start of DC-K562 co-culture. As a positive control, 10 nM of soluble pp65^{493–503} peptide was added for 1 hr in mixed cultures before extensive washes. A pp65^{493–503}-specific T-cell clone (0.5×10^5 cells per well)²² was then added in the presence of GolgiSTOP (Becton Dickinson) for an additional 12 hr. After fixation and permeabilization, intracellular expression of IFN- γ in T cells was monitored by flow cytometry using an anti-CD3. T-cell activation was determined as the percentage of IFN- γ -expressing cells within CD3⁺GFP[−]-gated cells. K562 killing was evaluated in similar NK/DC/K562 co-cultures: K562 cells were labeled with PKH67 (Sigma-Aldrich) and PI incorporation was analyzed by flow cytometry. For sequential cross-presentation assays, DC sorting was performed using CD1a microbeads (Miltenyi).

For cross-presentation of endogenous tumor-derived antigen, NYESO-1pos/HLA-A*0201neg melanoma cell lines M18 were Schwarz measles virus (MV)-infected (MOI = 1) or UV-B irradiated and cultured for 72 hr. They were then co-cultured with HLA-A*0201pos Mo-DC (DC:tumor cell ratio 1:1). After 18 hr, Mo-DCs were washed and co-cultured with the HLA-A*0201/NYESO-1(157–165)-specific CD8⁺ T-cell clone M117.167²³ (ratio 1:1) for 5 hr with Brefeldin-A (Sigma Aldrich). Cells were then fixed with 4% paraformaldehyde, permeabilized and stained with anti-IFN- γ - and CD8-specific antibodies (BD Biosciences) as described²³; IFN- γ production was analyzed by flow cytometry using a CD8⁺ T-cell gate.

Transwell experiments

IL-2-preactivated blood NK cells and target cells (E:T ratio of 2.5:1) were co-cultured in the upper compartment of a 0.4- μ M pore-size Transwell system (Costar, Sigma-Aldrich) where K562_N9V and DC were cultured in the bottom compartment (K562:Mo-DC ratio of 2:1) for 24 hr. Anti-CD20 Rituximab[®] and anti-HER2 Trastuzumab[®] were used at 10 μ g/ml. Cells contained in the bottom compartment were transferred to 96-well plates for further co-culture with N9V-specific T-cell clone as described above. Supernatants were collected for IFN- γ and TNF- α quantification by ELISA (BenderMedSystems, eBioScience, Paris, France).

Ag uptake analysis

A total of 1×10^5 PKH67-labeled K562 cells were co-cultured in round-bottomed 96-well plates with 0.5×10^5 DC in the presence or absence of activated NK cells at a K562:DC 2:1 ratio, as for cross-presentation assays. After 18–24 hr of culture, Mo-DC uptake was evaluated by flow cytometry or by confocal microscopy. Flow cytometry quantification and confocal microscopy were performed as described in Supporting Information Materials.

Statistics

Significances were determined using one-way ANOVA with Bonferroni's post-test or a Mann-Whitney test. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Results

Human primary NK cells efficiently promote cross-presentation of tumor cell-derived antigen by iDC

To investigate the potential capacity of human NK cells to promote Ag cross-presentation by DC, we introduced the HLA-A2-restricted pp65^{495–503} N9V epitope of the human CMV virus into the chicken ovalbumin (OVA) as a surrogate Ag into the NK-target K562 cell line (HLA-A2[−], named K562_N9V, Supporting Information Fig. S1A). When this construct was introduced into the HLA-A2⁺ MCF7 cell line, co-culture with N9V-specific CD8⁺ T cells led to T-cell activation, confirming endogenous processing and presentation of the fusion protein (Supporting Information Fig. S1B). K562_N9V were then co-cultured with immature Mo-DC in the presence of increasing numbers of NK cells. Cross-presentation by DC was subsequently assessed by adding N9V-specific CD8⁺ T-cell clones into co-cultures and by monitoring their intracytoplasmic IFN- γ production (Fig. 1a). IL-2-preactivated NK cells dramatically enhanced IFN- γ production by N9V-specific T cells (Fig. 1b). Lytic degranulation, monitored by CD107a staining on T cells, was similarly increased (data not shown). By contrast, no T-cell responses were observed using K562 cells lacking the N9V epitope (K562_GFP), HLA-A2[−] DC and fixed or mature HLA-A2⁺ DC (Fig. 1b and Supporting Information Fig. S1C), indicating that T-cell activation occurred *via* HLA-A2-restricted N9V cross-presentation by live iDC. Only the highest dose of resting NK cells led to a substantial T-cell response, whereas a low number of IL-2-preactivated NK cells was sufficient to induce DC cross-presentation. Of note, addition of high numbers of activated NK cells into mixed cultures completely abrogated T-cell activation (Fig. 1c). Autologous and allogenic NK/DC displayed comparable responses (Supporting Information Fig. S1D). NK cells have been previously shown to be able to kill DC at high NK:DC ratios,¹⁸ which has also been observed in activated CD8⁺ T cells.²⁴ Nevertheless, neither DC nor T-cell mortality was observed in our cultures (data not shown). Impaired Ag cross-presentation may be due to strong K562 killing (Fig. 1d), resulting in epitope degradation in these experimental conditions. Indeed, we observed by Western blot the complete loss of cellular OVA containing the N9V epitope (Supporting Information Fig. S2A). This is consistent with previous studies demonstrating epitope degradation during apoptosis.^{25,26} Finally, NK cells exposed to the innate DC cytokine IL-12 were as efficient as NK-IL2 at inducing Ag cross-presentation by DC (Fig. 1e). Altogether, these findings highlight a novel role for DC/NK cell cross-talk, bridging innate and adaptive immunity.

DC cross-presenting function requires NK cells during Ag uptake but does not depend on target cell killing

To identify NK cell effector functions required to induce tumor Ag cross-presentation by DC, we first inhibited lytic

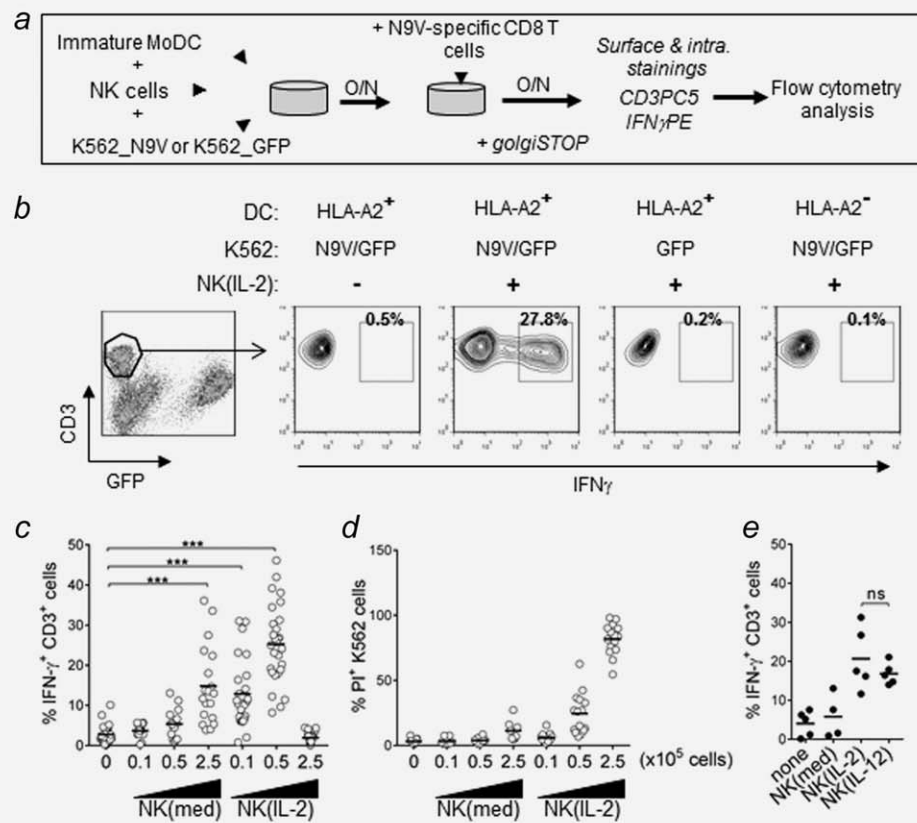


Figure 1. NK cells promote tumor cell-derived Ag cross-presentation by DC. (a) IL-2-preactivated NK cells [NK(IL-2)] were co-cultured for 24 hr with K562_N9V cells and DC. N9V-specific CD8⁺ T cells were then added and their activation was monitored by flow cytometry as illustrated. (b) One representative out of >12 independent experiments is shown using 1:1 NK:DC ratio. Negative controls included HLA-A2 negative DC (0.5% ± 0.3% of IFN-γ⁺ CD3⁺) and K562 cells infected with a lentivirus encoding GFP alone (1.1% ± 0.7% of IFN-γ⁺ CD3⁺). (c and e) NK cells exposed to medium [NK(med)] or preactivated with indicated recombinant cytokines [NK(IL-X)] were co-cultured at indicated number with K562_N9V (1 × 10⁵ cells per well) expressing the HLA-A2-restricted N9V epitope (GFP⁺) and DC (0.5 × 10⁵ cells per well) and cross-presentation was monitored as in (b). Values indicate the percentage of IFN-γ⁺ cells among total CD3⁺ T cells. (d) K562 killing was measured by propidium iodide (PI) incorporation in PKH67-labeled K562 cells in corresponding NK/K562/DC co-cultures. (c, d and e) Each symbol represents an individual experiment and bars show the mean of all experiments.

granule exocytosis by transient treatment of preactivated NK cells with chloroquin. Treated NK cells, which failed to kill K562 cells, induced dramatic IFN-γ responses by CD8⁺ T cells, especially at high cellular ratios (Fig. 2a), probably owing to the prevention of epitope degradation (Supporting Information Fig. S2A). Direct effect of residual chloroquin on DC was excluded because the responses induced by resting NK cells, with low killing activity, were not modified by the treatment (Fig. 2b). We extended this analysis in the KHYG1 NK cell line, which also promotes DC cross-presentation (Fig. 2c), by knocking down the Munc 13-4 protein, a critical effector of granule exocytosis²⁷ by RNA silencing (Supporting Information Fig. S2B). Unc13D-deficient KHYG1, while failing to kill K562, displayed increased capacity to promote DC cross-presentation (Fig. 2c). These data demonstrate that NK-cell-mediated killing of target cells is not a prerequisite to induce Ag cross-presentation by DC in our model.

Thus, we asked whether NK cells induced or increased Ag uptake by DC using K562 stained with a fluorescent PKH dye. As shown in Figure 3a, DC could capture antigenic material from K562 cells in the absence of NK cells (Figs. 3a and 3b). This capture was abolished upon fixation (Fig. 3a) and only marginally increased in the presence of activated NK cells (Fig. 3c). These data showed that NK cells were not required for tumor Ag capture by DC, which is consistent with previous results showing that lysis of target cells was not a prerequisite for Ag cross-presentation. We thus wondered whether NK cells induced Ag cross-presentation by providing immunostimulatory signals to DCs that have already engulfed antigenic material from tumor cells. To this aim, DCs were first co-cultured with K562_N9V for 24 hr, cell sorted and then cultured with NK cells in the presence of K562 to ensure full NK cell activation (Fig. 3d). Interestingly, activated NK cells were unable to induce Ag cross-presentation in these conditions. T-cell activation was

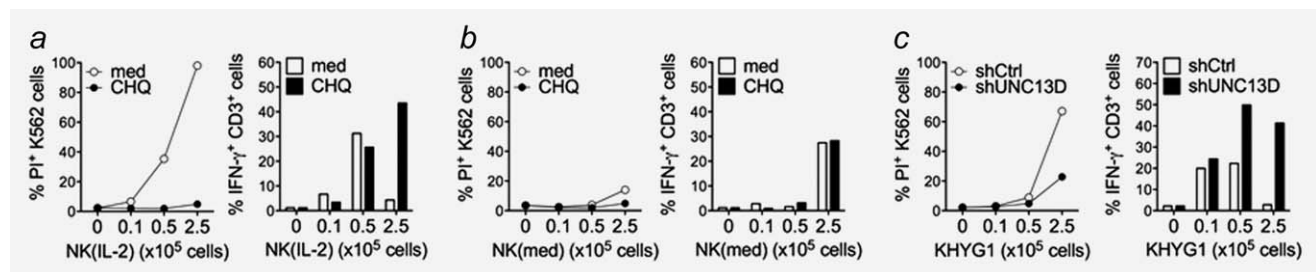


Figure 2. NK cells trigger Ag cross-presentation by DC independently of their capacity to kill target cells. NK cells deficient for lytic granule exocytosis were tested for their capacity to kill K562 cells (left) and to induce Ag cross-presentation by DC (right) as described in Figure 1. (a and b) IL-2-preactivated [NK(IL-2)] or resting [NK(med)] blood NK cells were treated with chloroquin (CHQ) before mixing of the cultures. (c) KHYG1 cell line expressing an irrelevant shRNA (shCtrl) or a shRNA against UNC13D gene. One representative experiment out of three is shown.

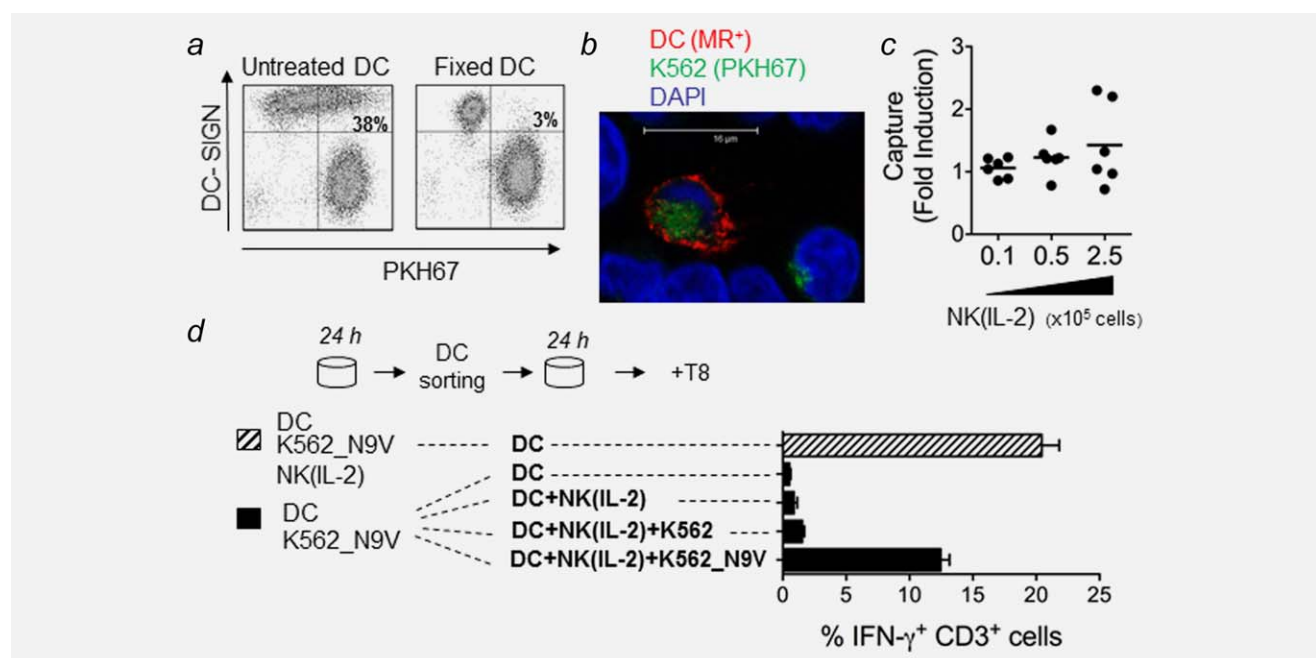


Figure 3. While cross-presentation required NK cells during early phase of Ag internalization, DCs capture K562 cellular material independently of NK cells. (a) Ag uptake of PKH67-labeled K562 in DC-SIGN-stained DC or fixed DC from one representative experiment out of 14 independent experiments. Values correspond to the percentage of viable DC PKH67⁺ within total viable DC. (b) Uptake of PKH67-labeled K562 cells (green) by mannose receptor-stained DC (red) analyzed by confocal microscopy (DAPI, blue). (c) Flow cytometry analysis of Ag uptake in the presence of indicated numbers of NK(IL-2), expressed as fold induction compared to DC/K562 alone. Each symbol represents an individual experiment and bars correspond to the mean of overall experiments. (d) Cross-presentation assays performed in sequential steps as illustrated. DC that had been co-cultured for 24 hr with K562_N9V alone at 1:2 DC:K562 ratio or in the presence of NK cells at 1:2:1 DC:K562:NK ratio were purified using CD1a microbeads and further cultured for 24 hr in medium or in the presence of indicated cells at similar ratios before adding T cells. Histograms show the mean of triplicate wells of culture $\pm$ SD of one representative experiment out of three.

restored only when K562_N9V were added again concomitantly with NK cells. As a control, the same kinetic and sorting conditions were applied to DC that had captured Ag in the presence of IL-2-activated NK cells and displayed usual T-cell response. These data show that NK cells need to be present during Ag uptake for subsequent cross-presentation and suggest that NK cells play a critical role in the early steps of the cross-presentation process, possibly triggering a specific pathway of Ag capture and/or intracellular processing.

Both IFN- γ and TNF- α production play key roles in NK-cell-induced Ag cross-presentation

We then investigated the role of IFN- γ and TNF- α , both cytokines of major importance in NK/DC cross-talk.²⁸ Ag cross-presentation induced by IL-2-preactivated NK cells or KHYG1 cells was significantly diminished by either IFN- γ or TNF- α neutralization and completely abolished when both cytokines were blocked (Fig. 4a). iDC cross-presentation induced by resting NK cells was similarly

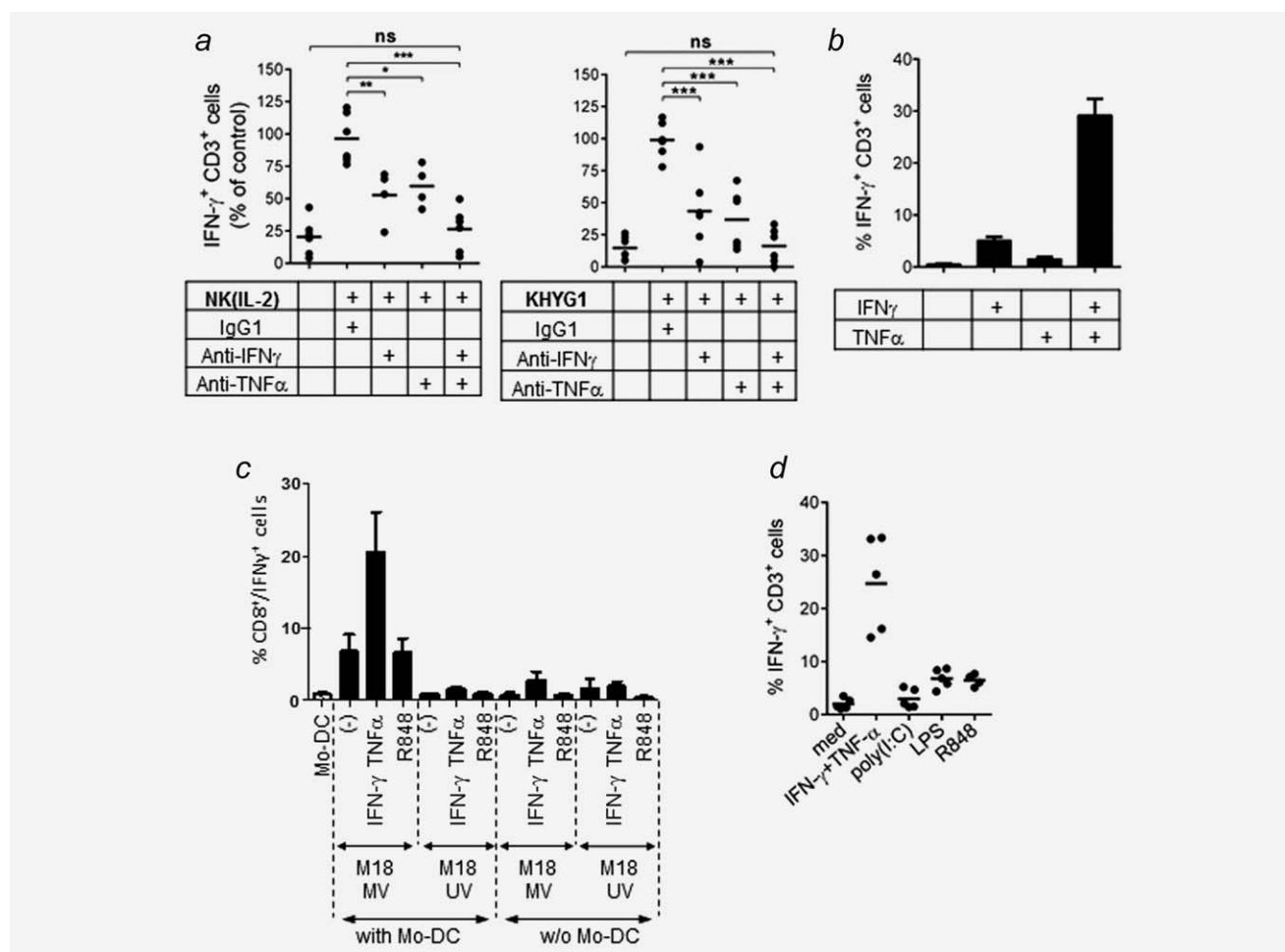


Figure 4. Both IFN γ and TNF α play key roles in NK-cell-induced Ag cross-presentation. (a) Cross-presentation assays were performed with or without neutralizing mAbs or isotype control. IFN- γ responses were normalized to 100% for NK cell conditions in the absence of any mAbs. (b) NK cells were replaced by recombinant IFN- γ , TNF- α or both or by indicated TLR ligands in cross-presentation assays (d). (c) Mo-DCs were cultured for 18 hr with UV-irradiated or MV-infected M18 tumor cells with or without R848, or a combination of IFN- γ /TNF- α . Mo-DCs were then co-cultured for 5 hr with the M117.167 CD8 $^{+}$ T-cell clone specific for HLA-A*0201/NYESO-1(157–165). IFN- γ production by the clone was measured by flow cytometry. (a, d) Each symbol represents an individual experiment and bars correspond to the mean of overall experiments. (b) Data represent means of triplicate wells of culture $\pm$ SD of a representative experiment out of three. (c) Data represent means of three independent experiments.

inhibited (data not shown). Additionally, a combination of recombinant IFN- γ and TNF- α was sufficient to induce Ag cross-presentation by DC (Fig. 4b), even at low concentration (Supporting Information Fig. S3). Intracellular staining of GFP $^{+}$ tumors cells, DC-SIGN $^{+}$ DC or CD56 $^{+}$ NK revealed a specific IFN- γ and TNF- α production in NK cells in mixed cultures (Supporting Information Fig. S4). Collectively, these data highlight a nonredundant role for IFN- γ and TNF- α in NK-cell-induced Ag cross-presentation by DC. This was confirmed using another cross-presentation model of an endogenous tumor Ag naturally expressed in melanoma cells. Indeed, we used the HLA-A*0201 $^{-}$ M18 cell line that expresses NYESO-1. After cell death of M18 tumor cells induced by MV infection, this tumor endogenous antigen is cross-presented by DC to a HLA-A*0201/NYESO-1(157–165)-specific CD8 $^{+}$ T-cell clone M117.167²³

and not if cell death was induced by UV. In this model, this process is also highly enhanced by IFN- γ and TNF- α , further highlighting the important role of NK-derived cytokines in cross-presentation (Fig. 4c).

Finally, as IFN- γ and TNF- α are known for their effect on DC activation, we examined whether TLR ligands [poly(I:C), LPS and R848] that induced phenotypic and functional DC maturation could mimic NK cell effect. Despite leading to strong DC activation as previously demonstrated, none of the tested TLR ligands was able to induce Ag cross-presentation similarly to exogenous IFN- γ and TNF- α (Fig. 4d), highlighting a specific impact of NK-cell-derived products. These results define a novel function of NK-cell-derived cytokines that likely contribute to induce specific CD8 $^{+}$ T-cell immunity by promoting cell-associated Ag cross-presentation.

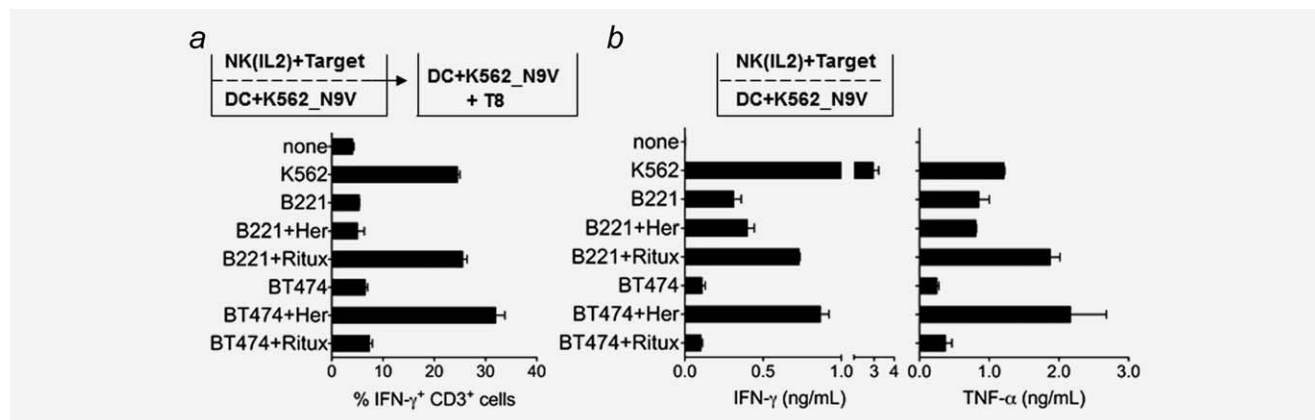


Figure 5. NK cell activation by therapeutic mAb-coated tumor cells induces Ag cross-presentation by DC. (a and b) IL-2-preactivated NK cells and the indicated target cells were added to the upper compartment of a transwell system where DC and K562_N9V were cultured in the bottom compartment. The experiments were performed with or without Rituximab® (Ritux) or Herceptin® (Her). N9V-specific T-cell clone activation was assessed using cells contained in the bottom compartment. (b) Supernatants were collected before co-culture with T cells for cytokine quantification by ELISA. Data represent means of triplicate wells of culture $\pm$ SD of one representative experiment out of three.

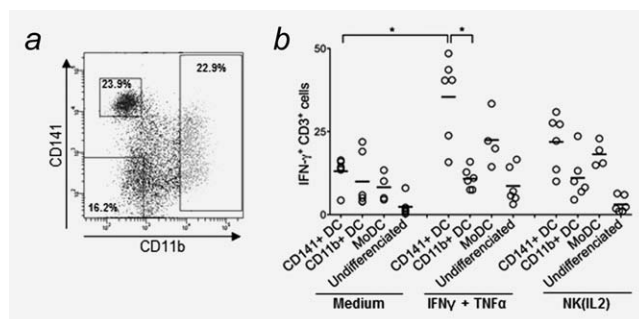


Figure 6. NK cells promote tumor cell-derived Ag cross-presentation by CD141^{high} DC. (a) CD34-derived DCs were cell-sorted based on CD11b and CD141 staining. Undifferentiated cells expressing neither CD11b nor CD141⁺ were also cell-sorted. (b) Cross-presentation of Mo-DC and purified CD34-derived CD141^{high} and CD11b⁺ DC subsets was analyzed as described in Figure 1 [with IL-2-preactivated NK cells; NK(IL-2)] (NK:DC ratio of 0.2:1) or IFN-γ and TNF-α. Negative controls included HLA-A2 negative Mo-DC and GFP-K562 cells. Each symbol represents an individual experiment and bars show the mean of all experiments.

NK cell activation by therapeutic mAb-coated tumor cells induces Ag cross-presentation by DC

As NK cells are known to produce large amounts of cytokines upon recognition of mAb-coated target cells, we then determined whether soluble factors produced by activated NK cells could also induce efficient Ag cross-presentation by DC. To this end, we set up a transwell system where NK cells and various target cells were co-cultured in the upper compartment being separated from DC and K562_N9V by a 0.4-μm pore-size membrane. Thus, soluble factors released by NK activated through antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) in the upper compartment will act on DC in contact with K562_N9V in the lower compartment. CD8⁺ T cells were subsequently added to the lower compart-

ment to measure N9V cross-presentation. We used as NK cell targets, the EBV-transformed CD20⁺ LCL721.221 and breast carcinoma HER2⁺ BT474 cell lines, treated or not with anti-CD20 Rituximab® or anti-HER2 Trastuzumab®, respectively. Although soluble factors produced upon “natural” recognition of these two cell lines by IL-2-activated NK cells were not sufficient to induce Ag cross-presentation by DC, those produced in the presence of appropriate targeting mAbs were highly efficient (Figs. 5a and 5b). These data reveal that human therapeutic mAbs may not only lead to direct antitumor effect but also to the development of poly-specific antitumor T-cell immunity through NK-cell-induced DC cross-presentation.

NK cells promote Ag cross-presentation by CD141^{high} DC

Functionally distinct DC subsets have been previously described. The superior ability of human CD141^{high} DC to cross-present Ag compared to the CD11b⁺/BDCA1⁺ DC subset has been reported,^{9,11,12} but was recently challenged. As CD141^{high} DCs are very rare in human blood, we generated them from CD34⁺ HSC as previously described.¹² The CD11b⁺/BDCA1⁺ and CD141^{high}/CD11b⁺ DC subsets as well as undifferentiated cells were FACS-sorted (detailed in Supporting Information Materials and Fig. 6a) and used in cross-presentation assays in the presence of NK cells [ratio NK:DC (0.2:1)] or exogenous IFN-γ and TNF-α. Interestingly, we observed that NK cells specifically enhance tumor cell-associated Ag cross-presentation by CD11b⁺CD141^{high} DC. Moreover, this DC subset was highly responsive to IFN-γ and TNF-α at an even higher magnitude than Mo-DC. In contrast, neither NK cells nor exogenous cytokines could promote efficient cross-presentation by the myeloid CD11b⁺ DC subset or undifferentiated cells (Fig. 6b). These results highlight a previously unknown cross-talk between NK cells and CD141^{high} DC for inducing tumor cell-derived Ag cross-presentation.

Discussion

Antigen cross-presentation is a specific DC function required to elicit CTL responses against tumors and intracellular pathogens. Besides their innate cytolytic function, NK cells have been described as regulators of multiple DC functions, including DC costimulatory function and IL-12 production, both properties required for T-cell priming and Th1 polarization. In our study, we show for the first time that human NK cells also promote cross-presentation of tumor cell-derived Ag by DC resulting in specific CD8⁺ T-cell activation. Moreover, we demonstrate a key role for both TNF- α and IFN- γ production by NK cells in inducing DC cross-presentation. Of importance, our results further highlight a preferential cross-talk between NK cells and CD141^{high} DC for inducing tumor cell-derived Ag cross-presentation.

Unexpectedly, lytic activity of NK cells was not required for DC cross-presentation showing that NK-cell-mediated killing of tumor cells was not a prerequisite for their engulfment by DC. Indeed, we found that DC could capture cellular material from K562 cells independently of the presence of NK cells. NK cells may thus help DC cross-presentation of Ag internalized by DC from natural cellular debris or live cells. DC cross-presentation of Ag derived from live infected or tumor cells has been previously described *in vitro*.^{3,4} This process may be critical in the initiation of T-cell responses to noncytopathic viruses and was recently shown to induce protective antitumor immunity *in vivo*.²⁹

Our work suggests that this mechanism is induced following specific recognition of tumor cells by NK cells. Importantly, we demonstrate that the production of IFN- γ and TNF- α by NK cells is critical to induce or increase DC cross-presentation to CD8⁺ T cells. Furthermore, we confirm in another model, the impact of those NK-derived cytokines in regulating cross-presentation. In this endogenous NYESO-1 cross-presentation model, the signal provided by the virus itself or the particular cell death pathway induced by infection is also critical for cross-presentation as previously discussed by Guillaume *et al.*²³ Indeed, cross-presentation was not observed when UV-irradiated tumor cells were used. Because the M18 cell line is not a natural NK target, we could not examine the direct impact of NK on promoting cross-presentation. However, the strong effects of the NK cytokines extend the concept that NK cells play a role in regulating cross-presentation. DCs stimulated with activated NK cells or recombinant IFN- γ and TNF- α exhibited a mature phenotype and enhanced cell surface expression of MHC class I molecules (data not shown). Nevertheless, TLR ligands, which also induced DC maturation, could not substitute NK cells for inducing Ag cross-presentation showing that the impact of NK cells is specific and not limited to upregulation of cell surface molecules on DC. Additionally, NK cells were inefficient at inducing cross-presentation when applied to DCs that have already internalized Ag demonstrating that NK cells are required during the early steps of intracellular Ag

processing. Furthermore, IFN- γ is known to increase immunoproteasome activity by inducing the neosynthesis of various immunoproteasome subunits and regulators as well as upregulation of transporters associated with antigen processing (TAP1/TAP2).³⁰ Nevertheless, it has been shown that the IFN- γ -inducible antigen processing machinery is not sufficient on its own to induce robust Ag cross-presentation by DC, as in our model where both IFN- γ and TNF- α are required. Although NK cells did not significantly impact the level of Ag capture by DC, they may promote a specific pathway of Ag capture and/or delivery suitable for downstream cross-presentation. It has been reported that IFN- γ promotes the formation of gap junctions by increasing connexin 43 expression in melanoma cells³¹ or the release of K562 exosomes,³² both mechanisms of Ag transfer from live cells to DC leading to T-cell cross-priming.^{31,33} Molecular processes triggered by IFN- γ and TNF- α in Ag cross-presentation need to be further investigated as well as the potential contribution of other NK-cell-derived signals, such as the release of HMGB1 or direct cellular interaction through Nkp30 or the MICA-NKG2D axis, both implicated in DC maturation by NK cells.^{16,34,35}

Here, we observed that NK cells (or IFN- γ and TNF- α) induced cell-derived Ag cross-presentation selectively in CD11b^{neg}CD141^{high} DC and in Mo-DC and not in CD11b⁺ DC. The superior ability for cross-presentation of different human DC subsets, such as CD141^{high} DC, is still a matter of debate and may rely on the Ag form and the intracellular compartment reached by the Ag through endocytic receptors.^{13,14,36} Indeed, if Ag is targeted to early endocytic compartments, CD11b⁺/BDCA1⁺ DCs are equivalent to CD141^{high} DC.¹³ Nevertheless, naturally recognized and internalized cellular Ag are better cross-presented by CD141^{high} DC.¹⁴ Therefore, more than an intrinsic specialization of the CD141^{high} DC subset, our observations may also reflect a particular Ag acquisition pathway from live cells and/or a preferential NK/CD141^{high} DC cross-talk. Indeed, among blood DC subsets and CD34-derived DC, CD11b^{neg}CD141^{high} represents the only DC population that does not express SIRP α , the receptor of the CD47 "don't eat me" signal.³⁷ Although the NK/CD141^{high} DC cross-talk has never been documented, several observations point to specific interactions between those two cell types. First, we have previously demonstrated a cooperation between circulating blood myeloid DC and NK cells in the early response to dsRNA (TLR3 ligands)³⁸ where CD141^{high} DCs selectively express high TLR3.³⁹ Second, XCR1 is a specific marker of CD141^{high} DC and its ligand XCL1 is mainly expressed by CD8⁺ T cells and NK cells. Interestingly, the XCR1-XCL1 axis was recently demonstrated as very important in CD8⁺ T-cell priming.^{10,40}

Thus, we propose a model where NK cells and DC sensing the emerging tumor allow the release of IFN- γ and TNF- α necessary for the processing and cross-presentation of tumor-associated Ag (TAA) acquired from live cells by

CD141^{high} DC. NK-cell-induced activated DC will then secrete high amounts of cytokines such as IL-12 that will amplify NK cell activation and consequently the cross-presentation pathway. Following migration into draining lymph nodes, Ag-bearing DC will ultimately induce an efficient CD8⁺ T-cell response. In accordance with this model, injection of NK cell targets such as class I-deficient splenocytes led to efficient specific CD8⁺ T-cell responses *in vivo*⁴¹ and recognition of MHC class I-deficient tumor cells by NK cells has been shown to induce DC activation and protective CD8⁺ T-cell immunity in mice.^{42,43} Furthermore, in a mouse model of subcutaneous melanoma, activation of NK cell functions at the tumor site appears to be critical for inducing specific CTL cross-priming and the antitumor response.⁴⁴ Thus, our *in vitro* observations with human cells are strongly supported by various *in vivo* murine models. Importantly, using tumor cells other than the typical target K562 cells, we also found that addition of specific antitumor therapeutic mAbs could induce potent Ag cross-presentation when natural recognition of target cells did not stimulate NK cells with high enough efficiency. This shows that NK cells, which contribute to antitumor activity of clinical mAbs through ADCC,⁴⁵ may also favor subsequent induction of specific T-cell immunity through their noncytolytic functions. These

observations extend recent studies showing that the efficacy of therapeutic mAbs (anti-EGFR, anti-Her2-neu or anti-CD20) may require the adaptive immune response.^{16,46–48}

To conclude, in addition to their previously described role in priming DC for IL-12 production and Th1 polarization *in vivo*,^{42,49} NK cells may also contribute to increase adaptive T-cell immunity through triggering cellular Ag cross-presentation by DC. This NK-cell-dependent pathway should be particularly relevant for initiating adaptive immunity in sterile inflammatory conditions such as in tumors, and may be necessary to generate epitope spreading and downstream polyspecific CD8⁺ T-cell responses against multiple endogenous TAA.

Acknowledgements

The authors thank the DTC platform (Inserm, Nantes, France) for monocytes, Dr M. Yagita (Japan) for KHYG1 cell line, G. de Saint Basile (France) for anti-Munc 13-4 antibody, C. Thery (France) for polyclonal rabbit anti-OVA and D. Nègre and the Anira Vectorologie Platform (France) for lentivirus production. F.D. designed and performed research, analyzed data and wrote the paper; V.O., A.C.D. and E.V. performed research; I.D. contributed analytical tools; R.G., J.M., H.V. and I.P. contributed vital reagents; C.D.D., T.W. and N.G. contributed to experimental design and writing of the paper; C.C. and J.V.G. supervised the study, contributed to experimental design and writing of the paper.

References

- Heath WR, Carbone FR. Cross-presentation, dendritic cells, tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol* 2001;19:47–64.
- Uhl M, Kepp O, Jusforgues-Saklani H, et al. Autophagy within the antigen donor cell facilitates efficient antigen cross-priming of virus-specific CD8⁺ T cells. *Cell Death Differ* 2009;16:991–1005.
- Harshyne LA, Watkins SC, Gambotto A, et al. Dendritic cells acquire antigens from live cells for cross-presentation to CTL. *J Immunol* 2001;166:3717–23.
- Maranon C, Desoutter JF, Hoeffel G, et al. Dendritic cells cross-present HIV antigens from live as well as apoptotic infected CD4⁺ T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:6092–7.
- Matheoud D, Baey C, Vimeux L, et al. Dendritic cells crosspresent antigens from live B16 cells more efficiently than from apoptotic cells and protect from melanoma in a therapeutic model. *PLoS One* 2011;6:e19104.
- Shortman K, Heath WR. The CD8⁺ dendritic cell subset. *Immunol Rev* 2010;234:18–31.
- Hildner K, Edelson BT, Purtha WE, et al. Batf3 deficiency reveals a critical role for CD8alpha⁺ dendritic cells in cytotoxic T cell immunity. *Science* 2008;322:1097–100.
- Bachem A, Guttler S, Hartung E, et al. Superior antigen cross-presentation and XCR1 expression define human CD11c⁺CD141⁺ cells as homologues of mouse CD8⁺ dendritic cells. *J Exp Med* 2010;207:1273–81.
- Haniffa M, Shin A, Bigley V, et al. Human tissues contain CD141hi cross-presenting dendritic cells with functional homology to mouse CD103⁺ nonlymphoid dendritic cells. *Immunity* 2012;37:60–73.
- Crozat K, Guiton R, Contreras V, et al. The CX chemokine receptor 1 is a conserved selective marker of mammalian cells homologous to mouse CD8alpha⁺ dendritic cells. *J Exp Med* 2010;207:1283–92.
- Jongbloed SL, Kassianos AJ, McDonald KJ, et al. Human CD141⁺ (BDCA-3)⁺ dendritic cells (DCs) represent a unique myeloid DC subset that cross-presents necrotic cell antigens. *J Exp Med* 2010;207:1247–60.
- Poulin LF, Salio M, Griessinger E, et al. Characterization of human DNGR-1⁺ BDCA3⁺ leukocytes as putative equivalents of mouse CD8alpha⁺ dendritic cells. *J Exp Med* 2010;207:1261–71.
- Cohn L, Chatterjee B, Esselborn F, et al. Antigen delivery to early endosomes eliminates the superiority of human blood BDCA3⁺ dendritic cells at cross presentation. *J Exp Med* 2013;210:1049–63.
- Segura E, Durand M, Amigorena S. Similar antigen cross-presentation capacity and phagocytic functions in all freshly isolated human lymphoid organ-resident dendritic cells. *J Exp Med* 2013;210:1035–47.
- Gerosa F, Baldani-Guerra B, Nisii C, et al. Reciprocal activating interaction between natural killer cells and dendritic cells. *J Exp Med* 2002;195:327–33.
- Srivastava RM, Lee SC, Andrade Filho PA, et al. Cetuximab-activated natural killer and dendritic cells collaborate to trigger tumor antigen-specific T-cell immunity in head and neck cancer patients. *Clin Cancer Res* 2013;19:1858–72.
- Agaugue S, Marcenaro E, Ferranti B, et al. Human natural killer cells exposed to IL-2, IL-12, IL-18, or IL-4 differently modulate priming of naive T cells by monocyte-derived dendritic cells. *Blood* 2008;112:1776–83.
- Piccoli D, Sbrana S, Melandri E, et al. Contact-dependent stimulation and inhibition of dendritic cells by natural killer cells. *J Exp Med* 2002;195:335–41.
- Tanaka F, Hashimoto W, Okamura H, et al. Rapid generation of potent and tumor-specific cytotoxic T lymphocytes by interleukin 18 using dendritic cells and natural killer cells. *Cancer Res* 2000;60:4838–44.
- Dao T, Gomez-Nunez M, Antczak C, et al. Natural killer cells license dendritic cell cross-presentation of B lymphoma cell-associated antigens. *Clin Cancer Res* 2005;11:8763–72.
- Mailliard RB, Son YI, Redlinger R, et al. Dendritic cells mediate NK cell help for Th1 and CTL responses: two-signal requirement for the induction of NK cell helper function. *J Immunol* 2003;171:2366–73.
- Retiere C, Prod'homme V, Imbert-Marcille BM, et al. Generation of cytomegalovirus-specific human T-lymphocyte clones by using autologous B-lymphoblastoid cells with stable expression of pp65 or IE1 proteins: a tool to study the fine specificity of the antiviral response. *J Virol* 2000;74:3948–52.
- Guillermie JB, Boisgault N, Roulois D, et al. Measles virus vaccine-infected tumor cells induce tumor antigen cross-presentation by human plasmacytoid dendritic cells. *Clin Cancer Res* 2013;19:1147–58.
- Rabinovich BA, Li J, Shannon J, et al. Activated, but not resting, T cells can be recognized and killed by syngeneic NK cells. *J Immunol* 2003;170:3572–6.

25. Castiglioni P, MartIn-Fontecha A, Milan G, et al. Apoptosis-dependent subversion of the T-lymphocyte epitope hierarchy in lymphoma cells. *Cancer Res* 2002;62:1116–22.
26. Labarriere N, Bretaudeau L, Gervois N, et al. Apoptotic body-loaded dendritic cells efficiently cross-prime cytotoxic T lymphocytes specific for NA17-A antigen but not for Melan-A/MART-1 antigen. *Int J Cancer* 2002;101:280–6.
27. Menager MM, Menasche G, Romao M, et al. Secretory cytotoxic granule maturation and exocytosis require the effector protein hMunc13-4. *Nat Immunol* 2007;8:257–67.
28. Walzer T, Dalod M, Robbins SH, et al. Natural-killer cells and dendritic cells: "l'union fait la force". *Blood* 2005;106:2252–8.
29. Matheoud D, Perie L, Hoeffel G, et al. Cross-presentation by dendritic cells from live cells induces protective immune responses in vivo. *Blood* 2010; 115:4412–20.
30. Strehl B, Seifert U, Kruger E, et al. Interferon-gamma, the functional plasticity of the ubiquitin-proteasome system, and MHC class I antigen processing. *Immunol Rev* 2005;207:19–30.
31. Saccheri F, Pozzi C, Avogadri F, et al. Bacteria-induced gap junctions in tumors favor antigen cross-presentation and antitumor immunity. *Sci Transl Med* 2010;2:44ra57.
32. Bausero MA, Gastpar R, Multhoff G, et al. Alternative mechanism by which IFN-gamma enhances tumor recognition: active release of heat shock protein 72. *J Immunol* 2005;175:2900–12.
33. Wolfers J, Lozier A, Raposo G, et al. Tumor-derived exosomes are a source of shared tumor rejection antigens for CTL cross-priming. *Nat Med* 2001;7:297–303.
34. Semino C, Ceccarelli J, Lotti LV, et al. The maturation potential of NK cell clones toward autologous dendritic cells correlates with HMGB1 secretion. *J Leukoc Biol* 2007;81:92–9.
35. Vitale M, Della CM, Carlomagno S, et al. NK-dependent DC maturation is mediated by TNFalpha and IFNgamma released upon engagement of the Nkp30 triggering receptor. *Blood* 2005;106: 566–71.
36. Segura E, Valladeau-Guilemond J, Donnadieu MH, et al. Characterization of resident and migratory dendritic cells in human lymph nodes. *J Exp Med* 2012;209:653–60.
37. Chao MP, Weissman IL, Majeti R. The CD47-SIRPalpha pathway in cancer immune evasion and potential therapeutic implications. *Curr Opin Immunol* 2012;24:225–32.
38. Perrot I, Deauvieu F, Massacrier C, et al. TLR3 and RIG-like receptor on myeloid dendritic cells and RIG-like receptor on human NK cells are both mandatory for production of IFN-gamma in response to double-stranded RNA. *J Immunol* 2010;185:2080–8.
39. Robbins SH, Walzer T, Dembele D, et al. Novel insights into the relationships between dendritic cell subsets in human and mouse revealed by genome-wide expression profiling. *Genome Biol* 2008;9:R17.
40. Dorner BG, Dorner MB, Zhou X, et al. Selective expression of the chemokine receptor XCR1 on cross-presenting dendritic cells determines cooperation with CD8+ T cells. *Immunity* 2009;31: 823–33.
41. Krebs P, Barnes MJ, Lampe K, et al. NK-cell-mediated killing of target cells triggers robust antigen-specific T-cell-mediated and humoral responses. *Blood* 2009;113:6593–602.
42. Adam C, King S, Allgeier T, et al. DC-NK cell cross talk as a novel CD4+ T-cell-independent pathway for antitumor CTL induction. *Blood* 2005;106:338–44.
43. Mocikat R, Braumuller H, Gumy A, et al. Natural killer cells activated by MHC class I(low) targets prime dendritic cells to induce protective CD8 T cell responses. *Immunity* 2003;19:561–9.
44. Liu C, Lou Y, Lizée G, et al. Plasmacytoid dendritic cells induce NK cell-dependent, tumor antigen-specific T cell cross-priming and tumor regression in mice. *J Clin Invest* 2008;118:1165–75.
45. Dall'Ozzo S, Tartas S, Pintauro G, et al. Rituximab-dependent cytotoxicity by natural killer cells: influence of FCGR3A polymorphism on the concentration-effect relationship. *Cancer Res* 2004;64:4664–9.
46. Park S, Jiang Z, Mortenson ED, et al. The therapeutic effect of anti-HER2/neu antibody depends on both innate and adaptive immunity. *Cancer Cell* 2010;18:160–70.
47. Nasser R, Pelegrin M, Michaud HA, et al. Long-lasting protective antiviral immunity induced by passive immunotherapies requires both neutralizing and effector functions of the administered monoclonal antibody. *J Virol* 2010;84:10169–81.
48. Abes R, Gelize E, Fridman WH, et al. Long-lasting antitumor protection by anti-CD20 antibody through cellular immune response. *Blood* 2010; 116:926–34.
49. Westwood JA, Kelly JM, Tanner JE, et al. Cutting edge: novel priming of tumor-specific immunity by NKG2D-triggered NK cell-mediated tumor rejection and Th1-independent CD4+ T cell pathway. *J Immunol* 2004;172:757–61.

Angiogenesis stimulated by human kallikrein-related peptidase 12 acting *via* a platelet-derived growth factor B-dependent paracrine pathway

Thomas Kryza,^{*,||,1} Carole Achard,^{#,***,††} Christelle Parent,^{*,||,1}
Sylvain Marchand-Adam,^{‡,||,1,‡‡,§§} Audrey Guillon-Munos,^{*,||,1,1} Sophie Iochmann,^{*,‡,||,1}
Brice Korkmaz,^{‡,||,1,‡‡} Renaud Respaud,^{§,|||} Yves Courty,^{‡,||,1,‡‡}
and Nathalie Heuzé-Vourc'h^{*,||,2}

*Equipe d'Accueil (EA) 6305, [†]Unité Mixte de Recherche (UMR) 1100, [‡]Institut Universitaire de Technologie (IUT) de Tours, and [§]EA 6306, Université François Rabelais, Tours, France; ^{||}UMR 1100 and ¹EA 6305, Centre d'Etude des Pathologies Respiratoires, Tours, France; [#]Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), UMR 892, Nantes, France; ^{**}Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), UMR 6299, Nantes, France; ^{††}Université de Nantes, Nantes, France; ^{‡‡}INSERM, UMR 1100, Tours, France; and ^{§§}Service de Pneumologie and ^{|||}Service de Pharmacie, Centre Hospitalier Régional Universitaire (CHRU) de Tours, Tours, France

ABSTRACT KLK12, a kallikrein peptidase, is thought to take part in the control of angiogenesis. Our analysis of the secretome of endothelial cells (ECs) that had been treated with KLK12 showed that KLK12 converts the extracellular matrix- or membrane-bound precursor of platelet-derived growth factor B (PDGF-B) into a soluble form. Both PDGF-B and vascular endothelial growth factor A (VEGF-A) take part in the induction of angiogenesis by KLK12 in a coculture model of angiogenesis that mimics endothelial tubule formation. We used a cellular approach to analyze the interplay between KLK12, PDGF-B, and VEGF-A and showed that release of PDGF-B by KLK12 leads to the fibroblast-mediated secretion of VEGF-A. This then stimulates EC differentiation and the formation of capillary tube-like structures. Thus, KLK12 favors the interaction of ECs and stromal cells. The released PDGF-B acts as a paracrine factor that modulates VEGF-A secretion by stromal cells, which ultimately leads to angiogenesis. Moreover, the genes encoding *KLK12* and *PDGFB* are both expressed in ECs and up-regulated in tumor cells

kept under hypoxic conditions, which is consistent with the physiological involvement of KLK12 in PDGF-B maturation.—Kryza, T., Achard, C., Parent, C., Marchand-Adam, S., Guillon-Munos, A., Iochmann, S., Korkmaz, B., Respaud, R., Courty, Y., Heuzé-Vourc'h, N. Angiogenesis stimulated by human kallikrein-related peptidase 12 acting *via* a platelet-derived growth factor B-dependent paracrine pathway. *FASEB J.* 28, 740–751 (2014). www.fasebj.org

Key Words: *proteolysis • processing • extracellular matrix • vascular endothelial growth factor • hypoxia*

THE PHYSIOLOGICAL PROCESS of angiogenesis occurs during growth, development, wound healing, and tissue repair. Its dysregulation is often associated with pathological conditions, such as cancer, diabetic retinopathy, and chronic inflammatory diseases. Several signaling pathways, involving vascular endothelial growth factor (VEGF), platelet-derived growth factor B (PDGF-B), and angiopoietin, take part in its regulation, either during the initiation phase in which endothelial cells (ECs) are recruited to form tubes and vessels, the maturation phase contributing to stabilization of the EC tubes, or both. Proteases, acting intra- or extracellularly, are also key regulators of angiogenesis; they control the degradation of internalized proteins, the processing and then release of growth factors, and the remodeling of

Abbreviations: EBM2, endothelial basal medium 2; EC, endothelial cell; ECM, extracellular matrix; FRET, fluorescence resonance energy transfer; HBMVEC-L, human lung blood microvascular endothelial cell; HIF-1 α , hypoxia-inducible factor 1 α ; HUVEC, human umbilical vein endothelial cell; KLK, kallikrein-related peptidase; MALDI-TOF, matrix-assisted laser desorption ionization/time of flight; MEM, minimal essential medium; MMP, matrix metalloproteinase; MTS, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium; NSCLC, non-small cell lung cancer; PBS, phosphate-buffered saline; PDGF-B, platelet-derived growth factor B; PDGFR- β , platelet-derived growth factor receptor β ; qPCR, quantitative PCR; TFA, trifluoroacetic acid; uPA, urokinase type of plasminogen activator; VEGF, vascular endothelial growth factor; VEGFR2, vascular endothelial growth factor receptor 2; VSMC, vascular smooth muscle cell

¹ Current address: CNRS UMR 9272, Université François Rabelais, F-37032 Tours, France.

² Correspondence: CEPR INSERM U1100/EA 6305, Faculté de Médecine, 10 Blvd. Tonnellé, F-37032 Tours cedex, France. E-mail: nathalie.vourc'h@med.univ-tours.fr
doi: 10.1096/fj.13-237503

This article includes supplemental data. Please visit <http://www.fasebj.org> to obtain this information.

extracellular matrix (ECM) components. The spatial and temporal activity of these proteases must be controlled to prevent excess proteolysis and subsequent inappropriate angiogenesis. Proteases [matrix metalloproteinases (MMPs), cysteine cathepsins, and serine proteinases] are all involved in the initiation and maturation phases of angiogenesis.

Human tissue kallikrein-related peptidases (KLK1–KLK15) are a subgroup of secreted serine proteases that are present in many tissues and cell populations (1). These proteases play important roles in several pathophysiological processes (2), including the homeostatic control of blood pressure, contraction and relaxation of smooth muscle (3), skin desquamation (4), innate immunity (5, 6), semen liquefaction (7), tooth enamel formation (8), neural development and plasticity (9, 10), and angiogenesis (11–13).

KLK12 is a trypsin-like KLK that is abundant in a variety of human tissues (14, 15). The gene encoding it was originally cloned using a positional candidate gene approach. KLK12 is particularly abundant in the nasal, tracheal, and lung compartments of the human respiratory tract and is overproduced in non-small cell lung cancers (NSCLCs; refs. 13, 15, 16). The physiological role of KLK12 in the respiratory tract and other tissues is not known, but recent evidence points to a role in the control of angiogenesis (12, 13, 17, 18). KLK12 induces the formation of pulmonary EC tubule-like structures, and anti-KLK12 antibodies block angiogenesis of dermal ECs. The regulation of KLK12 is abnormal in human skin ECs extracted from patients with systemic sclerosis, in whom angiogenesis is defective (12). Although the mechanisms by which KLK12 contributes to angiogenesis remain unclear, we recently demonstrated that KLK12 is not a kininogenase. Hence, kinins play no part in KLK12-mediated angiogenesis (17), although this enzyme might be associated with activation of the B2 kinin receptor signaling pathway (12).

We investigated the way in which KLK12 might regulate the availability of proangiogenic growth factors by analyzing the secretome of ECs exposed to the enzymatically active protease. We found that PDGF-B was released from ECs by KLK12. PDGF-B activates platelet-derived growth factor receptor β (PDGFR- β), which is abundant in stromal and mural cells, such as fibroblasts, pericytes, and vascular smooth muscle cells (VSMCs; refs. 19, 20). PDGF-B induces the recruitment and proliferation of mural cells, probably through a short-range paracrine action implicating PDGFR- β , thereby stabilizing new vessels (21). PDGF-B is also overabundant in many tumors (22–25). It acts as an autocrine and paracrine growth factor, stimulating tumor growth and angiogenesis by modulating erythropoietin and VEGF production by cancer and stromal cells (26–29). This study was designed to test the hypothesis that the angiogenic activity of KLK12 is attributed to a PDGF-B/PDGFR- β paracrine signaling pathway that modulates VEGF secretion by stromal cells and favors the interplay between ECs and stromal cells.

MATERIALS AND METHODS

Antibodies and reagents

The blocking anti-PDGF-B antibody, IgG control isotype, anti-CD31-phycoerythrin antibody, anti-hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α) antibody, and recombinant human pro-KLK12 were obtained from R&D Systems Europe (Lille, France). The anti-phospho-PDGFR- β antibody kit, the anti-phospho-vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2) antibody kit, the anti-Akt antibodies, and the recombinant human VEGF165 were supplied by Cell Signaling Technology (Ozyme, St. Quentin en Yvelines, France). The anti-VEGF antibody (Avas-tin; pharmacy of Tours Centre Hospitalier Régional Universitaire, Tours, France) was obtained from Genentech (San Francisco, CA, USA), and the anti- β -actin antibody was from Sigma-Aldrich Chimie Sarl (Lyon, France). The anti-PDGF-B antibody for immunofluorescence was bought from Abcam (Paris, France). Fluorescence resonance energy transfer (FRET) peptides were synthesized by GeneCust (Dudelange, Luxembourg).

Cells and culture conditions

The NSCLC cell lines NCI-H460, NCI-H520, NCI-H1838, NCI-H23, and NCI-H522 and the immortalized lung epithelial cell line BEAS-2B were obtained from American Type Culture Collection (LGC Standards Sarl, Molsheim, France) and cultured according to the manufacturer's instructions. Cells used for hypoxia assays were seeded (6×10^5 cells/well) in 6-well plates and grown in complete medium for 24 h under standard conditions. They were then kept under hypoxic (1% O₂, 5% CO₂, and 94% N₂) or standard conditions for an additional 24 h. Treated cells were washed, total RNA was extracted using RNeasy kits (Qiagen France, Courtaboeuf, France), and proteins were extracted using Phospho-Safe lysis buffer (EMD Millipore, Molsheim, France). Human lung primary fibroblasts (CCD16-Lu) were also obtained from American Type Culture Collection. Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were supplied by PromoCell (Heidelberg, Germany), and human lung blood microvascular endothelial cells (HBMVEC-Ls; patient 1, tissue acquisition no. 17888, lot no. 123873; and patient 2, tissue acquisition no. 14230, lot no. 6F3434) were provided by Lonza (Basel, Switzerland). The EC lines were cultured in EC growth medium 2 (EGM2-MV) containing 5% fetal bovine serum and bovine brain extract, human epithelial growth factor, hydrocortisone, GA-1000 (gentamicin and amphotericin-B), VEGF, human fibroblast growth factor-B, R3-IGF-1, and ascorbic acid (Lonza). All cells were treated in endothelial basal medium 2 (EBM2) and were grown for a maximum of 7 passages. EC-conditioned medium was obtained by culturing cells (2×10^5 cells/well) in 6-well plates in complete medium for 48 h. They were then starved for 1 h, followed by incubation in medium containing 10 nM active KLK12 or KLK12 activity buffer (controls) for 24 h. The resulting supernatants were recovered and used to analyze the secretion of proangiogenic factors (Proteome Profiler Human Angiogenesis Array Kit; R&D Systems Europe) or PDGF-B by an ELISA (Interchim, Montluçon, France) or incubated with CCD16-Lu fibroblasts. *PDGFB* gene expression in ECs was assayed by lysing the cells and extracting total RNA with RNeasy kits (Qiagen, Courtaboeuf, France).

EC-derived ECM was prepared by detaching the cells with citrate buffer [0.135 mM KCl, 15 mM NaCl in phosphate-buffered saline (PBS) without CaCl₂ or MgCl₂] before treatment.

Medium conditioned by lung fibroblasts was obtained by culturing these cells (1.5×10^5 cells/well) in 6-well plates in

complete minimal essential medium (MEM) for 24 h. The cells were then starved and incubated in EC-conditioned medium for 24 h. In some experiments, the medium was supplemented with 0.1 $\mu\text{g/ml}$ anti-PDGF-B antibody or a control isotype. The VEGF-A in this conditioned medium was analyzed by an ELISA (PeproTech France, Neuilly-Sur-Seine, France). *VEGFA* gene expression in fibroblasts was determined by lysing the cells and extracting total RNA using RNeasy kits.

Capillary formation assay

HBMVEC-Ls (patient 2) plus CCD16-Lu fibroblasts were incubated together in 24-well plates (20,000 cells/well) in complete EC medium for 72 h. The cells were then washed and incubated for 9 d in EBM2 containing 20 ng/ml KLK12 (1 nM), 10 ng/ml VEGF, or control buffer. This medium was supplemented with 0.1 $\mu\text{g/ml}$ anti-PDGF-B or anti-VEGF antibodies or a control isotype. The medium was changed every 48 to 72 h. The cells were then fixed by incubation in PBS containing 4% paraformaldehyde for 30 min for immunofluorescence. Under some conditions, the proangiogenesis factors in coculture supernatants were analyzed using the Proteome Profiler Human Angiogenesis Array Kit as recommended by the manufacturer.

Immunofluorescence

Capillaries were detected with an anti-CD31 antibody conjugated to phycoerythrin, and cell nuclei were stained with Hoechst compound (Interchim). The length of capillaries was determined on ≥ 6 fields at $\times 4$ view for each condition and each experiment, using ImageJ software (U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

To stain PDGF-B, HBMVEC-Ls or HBMVEC-L-derived ECM, treated or not treated with KLK12 for 24 h, was fixed for 30 min using 4% paraformaldehyde in PBS. PDGF-B was indirectly stained with an anti-PDGF-B antibody and a secondary antibody conjugated to Alexa Fluor 488 (Invitrogen, Courtaboeuf, France) and the cell nucleus with Hoechst compound (Interchim).

Fibroblast chemotaxis

Fibroblast chemotaxis was assessed using a modified Boyden chamber assay. In brief, conditioned medium from HBMVEC-Ls (patient 2) was supplemented with 0.1 $\mu\text{g/ml}$ of anti-PDGF-B antibody or the control isotype and placed in the bottom chamber. CCD16-Lu fibroblasts, suspended in EBM2 (20,000 cells/well), were placed in the upper chamber on 8- μm -pore diameter cell culture inserts (Becton Dickinson, Le Pont de Claix, France) and incubated for 48 h at 37°C and 5% CO_2 . The cells that had migrated to the lower side of the filter were fixed with methanol, stained with Hoechst stain, and counted in ≥ 6 microscope fields per filter.

Fibroblast growth assay

Cells (3000/well, 96-well plates) were incubated in complete medium for 24 h, starved for 1 h, and then incubated in EC-conditioned medium for 8, 24, or 48 h. The resulting supernatants were recovered, and the VEGF released by the fibroblasts was assayed with a VEGF ELISA. The growth of fibroblasts was analyzed using an 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium (MTS) assay, CellTiter 96 AQueous One Solution (Promega, Charbonnières les Bains, France), according to the manufacturer's

instructions. Cells were incubated at 37°C in 5% CO_2 for 2 h, and proliferation was assayed by measuring absorbance at 490 nm.

Enzyme activity

Pro-KLK12 was activated according to the manufacturer's instructions. The enzyme, in activation buffer [100 mM Tris, 150 mM NaCl, 10 mM CaCl_2 , and 0.05% (w/v) Brij35, pH 8.0], was incubated at 37°C for 24 h. KLK12 activity was titrated in activation buffer [100 mM Tris, 150 mM NaCl, 10 mM CaCl_2 , and 0.05% (w/v) Brij35, pH 7.5], using a Boc-VPR-AMC substrate (R&D Systems Europe). The assay buffer was used as a negative control in all experiments. The hydrolysis of fluorogenic peptides was monitored with a Cary Eclipse fluorescence spectrophotometer (Varian, Santa Clara, CA, USA). Second-order rate constants were calculated using EnzFitter software (Biosoft, Cambridge, UK), measured under pseudo-first-order conditions [peptides (500 nM) were incubated with 10 nM KLK12] and are reported as means $\pm$ SD ($n=3$). Total hydrolysis of peptides was obtained using 10 nM titrated trypsin. Michaelis constants were determined from Lineweaver-Burk plots (1–10 μM FRET peptides incubated with 10 nM KLK12) and are reported as means $\pm$ SD ($n=3$).

Analysis of KLK12 cleavage site

Cter2 peptide (5 μM) was incubated with 10 nM KLK12 at 37°C for 4 h. The fragments generated were separated by HPLC (Agilent 1200 series; Agilent, Santa Clara, CA, USA) on a C18 column (2.1 mm $\times$ 30 mm, Brownlee; PerkinElmer, Waltham, MA, USA) with a linear gradient (0–60%, v/v) of acetonitrile in 0.01% trifluoroacetic acid (0.3 ml/min) for 30 min. Eluted peaks were monitored at 220 nm and analyzed by mass spectrometry.

Mass spectrometry

Peptides were analyzed by matrix-assisted laser desorption/ionization/time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry. The matrix solution consisted of saturated 4-hydroxy- α -cyanocinnamic acid in 66.5% water, 33.3% acetonitrile, and 0.1% trifluoroacetic acid (TFA). Analytes (micromolar concentrations) were prepared by 400-fold dilution in the matrix solution. The analyte-matrix solutions were spotted onto a gold-plated sample probe using the ultrathin layer method (30, 31), and the spots were washed with 0.1% TFA. Analyses were performed in positive ion mode using an Ultraflex I mass spectrometer (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) equipped with a 337-nm nitrogen laser and a gridless delayed extraction ion source. Spectra were acquired in reflectron mode (1000 laser shots) in the 500–5000 m/z range. The system was calibrated with the PepMix I calibration kit (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) using the near-neighbor spot strategy. The instrument was controlled using Bruker flexControl software (Bruker Daltonics). MALDI-TOF mass spectrometry spectra were processed using flexAnalysis 2.0 software (Bruker Daltonics), and cleavage peptides were assigned using Paws 8.5.0.3 (ProteoMetrics, New York, NY, USA).

RT-PCR analysis

Total RNA was used to prepare cDNA with High Capacity cDNA Archive kits (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. All quantitative PCR (qPCR) analyses were performed on a LightCycler 480 (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA) in 10- μl reaction volumes, made up of 5 μl of ($2\times$)

TABLE 1. *KLK12*-regulated angiogenesis-related factors in 3 endothelial cell lines

Factor	Pixel density fold change		
	HUVECs	HBMVEC-Ls	
		Patient 1	Patient 2
Activin-A	0.70 ± 0.00	1.27 ± 0.11	16.06 ± 0.71
Artemin	0.82 ± 0.12	0.37 ± 0.05	0.61 ± 0.18
DPPIV	0.78 ± 0.00	1.67 ± 0.01	2.08 ± 0.10
Endoglin	1.13 ± 0.10	2.46 ± 0.12	1.52 ± 0.04
GM-CSF	ND	1.64 ± 0.10	2.13 ± 1.47
IGFBP-1	1.29 ± 0.19	1.15 ± 0.06	2.04 ± 0.08
TGF-β1	1.11 ± 0.03	1.13 ± 0.92	0.43 ± 0.01
PDGF-AB/BB	2.30 ± 0.06	5.20 ± 0.22	2.17 ± 0.08

HUVECs or HBMVEC-Ls (patients 1 and 2) were incubated with 10 nM *KLK12* for 24 h, and the angiogenesis-related factors in the cell supernatant were analyzed using a protein array. The pixel density of each spot was quantified using ImageJ software and compared with the corresponding spots for control conditions (cells treated with *KLK12* activity buffer only). Only ≥2-fold differences are shown in the table, and results are expressed as mean ± SD fold differences in pixel density. DPPIV, dipeptidyl peptidase 4; GM-CSF, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; IGFBP-1, insulin-like growth factor-binding protein 1; TGF-β1, transforming growth factor-β1; PDGF-AB/BB, platelet-derived growth factor-AB/BB; ND, not determined.

SYBR Premix Ex Tag (Takara, Kyoto, Japan), 2.8 μl of RNase/DNase-free water, 0.2 μl of gene-specific primers, and 2 μl of cDNA (60 ng for all genes except that encoding *KLK12*, 120 ng). The thermal cycling protocol included an initial denaturation step at 95°C for 30 s followed by 45 cycles at 95°C for 5 s for denaturation and 62°C for 40 s for primer annealing and extension. Fluorescence was mea-

sured at 80°C after each cycle. Quantitative normalization in each sample was determined using *TBP/HPRT/ACTB* geometric mean gene expression as an internal control for the analysis of gene expression in hypoxic conditions and using *TBP* mean gene expression for the other analyses (*PDGFB* expression in HBMVEC-Ls and *VEGFA* in lung fibroblasts treated with EC-conditioned medium). Relative quantities were estimated using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. The primers were purchased from Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Germany; Supplemental Table S1).

Western blotting

PDGFR-β phosphorylation was analyzed using fibroblasts cultured in 6-well plates (1.5×10^5 cells/well) for 24 h in complete MEM. VEGFR2 phosphorylation was analyzed using HBMVEC-Ls (patient 2) cultured in complete MEM in 6-well plate (2×10^5 cells/well) for 24 h. The cells were starved and incubated in either EC-conditioned or fibroblast-conditioned medium, supplemented in some experiments with 0.1 μg/ml anti-PDGF-B or control isotype antibody. Treated cells were lysed in PhosphoSafe buffer [50 mM Tris-HCl, pH 7.4; 1 mM EDTA; 150 mM NaCl; 1% Nonidet P-40 (v/v); 5 mM NaF; 0.25 sodium deoxycholate (w/v); protease inhibitor; and 2 mM Na_3VO_4]. Proteins were separated on 4–12% NuPAGE gels (Invitrogen) in *N*-morpholino propanesulfonic acid (MOPS) migration buffer, transferred to polyvinylidene difluoride membranes by Tris-glycine-SDS liquid transfer, and immunodetected and revealed by chemoluminescence.

Statistical analysis

All statistical analyses were performed with GraphPad Prism 5.00 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Results

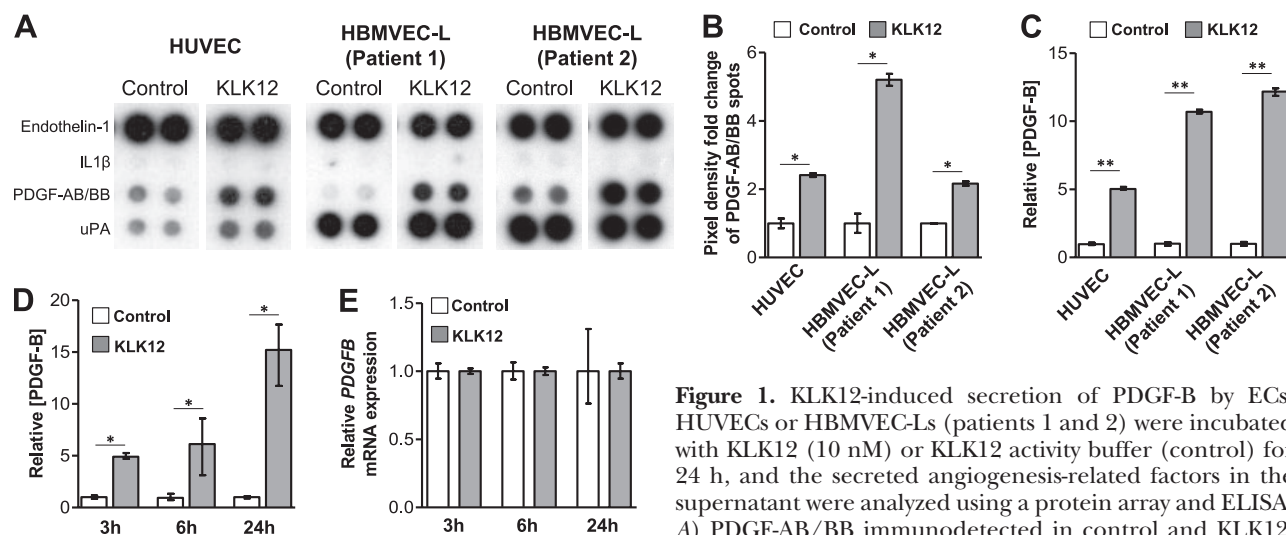


Figure 1. *KLK12*-induced secretion of PDGF-B by ECs.

HUVECs or HBMVEC-Ls (patients 1 and 2) were incubated with *KLK12* (10 nM) or *KLK12* activity buffer (control) for 24 h, and the secreted angiogenesis-related factors in the supernatant were analyzed using a protein array and ELISA. A) PDGF-AB/BB immunodetected in control and *KLK12*-

treated cells on the protein array (1 array/cell line). B) Densitometry of the PDGF-AB/BB spots was quantified using ImageJ. Results are expressed as fold differences in pixel density and are normalized to control conditions. C) Concentrations of PDGF-B in the control and *KLK12*-treated supernatant were determined using a specific PDGF-B ELISA ($n=3$). Mean PDGF-B concentrations were 232.5 ± 27.3 pg/ml (control) and 1176.5 ± 25.9 pg/ml (*KLK12*) for HUVECs, 145.8 ± 23.9 pg/ml (control) and 1562.2 ± 22.2 pg/ml (*KLK12*) for HBMVEC-Ls (patient 1), 128.8 ± 20.5 pg/ml (control) and 1567.0 ± 38.4 pg/ml (*KLK12*) for HBMVEC-Ls (patient 2). D) PDGF-B concentration in the supernatant of HBMVEC-Ls (patient 2) treated with *KLK12* (10 nM) or *KLK12* activity buffer (control) for 3, 6, and 24 h ($n=3$), determined by ELISA. E) Relative *PDGFB* mRNA concentrations in control and *KLK12*-treated HBMVEC-Ls (patient 2) cells incubated for 3, 6, and 24 h, determined by RT-qPCR ($n=3$). C–E) All results are relative concentrations of PDGF-B in control and *KLK12*-treated cells. Results are medians ± interquartile ranges, and statistical relevance was determined with the Mann-Whitney *U* test. * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$.

are given as medians and interquartile ranges of ≥ 3 independent experiments, except when specified.

RESULTS

KLK12-induced secretion of PDGF-B by ECs

We first used a protein array to identify the soluble angiogenic/angiostatic factors produced when primary HBMVEC-Ls or HUVECs were incubated with recombinant KLK12 and thus indicate the molecular mechanisms contributing to KLK12-induced angiogenesis. Several angiogenesis-related factors were detected in the supernatant of ECs (Supplemental Fig. S1) and regulated by KLK12 (Table 1). However, only PDGF-B was markedly increased in all EC lines (Table 1 and Fig. 1A, B). KLK12-mediated secretion of PDGF-B was confirmed using a specific PDGF-B ELISA (Fig. 1C). The release of PDGF-B into the supernatant was time-dependent (Fig. 1D), but RT-PCR indicated that it was not due to increased *PDGFB* gene expression (Fig. 1E).

KLK12-mediated release of PDGF-B from ECM components and cell surface *via* cleavage of its retention motif

Active PDGF is trapped extracellularly at the cell surface or by ECM components and may be cleaved proteolytically within its so-called retention motif to release soluble active PDGF (Fig. 2; refs. 32–34). However, the physiological proteolysis that sustains this mechanism has not been yet identified (34–36). Incubation with KLK12 released PDGF-B from the ECM (Fig. 2A) and reduced the amount of PDGF-B bound to the cell surface (Fig. 2B) of ECs, suggesting that KLK12 catalyzes the release of soluble PDGF.

The retention motif responsible for the interaction of PDGF-B with ECM components and the cell surface is a stretch of basic amino acids located in the C-terminal part of the protein (Fig. 2C). We wanted to determine whether KLK12 released matrix- and/or surface-bound PDGF-B by cleaving the retention motif. We therefore synthesized 2 FRET peptides covering the

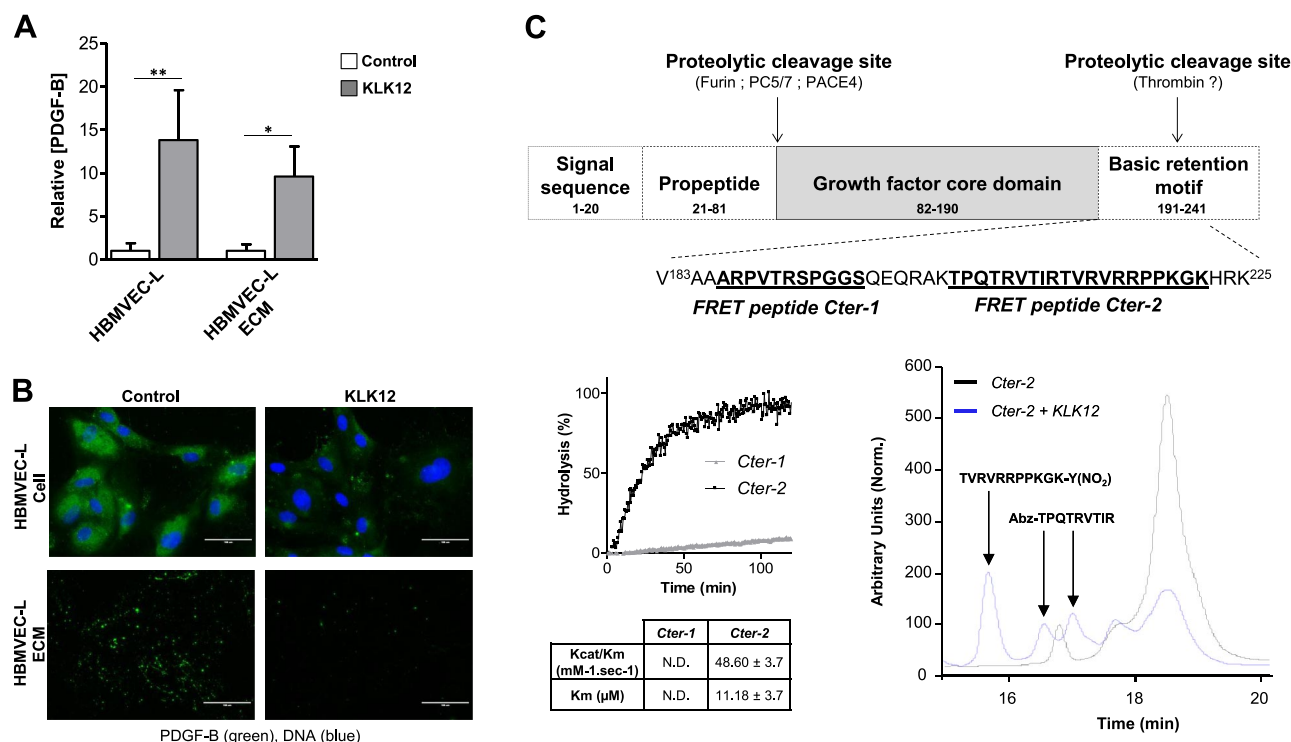


Figure 2. KLK12-catalyzed release of ECM-bound PDGF-B and cleavage of its retention motif. **A**) HBMVEC-Ls (patient 2) and ECM derived from HBMVEC-Ls were incubated with KLK12 (10 nM) or KLK12 activity buffer (control) for 24 h. PDGF-B concentration in the supernatant was determined using a specific PDGF-B ELISA. Results are expressed as the relative concentrations of PDGF-B under test and control conditions ($n=3$), given as medians $\pm$ interquartile ranges, with statistical relevance determined with the Mann-Whitney U test. * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$. **B**) HBMVEC-Ls (patient 2) and ECM derived from HBMVEC-Ls were incubated with KLK12 (10 nM) or KLK12 activity buffer (control) for 24 h. Then, PDGF-B localization on HBMVEC-Ls and ECM derived from HBMVEC-Ls was analyzed by immunofluorescence using an anti-PDGF-B antibody (green). Nuclei of HBMVEC-Ls were stained using Hoechst compound. Scale bars = 100 μ m. **C**) Top panel: PDGF-B protein sequence. Potential protease sites involved in PDGF-B maturation (propeptide) and ECM/cell membrane binding (basic retention motif) are indicated at top. The beginning of the basic retention motif amino acid sequence and those of the FRET peptides in bold (FRET peptide Cter-1 and Cter-2) are indicated at bottom. Bottom left panel: FRET peptide hydrolysis by 10 nM KLK12. Results are percentage hydrolysis (100% hydrolysis was obtained with 10 nM trypsin). Bottom right panel: Cter-2 proteolytic fragments separated by HPLC and analyzed by mass spectrometry. Mass spectrometry of the 3 main peaks: Cter-2 was cleaved by KLK12 after the ninth arginine, corresponding to R211 of PDGF-B.

amino-terminal part of the retention region (Fig. 2C, top panel) and analyzed the kinetics of hydrolysis by titrated KLK12. Because the specificity of KLK12 is trypsin-like (13, 37), it efficiently cleaved the peptide Cter-2 but not Cter-1, suggesting that the putative cleavage site in the PDGF-B retention motif is between residues 203 and 221 (Fig. 2C, bottom panel). HPLC and mass spectrometry analyses of the fragmented peptide Cter-2 revealed one main cleavage site at Arg211. The next question was whether the putative physiological cleavage at Arg-211 in microvascular EC- and/or membrane-bound PDGF-B released a soluble active PDGF-B, because additional cleavage within the core domain of the growth factor could not be excluded.

Effect of the active PDGF-B released by KLK12 on a fibroblast PDGFR- β signaling pathway and cellular responses

PDGF-B signaling ultimately results in cell growth, migration, and protection against apoptosis. This pathway is activated by the interaction of the growth factor with 2 cell surface receptors, PDGFR- α and PDGFR- β , on the membranes of mural cells (VSMCs and pericytes) and stromal cells, such as fibroblasts, EC progenitors, and cancer cells (34, 38). KLK12 may cleave PDGF-B after arginine residues in the growth factor core domain as well as in the basic retention motif (Fig. 2) to liberate an inactive PDGF-B growth factor. Therefore, we tested the capacity of PDGF-BB released by

KLK12 to activate PDGFR- β and stimulate cellular responses. Because lung ECs (HBMVEC-Ls, patients 1 and 2) lacked PDGFR- β (data not shown), we used lung fibroblasts, which bear this receptor, to investigate the ability of PDGF-BB released by KLK12 to activate PDGF-B/PDGFR- β signaling. We incubated lung fibroblasts with supernatants from pulmonary ECs treated with KLK12. The supernatants from KLK12-treated ECs enabled PDGFR- β autophosphorylation on several tyrosine residues in the intracellular domain of the receptor (Y1021, Y1009, Y771, and Y751). KLK12 also induced a PDGFR- β downstream connection through phosphatidylinositol 3-kinase/Akt (S374 and T308) signaling pathways (Fig. 3A) and favored fibroblast migration (Fig. 3B) and growth (see Fig. 5D). We verified that these effects depended solely on PDGF-B activity by blocking it with anti-PDGF-B antibodies (Fig. 3A, B).

KLK12-dependent angiogenesis mediation by PDGF-B paracrine effect in fibroblasts

EC-derived PDGF-B acts on vascular remodeling, maturation, and stability as a short-range paracrine factor. It promotes the proliferation and recruitment of adjacent progenitor mural cells (VSMCs and pericyte progenitors) to the nascent endothelium (34, 39, 40). Soluble PDGF-B also stimulates EC proliferation, sprouting, and tube formation in tumors and the production of angiogenic factors by stromal cells, including fibroblasts (28, 29, 34, 41). We postulated that the KLK12-dependent release of PDGF-B leads to an-

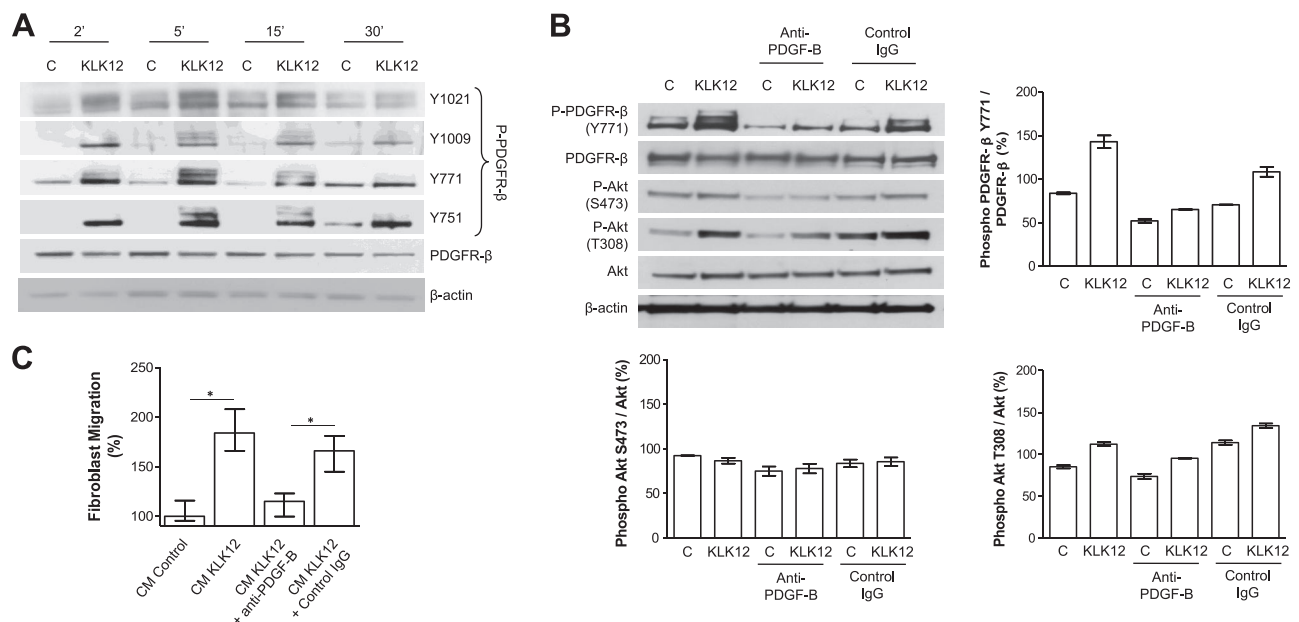


Figure 3. Biological activity of PDGF-B released by KLK12: it initiated the PDGFR- β signaling pathway and migration of lung fibroblasts. Lung fibroblasts were incubated with conditioned medium from control (C) HBMVEC-Ls (patient 2) or those treated with 10 nM KLK12 (KLK12) for 2, 5, 15, or 30 min. Conditioned medium was supplemented with 0.1 μ g/ml blocking anti-PDGF-B or isotype antibodies in some experiments. A, B) Phosphorylation of PDGFR- β (A) and downstream mediators (B) in lung fibroblast lysates was analyzed by Western blotting. Densitometry data were analyzed with ImageJ; results are expressed as relative densities (percentage) of phosphorylated/total proteins. C) Fibroblast migration induced by PDGF-B released by KLK12 from cultured ECs. Results of the migration assay in a modified Boyden chamber are shown as the relative percentage of migratory cells after incubation for 48 h. Kruskal-Wallis test was used for statistical analysis. * $P \leq 0.05$.

giogenesis *via* a paracrine effect on stromal cells. We tested this using an *in vitro* model of lung angiogenesis in which ECs are cultured with fibroblasts derived from lung. This system was based on that described by Bishop *et al.* (ref. 42; see Supplemental Fig. S2). Incubation of these cocultures with KLK12 led to tube formation by lung ECs, as did incubation with VEGF-A, which was used as a positive control (Fig. 4A). Anti-PDGF-B blocking antibodies prevented the KLK12-dependent tube formation (Fig. 4A), indicating that the KLK12-catalyzed release of PDGF-B is central to this effect. Analysis of the soluble factors produced by the 3-dimensional angiogenesis model showed a marked increase in VEGF-A, a major angiogenic factor produced by several cell types, including fibroblasts (Fig. 4B). However, the increase in VEGF was not due to a direct effect of KLK12 on either lung fibroblasts or HBMVEC-Ls, as shown by protein array (Supplemental Fig. S1) and confirmed by an ELISA (Supplemental Fig. S1 and data not shown for HBMVEC-Ls). Anti-VEGF blocking antibodies also limited KLK12-dependent tube formation (Fig. 4A), indicating that both PDGF-B and VEGF are required for the KLK12-mediated control of angiogenesis. These results suggest that the PDGF-B released from ECs by KLK12 stimulates the production of VEGF by fibroblasts, which in turn favors EC sprouting and tube formation. We tested this hypothesis by analyzing

the effect of supernatants from ECs cultured with KLK12 on fibroblasts.

KLK12 angiogenic effect, the release of PDGF-B, and subsequent VEGF secretion

ECs treated with KLK12 contained a factor that stimulated fibroblasts to secrete VEGF-A (Fig. 5A). Anti-PDGF-B antibody blocked most of the VEGF-A production, demonstrating that VEGF-A secretion by lung fibroblasts depends on a PDGF-B paracrine effect. However, supernatants from stimulated fibroblasts also induced VEGFR2 phosphorylation in ECs and the VEGFR2 signaling pathway was inactivated when the conditioned medium from fibroblasts was incubated with supernatants of ECs treated with KLK12 and anti-PDGF-B antibody (Fig. 5B). Thus, PDGF-B is probably one of the molecules linking the interaction between KLK12-induced ECs and fibroblasts.

Because PDGF-B could up-regulate *VEGFA* expression (27, 28), we compared the amounts of VEGF-A mRNA in fibroblasts stimulated with supernatants of ECs treated with KLK12 for 1, 3, and 5 h with the mRNA in fibroblasts treated with control EC supernatants. *VEGFA* gene expression was not increased (Fig. 5C). We also assayed secreted VEGF-A and the growth of fibroblasts stimulated for 8, 24, and 48 h with supernatants of KLK12-treated ECs and control EC

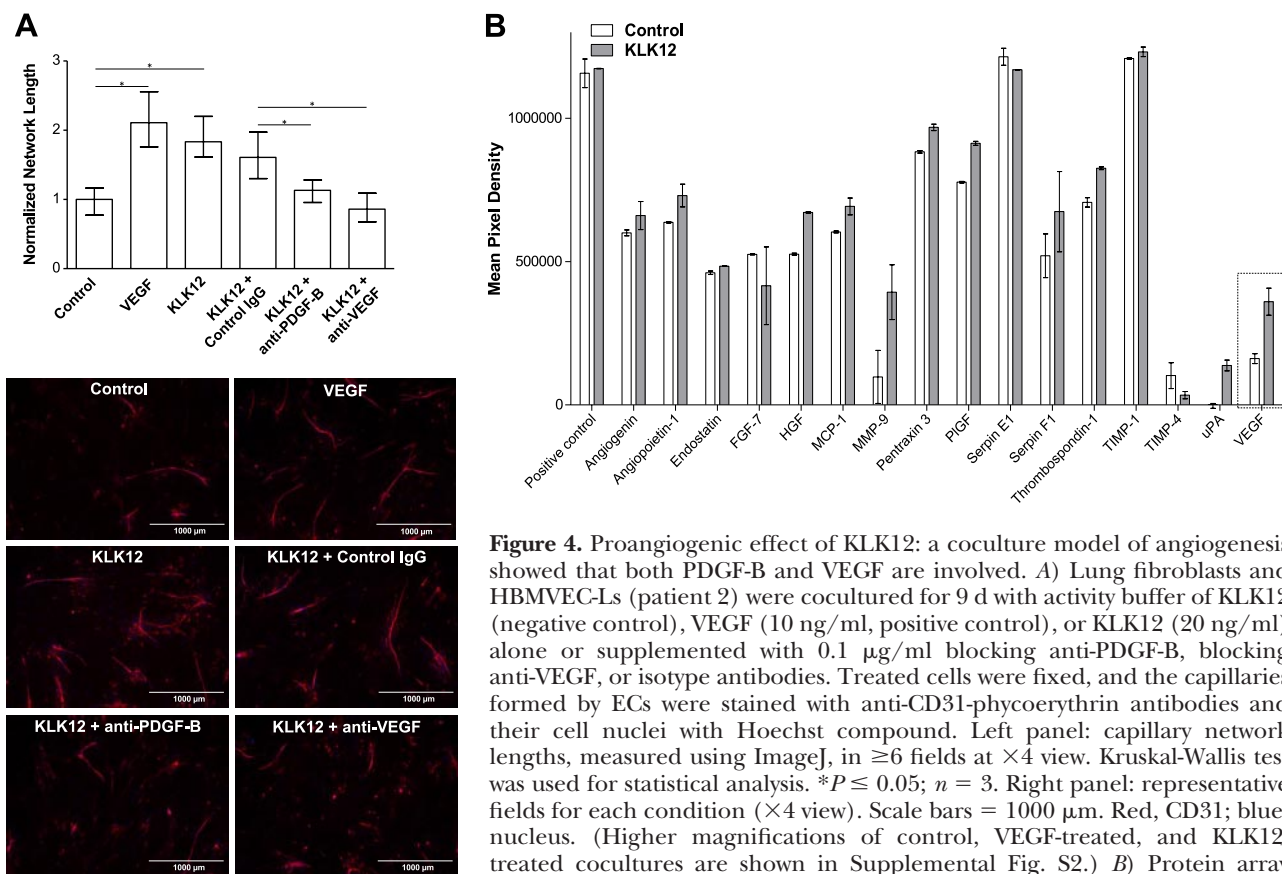


Figure 4. Proangiogenic effect of KLK12: a coculture model of angiogenesis showed that both PDGF-B and VEGF are involved. A) Lung fibroblasts and HBMVEC-Ls (patient 2) were cocultured for 9 d with activity buffer of KLK12 (negative control), VEGF (10 ng/ml, positive control), or KLK12 (20 ng/ml) alone or supplemented with 0.1 μ g/ml blocking anti-PDGF-B, blocking anti-VEGF, or isotype antibodies. Treated cells were fixed, and the capillaries formed by ECs were stained with anti-CD31-phycoerythrin antibodies and their cell nuclei with Hoechst compound. Left panel: capillary network lengths, measured using ImageJ, in ≥ 6 fields at $\times 4$ view. Kruskal-Wallis test was used for statistical analysis. $*P \leq 0.05$; $n = 3$. Right panel: representative fields for each condition ($\times 4$ view). Scale bars = 1000 μ m. Red, CD31; blue, nucleus. (Higher magnifications of control, VEGF-treated, and KLK12-treated cocultures are shown in Supplemental Fig. S2.) B) Protein array analysis of supernatants (d 7) of control and KLK12-treated cocultures for angiogenesis-related factors. Pixel density for each spot was determined using ImageJ. Bars represent mean $\pm$ SD pixel densities. VEGF secretion is enclosed by a dotted rectangle.

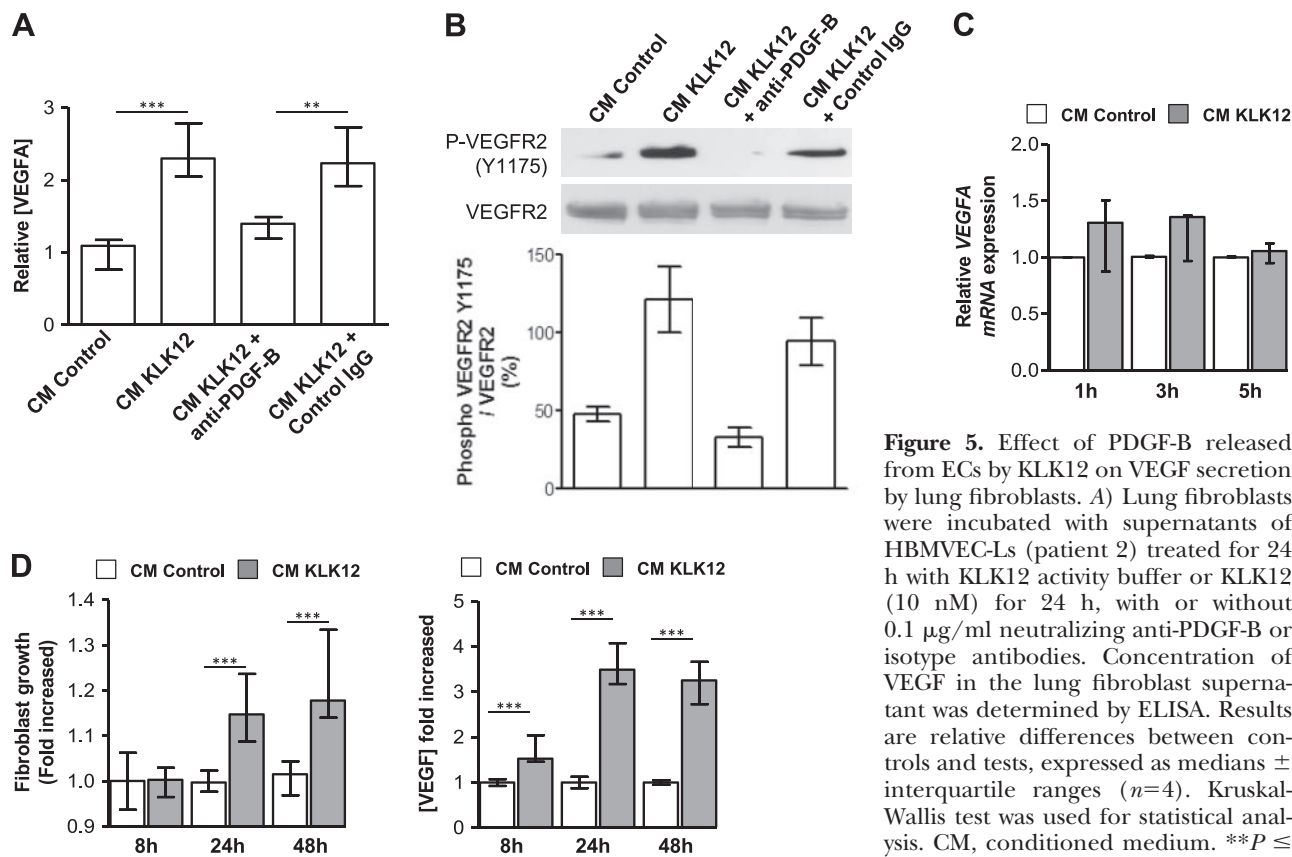


Figure 5. Effect of PDGF-B released from ECs by KLK12 on VEGF secretion by lung fibroblasts. **A)** Lung fibroblasts were incubated with supernatants of HBMVEC-Ls (patient 2) treated for 24 h with KLK12 activity buffer or KLK12 (10 nM) for 24 h, with or without 0.1 μ g/ml neutralizing anti-PDGF-B or isotype antibodies. Concentration of VEGF in the lung fibroblast supernatant was determined by ELISA. Results are relative differences between controls and tests, expressed as medians $\pm$ interquartile ranges ($n=4$). Kruskal-Wallis test was used for statistical analysis. CM, conditioned medium. ** $P \leq 0.01$; *** $P \leq 0.001$. **B)** VEGFR2 activation

in HBMVEC-Ls (patient 2) incubated for 5 min with supernatant from stimulated fibroblasts. Top panel: Western blot analysis of phospho (P)-VEGFR2. Bottom panel: densitometry analysis of phospho-VEGFR2/total VEGFR2 using ImageJ. **C)** RT-qPCR of VEGFA mRNA in lung fibroblasts incubated with supernatants from control or KLK12-treated HBMVEC-Ls (patient 2) for 1, 3, or 5 h, with or without neutralizing anti-PDGF-B or control isotype antibodies. Results are the relative amounts of VEGFA mRNA in control and treated cells. TBP mRNA was used as reference. **D)** Effects of conditioned medium from HBMVEC-Ls (patient 2) treated with KLK12 for 24 h on the growth of lung fibroblasts (MTS assay) and VEGF-A (ELISA), assayed at 8, 24, and 48 h. Results are the relative differences in optical density at 490 nm (fibroblast growth) and VEGF concentration in control and treated cells, expressed as medians $\pm$ interquartile ranges ($n=3$). Statistical analysis was performed using the Mann-Whitney U test. *** $P \leq 0.001$.

supernatants because PDGF-B-dependent VEGF production could reflect only fibroblast proliferation. Supernatants from KLK12-treated ECs stimulated both VEGF-A secretion and fibroblast growth (Fig. 5D), but the rates were different: VEGF-A increased before cells began to proliferate. These results suggest that the increase in VEGF-A mediated by PDGF-B is not due to either increased gene expression or an indirect effect of PDGF-B on fibroblast growth.

Expression of both KLK12 and PDGFB genes is regulated by hypoxia in the lung tumor microenvironment

Hypoxia often stimulates PDGF-B production by tumor cells (24, 43), acting as both an autocrine and a paracrine factor to promote tumor growth and progression (28, 29, 41, 44, 45).

We evaluated the action of hypoxia on the *KLK12* gene in lung epithelial cells because KLK12 synthesis is also stimulated in epithelial cancer cells (13, 46) and stimulates angiogenesis through PDGF-B. The expres-

sions of *KLK12*, *PDGFB*, and *VEGF* in NSCLC cells and lung epithelial cells were all increased by hypoxia (Fig. 6), whereas the synthesis of HIF-1 was stabilized, as expected. KLK12 treatment also stimulated the secretion of PDGF-B by 3 NSCLC cell lines that contained the most KLK12 when made hypoxic (Fig. 6C). Analysis of the 5'-flanking region of the *KLK12* gene revealed that it contains ≥ 2 HIF-1 binding sites, which are required for a response to hypoxia (47): [A/G]CGTG, at nt -1505 to -1509 (site 1) and -1174 to -1178 (site 2) from AUG (Fig. 6D; nucleotide sequence from ENSEMBL, GRCh37:19:51531348:51539486:1, AUG site located at 51537877, the first site located at 51539386-51539382, and the second site located at 51539055-51539051).

DISCUSSION

Angiogenesis, a dynamic phenomenon that involves interactions between endothelial and mesenchymal cells and the ECM (48-51), is regulated spatiotempo-

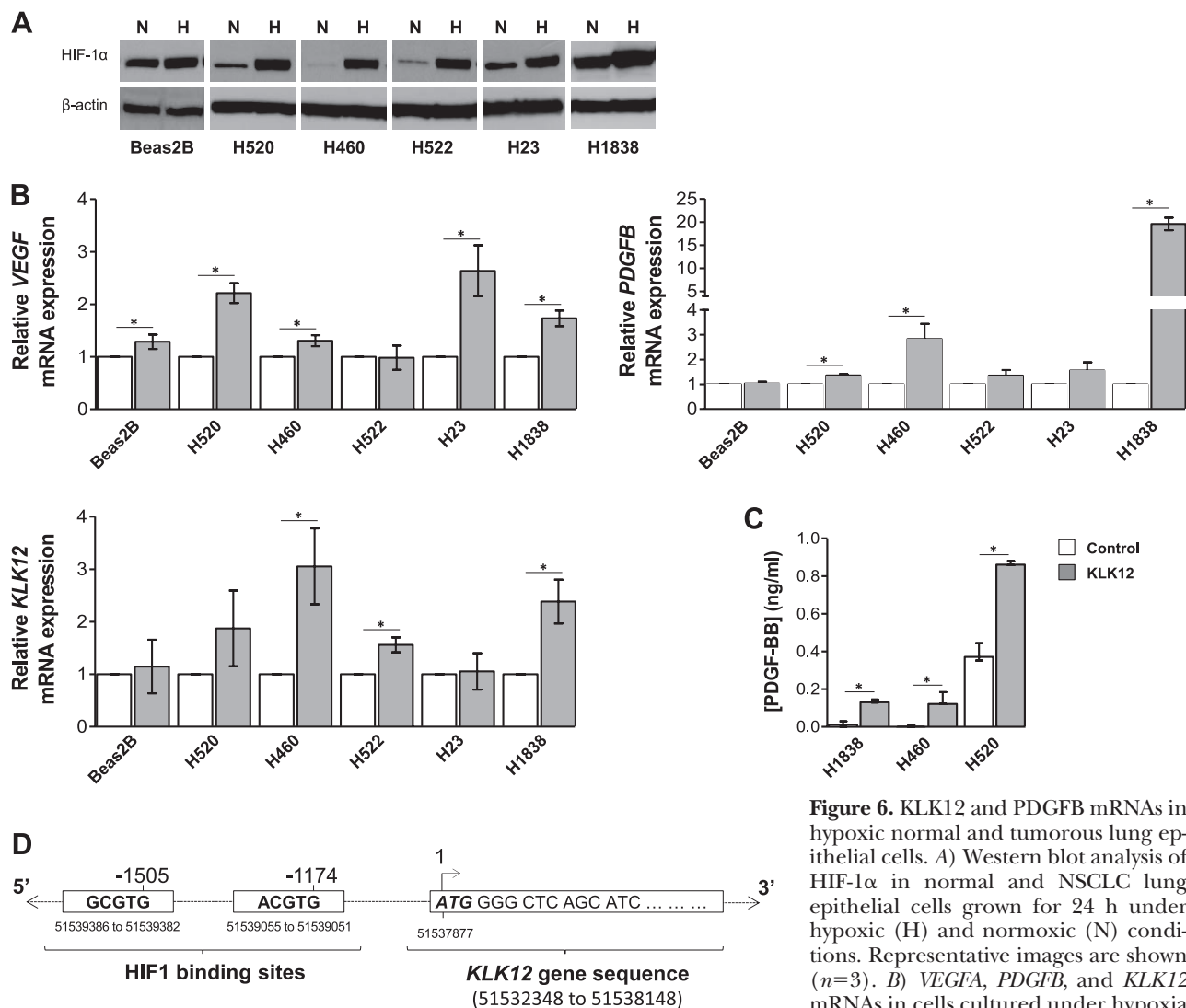


Figure 6. KLK12 and PDGFB mRNAs in hypoxic normal and tumorous lung epithelial cells. **A**) Western blot analysis of HIF-1α in normal and NSCLC lung epithelial cells grown for 24 h under hypoxic (H) and normoxic (N) conditions. Representative images are shown ($n=3$). **B**) *VEGFA*, *PDGFB*, and *KLK12* mRNAs in cells cultured under hypoxia

(gray bars) and normoxia (white bars). Results indicate the relative activities of the genes of interest in normoxia and hypoxia ($n=3$). Quantitative normalization was determined using the geometric mean of the activities of 3 housekeeping genes (*TBP*, *ACTB*, and *HPRT1*). **C**) NSCLC cells were incubated with KLK12 activity buffer or active KLK12 (10 nM) for 24 h, and concentration of PDGF-B in cell supernatants was measured by ELISA. Results are PDGF-B concentrations (ng/ml). **D**) Analysis of the 5'-flanked sequence of the human *KLK12* gene showing 2 potential HIF1 binding sites, one at position -1505 and the other at -1174 from the *KLK12* ATG. All results are given as medians $\pm$ interquartile ranges ($n=3$). Statistical analyses was performed using the Mann-Whitney *U* test. *** $P \leq 0.001$.

rally by several molecular pathways. One, the PDGF-B/PDGFR-β pathway, is important for normal control, through recruitment of pericytes to stabilize new vessels, and in tumor angiogenesis. The synthesis and processing of PDGF-B are tightly controlled at multiple levels, with secreted PDGF-B being removed from the N-terminal propeptide intracellularly by furin or related proprotein convertases. The C-terminal retention motif of the resulting PDGF-B interacts with the cell surface or the ECM so that the PDGF-B becomes trapped at these sites. We have now shown that KLK12 efficiently cleaves the C-terminal retention motif at a single R211 site, which might explain the release of soluble active PDGF-B into the extracellular compartment. To date, only thrombin had been reported to be a putative soluble PDGF-B-releasing protease, but the reality of this proteolytic process and the biological

relevance of this phenomenon remained questionable (36, 52, 53). KLK12 is synthesized in ECs, as is PDGF-B (data not shown and refs. 12, 18) and its active form secreted by these cells. KLK12 could thus be involved in the release of soluble PDGF-B *in vivo*.

PDGF-B synthesis is up-regulated in lung and gastric epithelial tumor cells (24, 43). We and others have found that KLK12 is overabundant in NSCLC cells and in breast and gastric cancer cells (13, 46, 54). This overabundance is associated with poor patient outcomes in gastric cancer (46). The activity of the *PDGFB* gene is regulated in part by tumor hypoxia and involves the HIF-1α signaling pathway (44, 45, 55). We have now found that hypoxic conditions increase KLK12 synthesis by NSCLC cells. These results suggest that the *PDGFB* and *KLK12* genes are coexpressed in some cells under both normal and pathological conditions and

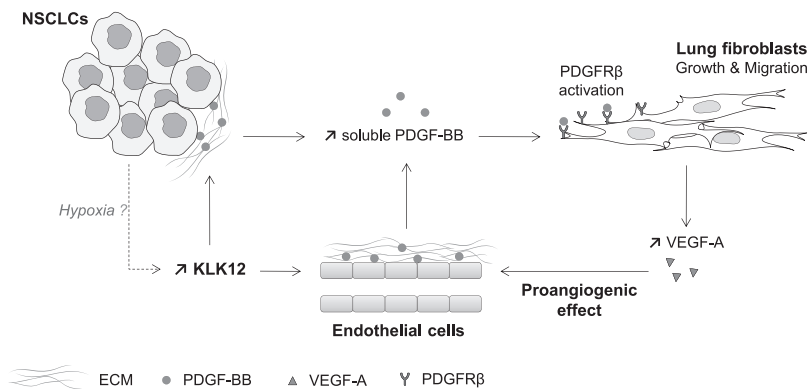


Figure 7. Diagram of the mechanism possibly underlying the proangiogenic effect of KLK12 on lung endothelial cells. The KLK12 gene is overexpressed in NSCLCs, perhaps under hypoxia. We have now shown that KLK12 increases PDGF-BB bioavailability by acting on lung endothelial and cancer cells. Release of PDGF-BB could be mediated by direct cleavage of the retention motif by KLK12. Liberated soluble PDGF-BB may act on lung fibroblasts to activate the PDGFR β signaling pathway. Autophosphorylation of this receptor stimulates the migration and growth of lung fibroblasts and also induced the release of soluble VEGF-A. This soluble VEGF-A stimulates lung ECs and induces angiogenesis.

that their expression is correlated with hypoxic conditions in tumor cells. Although androgens are common trans-activating modulators of KLK genes, HIF-1 α activates the *KLK3* (prostate-specific antigen) gene by interacting with the androgen receptor on the *KLK3* gene promoter (56). The 5'-flanking region of *KLK12* contains ≥ 2 HIF-1 binding elements, suggesting that HIF-1 could induce *KLK12* expression. Further studies are required to test this hypothesis. PDGF-B is produced mainly by ECs in normal angiogenesis and promotes the proliferation and recruitment of mesenchymal cells *via* a short-range paracrine mechanism (33, 39). Several *in vitro* and *in vivo* models of angiogenesis are available for analyzing the effect of angiogenic and angiostatic factors. We and others have used Matrigel angiogenesis assays to demonstrate the effect of KLK12 on angiogenesis, although they are poor mimics of *in vivo* capillary formation (12, 17). We have now used an *in vitro* angiogenesis assay based on the coculture of ECs and fibroblasts, which provides a more physiological environment with a matrix naturally laid down by ECs and fibroblasts, to support 3-dimensional capillary-like formation (Supplemental Fig. S2) and allow molecular interactions and crosstalk between ECs and mesenchymal cells (42, 50, 57–59). Addition of recombinant active KLK12 induced the formation of capillary-like structures by ECs in this model, thus providing novel proof that KLK12 is implicated in angiogenesis (Fig. 7). This angiogenic effect is undoubtedly due to the proteolytic action of KLK12 to release PDGF-B from ECs and the ECM- and the PDGF-B-dependent secretion of VEGF-A by stromal cells, because KLK12-dependent tube formation was abrogated by both anti-PDGF-B and anti-VEGF-A blocking antibodies. The release of PDGF-B by KLK12 results from the proteolysis cleavage of its retention motif, but we have not ascertained the mechanism underlying the induction of VEGF secretion. VEGF synthesis and bioavailability are controlled at multiple levels (26, 60–63). Because PDGF-B did not increase VEGF-A synthesis and KLK12 did not directly liberate VEGF trapped in the ECM produced by fibroblasts, another extracellular protease, such as plasmin or the urokinase type of plasminogen activator (uPA), and secreted matrix metalloproteases (MMP-3, MMP-7, MMP-9 and MMP-19) could be implicated in VEGF release (62). The marked

increases in both MMP-9 and uPA in the supernatants of KLK12-treated cocultures (Fig. 4) but not in those of KLK12-treated ECs (Supplemental Fig. S1) suggest that these proteases are involved in VEGF secretion.

Dysregulation of KLK12 in pathological conditions, such as systemic sclerosis and cancers (NSCLC and gastric cancer), might be important for disease development and progression. The KLK12-mediated liberation of sequestered PDGF-B might induce angiogenesis *via* the activation of ECs by stromal cell-secreted VEGF. However, the uncontrolled proteolysis of the PDGF-B retention motif might affect the investment of pericytes in the microvessel wall, leading to leaky, immature neovessels (21, 64). In the tumor microenvironment, the KLK12-dependent release of soluble PDGF-B may promote tumor development and progression through its autocrine, paracrine, and endocrine actions (29, 65, 66). Thus, the activity of KLK12 requires both spatial and temporal control to avoid abnormal vessel formation and unwanted tissue damage.

Many extracellular proteases contribute to angiogenesis by regulating ECM remodeling and cell migration and modulating growth factors and cytokines (67). KLK1 is the only KLK protease that has been directly linked to angiogenesis to date: it triggers the VEGF-A-independent activation of the Akt/endothelial nitric oxide synthase pathway (68, 69). However, the present study provides new evidence of the importance of KLK12 in the control of angiogenesis. This protease drives the liberation and diffusion of active PDGF-B from the ECM, enabling crosstalk between ECs and mesenchymal cells.

In summary, our results indicate that the KLK protease, KLK12, regulates PDGF-B availability possibly by cleaving its C-terminal retention motif. In light of the multiple roles of PDGF-B in both physiological and pathophysiological processes and the development of therapeutic strategies to block PDGF-B, this finding could provide new insights into the targeting of the PDGF-B signaling pathway in diseases. **[F]**

The authors thank Christophe Epinette (Université de Tours, Tours, France) for technical assistance with HPLC and the Plateforme de Spectrométrie de Masse et Protéomique du Centre de Biophysique Moléculaire (Orléans, France) for mass spectrometry analysis. The English text was edited by Dr. Owen

REFERENCES

- Borgono, C. A., Michael, I. P., Shaw, J. L., Luo, L. Y., Ghosh, M. C., Soosaipillai, A., Grass, L., Katsaros, D., and Diamandis, E. P. (2007) Expression and functional characterization of the cancer-related serine protease, human tissue kallikrein 14. *J. Biol. Chem.* **282**, 2405–2422
- Lundwall, A., and Brattsand, M. (2008) Kallikrein-related peptidases. *Cell. Mol. Life Sci.* **65**, 2019–2038
- Oikonomopoulou, K., Hansen, K. K., Saifeddine, M., Vergnolle, N., Tea, I., Blaber, M., Blaber, S. I., Scarisbrick, I., Diamandis, E. P., and Hollenberg, M. D. (2006) Kallikrein-mediated cell signalling: targeting proteinase-activated receptors (PARs). *Biol. Chem.* **387**, 817–824
- Eissa, A., Amodeo, V., Smith, C. R., and Diamandis, E. P. (2010) Kallikrein-related peptidase-8 (KLK8) is an active serine protease in human epidermis and sweat and is involved in a skin barrier proteolytic cascade. *J. Biol. Chem.* **286**, 687–706
- Sotiropoulou, G., Pampalakis, G., and Diamandis, E. P. (2009) Functional roles of human kallikrein-related peptidases. *J. Biol. Chem.* **284**, 32989–32994
- Sotiropoulou, G., and Pampalakis, G. (2010) Kallikrein-related peptidases: bridges between immune functions and extracellular matrix degradation. *Biol. Chem.* **391**, 321–331
- Veveris-Lowe, T. L., Kruger, S. J., Walsh, T., Gardiner, R. A., and Clements, J. A. (2007) Seminal fluid characterization for male fertility and prostate cancer: kallikrein-related serine proteases and whole proteome approaches. *Semin. Thromb. Hemost.* **33**, 87–99
- Lu, Y., Papagerakis, P., Yamakoshi, Y., Hu, J. C., Bartlett, J. D., and Simmer, J. P. (2008) Functions of KLK4 and MMP-20 in dental enamel formation. *Biol. Chem.* **389**, 695–700
- Scarisbrick, I. A., Blaber, S. I., Tingling, J. T., Rodriguez, M., Blaber, M., and Christophi, G. P. (2006) Potential scope of action of tissue kallikreins in CNS immune-mediated disease. *J. Neuroimmunol.* **178**, 167–176
- Scarisbrick, I. A., Linbo, R., Vandell, A. G., Keegan, M., Blaber, S. I., Blaber, M., Sneve, D., Lucchinetti, C. F., Rodriguez, M., and Diamandis, E. P. (2008) Kallikreins are associated with secondary progressive multiple sclerosis and promote neurodegeneration. *Biol. Chem.* **389**, 739–745
- Diamandis, E. P., Yousef, G. M., Luo, L. Y., Magklara, A., and Obiezu, C. V. (2000) The new human kallikrein gene family: implications in carcinogenesis. *Trends Endocrinol. Metab.* **11**, 54–60
- Giusti, B., Serrati, S., Margheri, F., Papucci, L., Rossi, L., Poggi, F., Magi, A., Del Rosso, A., Cinelli, M., Guiducci, S., Kahaleh, B., Matucci-Cerinic, M., Abbate, R., Fibbi, G., and Del Rosso, M. (2005) The antiangiogenic tissue kallikrein pattern of endothelial cells in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* **52**, 3618–3628
- Guillon-Munos, A., Oikonomopoulou, K., Michel, N., Smith, C. R., Petit-Courty, A., Canepa, S., Reverdiau, P., Heuze-Vourc'h, N., Diamandis, E. P., and Courty, Y. (2011) Kallikrein-related peptidase 12 hydrolyzes matricellular proteins of the CCN family and modifies interactions of CCN1 and CCN5 with growth factors. *J. Biol. Chem.* **286**, 25505–25518
- Yousef, G. M., Magklara, A., and Diamandis, E. P. (2000) KLK12 is a novel serine protease and a new member of the human kallikrein gene family-differential expression in breast cancer. *Genomics* **69**, 331–341
- Shaw, J. L., and Diamandis, E. P. (2007) Distribution of 15 human kallikreins in tissues and biological fluids. *Clin. Chem.* **53**, 1423–1432
- Hamilton, B. S., and Whittaker, G. R. (2013) Cleavage activation of the human-adapted influenza virus subtypes by kallikrein-related peptidases 5 and 12. *J. Biol. Chem.* **288**, 17399–17407
- Kryza, T., Lalmanach, G., Lavergne, M., Lecaille, F., Reverdiau, P., Courty, Y., and Heuze-Vourc'h, N. (2012) Pro-angiogenic effect of human kallikrein-related peptidase 12 (KLK12) in lung endothelial cells does not depend on kinin-mediated activation of B2 receptor. *Biol. Chem.* **394**, 385–391
- Giusti, B., Fibbi, G., Margheri, F., Serrati, S., Rossi, L., Poggi, F., Lapini, I., Magi, A., Del Rosso, A., Cinelli, M., Guiducci, S., Kahaleh, B., Bazzichi, L., Bombardieri, S., Matucci-Cerinic, M., Gensini, G. F., Del Rosso, M., and Abbate, R. (2006) A model of anti-angiogenesis: differential transcriptome profiling of microvascular endothelial cells from diffuse systemic sclerosis patients. *Arthritis Res. Ther.* **8**, R115
- Nissen, L. J., Cao, R., Hedlund, E. M., Wang, Z., Zhao, X., Wetterskog, D., Funai, K., Brakenhielm, E., and Cao, Y. (2007) Angiogenic factors FGF2 and PDGF-BB synergistically promote murine tumor neovascularization and metastasis. *J. Clin. Invest.* **117**, 2766–2777
- Bergers, G., and Hanahan, D. (2008) Modes of resistance to anti-angiogenic therapy. *Nat. Rev. Cancer* **8**, 592–603
- Bethsholtz, C., Lindblom, P., Bjarnegard, M., Enge, M., Gerhardt, H., and Lindahl, P. (2004) Role of platelet-derived growth factor in mesangium development and vasculopathies: lessons from platelet-derived growth factor and platelet-derived growth factor receptor mutations in mice. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* **13**, 45–52
- Bronzert, D. A., Pantazis, P., Antoniadis, H. N., Kasid, A., Davidson, N., Dickson, R. B., and Lippman, M. E. (1987) Synthesis and secretion of platelet-derived growth factor by human breast cancer cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **84**, 5763–5767
- Donnem, T., Andersen, S., Al-Saad, S., Al-Shibli, K., Busund, L. T., and Bremnes, R. M. (2011) Prognostic impact of angiogenic markers in non-small-cell lung cancer is related to tumor size. *Clin. Lung Cancer* **12**, 106–115
- Donnem, T., Al-Saad, S., Al-Shibli, K., Andersen, S., Busund, L. T., and Bremnes, R. M. (2008) Prognostic impact of platelet-derived growth factors in non-small cell lung cancer tumor and stromal cells. *J. Thorac. Oncol.* **3**, 963–970
- Kawai, T., Hiroi, S., and Torikata, C. (1997) Expression in lung carcinomas of platelet-derived growth factor and its receptors. *Lab. Invest.* **77**, 431–436
- Finkenzeller, G., Sparacio, A., Technau, A., Marme, D., and Siemeister, G. (1997) Sp1 recognition sites in the proximal promoter of the human vascular endothelial growth factor gene are essential for platelet-derived growth factor-induced gene expression. *Oncogene* **15**, 669–676
- Brogi, E., Wu, T., Namiki, A., and Isner, J. M. (1994) Indirect angiogenic cytokines upregulate VEGF and bFGF gene expression in vascular smooth muscle cells, whereas hypoxia upregulates VEGF expression only. *Circulation* **90**, 649–652
- Lederle, W., Stark, H. J., Skobe, M., Fusenig, N. E., and Mueller, M. M. (2006) Platelet-derived growth factor-BB controls epithelial tumor phenotype by differential growth factor regulation in stromal cells. *Am. J. Pathol.* **169**, 1767–1783
- Xue, Y., Lim, S., Yang, Y., Wang, Z., Jensen, L. D., Hedlund, E. M., Andersson, P., Sasahara, M., Larsson, O., Galter, D., Cao, R., Hosaka, K., and Cao, Y. (2011) PDGF-BB modulates hematopoiesis and tumor angiogenesis by inducing erythropoietin production in stromal cells. *Nat. Med.* **18**, 100–110
- Cadene, M., and Chait, B. T. (2000) A robust, detergent-friendly method for mass spectrometric analysis of integral membrane proteins. *Anal. Chem.* **72**, 5655–5658
- Gabant, G., and Cadene, M. (2008) Mass spectrometry of full-length integral membrane proteins to define functionally relevant structural features. *Methods* **46**, 54–61
- Lin, Y. S., Zheng, J. X., Tsui, Y. K., and Yen, Y. P. (2011) Colorimetric detection of cyanide with phenyl thiourea derivatives. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* **79**, 1552–1558
- Bethsholtz, C. (2004) Insight into the physiological functions of PDGF through genetic studies in mice. *Cytokine Growth Factor Rev.* **15**, 215–228
- Andrae, J., Gallini, R., and Bethsholtz, C. (2008) Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. *Genes Dev.* **22**, 1276–1312
- Siegfried, G., Basak, A., Prichett-Péjic, W., Scamuffa, N., Ma, L., Benjannet, S., Veinot, J. P., Calvo, F., Seidah, N., and Khatib, A. M. (2005) Regulation of the stepwise proteolytic cleavage and secretion of PDGF-B by the proprotein convertases. *Oncogene* **24**, 6925–6935
- LaRochelle, W. J., May-Siroff, M., Robbins, K. C., and Aaronson, S. A. (1991) A novel mechanism regulating growth factor

- association with the cell surface: identification of a PDGF retention domain. *Genes Dev.* **5**, 1191–1199
37. Memari, N., Jiang, W., Diamandis, E. P., and Luo, L. Y. (2007) Enzymatic properties of human kallikrein-related peptidase 12 (KLK12). *Biol. Chem.* **388**, 427–435
38. Abramsson, A., Lindblom, P., and Betsholtz, C. (2003) Endothelial and nonendothelial sources of PDGF-B regulate pericyte recruitment and influence vascular pattern formation in tumors. *J. Clin. Invest.* **112**, 1142–1151
39. Betsholtz, C., Karlsson, L., and Lindahl, P. (2001) Developmental roles of platelet-derived growth factors. *Bioessays* **23**, 494–507
40. Stratman, A. N., Schwindt, A. E., Malotte, K. M., and Davis, G. E. (2010) Endothelial-derived PDGF-BB and HB-EGF coordinately regulate pericyte recruitment during vasculogenic tube assembly and stabilization. *Blood* **116**, 4720–4730
41. Matei, D., Satpathy, M., Cao, L., Lai, Y. C., Nakshatri, H., and Donner, D. B. (2007) The platelet-derived growth factor receptor α is destabilized by geldanamycins in cancer cells. *J. Biol. Chem.* **282**, 445–453
42. Bishop, E. T., Bell, G. T., Bloor, S., Broom, I. J., Hendry, N. F., and Wheatley, D. N. (1999) An in vitro model of angiogenesis: basic features. *Angiogenesis* **3**, 335–344
43. Kodama, M., Kitada, Y., Sumida, T., Ohnishi, M., Ohara, E., Tanaka, M., Shinagawa, K., Tanaka, S., Yasui, W., and Chayama, K. (2010) Expression of platelet-derived growth factor (PDGF)-B and PDGF-receptor β is associated with lymphatic metastasis in human gastric carcinoma. *Cancer Sci.* **101**, 1984–1989
44. Schito, L., Rey, S., Tafani, M., Zhang, H., Wong, C. C., Russo, A., Russo, M. A., and Semenza, G. L. (2012) Hypoxia-inducible factor 1-dependent expression of platelet-derived growth factor B promotes lymphatic metastasis of hypoxic breast cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, E2707–E2716
45. Heldin, C. H., and Westermark, B. (1999) Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. *Physiol. Rev.* **79**, 1283–1316
46. Zhao, E. H., Shen, Z. Y., Liu, H., Jin, X., and Cao, H. (2012) Clinical significance of human kallikrein 12 gene expression in gastric cancer. *World. J. Gastroenterol.* **18**, 6597–6604
47. Semenza, G. L. (1998) Hypoxia-inducible factor 1: master regulator of O_2 homeostasis. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **8**, 588–594
48. Distler, J. H., Hirth, A., Kurowska-Stolarska, M., Gay, R. E., Gay, S., and Distler, O. (2003) Angiogenic and angiostatic factors in the molecular control of angiogenesis. *Q. J. Nucl. Med.* **47**, 149–161
49. Furuya, M., Nishiyama, M., Kasuya, Y., Kimura, S., and Ishikura, H. (2005) Pathophysiology of tumor neovascularization. *Vasc. Health Risk Manag.* **1**, 277–290
50. Hughes, C. C. (2008) Endothelial-stromal interactions in angiogenesis. *Curr. Opin. Hematol.* **15**, 204–209
51. Senger, D. R., and Davis, G. E. (2011) Angiogenesis. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **3**, a005090
52. Etulain, J., Fondevila, C., Negrotto, S., and Schattner, M. (2013) Platelet-mediated angiogenesis is independent of VEGF and fully inhibited by aspirin. *Br. J. Pharmacol.* **170**, 255–265.
53. Soyombo, A. A., and DiCorleto, P. E. (1994) Stable expression of human platelet-derived growth factor B chain by bovine aortic endothelial cells. Matrix association and selective proteolytic cleavage by thrombin. *J. Biol. Chem.* **269**, 17734–17740
54. Talieri, M., Devetzi, M., Scorilas, A., Pappa, E., Tsapralis, N., Missitzis, I., and Ardavanis, A. (2012) Human kallikrein-related peptidase 12 (KLK12) splice variants expression in breast cancer and their clinical impact. *Tumour Biol.* **33**, 1075–1084
55. Yoshida, D., Kim, K., Noha, M., and Teramoto, A. (2006) Hypoxia inducible factor 1- α regulates of platelet derived growth factor-B in human glioblastoma cells. *J. Neurooncol.* **76**, 13–21
56. Horii, K., Suzuki, Y., Kondo, Y., Akimoto, M., Nishimura, T., Yamabe, Y., Sakaue, M., Sano, T., Kitagawa, T., Himeno, S., Imura, N., and Hara, S. (2007) Androgen-dependent gene expression of prostate-specific antigen is enhanced synergistically by hypoxia in human prostate cancer cells. *Mol. Cancer Res.* **5**, 383–391
57. Bertolotti, E., Malagoli, D., and Franchini, A. (2013) Skin wound healing in different aged *Xenopus laevis*. *J. Morphol.* **274**, 956–964.
58. Donovan, D., Brown, N. J., Bishop, E. T., and Lewis, C. E. (2001) Comparison of three in vitro human 'angiogenesis' assays with capillaries formed in vivo. *Angiogenesis* **4**, 113–121
59. Reinke, J. M., and Sorg, H. (2012) Wound repair and regeneration. *Eur. Surg. Res.* **49**, 35–43
60. Khabar, K. S. (2010) Post-transcriptional control during chronic inflammation and cancer: a focus on AU-rich elements. *Cell. Mol. Life Sci.* **67**, 2937–2955
61. Mukhopadhyay, D., and Datta, K. (2004) Multiple regulatory pathways of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor (VPF/VEGF) expression in tumors. *Semin. Cancer Biol.* **14**, 123–130
62. Roskoski, R., Jr. (2007) Vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling in tumor progression. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **62**, 179–213
63. Stein, I., Itin, A., Einat, P., Skalter, R., Grossman, Z., and Keshet, E. (1998) Translation of vascular endothelial growth factor mRNA by internal ribosome entry: implications for translation under hypoxia. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 3112–3119
64. Lindblom, P., Gerhardt, H., Liebner, S., Abramsson, A., Enge, M., Hellstrom, M., Backstrom, G., Fredriksson, S., Landegren, U., Nystrom, H. C., Bergstrom, G., Dejana, E., Ostman, A., Lindahl, P., and Betsholtz, C. (2003) Endothelial PDGF-B retention is required for proper investment of pericytes in the microvessel wall. *Genes Dev.* **17**, 1835–1840
65. McGinnis, L. M., and Kuo, C. J. (2012) PDGF-B exploits stromal EPO. *Nat. Med.* **18**, 22–24
66. Yu, Y., Sweeney, M., Zhang, S., Platoshyn, O., Landsberg, J., Rothman, A., and Yuan, J. X. (2003) PDGF stimulates pulmonary vascular smooth muscle cell proliferation by upregulating TRPC6 expression. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **284**, C316–C330
67. van Hinsbergh, V. W., Engelse, M. A., and Quax, P. H. (2006) Pericellular proteases in angiogenesis and vasculogenesis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **26**, 716–728
68. Emanuelli, C., Salis, M. B., Van Linthout, S., Meloni, M., Desortes, E., Silvestre, J. S., Clergue, M., Figueroa, C. D., Gadau, S., Condorelli, G., and Madeddu, P. (2004) Akt/protein kinase B and endothelial nitric oxide synthase mediate muscular neovascularization induced by tissue kallikrein gene transfer. *Circulation* **110**, 1638–1644
69. Yao, Y., Sheng, Z., Li, Y., Fu, C., Ma, G., Liu, N., Chao, J., and Chao, L. (2013) Tissue kallikrein-modified human endothelial progenitor cell implantation improves cardiac function via enhanced activation of akt and increased angiogenesis. *Lab. Invest.* **93**, 577–591

Received for publication July 15, 2013.
Accepted for publication October 24, 2013.

Thèse de Doctorat

Carole ACHARD

Le virus oncolytique de la rougeole : sensibilité du mésothéliome pleural malin et activation du système immunitaire

Oncolytic measles virus: sensitivity of human pleural mesothelioma and activation of the immune system

Résumé

Au cours de ma thèse, j'ai étudié la virothérapie anti-tumorale basée sur l'utilisation du virus atténué de la rougeole (MV) pour le traitement du mésothéliome pleural malin (MPM). Il est décrit que le MV cible préférentiellement les cellules tumorales surexprimant son récepteur CD46 à leur surface. Suite à l'étude *in vitro* de 22 lignées de MPM, j'ai démontré que la sensibilité à l'infection par le MV ne dépend pas du niveau d'expression de CD46, mais de défauts de la réponse anti-virale interféron (IFN) de type I acquis pendant la tumorigenèse. Les cellules saines, capables de développer une réponse IFN de type I, ne sont pas sensibles. J'ai pu estimer que 70% des patients seraient donc potentiellement sensibles à cette thérapie. D'autre part, notre équipe a montré que le MV induit une mort immunogène des cellules tumorales, capable d'activer les cellules dendritiques (DCs) et leur capacité de présentation croisée d'antigènes de tumeur. J'ai poursuivi la caractérisation de l'effet du MV sur les DCs. J'ai montré que les DCs myéloïdes CD1c⁺ et les DCs plasmacytoïdes (pDCs) du sang expriment la protéine TRAIL à leur surface en réponse au MV, suite à la sécrétion d'IFN- α induite par la détection de l'ARN viral par les senseurs cytoplasmiques RLRs (RIG-I like receptors) dans les deux types de DCs, et par le TLR7 (Toll-like receptor 7) dans les pDCs seulement. Ces DCs exercent alors une activité cytotoxique envers des cellules sensibles à la lyse médiée par TRAIL. Mes résultats permettent de mieux comprendre l'activité oncolytique du MV, dont l'efficacité passe non seulement par l'infection et la lyse des cellules tumorales mais aussi par l'activation du système immunitaire.

Mots clés

virus oncolytique - virus de la rougeole - virothérapie anti-tumorale - interféron de type I - cellules dendritiques myéloïdes CD1c⁺ - cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDCs) – TRAIL – cytotoxicité

Abstract

I worked on an antitumor virotherapy strategy based on the use of an attenuated strain of measles virus (MV) to treat malignant pleural mesothelioma (MPM). It is described that MV preferentially infects tumor cells which overexpress its major receptor CD46 on their surface. By studying *in vitro* 22 human MPM cell lines, I demonstrated that 70% of the MPM cell lines are sensitive to the infection and that the sensitivity to MV depends on defects of their antiviral type I interferon (IFN) response rather than on the overexpression of CD46. Healthy cells are not sensitive to MV since they develop a full type I IFN response. Thus, 70% of patients may be sensitive to this therapeutic approach. It is admitted that MV induces immunogenic death of tumor cells, which is able to activate dendritic cells (DCs) and their capacity to cross-present tumor antigens. I continued to characterize the effects of MV on DCs and I showed that blood myeloid CD1c⁺ DCs and plasmacytoid DCs (pDCs) express TRAIL on their surface in response to MV. This TRAIL expression depends on their IFN- α secretion which is induced by the detection of viral RNA by the cytosolic sensors RLRs (RIG-I like receptors) in both types of DCs, and by TLR7 (Toll-like receptor 7) activation in pDCs only. These DCs are then able to induce the lysis of TRAIL-sensitive cells. Altogether, my results lead to a better understanding of the oncolytic activity of MV, which relies not only on the infection and lysis of tumor cells but also on the activation of the immune system against tumors.

Keywords

oncolytic virus – measles virus – antitumor virotherapy – type I interferon – myeloid CD1c⁺ dendritic cells - plasmacytoid dendritic cells (pDCs) – TRAIL - cytotoxicity